

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 4
апрель
2023



СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

ГАМКергические механизмы устойчивости мозга к гипоксии низших позвоночных животных	399
<i>Е. Э. Колесникова</i>	

Экспериментальные статьи

Электрическая стимуляция спинного мозга как метод регуляции кинематики ходьбы у постинсультных пациентов	424
<i>И. Н. Богачева, Н. А. Щербакова, Т. Р. Мошонкина, А. А. Гришин, Д. В. Скворцов, С. Н. Кауркин, Ю. П. Герасименко</i>	
Изучение молекулярно-генетических механизмов действия агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс	438
<i>Ю. И. Сысоев, М. В. Шустов, В. А. Приходько, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, С. В. Оковитый</i>	
Особенности изменения скоростных показателей мозгового кровотока крыс на разных этапах старения	457
<i>О. П. Горшкова</i>	
Иммуногистохимическое исследование макрофагов седалищного нерва крысы после повреждения и субпериневрального введения мезенхимных стволовых клеток	466
<i>Е. С. Петрова, Е. А. Колос</i>	
Изменение поведенческих характеристик и уровня тирозингидроксилазы в прилежащем ядре мозга крыс DAT-NET в режиме свободной алкоголизации	477
<i>И. В. Антонова, Е. О. Кучер, Е. В. Филатова, А. Е. Веракса, И. Ю. Морина, В. А. Завьялов, А. Ю. Егоров</i>	
Спектральные характеристики кардинальных гласных звуков как показатели слухоречевой обратной связи у пациентов с постлингвальной хронической сенсоневральной тугоухостью II и III степени	489
<i>К. С. Штин, А. М. Луничкин, А. П. Гвоздева, Л. Е. Голованова, И. Г. Андреева</i>	
Поддержание нормальной активности АМПК устраняет аномально ускоренную дифференцировку первичных миобластов, выделенных из атрофированной <i>m. soleus</i> крысы	502
<i>Н. А. Вильчинская, Т. М. Мирзоев, Б. С. Шенкман</i>	
Роль кальциевых каналов L-типа в повышенной утомляемости камбаловидных мышц крыс на фоне функциональной разгрузки	517
<i>К. А. Шарло, И. Д. Львова, С. А. Тыганов, Д. А. Сидоренко, Б. С. Шенкман</i>	
Исследование экспрессии рецепторов к IL-13, генов IL-13R в бронхах крыс с овалбумин-индуцированной бронхиальной астмой	530
<i>Л. Е. Блажевич, О. Е. Смирнова, В. М. Кирилина, П. М. Маслюков</i>	
Влияние длительного эмоционально-болевого стресса на экспрессию генов провоспалительных цитокинов у крыс с высокой и низкой возбудимостью нервной системы	545
<i>И. Г. Шалагинова, О. П. Тучина, А. В. Туркин, А. Э. Вылегжанина, А. Н. Нагуманова, Т. Г. Зачепило, М. Б. Павлова, Н. А. Дюжикова</i>	

CONTENTS

Reviews

- GABAergic Mechanisms of the Brain Tolerance to Hypoxia in Lower Vertebrates
E. E. Kolesnikova 399
-

Experimental Articles

- Electrical Stimulation of the Spinal Cord as a Method of Regulation Walking Kinematics in Post-Stroke Patients
I. N. Bogacheva, N. A. Shcherbakova, T. R. Moshonkina, A. A. Grishin, D. V. Skvortsov, S. N. Kaurkin, and Yu. P. Gerasimenko 424
- Exploring the Molecular and Genetic Mechanisms of Action of the $\alpha 2$ -Adrenergic Agonist Mafedine in Experimental Traumatic Brain Injury in Rats
Yu. I. Sysoev, M. V. Shustov, V. A. Prikhodko, D. D. Shite, M. M. Puchik, and S. V. Okovityi 438
- Features of Changes in the Velocity Indicators of Cerebral Blood Flow in Rats at Different Stages of Aging
O. P. Gorshkova 457
- Immunohistochemical Study of Macrophages of Sciatic Rat Nerve after Damage and Subperineural Injection of Mesenchymal Stem Cells
E. S. Petrova and E. A. Kolos 466
- Changes in Behavioral Characteristics and Tyrosine Hydroxylase Levels in the Nucleus Accumbens of the Brain of DAT-HET Rats during Free Alcoholization
I. V. Antonova, E. O. Kucher, E. V. Filatova, A. E. Veraksa, I. Yu. Morina, V. A. Zavyalov, and A. Yu. Egorov 477
- Spectral Characteristics of Cardinal Vowels as Indicators of the Auditory Speech Feedback Control in Patients with Moderate and Moderately Severe Chronic Postlingual Sensorineural Hearing Loss
K. S. Shtin, A. M. Lunichkin, A. P. Gvozdeva, L. E. Golovanova, and I. G. Andreeva 489
- The Maintenance of AMPK Activity Eliminates Abnormally Accelerated Differentiation of Primary Myoblasts Isolated from Atrophied Rat Soleus Muscle
N. A. Vilchinskaya, T. M. Mirzoev, and B. S. Shenkman 502
- Role of L-Type Calcium Channels in the Increased Fatigue of Rat Soleus Muscle under Functional Unloading
K. A. Sharlo, I. D. Lyova, S. A. Tyganov, D. A. Sidorenko, and B. S. Shenkman 517
- Research of the Expression of IL-13 Receptors and IL-13R Genes in the Bronch of Rats with Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma
L. E. Blazhevich, O. E. Smirnova, V. M. Kirilina, and P. M. Maslyukov 530
- The Effect of Prolonged Emotional and Painful Stress on the Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in Rats with High and Low Excitability of the Nervous System
I. G. Shalaginova, O. P. Tuchina, A. V. Turkin, A. E. Vylegzhanina, A. N. Nagumanova, T. G. Zachepilo, M. B. Pavlova, and N. A. Dyuzhikova 545
-
-

**ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ
СТАТЬИ**

*To convey hypoxia tolerance and prevent hypoxic damage,
it will be important to mimic a natural hypometabolic systems-level state.
Habitually hypoxia-exposed animals ... know exactly how to attain ... hypometabolic state, and our task should be to follow their lead.
[Ramirez et al., 2007].*

**ГАМКЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ МОЗГА К ГИПОКСИИ
НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**

© 2023 г. Е. Э. Колесникова*

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

**E-mail: dr-kolesnikova@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

Гипоксические/ишемические поражения головного мозга представляют серьезную медицинскую проблему. Одним из подходов к разработке терапевтических вмешательств является установление путей выживания нейронов устойчивых к дефициту O_2 позвоночных, которые могут подсказать способы смягчения гипоксической катастрофы для отдельных клеток при кислородном голодании. Метаболическая депрессия считается универсальной стратегией выживания толерантных к гипоксии животных, однако до настоящего времени детали механизма ограничения метаболизма мозга при снижении PO_2 не установлены. При кислородном голодании повышение внеклеточной концентрации тормозных нейромедиаторов может быть одним из значимых звеньев аппарата подавления электрической активности, что позволяет снижать потребление энергии. ГАМК (γ -амино-масляная кислота) служит универсальным тормозным нейромедиатором ЦНС высших и низших позвоночных животных, функционирование которого связывают с подавлением метаболизма и нивелированием последствий энергетического сбоя. В обзоре рассматриваются стратегии вовлечения ГАМК в механизмы обеспечения устойчивости мозга к кислородному голоданию у представителей разных таксономических групп низших позвоночных животных (круглоротых, хрящевых и костистых рыб, земноводных, рептилий), которые отличаются наиболее выраженной способностью выживать при острой и хронической гипоксии/аноксии.

Ключевые слова: ГАМК, мозг, гипоксия, метаболическая депрессия, низшие позвоночные

DOI: 10.31857/S0869813923040064, **EDN:** VJEVAV

ВВЕДЕНИЕ

Термин “гипоксия” (кислородное голодание; крайняя степень проявления гипоксии – аноксия) означает недостаточное снабжение тканей O_2 или нарушение его утилизации при биологическом окислении. Гипоксические состояния голов-

ного мозга наблюдаются при многих неврологических расстройствах (транзиторные ишемические атаки, инсульт, черепно-мозговая травма, кровотечение, перинатальная энцефалопатия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др.) [1, 2]. Несмотря на многолетние исследования, лечение и профилактика гипоксических/ишемических поражений головного мозга остаются серьезной медицинской проблемой. Как известно, одним из способов установления мишеней для разработки терапевтических вмешательств может служить изучение механизмов повреждения и гибели нейронов [1, 3]. Альтернативным подходом к проведению поисковых исследований является установление стратегии выживания толерантных к гипоксии нейронов [3]. Миллионы лет эволюции породили устойчивых к дефициту O_2 позвоночных [4]. Детализация механизмов переносимости гипоксии успешно выживающих при O_2 -голодании видов может не только обеспечить фундаментальные представления об экофизиологии экстремальных условий обитания, но и определить пути смягчения гипоксической катастрофы для отдельных нейронов в лишенном O_2 мозге [5].

УСТОЙЧИВОСТЬ МОЗГА К O_2 -ГОЛОДАНИЮ

Универсальным правилом энергетического обмена при нормоксии и гипоксии является уравнивание спроса и предложения АТФ [4, 6]. Другое универсальное требование заключается в интеграции метаболизма и функций мембран клеток [6]. Вероятно, основной причиной ограниченной толерантности мозга к гипоксии/аноксии является высокая потребность нейронов в энергии в сочетании с неспособностью снизить ее потребление при ограниченной выработке. При снижении уровня O_2 и последующем прекращении окислительного фосфорилирования мозг вынужден прибегать к менее эффективному анаэробному производству энергии (гликолизу) как к единственному источнику продукции АТФ. Как правило, гликолитические механизмы устойчивых позвоночных поддерживаются запасами гликогена в мозге, которые во много раз превышают аналогичные запасы не переносящих аноксию животных [7, 8]. В свою очередь, при длительной гипоксии/аноксии в неустойчивом к O_2 -голоданию мозге активность ключевых гликолитических ферментов подавляется [9].

У «обычных», неустойчивых позвоночных уровень АТФ в мозге резко падает в течение нескольких минут O_2 -голодания [4]. Вследствие снижения количества АТФ, работа Na^+/K^+ -АТФ-аз замедляется или останавливается, приводя к массивному оттоку из клетки ионов K^+ . Вскоре количество внеклеточного K^+ достигает достаточно высокой концентрации, обеспечивающей деполяризацию мембран нервных клеток. При деполяризации в нейроны начинают проникать ионы Na^+ и Ca^{2+} ; такое проникновение ионов стимулируется сопутствующим высвобождением возбуждающих нейротрансмиттеров, глутамата и аспартата, которые опосредуют повреждение и гибель нервных клеток [10]. Основным путем проникновения Ca^{2+} в клетки являются активируемые глутаматом NMDA-рецепторы. Результирующий вход Ca^{2+} приводит к активации гидролиза фосфолипидов (включая структурные повреждения пре- и постсинаптических мембран и нарушение рецепторной сигнализации), образованию свободных радикалов [10]. Длящиеся более нескольких минут упомянутые выше события приводят к необратимым последствиям, которые заканчиваются гибелью большинства позвоночных после достаточно короткого периода O_2 -голодания.

Основным отличием устойчивых от чувствительных к гипоксии/аноксии видов является способность их мозга в ответ на снижение уровня O_2 предотвращать истощение АТФ, нивелировать последствия энергетического сбоя, сохранять ионные градиенты [11] и поддерживать гомеостаз [12]. Предполагают, что сама гипоксия создает такую систему, в которой падение уровня O_2 автоматически вызывает повышение уровня тормозных нейротрансмиттеров/медиаторов, снижающих возбуждение и обеспечивающих метаболическую депрессию [13]. Вероятно, в условиях O_2 -голодания подавление энергетического обмена путем изменения внутриклеточных метаболических путей (метаболическая депрессия, “*metabolic arrest*”, гипометаболическое состояние) и электрических свойств мембраны (через ряд перекрывающихся механизмов: “*channel arrest*,” “*spike arrest*,” и “*synaptic arrest*”) представляют собой принципиальную схему защиты мозга [14–16].

По-видимому, метаболическая депрессия является практически универсальной стратегией выживания толерантных животных/видов [15]. Детали механизма ограничения метаболизма устойчивых животных долгое время остаются ускользающими от четкой идентификации. Поскольку именно нейромедиаторы играют центральную роль в синаптической коммуникации, контролируют деятельность мозга и координируют его адаптивные реакции, предполагают, что повышение внеклеточного содержания тормозных аминокислот может быть одним из тех самых неуловимых звеньев аппарата подавления электрической активности и потребления энергии в лишенном O_2 мозге [17]. При экспозиции к гипоксии/аноксии устойчивые виды животных демонстрируют достаточно сходные изменения медиаторного аминокислотного пула в виде повышения уровня ГАМК (γ -аминомасляная кислота) и глицина на фоне снижения уровня возбудительного медиатора глутамата и его предшественника глутамина [18]. Кроме того, у отдельных видов также повышается концентрация ингибирующей синаптическую передачу таурина [18]. Напротив, у видов с низкой переносимостью O_2 -голодания ГАМК является единственной тормозной аминокислотой, количество которой нарастает, в то время как концентрации глутамата и глутамина остаются неизменными или даже увеличиваются [18]. Очевидно, повышенный уровень тормозных аминокислотных медиаторов — ГАМК, глицина и таурина в сочетании со сниженной концентрацией возбуждающей аминокислоты глутамата способствует ограничению электрической активности и потребления энергии как ключевой стратегии выживания в условиях O_2 -голодания мозга. Кроме того, считается, что продукция ГАМК при аноксии защищает нервные клетки от гибели в результате эксцитотоксического повреждения [19]. Существует высокая вероятность того, что при гипоксии в мозге неустойчивых видов другие тормозные медиаторные механизмы не функционируют, что заставляет обратить более пристальное внимание именно на ГАМКергическую систему.

Очевидно, что опосредуемая ГАМК метаболическая депрессия доступна всем позвоночным [13]. Однако, поскольку большинство позвоночных достаточно быстро умирают при гипоксии/аноксии, по-видимому, они не успевают извлечь выгоду из обеспечиваемой ГАМК гипометаболического состояния и/или относительного падения уровня глутамата [13]. Хотя большая часть современных позвоночных не может компенсировать энергетический сбой путем активации анаэробного гликолиза, вместе с тем многие виды обладают такими метаболическими характеристиками, которые позволяют им справляться с более умеренной гипоксией. Так или иначе, в ситуации O_2 -голодания шансы на выживание отдельного организма существенно возрастают при условии экономии топлива (гликогена) за счет перехода к метаболической депрессии [13].

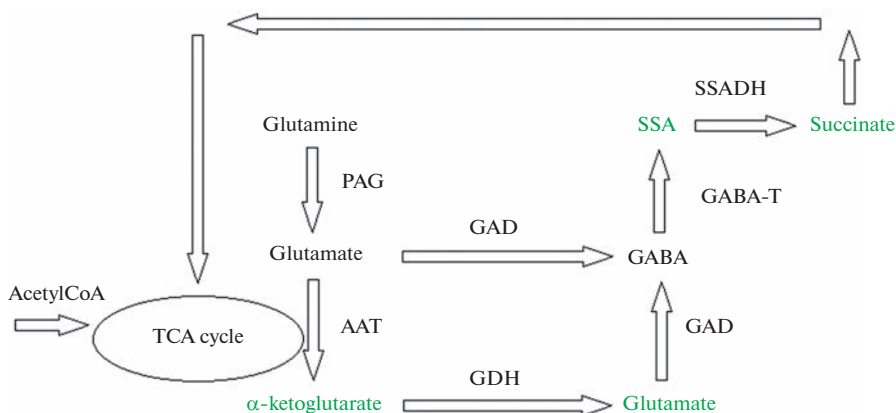


Рис. 1. Пути синтеза ГАМК.

Glutamine – глутамин, glutamate – глутамат, TCA cycle – цикл трикарбоновых кислот, acetylCoA – ацетилкофермент А, α-ketoglutarate – α-кетоглутарат, GABA – ГАМК, SSA – янтарный полуальдегид, succinate – сукцинат, ААТ – аспаратаминотрансфераза, GABA-T – ГАМК-трансаминаза, GAD – глутаматдекарбоксилаза, GDH – глутаматдегидрогеназа, PAG – фосфатактивируемая глутаминаза, SSADH – дегидрогеназа янтарного полуальдегида. Шунт ГАМК (обозначен зеленым цветом) состоит из трех ферментативных реакций, катализируемых GAD, GABA-T и SSADH.

БИОХИМИЯ И РЕЦЕПТОРЫ ГАМК

ГАМК является одним из наиболее важных медиаторов/трансмисмиттеров ЦНС позвоночных животных, функционирующая в зрелом мозге в качестве тормозного агента за счет изменения проницаемости клеточной мембраны к ионам Cl^- . В развивающемся мозге ГАМК обеспечивает процесс возбуждения и оказывает нейротрофическое действие [20]. Известно, что около 20–40% всех нейронов ЦНС позвоночных являются ГАМКергическими [13].

Синтез ГАМК (рис. 1) включает метаболические пути митохондриального цикла трикарбоновых кислот (ТКА) [21]. Гидролиз глутамин под действием фосфатактивируемой глутамины приводит к образованию глутамата (глутаминовой кислоты) в митохондриальном матриксе. Синтез ГАМК осуществляется цитозольным ферментом декарбоксилазой глутаминовой кислоты (GAD) из глутамата путем ее декарбоксилирования. ГАМК образуется либо непосредственно из глутамата либо из глутамата, произведенного из α-кетоглутарата, который синтезируется в цикле ТКА из дезаминированного глутамата с участием глутаматдегидрогеназы (GDH).

ГАМКергическая система мозга включает в себя достаточно обширный аппарат в виде ионотропных ГАМК(A)- и метаботропных ГАМК(B)-рецепторов, транспортеров, упоминавшихся выше ферментов синтеза – глутаматдекарбоксилаза (gads – цитоплазматическая GAD67 и GAD65, локализованная преимущественно в пресинаптических терминалях), 4-аминобутиратаминотрансферазы (abat) и ассоциированных белков [22]. ГАМК(A)-рецепторы состоят из пентамерного агрегата отдельных субъединиц, образующих центральный ионный канал, который проницаем для хлоридных и, в меньшей степени, бикарбонатных анионов [20]. В физиологических условиях активация постсинаптических ГАМК(A)-рецепторов вызывает гиперполяризацию мембраны и уменьшает величину потенциала действия. ГАМК также действует на ГАМК(B)-рецепторы, локализованные на пре- и постсинаптических

мембранах. Активация пресинаптических ГАМК(В)-рецепторов снижает высвобождение нейротрансмиттера за счет ингибирования потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов N- или P/Q-типа. В свою очередь, активация постсинаптических ГАМК(В)-рецепторов вызывает активацию K^{+} -каналов внутреннего выпрямления (GIRK или Kir3), которые играют важную роль на поздней фазе генерации тормозного постсинаптического потенциала.

ГАМКергическая передача сигналов является одним из основных путей, которые способствуют выживанию нейронов при гипоксии/аноксии за счет подавления клеточной возбудимости [16]. Кроме того, предполагается, что именно фактор гипоксии осуществляет эволюционный отбор и консервацию двух основных медиаторных систем мозга — тормозной ГАМКергической и возбуждающей глутаматергической [13]; частным проявлением баланса двух медиаторных систем служат реципрокные отношения ГАМК и глутамата при гипоксии [18, 23].

ГАМК может служить не только агентом, функции которого сводятся к обеспечению метаболической депрессии [24]. В частности, длительное, многомесячное выживание эмбрионов киллифиш *Austrofundulus limnaeus* в условиях аноксии связывают с накоплением миллимолярных количеств ГАМК [25]. Такое количество медиатора является избыточным, превышающим нейропротекторную концентрацию. Накопление ГАМК (в 1000 раз больше, чем у других устойчивых к аноксии видов) предполагает множественные или совершенно новые, выходящие за рамки нейротрансмиссии функции. Предполагают, что при аноксии и аэробном восстановлении (реоксигенации) ГАМК может выступать одновременно в качестве медиатора и антиоксиданта [19]. Кроме того, ГАМК может использоваться в качестве энергетического субстрата [19] в так называемом шунте ГАМК при превращении ее в янтарный полуальдегид (SSA) ГАМК-трансаминазой (GABA-T) (рис. 1). Далее SSA преобразуется SSA-дегидрогеназой (SSADH) в сукцинат, компонент цикла TCA, и NADH, которые являются донорами электронов митохондриальной цепи с конечным продуктом в виде АТФ.

Кроме нейронов, синтез ГАМК осуществляется клетками глии [26]. В частности, предполагается, что ГАМК может синтезироваться астроцитами GAD-независимым путем, который требует наличия путресцина в качестве исходного субстрата. Кроме ГАМК астроциты синтезируют и высвобождают другие медиаторы (так называемые глиотрансмиттеры) и таким образом способны модулировать возбудимость и синаптическую передачу нервных клеток [26]. Глиальная ГАМК играет особую роль в развивающемся мозге. Астроциты взрослого мозга служат источником тормозного медиатора, взаимодействующего с тоническими ГАМК-рецепторами нейронов и обеспечивающего нейронально-глиальные взаимодействия. Например, в мозжечке глиальные клетки могут высвобождать ГАМК во внеклеточное пространство и тонически активировать высокоаффинные ГАМК(A)-рецепторы нейронов посредством объемной передачи, поддерживая стойкий тормозной тонус в этой области мозга [27, 28]. Предполагают, что высвобождение ГАМК из клеток глии может быть также напрямую связано с рядом патологических состояний мозга [29].

ПОЧЕМУ НИЗШИЕ ПОЗВОНОЧНЫЕ ЛУЧШЕ ПРИСПОСОБЛЕНЫ К ГИПОКСИИ/АНОКСИИ?

По сравнению с высшими позвоночными, низшие позвоночные оказались более устойчивы к варьирующей средовой доступности O_2 , выживая при полной аноксии в течение длительного времени [30]. В процессе эволюции именно низ-

шие позвоночные реализовали основную триаду – способность к метаболической депрессии, толерантность к повышенным концентрациям побочных продуктов метаболизма, способность избегать и/или восстанавливать клеточные повреждения после реоксигенации, что позволяет им переносить аноксию намного лучше, чем птицам и млекопитающим [30]. Такие животные существенно расширили свои возможности для борьбы с острой и хронической гипоксией/аноксией через целый комплекс приспособлений, которые практически отсутствуют у других позвоночных [31]. Причем, следует отметить, что репертуар путей адаптации низших позвоночных к варьирующему уровню O_2 оказался весьма разнообразным [31] и вызывает особый научный интерес, поскольку скорость метаболизма мозга низших позвоночных сопоставима с таковой у млекопитающих при схожей температуре.

ГАМКергические механизмы устойчивости мозга к гипоксии/аноксии

I. Класс Круглоротые (Cyclostomata): подкласс Миксины (Muxini), подкласс Миноги (Petromyzontiformes). Представители круглоротых, миксины и миноги являются одними из самых древних позвоночных, которые приобрели современный внешний вид около 500 миллионов лет назад [32]. Круглоротые представляют наиболее примитивную группу современных позвоночных, которые лишены челюстей и парных конечностей. Наряду с этим им свойственен ряд весьма своеобразных черт, в известной мере связанных со специализацией, обусловленной полупаразитическим или настоящим паразитическим образом жизни. По внешнему виду и отчасти по биологии круглоротые близки к рыбам, но ряд черт их организации указывает на определенную обособленность и принадлежность к особой ветви позвоночных.

Миксины обитают в соседствующих с донными отложениями обедненных O_2 слоях воды, остаются активными даже при PO_2 ниже 3 кПа [33], способны переживать 36-часовое воздействие полной аноксии при $10^\circ C$ [34], могут прекращать вентиляцию на несколько часов при зарывании в грунт [35], что заставляет считать их одними из самых устойчивых позвоночных. Минога *Entosphenus tridentatus* способна поддерживать постоянный уровень потребления O_2 (VO_2) при падении его напряжения (PwO_2), скорость VO_2 оставалась неизменной даже при снижении PwO_2 до 10 мм рт. ст. как при $15^\circ C$, так и $5^\circ C$ [36]. Отмечаемый при аноксии уровень потребления O_2 позволяет предположить, что миксины активно используют практически двукратное подавление скорости метаболизма для повышения своей выживаемости [34]. Косвенным указанием на степень приспособления миксин и миног к выживанию в условиях гипоксии/аноксии служат резервы гликогена не только в мозге, но и мышцах [33, 37, 38], которые также могут быть частично задействованы в период преднерестового голодания. В настоящее время в литературе не представлены неоспоримые данные об привлечении ГАМК либо других медиаторных систем к обеспечению устойчивости мозга этих животных в условиях O_2 -голодания, однако можно привести некоторые данные, касающиеся обустройства ГАМКергической системы бесчелюстных.

Мозг миног обнаруживает большое сходство с мозгом Gnathostomata. Такого рода высокая степень консервации архитектуры мозга не очевидна при первом взгляде, поскольку сама морфология мозга миноги сильно отличается от известной морфологии мозга челюстноротых [39]. Показано, что ГАМКергическая система взрослых миног представлена множеством ГАМК-иммунореактивных клеток [40]. Сравнение мозга двух видов – морской *Petromyzon marinus* и речной *Lampetra fluviatilis* миног – демонстрирует общность распределения и локализации ГАМКерги-

ческих нейронов в переднем мозге и стволе головного мозга взрослых животных [41]. Поскольку отряд миног ответвился от общего эволюционного древа позвоночных около 450–500 млн лет назад, отмечаемое сходство в распределении ГАМК в мозге круглоротых и представителей других классов позвоночных, включая млекопитающих, означает, что в процессе эволюции был выработан кардинальный план ГАМКергической архитектуры различных отделов мозга, начиная с самых примитивных позвоночных. Кроме того, мозг миног характеризуется совместной локализацией ГАМК с другими тормозными медиаторами, в частности, серотонином serotonin, в пределах одних и тех же нейронов [42]. Серотонин-ГАМКергические нейроны имеют более широкое представительство в мозге миног по сравнению с мозгом млекопитающих, которое могло появиться у примитивных позвоночных еще до разделения общего эволюционного пути бесчелюстных и челюстноротых. Кроме того, дополнительная совместная локализации ГАМК и дофамина в отдельных дофаминергических ядрах мозга (присутствие ГАМК не менее, чем в 25% DA-иммунореактивных нейронов) свидетельствует о возможном одновременном высвобождении ГАМК и дофамина [43]. Очевидно, что совпадающее во времени и локусе высвобождение ГАМК с другими тормозными медиаторами может повышать мощность и эффективность механизма, обеспечивающего метаболическую депрессию при аноксии.

Для тканей мозга всех позвоночных – от бесчелюстных до млекопитающих – характерно выраженное связывание радиолиганда [³H]ГАМК и конкурентного антагониста бикикулина с ГАМК-рецепторами [44]. Вместе с тем ткани мозга миксин связывают в два раза больше [³H]ГАМК, чем ткани следующего по “эволюционному старшинству” вида – колючей акулы *Squalus acanthias* [44]. Мозг представителей других классов позвоночных связывал примерно одинаковое количество [³H]ГАМК, которое составляло всего от одной трети до одной четверти регистрируемого у миксин. Хотя количество ГАМК-рецепторов миксин составляют всего 1/10 от общего числа рецепторов на единицу ткани мозга других позвоночных, однако упомянутые рецепторы обладают примерно в 20 раз большим сродством к ГАМК. После обработки тканей мозга тритоном X-100 (позволяет удалять эндогенные модуляторы аффинности рецепторов) у миксин наблюдалось наименьшее количество ассоциировавшейся с рецепторами [³H]ГАМК (докинг); вместе с тем у представителей других таксонов позвоночных степень связывания [³H]ГАМК под действием тритона X-100 увеличивалась с повышением таксона. По-видимому, в процессе эволюции бесчелюстных в молекуле рецептора возник чувствительный к тритону X-100 сайт, который способен существенно изменить кинетические свойства ГАМК-рецепторов миксины в сторону повышения их сродства к лиганду.

Таким образом, можно предположить, что обладающий классической ГАМКергической системой мозг устойчивых к аноксии бесчелюстных заручается своеобразной дополнительной поддержкой других тормозных медиаторов на фоне экстремально высокой аффинности ГАМК-рецепторов к лиганду.

II. Класс Хрящевые рыбы (Chondrichthyes), надотряд Акулы (Selachii). Самые древние представители акул появились примерно 450–420 млн лет назад. В настоящее время известно более 450 видов акул, которые населяют практически все моря и океаны на глубинах до 2000 м; причем отдельные виды способны жить в пресной воде. Особенностью акул считается отсутствие жаберных крышек, которые у рыб позволяют прогонять воду сквозь жабры. Для обеспечения вентиляции жабр (дыхания) акулы вынуждены находиться в постоянном движении, захватывая и прокачивая через приоткрытую пасть воду, затем удаляя ее через жаберные щели.

Эполетная акула (глазчатая эполетная (эполетовая) акула, глазчатая кошачья акула, *Hemiscyllium ocellatum*) обитает в водах прибрежного мелководья тропических рифов на глубинах до 50 м, передвигаясь преимущественно с использованием грудных плавников, которые позволяют ей буквально “ползать” по дну на малой глубине. В период отлива эполетная акула зачастую оказывается отрезана от океана. При ночных отливах за счет дыхания кораллов и связанных с ними организмов [O₂] может критически снижаться, создавая условия тяжелой severe гипоксии (5% O₂, что соответствует ~0.34 мг O₂/л) или даже even аноксии при температуре 25–30°C [45–48]. Очевидно, что эполетная акула постоянно находится в режиме естественного гипоксического прекондиционирования (метаболической адаптации). Гипоксическое прекондиционирование акулы предопределяет/обеспечивает снижение скорости ее метаболизма и критических значений PO₂ [46]. На фоне O₂-голодания акулы способны отключать некоторые функции мозга без признаков его повреждения, включая возможность отсрочки запуска апоптоза [47, 49]. В отличие от млекопитающих, черепах и костистых рыб гипоксия не вызывает увеличения мозгового кровотока эполетной акулы. Напротив, в условиях O₂-голодания системное артериальное давление акулы снижается приблизительно на 50% на фоне сопутствующих церебральной вазодилатации и брадикардии [50]. Экспозиция эполетной акулы к более жесткой гипоксии (0.39 мг O₂/л) в течение 3.5 ч не изменяет основные показатели неврологических функций [45]. Реакция восстановления (рефлекс восстановления), позволяющая скорректировать ориентацию тела акулы при утрате нормального положения (равновесие в ответ на гипоксию), временно нарушалась только после 4 ч гипоксии; при реоксигенации рефлекс удавалось восстановить в течение 30 мин. Вместе с тем приблизительно после 40 мин аноксии (полного отсутствия O₂) эполетные акулы полностью переставали реагировать на раздражители и утрачивали восстановительный рефлекс, одновременно успешно сохраняя уровень АТФ в тканях мозга [49]. Отмечается, что для данного вида акул характерна выраженная градуированная реакция на гипоксию, которая предполагает существенное повышение уровня анаэробного метаболизма [45]. Одновременно снижение PO₂ сопровождается 3.5-кратным увеличением уровня аденозина в мозге акулы [49]. Обычно у устойчивых к гипоксии/аноксии видов высокий уровень аденозина выступает триггером отключения энергозатратных клеточных процессов [51], регулирует скорость гликолиза, стимулирует мозговой кровоток и инициирует запуск механизма метаболической депрессии [12, 52, 53]. Было показано, что при нормоксии перфузат с аденозином увеличивает скорость кровотока в мозге акулы, однако при гипоксической артериальной гипотензии антагонист аденозиновых рецепторов аминофиллин не смог оказать заметного влияния на поддержку мозгового кровообращения [50]. По-видимому, в отличие от большинства других позвоночных животных, аденозин не играет заметной роли в механизмах гипоксической церебральной вазодилатации эполетной акулы.

При гипоксии/аноксии общий уровень ГАМК в мозге акулы остается практически неизменным [54, 55]; вместе с тем в региональном распределении ГАМК происходят значительные сдвиги. Было показано, что [ГАМК] заметно повышалась в двигательных ядрах и в отдельных сенсорных ядрах (двигательное ядро X черепно-мозгового нерва, гребень мозжечка, нижнее ядро оливы, нижнее ретикулярное ядро, медиальный продольный пучок), одновременно оставаясь практически на постоянном уровне в обеспечивающих реакцию настороженности сенсорных ядрах [1, 12]. Локализация ГАМК в тканях точно соответствовала сниженной активности

цитохромоксидазы, что связывают с падением интенсивности метаболизма нейронов [12, 48].

Гипоксическое прекондиционирование эполетной акулы не только способствует значительному увеличению [ГАМК], но и плотности распределения ГАМК-рецепторов в отдельных структурах мозга [12], в частности, в мозжечке [54, 55]. По-видимому, такое сочетание увеличения количества и аффинности ГАМК-рецепторов должно снижать вероятность возникновения фиксации потенциала либо гиперполяризации мембраны нейронов, что обеспечивает значительную экономию энергии [12], а также реализует защитную функцию при реоксигенации на фоне меньшего высвобождения ГАМК [55]. Кроме того, оказалось, что акулы являются единственными позвоночными животными, ГАМК(А)-рецепторы которых обладают специфической субъединицей с бензодиазепин-связывающим участком менее 53 кДа [56]. Очевидно, ГАМК(А)-рецепторы пластинчатожаберных структурно отличаются от ГАМК(А)-рецепторов других позвоночных, включая утративших такую субъединицу костистых рыб. Кроме того, плотность распределения ГАМК-рецепторов на мембране нервных клеток мозжечка эполетной акулы примерно в 3 раза выше, чем у акулы – морской собаки (обыкновенная кошачья акула, мелкопятнистая кошачья акула, *Scyliorhinus canicula*) [55], для которой критическая $[O_2]$ составляет приблизительно 4.5 мг/л. Вероятно, именно такая высокая плотность аппарата ГАМК-рецепторов мозжечка эполетной акулы определяет упоминавшуюся выше утрату равновесия тела при аноксии на фоне высвобождения медиатора.

При гипоксии/аноксии изменение баланса между ГАМК- и глутаматергическими системами может служить обеспечению метаболической депрессии в отдельных областях мозга эполетной акулы [1]. В то же время предполагается, что сохраняющийся абсолютный уровень глутамата необходим для восстановления активности нейронов при реоксигенации [1, 12].

Таким образом, можно заключить, что, в то время как все известные на сегодняшний день устойчивые к гипоксии и аноксии виды позвоночных реагируют на низкий уровень O_2 повышением уровня ГАМК в мозге, филогенетически “старая” эполетная акула использует альтернативный, “адресный” тормозный механизм для сохранения энергии в ядрах мозга [55]. Нейропротекторные механизмы акул в виде изменения регионального распределения ГАМК способствует защите от повреждения жизненно важных областей мозга при O_2 -голодании и последующей реоксигенации [12].

III. Класс Костные рыбы (Osteichthyes), инфракласс Костистые рыбы (Teleostei).

Обитатели соленых и пресных водоемов, костные рыбы, произошли от хрящевых рыб и составляют самый многочисленный по видам класс позвоночных животных (почти 30000 видов). Костных рыб разделяют на костно-хрящевых, двоякодышащих, кистеперых и костистых; к последним относится большинство современных рыб. Костистые рыбы составляют эволюционную группу, появившуюся около 435 млн лет назад.

Мозг костистых рыб имеет сходную с мозгом млекопитающих удельную скорость метаболизма [57], а отдельные виды рыб обладают такой же высокой степенью чувствительности к аноксии, которая характерна для высших позвоночных. Так, подобно мозгу млекопитающих, под воздействием аноксии мозг форели (*Oncorhynchus mykiss*) достаточно быстро утрачивает ионный гомеостаз и массово высвобождает обладающий эксцитотоксическим эффектом глутамат [58]. Вместе с тем в отличие от крайне чувствительных к O_2 -голоданию видов Teleostei существуют ряд представителей этого таксона, демонстрирующих рекордную переносимость гипоксии/аноксии (карась *Carassius carassius*, золотая рыбка *Carassius auratus*, горчак

Rhodeus sericeus) [59–62]. Один из уникальных приспособительных механизмов таких устойчивых видов позволяет им при недостатке O_2 избавляться от продуктов анаэробного гликолиза, что связано с экзотической способностью мышечной ткани превращать конечный продукт анаэробного распада глюкозы лактат в этанол [59–61]. В условиях аноксии все ткани рыб, включая мозг, производят лактат, который транспортируется с кровью к мышцам. Из мышц образовавшийся из лактата этанол высвобождается обратно в кровь, транспортируется к жабрам, которые экскретируют его из организма рыб. В условиях аноксии общее содержание этанола в крови устойчивых видов не поднимается выше стабильного уровня ~ 10 мМ, что позволяет избежать подавления активности нервных клеток [63]. Такое устройство метаболизма обеспечивает выживание при длительной аноксии без накопления лактата и последующего ацидоза.

Костистые рыбы имеют хорошо развитую ГАМКергическую систему мозга. Экспрессия ГАМК одновременно с катехоламинами и серотонином отмечается уже в первичных популяциях клеток нейромеров мозга эмбрионов [64]. В ЦНС эмбрионов *Danio rerio* ГАМК присутствует в ядрах конечного мозга, вентральной части промежуточного и среднем мозге [65]. По мере развития эмбриона количество ГАМК-иммунореактивных нейронов постепенно нарастает [66], что указывает на определенную роль ГАМК в качестве нейротрофического фактора, предполагает ее участие в синаптогенезе и дифференцировке нейронов на ранних стадиях развития рыб [67, 68]. В головном мозге взрослых особей *D. rerio* ГАМК-иммунореактивные клетки (GABA-IR) присутствуют в обонятельной луковице, конечном мозге, тектуме и гипоталамусе [65]. Спектр распределения мРНК субъединиц ГАМК(A)-рецепторов по отдельным компартментам придает сходство мозгу *D. rerio* с мозгом млекопитающих [22]. Кроме того, у *D. rerio* были идентифицированы три изоформы глутаматдекарбоксилаз (GAD), две из которых – *gad1a* и *gad1b* – напоминают GAD67 ГАМКергических нейронов млекопитающих, третья – *gad2* – гомологична GAD65, локализованной в нервных терминалях высших позвоночных [22]. В мозге *Carassius auratus* ГАМК распределяется по компартментам мозга сходным образом и наиболее плотно скапливается по его средней линии [69]. Широкое представительство ГАМКергических нейронов в разных ядрах мозга Teleostei указывает на значимость ГАМК как одного из основных трансммиттеров и предполагает подобие организации медиаторных систем костистых рыб и высших позвоночных животных.

Аноксия способна одновременно воздействовать на разные медиаторные системы (включая ГАМКергическую систему) мозга рыб, отличающихся метаболической стратегией выживания [10]. Золотая рыбка объединяет преобразование лактата в этанол с метаболической депрессией (гипометаболизм), тилапия *Oreochromis mossambicus* сочетает анаэробный гликолиз с гипометаболизмом, а карп *Cyprinus carpio* использует интенсивный анаэробный гликолиз для производства энергии. Для золотой рыбки был определен 8-часовой период экспозиции. Длительность нахождения в условиях аноксии для тилапии и карпа была выбрана до момента утраты равновесия и проявления реакции избегания (2 ч для тилапии, 30 мин – для карпа). Примечательно, что паттерн содержания аминокислот в мозге рыб наиболее существенно изменялся именно у толерантных к аноксии золотых рыбок [10]: уровень глутамата, глутамин снижался, а концентрация глицина, аланина, ГАМК (на 48.8%), серина повышалась. Тилапия характеризовалась промежуточным типом реакции, при которой достоверно возрастало содержание глицина, аланина, ГАМК (на 27%), серина [10]. В мозге неустойчивого к аноксии карпа изменения концентрации аминокислот были минимальны за исключением понижения уров-

ня глутамина glutamine. Очевидно, независимо от избираемой метаболической стратегии выживания устойчивость мозга к гипоксии/аноксии поддерживается в первую очередь ГАМКергической системой.

O₂-голодание на протяжении 5 ч крайне устойчивого карася *Carassius carassius* приводило к удвоению количества высвобождаемой ГАМК в конечном мозге [70]. При более длительной аноксии (в течение примерно двух недель) [ГАМК] продолжала нарастать и увеличивалась приблизительно в 5 раз [71, 72]. Было установлено, что изменение [ГАМК] подвержено значительной индивидуальной вариабельности, что может указывать на участие этого медиатора в механизмах очень тонкой настройки подавления электрической активности ЦНС при аноксии [70]. Кроме того, потенциальные возможности объемов высвобождения ГАМК значительно превышали таковые для глутамата. Деполяризация тканей мозга путем перфузии раствором Рингера с высокой [K⁺] сопровождалась увеличением внеклеточного уровня ГАМК в 14 раз, в то время как количество глутамата в заданных условиях едва удваивалось [70]. Соотношение количества глутамата и ГАМК свидетельствует о способности мозга карася избегать высвобождения глутамата в “эксцитотоксическом количестве”. Ингибирование гликолиза в конечном мозге карася при введении йодоацетата (IAA) заставило не только стремительно снизить уровень, но и обеспечило быстрое массивное высвобождение ГАМК (10-кратное увеличение через 30 мин) относительно глутамата (в 3 раза через 2 ч) [70]. Полученные результаты свидетельствуют о сопряжении развивающегося при гипоксии/аноксии дефицита энергии со значительным выбросом ГАМК, что обеспечивает достаточно сильное угнетение электрической активности нейронов и позволяет восстановить уровень АТФ.

При дефиците O₂ динамика высвобождения и количество высвобождаемых медиаторов существенно различаются у видов рыб с разной степенью устойчивости к гипоксии/аноксии. В мозге неустойчивой форели *Oncorhynchus mykiss* выход глутамата предшествовал высвобождению ГАМК, начинаясь через 45–60 мин аноксии, в то время как уровень ГАМК не повышался до 90–105 мин экспозиции [58]. У карася аноксия запускала обратную динамику событий в виде существенного увеличения внеклеточной ГАМК в течение первых 30 мин аноксии, в то время как глутамат еще не достигает статистически значимого повышения вплоть до 90-й мин O₂-голодания [70]. По-видимому, толерантные виды рыб способны отсрочить и ограничить выход глутамата до того момента, когда будет реализован накопительный нейропротекторный эффект быстрого и массивного высвобождения ГАМК.

IV. Класс Земноводные (Amphibia): отряд бесхвостых земноводных (Anura), семейство Лягушковые (Ranidae). Амфибии появились более 370 млн лет назад и считаются переходной эволюционной стадией между рыбами и рептилиями. Подобно пресноводным черепахам и карасям, зимующие лягушки сталкиваются с тяжелой гипоксией/аноксией при зимовке в покрытых льдом прудах и озерах [73]. Полагают [74–76], что отдельные виды лягушек (*Rana temporaria*, *Rana pipiens*) обладают промежуточной степенью чувствительности к аноксии между чувствительностью млекопитающих и толерантностью к аноксии черепах и карася. Североамериканская леопардовая лягушка *Rana pipiens* время от времени “ныряет” в лишенные O₂ слои воды от хищников и выдерживает аноксию в течение нескольких дней при 3–5°C [74]. Европейская обыкновенная лягушка *Rana temporaria* демонстрирует аналогичную степень устойчивости к O₂-голоданию [75]. Мозг *R. temporaria* и *R. pipiens* способен пережить 4–5 ч в отсутствие O₂ при комнатной температуре [74, 77] и вы-

держат не менее 30 ч аноксии при 5°C [76]. При гипоксии/аноксии рефлексы земноводных постепенно утрачиваются, спустя некоторое время развивается состояние полного паралича [75].

В условиях аноксии (100% N₂) при комнатной температуре содержание АТФ в мозге лягушек снижается достаточно медленно в течение примерно 3 ч [73, 77]. При низком содержании O₂ (P_{O₂} воды 30–60 мм рт. ст.) лягушки могут поддерживать определенный уровень АТФ до 16 недель [74, 77]. Развивающееся при аноксии падение [АТФ] до 35% от нормоксического уровня нарушает ионный гомеостаз, когда концентрация внеклеточного K⁺ ([K⁺]_o) начинает постепенно нарастать [77]. В дальнейшем медленное увеличение [K⁺]_o приводит к еще большему его повышению с последующим высвобождением глутамата и ГАМК. Таким образом, “медленная смерть мозга лягушки” при аноксии (*slow death of the anoxic frog brain*) наделена всеми признаками острой энергетической недостаточности, которая характерна для млекопитающих, но разворачивается в более длительном временном масштабе [73, 77].

Коллапс уровня АТФ в мозге лягушек похож на более быструю реакцию млекопитающих [78], однако существенно отличается от процессов адаптированных к аноксии животных, которые поддерживают [АТФ] в мозге на протяжении многих часов [9]. Примерно на 100-й мин O₂-голодания в мозге лягушек начинает нарастать концентрация аденозина (позднее высвобождение аденозина), что, вероятно, является результатом распада внутриклеточных запасов АТФ и рассматривается как патологическое событие, связанное с энергетическим сбоем [74]. В свою очередь, после истощения запасов АТФ повышение внеклеточного уровня глутамата и ГАМК не происходит еще в течение 1–2 ч [74]. Такого рода реакция совершенно не похожа на процессы, наблюдаемые у других позвоночных независимо от степени их устойчивости. Следует напомнить, что характерный для неустойчивых видов энергетический сбой приводит к достаточно быстрому неконтролируемому и нейротоксическому высвобождению возбуждающих аминокислот.

Способность мозга лягушки переносить утрату АТФ является весьма интригующим фактом, поскольку защита энергетического статуса считается достаточно важным моментом выживания нейронов. Очевидно, энергетический сбой мозга сам по себе не является фатальным событием для этих земноводных. Особенности функционирования мозга амфибий показывают, что потеря АТФ и гибель нейронов могут быть не настолько тесно взаимосвязаны между собой, как это принято считать [74].

ГАМКергическая система мозга амфибий характеризуется достаточно хорошим развитием и близким подобием черт, присущих млекопитающим [79]. В мозге лягушек аноксия сопровождается увеличением содержания целого ряда аминокислот – серина, глицина, аланина и ГАМК, что демонстрируют толерантные виды. Следует признать, что содержание глутамата, таурина и глутамата не возрастает в той же мере, что у истинных факультативных анаэробов [80]. Было показано, что [ГАМК] возрастала на 45% после первого часа и еще более существенно повышалась до 302 ± 78% по истечении 4-го ч аноксии, достигая самого высокого показателя среди других медиаторов [80]. Очевидно, что в мозге амфибий концентрации внеклеточных ГАМК и глутамата начинают увеличиваться достаточно поздно [74]. Примечательно, что у лягушек повышение [ГАМК] было очень мало/незначительно по сравнению с 90-кратным увеличением количества медиатора в мозге устойчивых видов черепах после 6 ч аноксии [17]. При сопоставлении концентраций медиатора в разных таксонах ценность ГАМК в качестве тормозного нейротрансмиттера для

мозга лягушки может быть тем случаем, который описывается выражением “слишком мало, слишком поздно” (a case of ‘too little, too late’). Как и у млекопитающих при аноксии, наибольший прирост внеклеточной [ГАМК] земноводных отмечается после деполяризации клеточных мембран [74], что является скорее патологической реакцией. Вместе с тем высвобождение большого объема тормозных соединений одновременно с экситотоксическими агентами может представлять собой специфичный защитный механизм, противодействующий эффекту избытка возбуждающих аминокислот [81]. Такие защитные механизмы срабатывают на раннем этапе O_2 -голодания и функционируют более интенсивно у устойчивых к гипоксии/аноксии организмов [80]. Очевидно, что на фоне заметного прироста внеклеточных концентраций аспартата, таурина и ГАМК относительный уровень глутамата снижается. Поддержание сравнительно низкого уровня внеклеточного глутамата при аноксии/ишемии составляет наиболее существенное различие между мозгом лягушки и мозгом млекопитающих [80]. Кроме того, в течение нескольких часов “медленной смерти” мозга лягушки при аноксии было найдено 12-кратное увеличение внеклеточного уровня дофамина, что также отличало *R. pipiens* от устойчивых к аноксии позвоночных [80]. По-видимому, ГАМК может функционировать как “добросовестный”/*bona fide* ко-трансммиттер в моноаминергических (в частности, дофаминергических) нейронах [82].

Помимо снижения скорости метаболизма на фоне медленной утраты пула АТФ и диссипации ионного градиента [30], одним из механизмов, объясняющих способность лягушек переносить энергетическую недостаточность мозга, может быть задержка высвобождения возбуждающих аминокислот, что предполагает иную последовательность событий во время и после самого энергетического сбоя [74]. Возможно, что в аноксическом мозге лягушки деполяризация мембран нервных клеток либо задерживается на срок до 2 ч после истощения АТФ, либо высвобождение возбуждающих аминокислот происходит значительно позже деполяризации [74].

V. Класс Пресмыкающиеся (Reptilia), отряд Черепахи (Testudines). Черепахи — один из четырех современных отрядов пресмыкающихся, которые существуют на протяжении 250 миллионов лет. Отряд включает около 328 современных видов, предпочитающих тропический и умеренный климат. Характерной особенностью строения черепах является костно-роговой или костно-кожистый панцирь. Большинство видов черепах ведет полуводный образ жизни; в холодное и засушливое время года черепахи могут впадать в спячку. Среди черепах встречаются сухопутные, пресноводные и морские виды животных.

Отдельные представители этого отряда обладают исключительной устойчивостью к аноксии не только среди рептилий, но также среди других позвоночных [30]. Зарываясь в илистое дно покрытых льдом озер и прудов в период зимнего покоя, североамериканская пресноводная расписная черепаха *Chrysemys picta* способна выдержать 4–5 мес. аноксии при температуре 1–3°C; при более высоких температурах она выдерживает аноксию в 100–1000 раз дольше млекопитающих [83–85]. Каймановая или кусающаяся черепаха *Chelydra serpentina* выдерживают 100 дней погружения в лишенной O_2 воде [86]. Вместе с тем другие виды черепах, в частности, злой трионикс *Apalone ferox* не отличаются особой выносливостью [87]. По-видимому, основные механизмы толерантности к аноксии черепах представляют собой набор уникальных приспособлений внутри самой таксономической группы.

Падение продукции макроэргов в мозге черепах при аноксии сопровождается уменьшением потребления АТФ, что позволяет поддерживать его уровень и избежать деполяризации мембраны клеток [17]. Безусловно, способность мозга этих

рептилий снижать потребление энергии играет ключевую роль в их способности переносить O_2 -голодание длительное время. Исходно у эктотермных рептилий интенсивность энергетического метаболизма всего на 10–20% меньше таковой у млекопитающих такого же размера при одинаковой температуре тела [88]. Аноксия вызывает дополнительное резкое падение энергетического обмена черепах приблизительно на 90% [89, 90]. Показано, что в состоянии зимней спячки (гибернации) скорость метаболизма черепах понижается более чем в 10000 раз по сравнению с покоящимися млекопитающими аналогичного размера [90]. По-видимому, низкая скорость обменных процессов критически важна для черепах, поскольку позволяет им замедлить истощение энергетических резервов и отсрочить накопление большого количества кислых конечных продуктов жизнедеятельности. После нескольких месяцев O_2 -голодания в крови и тканях гибернирующих черепах зачастую наблюдаются высокое содержание лактата, до 200 мМ [91, 92]. Образующийся в процессе анаэробного гликолиза лактат одновременно с повышением его концентрации в плазме легко проникает в ткани панциря и костей животных, где происходит/осуществляется буферизация лактатной нагрузки с помощью карбоната кальция [91]. Из-за значительной относительной массы панциря и костей скелета (более 35% массы тела черепах) в минерализованных костных структурах скапливалось до 40–45% всего произведенного в организме лактата [91, 92].

Нейропротекторный механизм мозга черепах включает раннее высвобождение аденозина [93, 94], а также более позднее, длительное высвобождение ГАМК [17, 52]. Массированное увеличение [ГАМК] отмечается примерно в момент времени снижения первичного пика аденозина [52]. При аноксии содержание ГАМК в мозге черепах увеличивается в 80 раз, а электрическая активность мозга подавляется на 75–95% [17, 53, 95, 96]. У *P. scripta* через 240 мин O_2 -голодания [ГАМК] превышала нормоксический уровень 90-кратно, в то же время существенного изменения уровня глутамата не отмечалось [17] на фоне продолжающейся работы транспортеров глутамата (EAAT, семейство переносчиков возбуждающих аминокислот) [97]. По-видимому, пресинаптическое высвобождение глутамата ингибируется посредством активации ГАМК-рецепторов [98]. Интенсивное повышение [ГАМК] при аноксии также возможно за счет анаэробного превращения глутамата в ГАМК, тогда как распад ГАМК зависит от наличия O_2 . Нарастание [ГАМК] сопряжено с увеличением количества ГАМК(A)-рецепторов в течение как минимум 24 ч, что повышает эффективность действия тормозного медиатора [99].

Глубокая метаболическая депрессия мозга черепах сопровождается состоянием, визуально подобным коме [100]. Вместе с тем черепахи не входят в состояние глубокой комы, поскольку сохраняют замедленную реакцию настороженности, а при зимней спячке поддерживают некоторые двигательные функции. В основе практически коматозного состояния (*a comatose like state*) мозга черепах также может лежать ряд процессов в виде раннего высвобождения аденозина, активации K_{ATP} -каналов, прогрессирующего высвобождения ГАМК, резкого снижения электрической активности и ограничения ионных токов [73]. При аноксии выброс большого количества ГАМК действует подобно эндогенной анестезии, которая подавляет метаболизм и защищает мозг практически так же, как анестетики срабатывают в мозге млекопитающих [101]. Отсутствие заметного высвобождения глутамата во время аноксии разительно отличает мозг черепахи от мозга млекопитающих. Один из предполагаемых механизмов, обеспечивающих массированное высвобождение ГАМК, может быть связан с активацией АТФ-зависимых K^+ -каналов клеточной мембраны [102]. В отсутствие O_2 в мозге черепахи осуществляется переход от мито-

хондриальной (окислительной) к цитозольной (гликолитической) продукции АТФ. Очевидно, аноксия может сопровождаться локальным увеличением концентрации АТФ вблизи клеточной мембраны и таким образом способствовать локальной деполяризации мембраны, содержащей АТФ-зависимые K^+ -каналы. Повышенное количество эндогенной ГАМК при аноксии замедляет необходимую для достижения пикового значения потенциала действия деполяризацию мембраны (spike arrest) путем активации ГАМК(А)- и ГАМК(В)-рецепторов [102]. Также аноксия помимо ГАМК стимулирует выход повышенного количества других тормозных, снижающих синаптическую передачу нейротрансмиттеров, — глицина и таурина [17]. Увеличение внеклеточного пула ингибирующих аминокислот может быть одним из механизмов, лежащих в основе снижения спонтанной электрической активности и потребления энергии в лишенном O_2 мозге черепахи [17]. По-видимому, высокая устойчивость мозга черепах на фоне многократного повышения [ГАМК] связана с тесным сопряжением процессов гибернации, тормозящих практически все физиологические функции, и процессов, обеспечивающих выживание при O_2 -голодании.

ВЫСОКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ГИПОКСИИ/АНОКСИИ ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Считается, что высшие позвоночные (птицы, млекопитающие, включая человека) обладают весьма ограниченной способностью переносить гипоксию/аноксию [30]. Вместе с тем во избежание предвзятого представления об этих группах позвоночных и человеке, следует признать, что среди них встречаются свои исключения. Ныряющие, роющие и впадающие в спячку животные являются безусловными мастерами адаптации к гипоксии [31]. К сожалению, данные о функционировании ГАМКергической системы таких позвоночных отсутствуют. Вместе с тем к настоящему времени сложилось представление о том, что устойчивые к O_2 -голоданию высшие позвоночные особо выделяются тщательно скоординированной на уровне систем органов реконfigurацией, включающей частичное отключение функций отдельных органов при снижении PO_2 [31]. Такая системная реконfigurация достигается за счет столь же сложной перенастройки на клеточном и молекулярном уровнях, которые зависят от множества факторов, включая окружающую среду, степень гипоксического стресса, а также условия развития, поведения и экологии определенных видов.

В данном обзоре приводится весьма краткий перечень наиболее адаптированных представителей высших позвоночных.

Птицы-ныряльщики (пингвины, утки) переживают длительные периоды гипоксии (гипоксемии)/асфиксии по сравнению с наземными видами [103, 104]. Императорские пингвины *Aptenodytes forsteri* ныряют на глубину 500 метров на ~15 мин [105]. Утки способны переносить погружение в течение более 10 мин [104, 106]. Было показано, что мозг представителя утиных (Anatidae) обыкновенной гаги *Somateria mollissima* обладает повышенной анаэробной емкостью, поскольку в его ткани содержится всего один изофермент лактатдегидрогеназы LDH5, который у млекопитающих обнаруживается только в скелетных мышцах [107].

Напряжение O_2 в крови морских млекопитающих (китов, тюленей) при погружениях падает ниже 20 мм рт. ст. [2]. Тюлень-хохлач *Cystophora cristata* может погружаться на глубину более 1000 м и оставаться под водой более 52 мин [108]. Функции мозга ныряющего обыкновенного тюленя *Phoca vitulina* (паттерн ЭЭГ), по-видимому, практически не изменяются при снижении напряжения O_2 артери-

альной крови (PaO_2) до 10–18 мм рт. ст. [109], что существенно ниже критического значения PaO_2 для мозга неныряющих млекопитающих (25–40 мм рт. ст.) [110]. При погружении тюленя-хохлача энергетический баланс его мозга удерживается, в частности, за счет снижения интенсивности синаптической передачи [2]. Кроме того, было установлено, что в нейронах тюленя *C. cristata* (по сравнению с мышью) большинство связанных с химической синаптической (глутамат- и ГАМК-ергической) передачей генов экспрессируются в гораздо меньшем объеме (на 78 и 80% соответственно). Кроме того, нейроны тюленя *C. cristata* обладают способностью ограничивать высвобождение и увеличивать обратный захват глутамата, который может оказать эксцитотоксический эффект при гипоксии [2].

Длительные периоды острой гипоксии переживают также живущие на большой высоте (лама *Lama glama*, як *Bos grunniens*) либо впадающие в зимнюю спячку млекопитающие (американский длиннохвостый суслик *Spermophilus parryi*) [15, 31, 111]. Сатурация гемоглобина (SaO_2) ламы остается свыше 92% при напряжении O_2 артериальной крови (PaO_2) около 50 мм рт. ст. [112]. Устойчивость мозга норного грызуна голого землекопа *Heterocephalus glaber*, живущего свыше 30 лет, сравнивают с хорошо известной толерантностью мозга новорожденных млекопитающих [3, 113]. Показано, что при O_2 -голодании нейроны голого землекопа сохраняют способность к синаптической передаче гораздо дольше, чем нейроны мыши, и легко восстанавливаются после 30 мин периодов полной аноксии [5]. Предполагают, что устойчивость голого землекопа может быть результатом сохранения целого ряда ювенильных характеристик мозга взрослого грызуна (гипотеза неотении) [5, 15, 113]. В частности, определенные параллели между мозгом этих уникальных грызунов и новорожденных млекопитающих могут просматриваться в наличии неонатальной разновидности субъединиц глутаматных NMDA-рецепторов [113].

Развивающиеся эмбрионы млекопитающих прекрасно адаптированы к гипоксии: напряжение O_2 в утробе материнского организма соответствует PO_2 на высоте 8000 м над уровнем моря [3, 114]. Новорожденные крысята могут выживать в состоящей на 100% из азота атмосфере (аноксия) в 45 раз дольше, чем взрослые особи [115]. При гипоксии новорожденные крысята снижают опосредуемое эффектом глутамата поступление Ca^{2+} внутрь нервных клеток [116, 117], что делает их мозг похожим на мозг черепах или голых землекопов [113, 118]. Также устойчивость мозга новорожденных млекопитающих объясняют сравнительно недифференцированным состоянием этого органа, приближающим его функционирование к представителям более примитивных таксонов, в частности, к рептилиям [53].

Населяющие высокогорье (на высотах более 4000 м, в некоторых случаях более 5000 м) народности плато Тибета (тибетцы), Андского нагорья Альтиплано (популяция индейцев кечуа) и плато Семиен Эфиопского нагорья в течение многих поколений адаптировались к условиям с низким парциальным давлением O_2 в атмосфере (~ на 40% ниже, чем на уровне моря), что в первую очередь связывают с наличием определяющего высокую концентрацию гемоглобина (hemoglobin) гена *EPAS1*, а также набора других чувствительных к гипоксии и регулирующих адаптацию к высокогорью генов (являются неотъемлемой частью регуляции программы транскрипции HIF) [119–121]. По-видимому, эпигенетические процессы предоставляют путь к быстрому приобретению наследуемых, адаптивных функций и могут дать избирательное преимущество в быстро меняющейся среде. Такие исследования жителей высокогорья могут позволить глубже понять механизмы, лежащие в основе адаптивного потенциала человека и истории эволюции человека [121].

Таблица 1. Особенности функционирования ГАМКергического механизма мозга низших позвоночных при гипоксии/аноксии

Таксон	Устойчивость к гипоксии/аноксии	Особенности функционирования ГАМКергического механизма при гипоксии/аноксии	Ссылки
<i>Надкласс Бесполостные</i>	Высокая (вплоть до аноксии)	Прямые данные отсутствуют; количество ГАМК-рецепторов в мозге составляют 1/10 от общего числа рецепторов на единицу ткани других позвоночных; повышенная аффинность ГАМК-рецепторов (в 20 раз); одновременное высвобождение ГАМК с другими тормозными медиаторами	[43, 44]
<i>Класс Хрящевые рыбы</i>	Высокая (вплоть до аноксии); поддерживается режимом естественного гипоксического преадаптации	ГАМК(A)-рецепторы структурно отличаются; концентрация ГАМК выборочно повышается в двигательных ядрах и отдельных сенсорных ядрах (“ад-ресный” тормозный механизм), общий уровень ГАМК остается практически неизменным	[1, 12, 54, 55]
<i>Инфракласс Костистые рыбы</i>	Высокая (вплоть до аноксии)	Значительный выброс ГАМК до наступления заметных изменений уровня глутамата; накопительный протекторный эффект ГАМК	[70]
<i>Класс Земноводные (лягушки)</i>	Переходная степень устойчивости в способности переносить гипоксию/аноксию между млекопитающими и устойчивыми видами черепах и костистых рыб	Эффект “медленной смерти мозга”: после истощения запасов АТФ повышение внеклеточного уровня глутамата и ГАМК отсрочено на 1–2 ч; поддержание относительно низкого уровня внеклеточного глутамата как наиболее существенное отличие	[9, 73, 74, 77, 80]
<i>Класс Рептилии (черепахи)</i>	Высокая (вплоть до аноксии)	[ГАМК] повышается в 80 раз без существенного изменения уровня глутамата; подобное комое состояние, однако сохраняются отдельные двигательные реакции; существенное увеличение внеклеточного пула ингибирующих аминокислот	[17, 100]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы устойчивости мозга низших позвоночных при гипоксии/аноксии предполагают значительное снижение метаболизма, наличие запасов и эффективное использование субстратов, толерантность к конечным продуктам анаэробного метаболизма, предотвращение повреждений свободными радикалами в процессе реоксигенации [30]. В то же время очевидно, что при O_2 -голодании метаболическая депрессия устойчивых представителей разных таксонов достигается различными путями. Обеспечивающее гипометаболическое состояние высвобождение и конечный эффект ГАМК на разных ступенях эволюции осуществляется по достаточно гибкой схеме (табл. 1), которая предполагает различные концентрации высвобождаемой ГАМК, тесное взаимодействие с другими тормозными медиаторными системами, адресное или генерализованное воздействие на структуры мозга, уникальные временные рамки высвобождения тормозных и возбуждающих аминокислот и достигаемое соотношение с основным эксцитотоксическим агентом мозга – глутаматом. Кроме того, наблюдаемая при гипоксии/аноксии активация ГАМКергической системы сопровождается широким спектром неврологических проявлений, которые предполагают как сохранение основных реакций организма, так и вхождение в практически коматозное состояние. Очевидно, что ГАМКергическая система мозга нуждается в дальнейшем исследовании. Задача будущих поисков в данной области состоит в том, чтобы более детально изучить механизмы и условия вхождения мозга и отдельных нейронных сетей в гипометаболическое состояние. Не вызывает сомнения тот факт, что постоянно подвергающиеся действию гипоксии животные точно “знают”, как достичь необходимой для выживания глубины метаболической депрессии; “задача исследователей должна заключаться в том, чтобы следовать их примеру” [31], извлекая некое рациональное зерно в поиске путей сохранения целостности мозга при дефиците O_2 .

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” (номер гос. регистрации 121041400077-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mulvey JM, Renshaw GM* (2009) GABA is not elevated during neuroprotective neuronal depression in the hypoxic epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152: 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.017>
2. *Gefñer C, Krüger A, Folkow LP, Fehrle W, Mikkelsen B, Burmester T* (2022) Transcriptomes Suggest That Pinniped and Cetacean Brains Have a High Capacity for Aerobic Metabolism While Reducing Energy-Intensive Processes Such as Synaptic Transmission. *Front Mol Neurosci* 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.877349>

3. *Bickler PE* (2004) Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. *J Exp Biol* 207: 3243–3249.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00977>
4. *Nilsson GE* (2001) Surviving anoxia with the brain turned on. *Physiology* 16: 217–221.
<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.5.217>
5. *Larson J, Park TJ* (2009) Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain. *Neuroreport* 20: 1634–1637.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32833370cf>
6. *Hochachka PW, Lutz PL* (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 130: 435–459.
[https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00408-0](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00408-0)
7. *McDougal DB, Holowach J, Howe MC, Jones EM, Thomas CA* (1968) The effects of anoxia upon energy sources and selected metabolic intermediates in the brain of fish, frog and turtle. *J Neurochem* 15: 577–588.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1968.tb08956.x>
8. *Schmidt H, Wegener G* (1988) Glycogen phosphorylase in fish brain (*Carassius carassius*) during hypoxia. *Biochem Soc Trans* 16 (4): 621–622.
<https://doi.org/10.1042/bst0160621>
9. *Lutz P, Nilsson G* (1997) Contrasting strategies for anoxic brain survival—glycolysis up or down. *J Exp Biol* 200: 411–419.
<https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.411>
10. *van Ginneken V, Nieveen M, Van Eersel R, Van den Thillart G, Addink A* (1996) Neurotransmitter levels and energy status in brain of fish species with and without the survival strategy of metabolic depression. *Comp Biochem Physiol A: Physiol* 114: 189–196.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02127-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02127-2)
11. *Lutz PL, Nilsson GE, Pérez-Pinzón MA* (1996) Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspective. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113: 3–13.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02046-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02046-2)
12. *Nilsson GE, Renshaw GM* (2004) Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J Exp Biol* 207: 3131–3139.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00979>
13. *Nilsson GE, Lutz PL* (1993) Role of GABA in hypoxia tolerance, metabolic depression and hibernation—possible links to neurotransmitter evolution. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol* 105: 329–336.
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90069-w](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90069-w)
14. *Folkow LP, Ramirez JM, Ludvigsen S, Ramirez N, Blix AS* (2008) Remarkable neuronal hypoxia tolerance in the deep-diving adult hooded seal (*Cystophora cristata*). *Neurosci Lett* 46: 147–150.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.040>
15. *Larson J, Drew KL, Folkow LP, Milton SL, Park TJ* (2014) No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. *J Exp Biol* 217: 1024–1039.
<https://doi.org/10.1242/jeb.085381>
16. *Hosseini-Javaheri N, Buck LT* (2021) GABA receptor inhibition and severe hypoxia induce a paroxysmal depolarization shift in goldfish neurons. *J Neurophysiol* 125: 321–330.
<https://doi.org/10.1152/jn.00149.2020>
17. *Nilsson GE, Lutz PL* (1991) Release of inhibitory neurotransmitters in response to anoxia in turtle brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 261: R32–R37.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.1.R32>
18. *Nilsson GE, Lutz PL, Jackson TL* (1991) Neurotransmitters and anoxic survival of the brain: a comparison of anoxia-tolerant and anoxia-intolerant vertebrates. *Physiol Zool* 64: 638–652.
<https://doi.org/10.1086/physzool.64.3.30158198>
19. *Zajic DE, Podrabsky JE* (2020) GABA metabolism is crucial for long-term survival of anoxia in annual killifish embryos. *J Exp Zool* 223:jeb229716.
<https://doi.org/10.1242/jeb.229716>
20. *Ben-Ari Y* (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728–739.
<https://doi.org/10.1038/nrn920>
21. *Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS* (2013) Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front Endocrinol* 4: 102.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>
22. *Cocco A, Rönnerberg AC, Jin Z, André GI, Vossen LE, Bhandage AK, Thörnqvist PO, Birnir B, Winberg S* (2017) Characterization of the γ -aminobutyric acid signaling system in the zebrafish (*Danio rerio* Hamilton) central nervous system by reverse transcription-quantitative poly-

- merase chain reaction. *Neuroscience* 343: 300–321.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.018>
23. Nilsson GE, Lutz PL (2004) Anoxia tolerant brains. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 475–486.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200405000-00001>
 24. Nilsson GE (1992) Evidence for a role of GABA in metabolic depression during anoxia in crucian carp (*Carassius carassius*). *J Exp Biol* 164: 243–259.
<https://doi.org/10.1242/jeb.164.1.243>
 25. Podrabsky JE, Lopez JP, Fan TW, Higashi R, Somero GN (2007) Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: insights from a metabolomics analysis. *J Exp Biol* 210: 2253–2266.
<https://doi.org/10.1242/jeb.005116>
 26. Yoon BE, Lee CJ (2014) GABA as a rising gliotransmitter. *Front Neural Circuits* 8: 141.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>
 27. Rossi DJ, Hamann M, Attwell D (2003) Multiple modes of GABAergic inhibition of rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 548: 97–110.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00097.x>
 28. Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330: 790–796.
<https://doi.org/10.1126/science.1184334>
 29. Wójtowicz AM, Dvorzhak A, Semtner M, Grantyn R (2013) Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Front Neural Circuits* 7: 88.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00188>
 30. Bickler PE, Buck LT (2007) Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu Rev Physiol* 69: 145–170.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>
 31. Ramirez J-M, Folkow LP, Blix AS (2007) Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol* 69: 113–143.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163111>
 32. Miyashita T, Coates MI, Farrar R, Larson P, Manning PL, Wogelius RA, Currie PJ (2019) Hagfish from the Cretaceous Tethys Sea and a reconciliation of the morphological–molecular conflict in early vertebrate phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 2146–2151.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1814794116>
 33. Cox GK, Sandblom E, Richards JG, Farrell AP (2011) Anoxic survival of the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). *J Comp Physiol* 181: 361–371.
<https://doi.org/10.1007/s00360-010-0532-4>
 34. Cox GK, Sandblom E, Farrell AP (2010) Cardiac responses to anoxia in the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. *J Exp Biol* 213: 3692–3698.
<https://doi.org/10.1242/jeb.046425>
 35. Malte H, Lomholt JP (1998) Ventilation and gas exchange. The biology of hagfishes. Dordrecht: Springer Netherlands. 223–234.
 36. Johansen K, Lenfant C, Hanson D (1973) Gas exchange in the lamprey, *Entosphenus tridentatus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 44: 107–119.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90374-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90374-5)
 37. Rovainen CM (1970) Glucose production by lamprey meninges. *Science* 167: 889–890.
<https://doi.org/10.1126/science.167.3919.889>
 38. Rovainen CM, Lowry OH, Passonneau JV (1969) level of metabolites and production of glucose in the lamprey brain. *J Neurochem* 16: 1451–1458.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1969.tb09897.x>
 39. Osório J, Rétaux S (2008) The lamprey in evolutionary studies. *Dev Genes Evol* 218:221–235.
<https://doi.org/10.1007/s00427-008-0208-1>
 40. Pombal MA, Alvarez-Otero R, Pérez-Fernández J, Solveira C, Megías M (2011) Development and organization of the lamprey telencephalon with special reference to the GABAergic system. *Front Neuroanat* 5: 20.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00020>
 41. Robertson B, Auclair F, Ménard A, Grillner S, Dubuc R (2007) GABA distribution in lamprey is phylogenetically conserved. *J Comp Neurol* 503: 47–63.
<https://doi.org/10.1002/cne.21348>
 42. Barreiro-Iglesias A, Cornide-Petronio ME, Anadón R., Rodicio MC (2009a) Serotonin and GABA are colocalized in restricted groups of neurons in the larval sea lamprey brain: insights into the early evolution of neurotransmitter colocalization in vertebrates. *J Anat* 215: 435–443.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01119.x>
 43. Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Anadón, R, Rodicio MC (2009b) Dopamine and γ -aminobutyric acid are colocalized in restricted groups of neurons in the sea lamprey brain: insights

- into the early evolution of neurotransmitter colocalization in vertebrates. *J Anat* 215: 601–610. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01159.x>
44. Mann E, Enna SJ (1980) Phylogenetic distribution of bicuculline-sensitive γ -amino-butyric acid (GABA) receptor binding. *Brain Res* 184: 367–373. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90805-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90805-7)
 45. Wise G, Mulvey JM, Renshaw GM (1998) Hypoxia tolerance in the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*). *J Exp Zool* 281: 1–5. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980501\)281:1<1::AID-JEZ1>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980501)281:1<1::AID-JEZ1>3.0.CO;2-S)
 46. Routley MH, Nilsson GE, Renshaw GM (2002) Exposure to hypoxia primes the respiratory and metabolic responses of the epaulette shark to progressive hypoxia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131: 313–321. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00484-6](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00484-6)
 47. Renshaw GM, Kerrisk CB, Nilsson GE (2002) The role of adenosine in the anoxic survival of the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131: 133–141. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00484-5](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00484-5)
 48. Mulvey JM, Renshaw GMC (2000) Neuronal oxidative hypometabolism in the brainstem of the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) in response to hypoxic pre-conditioning. *Neurosci Lett* 290: 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01321-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01321-5)
 49. Renshaw GM, Dyson SE (1999) Increased nitric oxide synthase in the vasculature of the epaulette shark brain following hypoxia. *Neuroreport* 10: 1707–1712. <https://doi.org/10.1097/00001756-199906030-00015>
 50. Söderström V, Renshaw GM, Nilsson GE (1999) Brain blood flow and blood pressure during hypoxia in the epaulette shark *Hemiscyllium ocellatum*, a hypoxia-tolerant elasmobranch. *J Exp Biol* 202: 829–835. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.7.829>
 51. Newby AC (1984) Adenosine and the concept of ‘retaliatory metabolites’. *Trends Biochem Sci* 9: 42–44. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90176-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90176-2)
 52. Nilsson GE, Lutz PL (1992) Adenosine release in the anoxic turtle brain: a possible mechanism for anoxic survival. *J Exp Biol* 162: 345–351. <https://doi.org/10.1242/jeb.162.1.345>
 53. Pérez-Pinzón MA, Nilsson GE, Lutz PL (1993) Relationship between ion gradients and neurotransmitter release in the newborn rat striatum during anoxia. *Brain Res* 602: 228–233. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90687-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90687-i)
 54. Smeets W, Nieuwenhuys R, Roberts BL (1983) The Central Nervous System of Cartilaginous Fishes. Structure and functional correlations. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-68923-9>
 55. Renshaw GM, Wise G, Dodd PR (2010) Ecophysiology of neuronal metabolism in transiently oxygen-depleted environments: evidence that GABA is accumulated pre-synaptically in the cerebellum. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 155: 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.039>
 56. Hebebrand J, Friedl W, Breidenbach B, Propping P (1987) Phylogenetic comparison of the photoaffinity-labeled benzodiazepine receptor subunits. *J Neurochem* 48: 1103–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb05633.x>
 57. Nilsson GE (1996) Brain and body oxygen requirements of *Gnathonemus petersii*, a fish with an exceptionally large brain. *J Exp Biol* 199: 603–607. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.3.603>
 58. Hylland P, Nilsson GE, Johansson D (1995) Anoxic brain failure in an ectothermic vertebrate: release of amino acids and K^+ in rainbow trout thalamus. *Am J Physiol* 269: R1077–R1084. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.5.R1077>
 59. Shoubridge EA, Hochachka PW (1980) Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science* 209: 308–309. <https://doi.org/10.1126/science.7384807>
 60. Nilsson GE (1988) A comparative study of aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities in crucian carp and three other vertebrates: apparent adaptations to ethanol production. *J Comp Physiol* 158: 479–485. <https://doi.org/10.1007/BF00691145>
 61. Vornanen, M, Stecyk JA, Nilsson GE (2009) The anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Fish Physiol* 27: 397–441. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00009-5)

62. *Morosawa T* (2011) Hypoxia tolerance of three native and three alien species of bitterling inhabiting Lake Kasumigaura, Japan. *Environ Biol Fishes* 91: 145–153.
<https://doi.org/10.1007/s10641-011-9767-5>
63. *van Waarde A, Van den Thillart G, Verhagen M* (1993) Ethanol formation and pH regulation in fish. *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. [11] CRC Press. 157–170.
64. *Holmqvist BI, Forsell J, Helvik JV* (1996) Patterns of embryonic development of the brain and sensory organs studied in three marine teleost species. *Soc Neurosci Abst* 22: 991
65. *Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ* (2004) Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 355: 29–32.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.024>
66. *Doldan MJ, Prego B, Holmqvist BI, de Miguel E* (1999) Distribution of GABA-immunolabeling in the early zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Eur J Morphol* 37: 126–129.
<https://doi.org/10.1076/ejom.37.2.126.4748>
67. *Lauder JM* (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16: 233–240.
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90162-f](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90162-f)
68. *Meier E, Hertz L, Shousboe A* (1991) Neurotransmitters as developmental signals. *Neurochem Int* 19: 1–15.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(91\)90113-R](https://doi.org/10.1016/0197-0186(91)90113-R)
69. *Martinoli MG, Dubourg P, Geffard M, Calas A, Kah O* (1990) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the forebrain of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res* 260: 77–84.
<https://doi.org/10.1007/BF00297492>
70. *Hylland P, Nilsson GE* (1999) Extracellular levels of amino acid neurotransmitters during anoxia and forced energy deficiency in crucian carp brain. *Brain Res* 823: 49–58.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01096-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01096-3)
71. *Nilsson GE* (1990) Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *J Exp Biol* 150: 295–320.
<https://doi.org/10.1242/jeb.150.1.295>
72. *Buck LT, Pamerter ME* (2018) The hypoxia-tolerant vertebrate brain: arresting synaptic activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 224: 61–70.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.11.015>
73. *Lutz PL, Nilsson GE* (2004) Vertebrate brains at the pilot light. *Resp Physiol Neurobiol* 141: 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.013>
74. *Lutz PL, Reinert R* (1997) Survival of energy failure in the anoxic frog brain: delayed release of glutamate. *J Exp Biol* 200: 2913–2917.
<https://doi.org/10.1242/jeb.200.22.2913>
75. *Wegener G, Krause U* (1993). Environmental and exercise anaerobiosis in frogs. In *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. Boca Raton, FL: CRC Press. 217–236.
76. *Hermes-Lima M, Storey KB* (1996) Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. *Am J Physiol* 271: R918–R925.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.4.R918>
77. *Knickerbocker DL, Lutz PL* (2001) Slow ATP loss and the defense of ion homeostasis in the anoxic frog brain. *J Exp Biol* 204: 3547–3551.
<https://doi.org/10.1242/jeb.204.20.3547>
78. *Siesjö BK* (1978) Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm Suppl* 14: 17–22.
79. *Franzoni MF, Morino P* (1989) The distribution of GABA-like-immunoreactive neurons in the brain of the newt, *Triturus cristatus carnifex*, and the green frog, *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res* 255: 155–166.
<https://doi.org/10.1007/BF00229077>
80. *Milton SL, Manuel L, Lutz PL* (2003) Slow death in the leopard frog *Rana pipiens*: neurotransmitters and anoxia tolerance. *J Exp Biol* 206: 4021–4028.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00647>
81. *Saransaari P, Oja SS* (1998) Release of endogenous glutamate, aspartate, GABA, and taurine from hippocampal slices from adult and developing mice under cell-damaging conditions. *Neurochem Res* 23: 563–570.
<https://doi.org/10.1023/a:1022494921018>
82. *Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL* (2012) Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 490: 262–266.
<https://doi.org/10.1038/nature11466>

83. Jackson DC (2002) Hibernating without oxygen: physiological adaptations of the painted turtle. *J Physiol* 543: 731–737.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024729>
84. Jackson DC, Ultsch GR (2010) Physiology of hibernation under the ice by turtles and frogs. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313: 311–327.
<https://doi.org/10.1002/jez.603>
85. Hogg DW, Hawrysh PJ, Buck LT (2014) Environmental remodelling of GABAergic and glutamatergic neurotransmission: Rise of the anoxia-tolerant turtle brain. *J Therm Biol* 44: 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.01.003>
86. Reese SA, Jackson DC, Ultsch GR (2002) The physiology of overwintering in a turtle that occupies multiple habitats, the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Physiol Biochem Zool* 75: 432–438.
<https://doi.org/10.1086/342802>
87. Crocker CE, Ultsch GR, Jackson DC (1999) The physiology of diving in a north-temperate and three tropical turtle species. *J Comp Physiol B* 169: 249–255.
<https://doi.org/10.1007/s003600050218>
88. Bennett AF, Ruben JA (1979) Endothermy and activity in vertebrates. *Science* 206: 649–654.
<https://doi.org/10.1126/science.493968>
89. Jackson DC (1968) Metabolic depression and oxygen depletion in the diving turtle. *J Appl Physiol* 24: 503–509.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1968.24.4.503>
90. Buck LT, Land SC, Hochachka PW (1993) Anoxia-tolerant hepatocytes: model system for study of reversible metabolic suppression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R49–R56.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.1.R49>
91. Jackson DC (2000) How a turtle's shell helps it survive prolonged anoxic acidosis. *News Physiol Sci* 15: 181–185.
<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.4.181>
92. Jackson DC, Ramsey AL, Paulson JM, Crocker CE, Ultsch GR (2000) Lactic acid buffering by bone and shell in anoxic softshell and painted turtles. *Physiol Biochem Zool* 73: 290–297.
<https://doi.org/10.1086/316754>
93. Buck LT, Bickler PE (1995) Role of adenosine in NMDA receptor modulation in the cerebral cortex of an anoxia-tolerant turtle (*Chrysemys picta bellii*). *J Exp Biol* 198: 1621–1628.
<https://doi.org/10.1242/jeb.198.7.1621>
94. Pék M, Lutz PL (1997) Role for adenosine in channel arrest in the anoxic turtle brain. *J Exp Biol* 200: 1913–1917.
<https://doi.org/10.1242/jeb.200.13.1913>
95. Chih CP, Rosenthal M, Sick TJ (1989) Ion leakage is reduced during anoxia in turtle brain: a potential survival strategy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 257: R1562–R1564.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.6.R1562>
96. Feng ZC, Rosenthal M, Sick TJ (1988) Suppression of evoked potentials with continued ion transport during anoxia in turtle brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 255: R478–R484.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.255.3.R478>
97. Milton SL, Thompson JW, Lutz PL (2002) Mechanisms for maintaining extracellular glutamate levels in the anoxic turtle striatum. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 282: R1317–R1323.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00484.2001>
98. Pamerter ME, Hogg DW, Ormond J, Shin DS, Woodin, MA, Buck LT (2011) Endogenous GABA-AA and GABAB receptor-mediated electrical suppression is critical to neuronal anoxia tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1274–11279.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102429108>
99. Lutz PL, Leone-Kabler SA (1995) Upregulation of GABAA receptor during anoxia in the turtle brain. *Am J Physiol* 37: R1332–R1335.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.268.5.R1332>
100. Madsen JG, Wang T, Beedholm K, Madsen PT (2013) Detecting spring after a long winter: coma or slow vigilance in cold, hypoxic turtles? *Biol Lett* 9: 20130602.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0602>
101. Lutz PL, Nilsson GE, Prentice H (2003) *The Brain Without Oxygen*, 3rd ed. Dordrecht: Kluwer Acad Publ.
102. Buck LT, Hogg DWR, Rodgers-Garlick C, Pamerter ME (2012) Oxygen sensitive synaptic neurotransmission in anoxia-tolerant turtle cerebrocortex. *Adv Exp Med Biol* 758: 71–79.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-4584-1_10

103. *Blix AS, Berg T* (1974) Arterial hypoxia and the diving responses of ducks. *Acta Physiol Scand* 92: 566–568.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1974.tb05779.x>
104. *Hudson DM, Jones DR* (1986) The Influence of Body Mass on the Endurance to Restrained Submergence in the Pekin Duck. *J Exp Biol* 120: 351–367.
<https://doi.org/10.1242/jeb.120.1.351>
105. *Kooyman GL, Kooyman TG* (1995) Diving behavior of emperor penguins nurturing chicks at Coulman Island, Antarctica. *The Condor* 97: 536–549.
<https://doi.org/10.2307/1369039>
106. *Caputa M, Folkow L, Blix AS* (1998) Rapid brain cooling in diving ducks. *Am J Physiol* 275: R363–R371.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.2.R363>
107. *Blix AS, From SH* (1971) Lactate dehydrogenase in diving animals—a comparative study with special reference to the eider (*Somateria mollissima*). *Comp Biochem Physiol B Biochem* 40: 579–584.
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90132-5)
108. *Folkow LP, Blix AS* (1999) Diving behaviour of hooded seals (*Cystophora cristata*) in the Greenland and Norwegian Seas. *Polar Biology* 22: 61–74.
109. *Kerem D, Elsnor R* (1973) Cerebral tolerance to asphyxial hypoxia in the harbour seal. *Resp Physiol* 19: 188–200.
[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(73\)90077-7](https://doi.org/10.1016/0034-5687(73)90077-7)
110. *Erecinska E, Silver IA* (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Resp Physiol* 128: 263–276.
[https://doi.org/10.1016/s0034-5687\(01\)00306-1](https://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00306-1)
111. *Оюн НЮ, Коноров ЕА, Артюшин ИВ, Столповский ЮА* (2018) Исследование генетических основ адаптации яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона к условиям высокогорья. *Генетика* 54: 70–73. [*Oyun NYu, Konorov EA, Artyushin IV, Stolpovsky Yu A* (2018) Study of the Genetic Bases of the Yak (*Bos grunniens*) Adaptation to the Highlands in Sayan-Altai Region. *Genetics* 54: 70–73. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0016675818130167>
112. *Banchero N, Grover RF, Will JA* (1971) Oxygen transport in the llama (*Lama glama*). *Respir Physiol* 13: 102–115.
[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(71\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(71)90067-3)
113. *Peterson BL, Larson J, Buffenstein R, Park TJ, Fall CP* (2012) Blunted neuronal calcium response to hypoxia in naked mole-rat hippocampus. *PLoS One* 7: e31568.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031568>
114. *Singer D* (1999) Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 123: 221–234.
[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)00057-4)
115. *Duffy TE, Kohle SJ, Vannucci RC* (1975) Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. *J Neurochem* 24: 271–276.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb11875.x>
116. *Friedman JE, Haddad GG* (1993) Major differences in Ca^{2+} i response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca^{2+} o and Na^{+} o. *J Neurosci* 13: 63–72.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00063.1993>
117. *Bickler PE, Hansen BM* (1998) Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices. *Brain Res Dev Brain Res* 106: 57–69.
[https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(97)00189-2)
118. *Bickler PE, Gallego SM* (1993) Inhibition of brain calcium channels by plasma proteins from anoxic turtles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R277–R281.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.2.R277>
119. *Huerta-Sánchez E, Jin X, Bianba Z, Peter BM, Vinckenbosch N, Liang Y, Nielsen R* (2014) Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. *Nature* 512: 194–197.
<https://doi.org/10.1038/nature13408>
120. *Ge RL, Simonson TS, Gordeuk V, Prchal JT, McClain DA* (2015) Metabolic aspects of high-altitude adaptation in Tibetans. *Exp Physiol* 100: 1247–1255.
<https://doi.org/10.1113/EP085292>
121. *Julian CG* (2017) Epigenomics and human adaptation to high altitude. *J Appl Physiol* 123: 1362–1370.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00351.2017>

GABAergic Mechanisms of the Brain Tolerance to Hypoxia in Lower Vertebrates**E. E. Kolesnikova****Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia***e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru*

Hypoxic/ischemic brain injuries a major medical challenge. One of the approaches to the development of therapeutic interventions is to establish the pathways of survival for neurons in tolerant to O₂ deficiency vertebrates, which could suggest the ways to mitigate hypoxic catastrophe for separate cells under oxygen starvation. Metabolic depression is considered to be a universal strategy for the survival of hypoxia tolerant animals; however, the details of the mechanism of brain metabolism limitation with a decrease in PO₂ have not hitherto been established. Under oxygen starvation, an increase in the extracellular concentration of inhibitory neurotransmitters can be one of the significant links in the apparatus for suppression of electrical activity, which makes it possible to reduce energy demand. GABA (γ -aminobutyric acid) serves as a universal inhibitory neurotransmitter in the CNS of higher and lower vertebrates, the functioning of which is associated with the metabolism suppression and leveling the consequences of an energy failure. GABA is found in various taxonomic groups of vertebrates. This review considers strategies for GABA involvement in the mechanisms of ensuring a brain tolerance to oxygen starvation in representatives of various taxonomic groups of lower vertebrates (cyclostomes, cartilaginous and bony fish, amphibians, reptiles), which are distinguished by a most pronounced ability to survive under acute and chronic hypoxia/anoxia.

Keywords: GABA, brain, hypoxia, metabolic depression, lower vertebrates

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА КАК МЕТОД
РЕГУЛЯЦИИ КИНЕМАТИКИ ХОДЬБЫ У ПОСТИНСУЛЬТНЫХ ПАЦИЕНТОВ**

© 2023 г. И. Н. Богачева^{1, *}, Н. А. Щербакова¹, Т. Р. Мошонкина¹, А. А. Гришин¹,
Д. В. Скворцов^{2, 3}, С. Н. Кауркин^{2, 3}, Ю. П. Герасименко¹

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

²*Федеральный научный клинический центр ФМБА России, Москва, Россия*

³*Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Мультисегментарная чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ), воздействующая на спинальные нейронные сети и моторные пулы мышц ног, применялась для коррекции ходьбы по беговой дорожке у пациентов, перенесших инсульт. В исследовании принимали участие 15 пациентов в восстановительном периоде после острого нарушения мозгового кровообращения. Неинвазивный спинальный нейропротез с многоканальным стимулятором для ЧЭССМ и системой детектирования фаз шагательного цикла (“Косима”, Россия) использовался для активации моторных пулов мышц-сгибателей ноги в фазе переноса, активации моторных пулов мышц-разгибателей в фазе опоры в сочетании с непрерывной активацией спинальных локомоторных сетей. Применение ЧЭССМ при ходьбе по беговой дорожке вызывало увеличение амплитуды движений в голеностопном суставе и длины цикла шага на стороне пареза, а также уменьшение асимметрии в фазах шага обеих ног. У 80% пациентов возрастал подъем паретичной ноги над опорой. При сочетании непрерывной и фазозависимой стимуляций увеличение размаха движения в суставах было максимальным по сравнению с только фазозависимой или только постоянной стимуляцией. Полученные данные демонстрируют, что предложенный алгоритм ЧЭССМ модулирует параметры шагательных движений у пациентов с последствиями нарушения мозгового кровообращения и может рассматриваться как перспективный метод двигательной реабилитации.

Ключевые слова: спинной мозг, электрическая стимуляция, инсульт, ходьба, нейропротез

DOI: 10.31857/S0869813923040040, **EDN:** VIYDMZ

Список сокращений и обозначений: Асимм. – асимметрия (модуль разницы значений параметра для паретичной и здоровой ноги); ВПН – высота подъема ноги; ГСС – амплитуда сгибания–разгибания для голеностопного сустава; ДО – суммарный период двойной опоры; ДЦШ – длина цикла шага; КС – суммарная амплитуда сгибания–разгибания коленного сустава; КСМР – фаза максимального разгибания коленного сустава; КСС – фаза максимального сгибания коленного сустава; НВД – начало второй двойной опоры; ОО – период одиночной опоры; ПО – период опоры; СМ – спинной мозг; СХ – скорость ходьбы; ТБС – изменение угла тазобедренного сустава в сагиттальной плоскости; ТМР – фаза максимального разгибания тазобедренного сустава; ТМС – фаза максимального сгибания тазобедренного сустава; ЦШ – цикл шага; ЧЭССМ – чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема реабилитации пациентов с двигательными нарушениями после инсульта сохраняет свою актуальность в связи с увеличением инвалидизации населения: во всем мире наблюдается тенденция к уменьшению числа летальных случаев инсульта, при этом количество пациентов, нуждающихся в длительном уходе и восстановлении после инсульта, растет [1]. Одним из распространенных последствий инсульта является нарушение походки, в частности, снижение скорости ходьбы, укорочение длины шага, избыточное перераспределение нагрузки на здоровую ногу. Для восстановления этих параметров используют различные способы тренировки ходьбы, в том числе тренировки с помощью электромеханических и роботизированных средств и тренировки на беговой дорожке с разгрузкой массы тела [2].

Известно, что использование эпидуральной электрической стимуляции спинного мозга (СМ) в сочетании с двигательной локомоторной тренировкой улучшает моторные функции и восстанавливает самостоятельную ходьбу по ровной поверхности у парализованных пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой [3, 4]. Показано, что чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ) также способна активировать спинальные локомоторные нейронные сети, и, в зависимости от интенсивности, позволяет воздействовать на Ia афференты, афференты группы Ib, кожные афференты, афференты мышечных веретен II группы, а также на спинальные интернейроны и вызывать прямую двигательную активацию моторных пулов [5]. ЧЭССМ может рассматриваться как неинвазивный аналог эпидуральной стимуляции СМ и использоваться для регуляции двигательной активности [6–8]. Показано, что в сочетании с локомоторной тренировкой ЧЭССМ может улучшить постуральный контроль и равновесие [9] и вызвать восстановление локомоторных функций у пациентов с травмой СМ [10, 11]. Преимуществами ЧЭССМ перед эпидуральной стимуляцией СМ являются неинвазивность воздействия и возможность синхронно стимулировать несколько спинальных центров.

Возможность применения ЧЭССМ как метода коррекции локомоторных способностей человека после нарушения церебрального кровообращения ишемического генеза мало исследована. В работе [12] применяли ЧЭССМ на уровне T11–T12 для пациентов с двигательными нарушениями различной степени тяжести, вызванными нарушением кровообращения головного мозга. Стимуляция с частотой 1 Гц вызывала в мышцах нижних конечностей пациентов рефлекторные ответы с моно- и полисинаптическими компонентами, а при стимуляции с частотами 5 и 30 Гц у пациентов возникали произвольные движения ног, схожие с локомоторными.

В последние годы нами разработана новая технология мультисегментарной ЧЭССМ, позволяющая адресно активировать флексорные и экстензорные моторные пулы в определенные фазы шагательного цикла, так называемая фазозависимая стимуляция. Проведенные нами исследования с участием здоровых добровольцев показали, что мультисегментарная фазозависимая ЧЭССМ модулирует параметры ходьбы на беговой дорожке [13]. Недавно показано, что мультисегментарная ЧЭССМ безопасна и эффективна для регуляции постурального контроля у спинальных пациентов детского возраста [14], а также для восстановления ходьбы у пациента с полным моторным поражением СМ [15].

Цель данного исследования — изучить влияние фазозависимой ЧЭССМ на функцию ходьбы у больных с гемипарезом в восстановительном периоде после острого нарушения мозгового кровообращения.

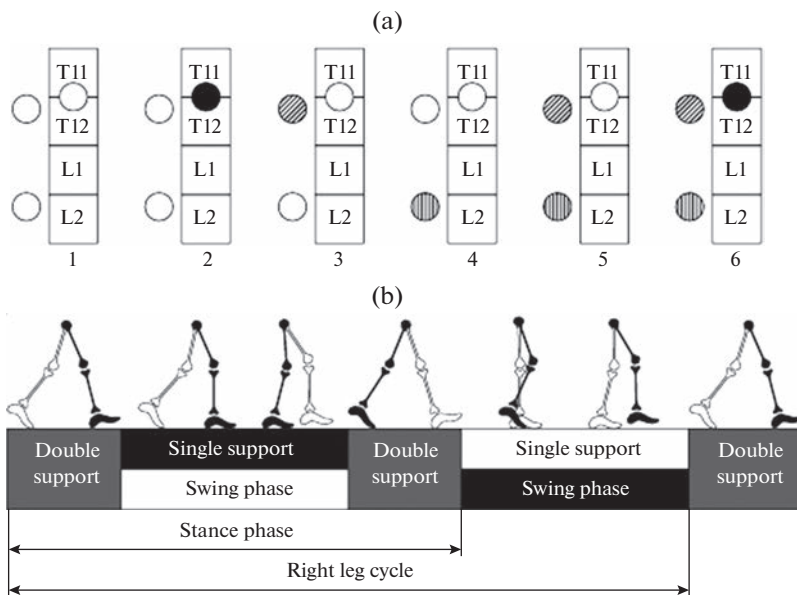


Рис. 1. (а) – Схема расположения стимулирующих электродов в разные этапы исследования. Расположение катодов показано относительно позвонков Т11, Т12, L1, L2. Катоды изображены кругами, белый фон – отсутствие стимуляции, черный фон – непрерывная стимуляция с частотой 30 Гц, косая и вертикальная штриховка – стимуляция в фазы переноса и опоры паретичной ноги с частотой 40 и 20 Гц. Цифры внизу – номера этапов исследования. (б) – Анализируемые циклы шага (по [17]). Черным цветом обозначена правая нога.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании участвовали 15 пациентов, женщины ($n = 4$) и мужчины, в возрасте от 33 до 79 лет (58.9 ± 14.3 лет; медиана 57.0 лет) после перенесенного инфаркта головного мозга ($n = 8$) или ишемического инсульта. Период после болезни – от 1 мес. до 1 года (5.1 ± 4.0 мес.; медиана 4.0 мес.). У всех пациентов диагностировали сопутствующие заболевания (гипертоническая болезнь, хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет и др.).

Для стимуляции использовали “Спинальный нейропротез” (“Косима”, Москва), включающий многоканальный стимулятор для ЧЭССМ и датчик для определения фаз переноса и опоры в шагательном цикле [16].

Нейропротез обеспечивает непрерывную ЧЭССМ на уровне позвонков Т11–Т12 и/или фазозависимую стимуляцию корешков СМ на уровне позвонков Т11 и L1 с пораженной стороны в зависимости от фазы движения (перенос/опора) этой конечности (рис. 1а). Электроды (катоды) для непрерывной стимуляции размещали по средней линии позвоночника между позвонками Т11–Т12. Ритмическая стимуляция осуществлялась через электроды, расположенные на паретичной стороне, латеральнее на ~2 см от средней линии позвоночника, по ходу корешков СМ. Два общих анода фиксировали симметрично над гребнями подвздошных костей. Подробно материалы и методы стимуляции с использованием неинвазивного спинального нейропротеза описаны в [13, 16]. Апробация “Спинального нейропротеза” на здоровых испытуемых – добровольцах [13] и на пациенте с полным мотор-

ным поражением спинного мозга [15] показала его эффективность в регуляции локомоторной активности человека.

Последовательность этапов исследования:

1. ходьба по тредбану без стимуляции (этап 1);
2. ходьба по тредбану, непрерывная ЧЭССМ на уровне T11–T12 позвонков, частота 30 Гц (этап 2);
3. ходьба по тредбану, стимуляция корешков СМ в области позвонка T12 на стороне пареза (активация флексорных моторных пулов) во время фазы переноса паретичной ноги, частота 40 Гц (этап 3);
4. ходьба по тредбану, стимуляция корешков СМ в области позвонка L1 на стороне пареза (активация экстензорных моторных пулов) во время фазы опоры паретичной ноги, частота 20 Гц (этап 4);
5. ходьба по тредбану, сочетание типов стимуляции 3 и 4 (этап 5);
6. ходьба по тредбану, сочетание типов стимуляции 2–4 (этап 6).

Схема расположения электродов в этапах исследования представлена на рис. 1а.

Интенсивность стимуляции каждому пациенту подбирали индивидуально, для каждого уровня стимуляции отдельно, сразу после начала ходьбы по беговой дорожке, увеличивая интенсивность по 1 мА. Стимуляция не должна была вызывать неприятных или болезненных ощущений.

Биомеханическое исследование функции ходьбы проводили с помощью комплекса “Стэдис” (“Нейрософт”, Иваново). Инерционные сенсоры “Нейросенс”, входящие в состав “Стэдис”, фиксировали на крестце, а также на обеих конечностях на наружной поверхности средней трети бедра, наружной лодыжке и подъеме стопы. Регистрировали биомеханические параметры походки: скорость ходьбы, длина шага, углы в суставах и др. Положение калибровки соответствовало положению пациента стоя прямо с выпрямленными тазобедренными и коленными суставами. На каждом этапе исследования пациент выполнял не менее 30 циклов шага (ЦШ) – периода от начала контакта с опорой данной ноги до следующего такого же контакта этой же ногой (рис. 1б). Используя программные возможности “Стэдис”, определяли длительности фаз шага для каждой ноги относительно длительности ЦШ одноименной ноги, принимая длительность ЦШ каждой ноги за 100%. Пространственные и кинематические параметры походки также определялись программно для каждой ноги в пределах ЦШ. Асимметрию параметров, характеризующих фазы ходьбы, считали как модуль разности между значениями параметра на здоровой и паретичной стороне.

Для оценки влияния условий стимуляции на кинематику походки проводили сравнение параметров ходьбы при стимуляционных воздействиях и параметров ходьбы без стимуляции (параметры, зарегистрированные на этапах 2–6, сравнивали с параметрами, полученными на этапе 1).

Статистический анализ проводили в программе Excel. Достоверность различий показателей определяли с применением парного t -критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0.05$. Нормальность распределений проверялась по критерию Шапиро–Уилки. Достоверность коэффициентов корреляции определялась по критерию Пирсона на уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скорость ходьбы по беговой дорожке без ЧЭССМ варьировала в диапазоне 0.16–0.38 м/с (0.27 ± 0.07 м/с). При ходьбе с ЧЭССМ скорость ходьбы по беговой дорожке достоверно не отличалась от ходьбы без стимуляции (табл. 1). Другие параметры ходьбы зависели от условия стимуляции. Средние значения кинематических параметров по группе представлены в табл. 1.

Таблица 1. Биомеханические параметры ходьбы для паретичной и здоровой ноги (верхний и нижний ряд значений соответственно)

Параметры	Этап 1	Этап 2	Этап 3	Этап 4	Этап 5	Этап 6
ПО (% [#])	71.3 ± 1.0 74.4 ± 1.3	72.3 ± 1.1 75.0 ± 1.2	72.3 ± 1.1 75.3 ± 2.2	72.5 ± 1.3 76.1 ± 1.2	72.5 ± 1.3 75.7 ± 1.1	72.7 ± 1.3 75.8 ± 1.3
Асимм. ПО (%)	4.5 ± 1.4	3.9 ± 1.3	3.6 ± 1.2*	4.6 ± 1.4	4.1 ± 1.1	4.0 ± 1.3
ОО (% [#])	25.7 ± 1.1 29.0 ± 1.1	25.4 ± 1.1 28.3 ± 1.2	24.6 ± 1.1* 27.5 ± 1.1	24.3 ± 1.2* 27.8 ± 1.2	24.7 ± 1.1 27.9 ± 1.3	24.6 ± 1.2* 27.7 ± 1.2
Асимм. ОО (%)	5.2 ± 1.5	3.7 ± 1.3*	3.6 ± 1.2	4.4 ± 1.3	4.1 ± 1.1	3.9 ± 1.3*
ДО (% [#])	44.8 ± 1.8 44.5 ± 1.8	46.7 ± 1.8* 46.6 ± 1.8	47.8 ± 1.9* 47.9 ± 1.9*	48.3 ± 1.9* 48.3 ± 1.8*	47.9 ± 2.0* 48.1 ± 1.9*	48.1 ± 2.0* 48.3 ± 2.1*
Асимм. ДО (%)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0
НВД (% [#])	46.5 ± 1.2 53.0 ± 1.6	49.7 ± 1.5 53.0 ± 1.4	47.5 ± 1.4 53.3 ± 1.4	47.3 ± 1.6 53.7 ± 1.4	47.5 ± 1.5 53.5 ± 1.4	47.0 ± 1.6 52.9 ± 1.5
Асимм. НВД (%)	7.9 ± 2.4	6.7 ± 2.6*	7.0 ± 2.5*	8.2 ± 2.6	8.1 ± 2.4	7.9 ± 2.6
ДЦШ (см)	48.4 ± 3.5	52.1 ± 4.00	54.1 ± 3.9*	54.5 ± 4.0*	54.8 ± 3.8*	54.7 ± 4.2*
СХ (м/с)	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
ВПН (см)	9.4 ± 0.8 11.7 ± 0.9	9.7 ± 0.7 11.8 ± 0.8	9.8 ± 0.7 11.6 ± 0.8	9.9 ± 0.7 11.8 ± 0.8	9.9 ± 0.7 11.8 ± 0.8	10.1 ± 0.7 11.6 ± 0.9
ТБС (град.)	23.0 ± 1.9 29.3 ± 1.3	23.9 ± 1.9 29.9 ± 1.3	23.2 ± 1.9 30.7 ± 1.6	24.0 ± 2.0 30.5 ± 1.6	23.7 ± 2.0 30.3 ± 1.6	23.9 ± 2.0 30.7 ± 1.8
ТМР (%)	52.8 ± 1.5 58.0 ± 1.5	53.1 ± 2.3 57.8 ± 1.4	55.3 ± 1.4* 58.5 ± 1.3	55.3 ± 1.7* 59.9 ± 1.4*	54.9 ± 1.7* 59.9 ± 1.3*	55.3 ± 1.7* 59.2 ± 1.4*
ТМС (%)	88.5 ± 1.5 89.3 ± 0.8	90.0 ± 1.2 91.3 ± 1.1	89.8 ± 1.2 91.7 ± 1.2	90.0 ± 1.1 91.9 ± 1.1	90.1 ± 1.3 92.5 ± 1.0	90.1 ± 1.1 92.1 ± 1.1
КС (град.)	38.9 ± 3.7 48.9 ± 2.1	39.9 ± 3.6* 48.8 ± 1.7	39.3 ± 3.5 48.2 ± 1.7	39.6 ± 3.4 48.3 ± 1.8	39.0 ± 3.5 48.0 ± 1.8	39.9 ± 3.6 47.9 ± 1.9
КСМР (%)	40.9 ± 4.7 39.1 ± 1.9	39.6 ± 5.0 42.9 ± 1.8	40.1 ± 5.2 42.3 ± 2.0	41.4 ± 5.2 42.3 ± 1.9	42.2 ± 5.3 42.8 ± 2.0	41.5 ± 5.5 43.3 ± 2.0*
КСС (%)	76.5 ± 1.1 77.3 ± 2.9	77.8 ± 0.8 76.4 ± 2.9	77.5 ± 0.9 77.5 ± 3.0	77.2 ± 1.1 78.1 ± 2.8	76.9 ± 1.1 77.5 ± 3.0	77.6 ± 1.0 77.5 ± 3.0
ГСС (град)	15.4 ± 2.0 15.1 ± 1.2	17.1 ± 2.1* 15.7 ± 1.1	18.1 ± 2.0* 16.7 ± 1.5	18.4 ± 2.0* 17.3 ± 1.4*	19.0 ± 2.0* 17.1 ± 1.5*	18.3 ± 2.1* 17.3 ± 1.3*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Обозначения: [#] – значения в % относительно ЦШ. * – достоверные изменения параметров по сравнению со значениями на 1-м этапе исследования

Непрерывная стимуляция по средней линии спинного мозга на уровне T11–T12 (активация локомоторных сетей нижних конечностей, этап 2) увеличивала суммарный период двойной опоры паретичной ноги на 2%, что привело к достоверному уменьшению асимметрии одиночной опоры и асимметрии начала второй двойной опоры. Непрерывная стимуляция на уровне T11–T12 достоверно увеличила амплитуду движений в суставах паретичной ноги: на 1 градус в коленном суставе и на 2 градуса в голеностопном суставе.

Фазозависимая стимуляция корешков на стороне пареза на уровне T11–T12 (активация сгибателей, этап 3) приводила к увеличению суммарных периодов двойной опоры здоровой и паретичной конечности на 3%, период одиночной опоры на па-

ретичной стороне уменьшился на 1%. Это отразилось в уменьшении асимметрии периода опоры и начала второй двойной опоры на 1%. Амплитуда движений в голеностопном суставе паретичной ноги увеличилась на 2.5 градуса. Длина шага достоверно увеличилась на 5 см, вероятно, это связано с удлинением фазы максимального разгибания тазобедренного сустава паретичной ноги (на 2.5%).

Фазозависимая стимуляция корешков на стороне пареза на уровне L1–L2 (активация разгибателей, этап 4) вызывала увеличение суммарных периодов двойной опоры здоровой и паретичной конечности на 3.5%, уменьшение периода одиночной опоры на 1%. Амплитуды движений в голеностопных суставах паретичной и здоровой ног увеличились на 2–3 градуса. Зарегистрировано увеличение длины шага на 6 см и удлинение фазы максимального разгибания тазобедренного сустава на паретичной и здоровой стороне на 2–3%.

Фазозависимая стимуляция корешков на стороне пареза на уровне L1–L2 и T11–T12 (этап 5). Зарегистрировано увеличение суммарных периодов двойной опоры здоровой и паретичной конечности на 3%, увеличение амплитуды движений в голеностопных суставах паретичной и здоровой ног на 2–3 градуса. Длина шага увеличилась на 6 см, это сопровождалось удлинением фазы максимального разгибания тазобедренного сустава на паретичной и здоровой стороне на 2%.

Непрерывная стимуляция на уровне T11–T12 и фазозависимая стимуляция корешков на стороне пареза на уровне L1–L2 и T11–T12 (этап 6). Получено увеличение суммарных периодов двойной опоры здоровой и паретичной конечности на ~3.5%, увеличение периода одиночной опоры на паретичной стороне на 1% и уменьшение асимметрии одиночной опоры на 1%. Амплитуды движений в голеностопных суставах паретичной и здоровой ног увеличились на 2–3 градуса. Длина шага увеличилась на 6 см, это сопровождалось удлинением фазы максимального разгибания тазобедренного сустава на паретичной и здоровой стороне на 2% и удлинением фазы максимального разгибания коленного сустава здоровой ноги на 4%.

Однонаправленные изменения параметра в группе пациентов являются важным показателем эффективности воздействия стимуляции. Эти данные представлены на рис. 2. Можно видеть, что увеличение размаха движений в суставах и увеличение длины цикла шага наблюдались у большинства пациентов, их число возрастало при ритмической стимуляции. Увеличение высоты подъема ноги отмечено на 5-х и 6-х этапах стимуляции у 11 пациентов.

Для выяснения причин увеличения ДЦШ была вычислена корреляция между ДЦШ и амплитудами углов движения в суставах для паретичной и здоровой ноги, поскольку цикл шага складывается из движений обеих ног. Результаты представлены на рис. 3. На рисунке показано, что при ритмической стимуляции сгибателей (этап 3) связь между ДЦШ и движениями в суставах паретичной и здоровой ноги становится схожей. В этом случае достоверная корреляция установлена между ДЦШ и тазобедренным и ДЦШ и коленным суставом для обеих ног так же, как и на этапе 5 — при стимуляции сгибателей и разгибателей. На основании этих данных можно заключить, что ДЦШ в большей мере определяют тазобедренный и коленный суставы, чем голеностопный сустав.

Также была вычислена корреляция между ВПН и размахом движения в суставах. Результаты представлены на рис. 4. При стартовой ходьбе без стимуляции коэффициенты корреляции составляли 0.52 для ТБС, 0.84 для КС и 0.56 для ГСС. Увеличение размаха движений в ГСС под влиянием стимуляции приводило к возрастанию связи между ГСС и ВПН (рис. 4), наибольший коэффициент корреляции между этими величинами при стимуляции сгибателей составлял 0.78, в то время как корреляции с ТБС составляли 0.64 и 0.59 на 4-м и 6-м этапе соответственно. Из рис. 4. можно видеть большее влияние КС и ГСС на ВПН, чем ТБС, как для паретичной, так и для здоровой ноги. Результаты могут являться подтверждением того, что

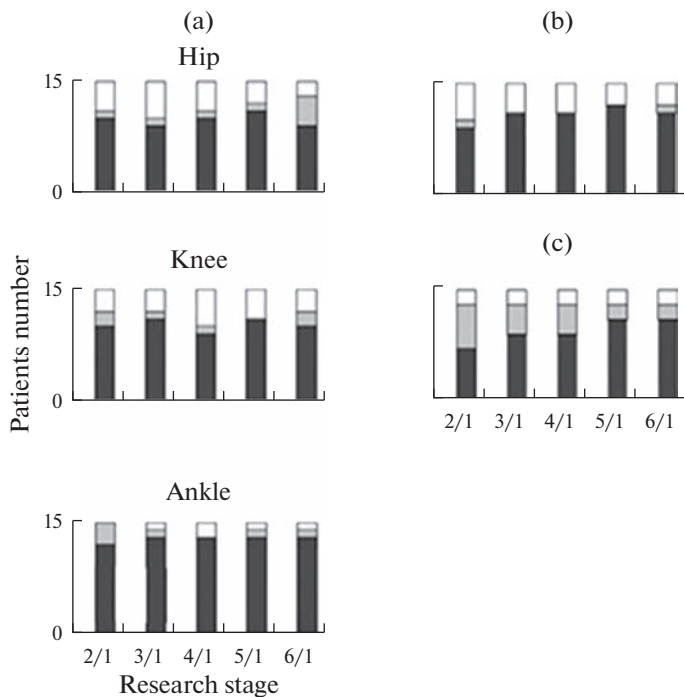


Рис. 2. Распределение количества пациентов с изменениями параметров: амплитуды движения в суставах (а), длины цикла шага (б) и высоты подъема (с) паретичной ноги на разных этапах стимуляции (2–6) относительно значения параметра при ходьбе без стимуляции (этап 1). Hip – тазобедренный, Knee – коленный, Ankle – голеностопный сустав. По оси абсцисс – номер этапа стимуляции. По оси ординат – количество пациентов. Черный цвет – увеличение значения параметра, серый – значение параметра осталось без изменения, белый – уменьшение значения параметра.

ДЦШ и ВПН определяются движениями во всех трех суставах, однако ВПН больше связана с движениями в коленном и голеностопном суставах, в то время как ДЦШ – в коленном и тазобедренном суставах. Схожесть этой связи для паретичной и здоровой ноги отражает влияние стимуляции (рис. 3–4), что наиболее выражено при фазозависимой стимуляции (рис. 3), а также при сочетании фазозависимой и непрерывной стимуляции (рис. 4).

Следует отметить наличие индивидуальных особенностей пациентов, известно, что даже в норме некоторые люди при ходьбе прилагают наибольшие усилия в голеностопном суставе, другие больше задействуют коленный сустав [18], а после перенесенного инсульта, вероятно, будет иметь значение подвижность того или иного сустава. Пример зависимости ВПН от размаха движений в суставах для одного из пациентов приведен на рис. 5. Можно видеть, что увеличение высоты подъема паретичной ноги обусловлено увеличением размаха движений во всех суставах, наиболее выраженная связь наблюдается с ГСС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Апробация “Спинального нейропротеза” на здоровых испытуемых – добровольцах [13] и на пациенте с полным моторным поражением спинного мозга [15] показала его эффективность в регуляции локомоторной активности человека.

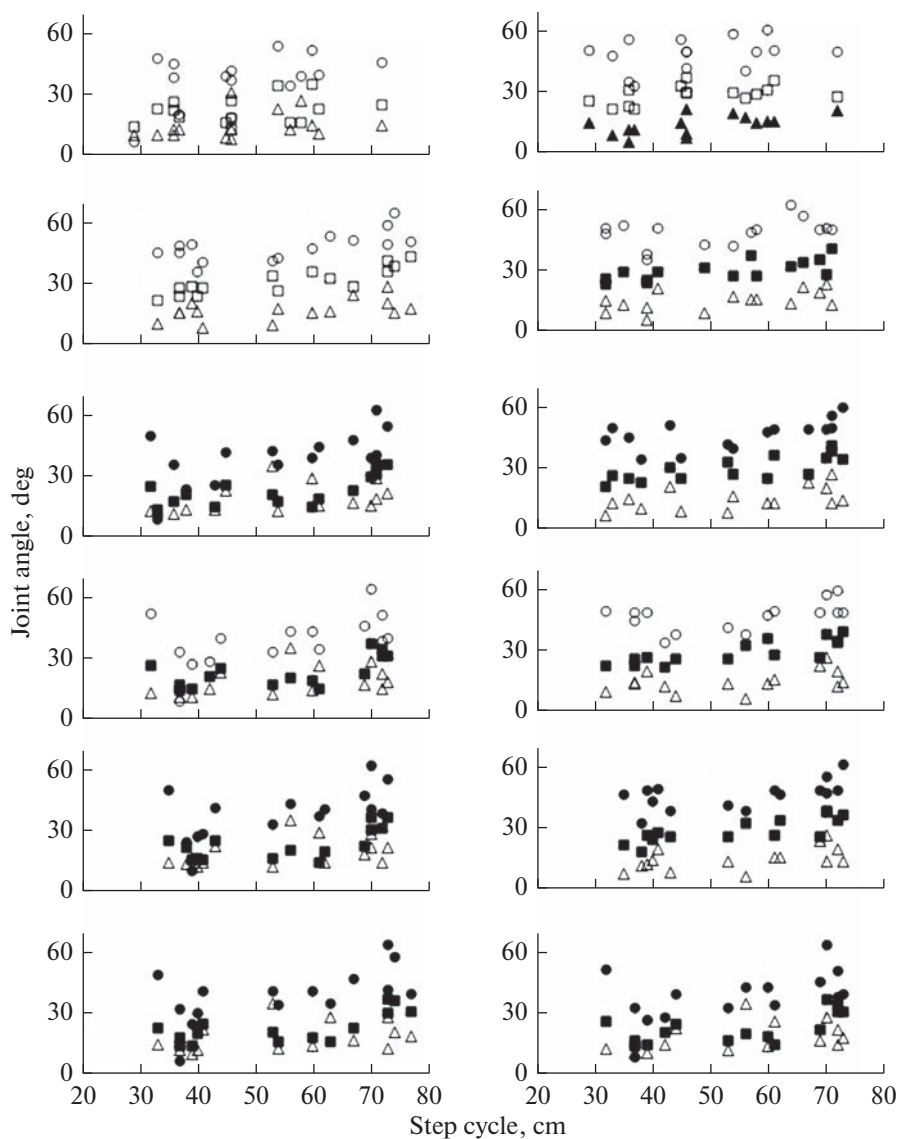


Рис. 3. Зависимости углов в тазобедренном (□), коленном (○) и голеностопном (△) суставах от ДЦШ при разных условиях стимуляции. Сверху вниз – этапы исследования 1–6. Слева – паретичная нога, справа – здоровая нога. Черные символы указывают на достоверную корреляцию между величиной угла в суставе и ДЦШ.

У 80% постинсультных пациентов нарушение походки формируется уже в первые 3 мес. после заболевания [19]. Одним из ее проявлений является укорочение длины шага. Согласно полученным результатам, на разных этапах применения ЧЭССМ длина шага увеличивалась у 60–73% пациентов, при ритмической чередующейся стимуляции сгибателей и разгибателей наблюдалось максимальное увеличение. Скорость ходьбы при этом мало изменялась и была задана скоростью беговой дорожки, увеличение скорости дорожки по просьбе пациента может быть связано с

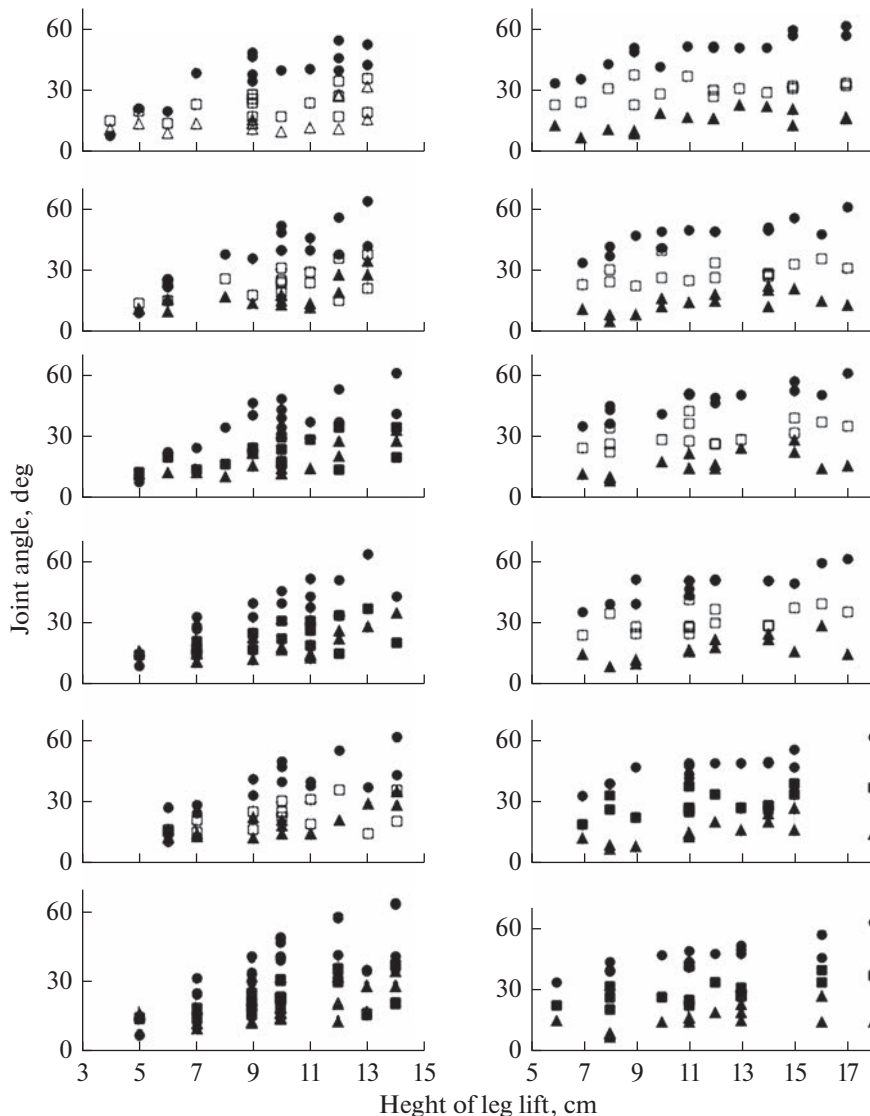


Рис. 4. Зависимости углов в тазобедренном (□), коленном (○) и голеностопном (△) суставах от ВПН при разных условиях стимуляции. Сверху вниз – этапы исследования 1–6. Слева – паретичная нога, справа – здоровая нога. По горизонтали – ВПН, см, по вертикали – амплитуда изменений суставных углов, градусы. Черные символы указывают на достоверную корреляцию между изменением угла и ВПН.

увеличением ДЦШ. Одним из распространенных осложнений после инсульта является так называемая свисающая стопа (foot drop), которая формируется в результате парезов и параличей мышц, участвующих в подъеме передней части стопы, и слабости разгибателя голеностопного сустава [20]. Наши результаты показывают, что ЧЭССМ действует прежде всего на голеностопный сустав, под действием ЧЭССМ размах движений в голеностопном суставе увеличивался у 86% пациентов, среднее по группе достоверно отличалось от среднего без стимуляции, для

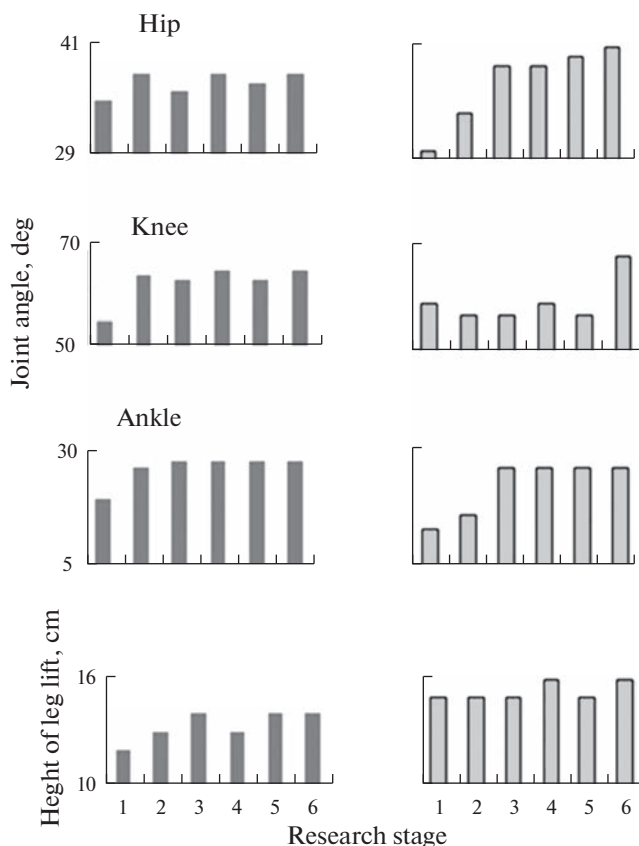


Рис. 5. Изменение средних значений амплитуды движения в суставах и высоты подъема ноги в ходе эксперимента у пациента БВ. Слева – паретичная нога, справа – здоровая нога. По оси X – номер этапа исследования. По оси Y – амплитуды изменений суставных углов, градусы; ВПН, см. Сверху вниз: суставные углы для ТБС, КС, ГСС и ВПН.

других суставов подобного эффекта не наблюдалось, хотя на уровне тенденции присутствовало во всех суставах. Так, во время ходьбы по беговой дорожке без стимуляции размах движений в голеностопном суставе на паретичной стороне составлял в среднем 15.4 ± 2.0 град., увеличение этого параметра наблюдалось на всех этапах применения ЧЭССМ, максимально при стимуляции сгибателей и разгибателей (этап 5) на 3.6 град. При включении стимуляции разгибателей достоверное увеличение наблюдалось на 2 град. и на здоровой стороне. В исследовании, проведенном на здоровых испытуемых [13], было получено достоверное увеличение амплитуды сгибания в голеностопном суставе, в среднем по группе на 24%, в нашем исследовании увеличение размаха движений в ГСС составляло 23%. Увеличение коэффициентов корреляции между движениями в суставах и ДЦШ во время ЧЭССМ показывает, что при этом возрастает связь данного параметра с работой ГСС. Схожие результаты были получены ранее: при увеличении длины шага углы в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах возрастали, особенно амплитуда разгибания в голеностопном суставе [21].

Переход через препятствие является проблематичным для постинсультных пациентов, поскольку высота подъема паретичной конечности обычно меньше, чем

здоровой. Важным результатом действия ЧЭССМ является повышение подъема ноги под действием стимуляции. Если при непрерывной стимуляции увеличение ВПН отмечено у 46% пациентов, то при ритмической стимуляции — у 60–90% пациентов. Мы попытались ответить на вопрос, какой сустав в большей степени определяет подъем ноги у пациентов с гемипарезом. При проведении аналогичных исследований с участием здоровых испытуемых было показано, что подъем ноги определяется работой всех суставов, при этом увеличение амплитуды угла в ТБС с увеличением ВПН отмечалось у всех участников [13]. Наши результаты показывают, что в подъеме ноги у постинсультных пациентов участвуют все суставы, так же, как и у здоровых людей, однако с большим участием КС и ГСС. Схожесть корреляционных зависимостей ДЦШ и ВПН с движениями в суставах для паретичной и здоровой ноги подтверждает возможность регуляции кинематических параметров ходьбы у постинсультных пациентов. Для обоснованного выбора методов лечения и эффективных технологий реабилитации следует учитывать объективные показатели ходьбы [22], анализ индивидуальных особенностей важен в этом случае для каждого пациента.

Слабость мышц, обеспечивающих движения голеностопного сустава и стопы, приводит к снижению скорости ходьбы и асимметрии [20]. Одним из важных критериев эффективности проводимой реабилитации можно считать уменьшение асимметрии при ходьбе [22]. По нашим данным уменьшение асимметрии при ЧЭССМ установлено для таких фаз шага как ПО, ОО и НВД, при этом более выраженные изменения наблюдались при ритмической стимуляции. Так, при стимуляции сгибателей наблюдалось уменьшение асимметрии периода опоры у 13 пациентов, в среднем по группе с 4.48 до 3.61%, уменьшение асимметрии одиночной опоры с 5.19 до 3.71 и 3.88 наблюдалось на этапах 2 и 6 соответственно. При непрерывной стимуляции (этап 2) асимметрия НВД уменьшилась с 7.88 до 6.71, а при стимуляции сгибателей (этап 3) до 6.95. По совокупности влияния на асимметрию фаз шага наибольший вклад вносила стимуляция сгибателей (табл. 1).

Одним из широко применяемых методов реабилитации после инсульта является функциональная электростимуляция мышц (ФЭС), в частности, передней большеберцовой и малоберцовой мышц паретичной конечности при ходьбе во время фазы переноса ноги. При этом могут использоваться как имплантируемые, так и накладываемые электроды. Использование неинвазивной ФЭС у неврологических пациентов оказало положительный эффект на движения в ГСС, а также на увеличение ВПН во время фазы переноса ноги в цикле шага [23]. По мнению Витензона, одного из основоположников ФЭС, цель этой методики состоит в том, чтобы не только восстановить или улучшить биомеханику ходьбы и функциональное состояние мышц, но и внести определенную коррекцию в работу локомоторных центров [24]. Применение ЧЭССМ направлено прежде всего на локомоторные центры спинного мозга. Отличие ФЭС от ЧЭССМ заключается в том, что в первом случае стимулируется нервно-мышечный аппарат, а во втором — воздействие адресуется к задним корешкам, рефлекторно активируя постуральные и локомоторные сети спинного мозга, а при фазовой стимуляции и сгибательные/разгибательные моторные пулы мышц ног. Использование фазовой стимуляции позволяет модулировать их активность в рамках шагательного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное применение ЧЭССМ у постинсультных пациентов вызывало положительные изменения кинематических параметров шага. Ритмическая стимуляция, главным образом воздействуя на фазы шага, приводила к уменьшению асимметрии ПО, ОО, и НВД. При ритмической стимуляции у 80% пациентов наблюда-

лось увеличение ВПН, что связано с увеличением подвижности в ГСС и КС. Достоверное увеличение ДЦШ определялось в большей степени движением ТБС и КС. При сочетании непрерывной и ритмической стимуляции увеличение размаха движения во всех суставах было максимальным. При такой стимуляции показана схожесть корреляционных зависимостей ДЦШ и ВПН с движениями в суставах для паретичной и здоровой ноги, что свидетельствует о возможности ЧЭССМ регулировать кинематические параметры ходьбы у постинсультных пациентов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены биоэтическим комитетом Федерального научного клинического центра ФМБА России (Москва). Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по государственному заданию по теме № 0113-2019-0006 (63.4.) и по государственному заданию ФМБА России (НИР “Нейромодуляция-приматы”, шифр 20.002.22.800; НИР “Биомеханика-нестабильность”, шифр 20.004.21.800).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.В.С. — проведение клинических исследований, участие в обсуждении результатов. И.Н.Б. — анализ и интерпретация данных, участие в написании статьи. Н.А.Щ. — обзор публикаций по теме статьи, подготовка рисунков. А.А.Г., С.Н.К. — проведение клинических исследований. Т.Р.М. — разработка дизайна исследования, участие в написании статьи. Ю.П.Г. — разработка дизайна исследования, обсуждение результатов, финальной версии статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feigin V, Norrving B, Mensah G (2017) Global burden of stroke. *Circ Res* 120: 439–448. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308413>
2. Хатькова СЕ, Костенко ЕВ, Акулов МА, Дягилева ВП, Николаев ЕА, Орлова АС (2019) Со-временные аспекты патофизиологии нарушений ходьбы у пациентов после инсульта и особенности их реабилитации. *Журн неврол психиатр им СС Корсакова* 119: 43–50. [Khatkova SE, Kostenko EV, Akulov MA, Diaghileva VP, Nikolaev EA, Orlova AS (2019) Modern aspects of the pathophysiology of walking disorders in patients after stroke and features of their rehabilitation. *J Neurol Psychiatry named after SS Korsakov* 119: 43–50. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro20191191214>
3. Angeli CA, Boakye M, Morton RA, Vogt J, Benton K, Chen Y, Ferreira CK, Harkema SJ (2018) Recovery of over-ground walking after chronic motor complete spinal cord injury. *N Engl J Med* 379: 1244–1250. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803588>
4. Darrow D, Balsler D, Netoff Th, Krassioukov A, Phillips A, Parr A, Samadani U (2019) Epidural Spinal Cord Stimulation Facilitates Immediate Restoration of Dormant Motor and Autonomic Supraspinal Pathways after Chronic Neurologically Complete Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 36: 2325–2336. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6006>
5. Gerasimenko Y, Gorodnichev R, Moshonkina T, Sayenko D, Gad P, Edgerton VR (2015) Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans. *An Phys Rehabil Med* 58: 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.05.003>

6. Hofstoetter U, Freundl B, Binder H, Minassian K (2018) Common neural structures activated by epidural and transcutaneous lumbar spinal cord stimulation: elicitation of posterior root-muscle reflexes. *PLoS One* 13: 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192013>
7. Danner S, Hofstoetter U, Ladenbauer J, Rattay F, Minassian K (2011) Can the human lumbar posterior columns be stimulated by transcutaneous spinal cord stimulation? A modeling study. *J Artif Organs* 35: 257–282.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01213.x>
8. Minassian K, Perret I, Hofstoetter U (2021) Epidural and Transcutaneous Spinal Cord Stimulation Strategies for Motor Recovery After Spinal Cord Injur. In: *Neuroprosthetics and Brain-Computer Interfaces in Spinal Cord Injury* 167–190.
9. Rath M, Vette AH, Ramasubramaniam S, Li K, Burdick J, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Sayenko DG (2018) Trunk Stability Enabled by Noninvasive Spinal Electrical Stimulation after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 21: 2540–2553.
<https://doi.org/10.1089/neu.2017.5584>
10. Gad P, Gerasimenko Y, Zdunowski S, Turner A, Sayenko D, Lu DC, Edgerton VR (2017) Weight bearing over-ground stepping in an exoskeleton with non-invasive spinal cord neuromodulation after motor complete paraplegia. *Front Neurosci* 11: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00333>
11. Seáñez I, Capogrosso M (2021) Motor improvements enabled by spinal cord stimulation combined with physical training after spinal cord injury: review of experimental evidence in animals and humans. *Bioelectron Med* 7: 16
<https://doi.org/10.1186/s42234-021-00077-5>
12. Балькин МВ, Якупов РН, Машин ВВ, Котова ЕЮ, Балькин ЮМ, Герасименко ЮП (2017) Влияние неинвазивной электрической стимуляции спинного мозга на локомоторные функции пациентов с двигательными нарушениями центрального генеза. *Вопр курортол физиотер и лечебн физкульт* 4: 4–9. [Balykin MV, Yakupov RN, Mashin VV, Kotova EY, Balykin YuM, Gerasimenko UP (2017) The effect of non-invasive electrical spinal cord stimulation on locomotor functions of patients with movement disorders of central origin. *Qurortol physiotherap and therap physical education* 4: 4–9. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/kurort20179444-9>
13. Gorodnichev RM, Pukhov AM, Moiseev SA, Ivanov SM, Markevich VV, Bogacheva IN, Grishin AA, Moshonkina TR, Gerasimenko YP (2021) Regulation of Stepping Phases During Noninvasive Electrical Spinal Cord Stimulation. *Human Physiol* 47: 60–69.
<https://doi.org/10.31857/S0131164621010057>
14. Keller A, Singh G, Sommerfeld JH, King M, Parikh P, Ugiliweneza B, D'Amico J, Gerasimenko Y, Behrman AL (2021) Noninvasive spinal stimulation safely enables upright posture in children with spinal cord injury. *Nat Commun* 12: 5850.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26026-z>
15. Siu R, Brown EH, Mesbah S, Gonnelli F, Pisolkar T, Edgerton VR, Ovechkin AV, Gerasimenko YP (2022) Novel Noninvasive Spinal Neuromodulation Strategy Facilitates Recovery of Stepping after Motor Complete Paraplegia. *J Clin Med* 11: 3670.
<https://doi.org/10.3390/jcm11133670>
16. Grishin AA, Bobrova EV, Reshetnikova VV, Moshonkina TR (2021) A System for Detecting Stepping Cycle Phases and Spinal Cord Stimulation as a Tool for Controlling Human Locomotion. *Biomed Eng* 54: 312–316.
17. Скворцов ДВ (2007) Диагностика двигательной патологии инструментальными методами: анализ походки, стабилметрия. Науч-мед фирма МБН/М 617. [Skvortsov DV (2007) Diagnosis of motor pathology by instrumental methods mi: gait analysis, stabilometry. Scient med firm MBN/M 617. (In Russ)].
18. Simonsen EB (2014) Contributions to the understanding of gait control. *Dan Med J* 61: B4823.
19. Duncan PW, Zorowitz R, Bates B, Choi JY, Glasberg JJ, Graham GD, Katz RC, Lamberty K, Reker D (2005) Management of Adult Stroke Rehabilitation Care: a clinical practice guideline. *Stroke* 36: 100–143.
<https://doi.org/10.1161/01.str.0000180861.54180.ff>
20. Гурьянова ЕА, Ковальчук ВВ, Тихоплав ОА, Литвак ФГ (2020) Функциональная электро-стимуляция при восстановлении ходьбы после инсульта. *Физ реабилит мед, мед реабилит* 2: 244–262. [Guryanova EA, Kovalchuk VV, Tikhoplav OA, Litvak FG (2020) Functional electrical stimulation during recovery of walking after stroke. *Phys rehabilit med, med rehabilitat* 2: 244–262. (In Russ)].
<https://doi.org/10.36425/rehab34831>
21. Баскакова НВ, Витензон АС (1975) Влияние темпа и длины шага на основные параметры ходьбы человека. *Биомеханика* 13: 242–247. [Baskakova NV, Vitenzon AS (1975) The influence of pace and step length on the basic parameters of human walking. *Biomechanics* 13: 242–247. (In Russ)].

22. *Скворцов ДВ, Королева СВ* (2019) Динамика параметров ходьбы в процессе реабилитации после эндопротезирования коленного сустава. Научно-практ ревматол 57: 704–707. [*Skvortsov DV, Koroleva SV* (2019) Changes in gait parameters during rehabilitation after total knee arthroplasty. *Scient Pract Rheumatol* 57: 704–707. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2019-704-707>
23. *Gervasoni E, Parelli R, Uszynski M, Crippa A, Marzegan A, Montesano A, Cattaneo D* (2017) Effects of functional electrical stimulation on reducing falls and improving gait parameters in multiple sclerosis and stroke. *PMR* 4: 339–347.e1. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2016.10.019>
24. *Витензон АС, Петрушанская КА* (2010) Физиологические обоснования метода искусственной коррекции движений посредством программируемой электростимуляции мышц при ходьбе. Рос журн биомехан 14: 7–27. [*Vitenzon AS, Petrushanskaya KA* (2010) Physiological substantiations of the method of artificial correction of movements by means of programmable electrical stimulation of muscles during walking. *Rus J Biomechan* 14: 7–27. (In Russ)].

Electrical Stimulation of the Spinal Cord as a Method of Regulation Walking Kinematics in Post-Stroke Patients

I. N. Bogacheva^{a, *}, N. A. Shcherbakova^a, T. R. Moshonkina^a, A. A. Grishin^a,
D. V. Skvortsov^{b, c}, S. N. Kaurkin^{b, c}, and Yu. P. Gerasimenko^a

^a*Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia*

^b*Federal Research Clinical Center of the FMBA of Russia, Moscow, Russia*

^c*Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the FMBA of Russia, Moscow, Russia*

**e-mail: bogacheva@infran.ru*

Multisegmental transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord (scTS), affecting spinal neural networks and motor pools of leg muscles, was used to correct treadmill walking in stroke patients. The study involved 15 patients in the recovery period after acute cerebrovascular accidents. A noninvasive spinal neuroprosthesis with a multichannel stimulator and a system for detecting phases of the walking cycle (“Cosima”, Russia) was used to activate motor pools of leg flexor muscles in the transfer phase, activation of motor pools of extensor muscles in the stance phase in combination with continuous activation of spinal locomotor networks. Using of scTS during walking on a treadmill increased the amplitude of movements in the ankle joint and the length of the step cycle on the paresis side, as well as decreased the asymmetry of both legs in the phases of the step. The height of the paretic leg lift increased in 80% of patients. With a combination of continuous and phase-dependent stimulation, the increase in the range of motion in the joints was maximal compared to phase-dependent or only constant stimulation. The obtained data demonstrate that the proposed algorithm of the scTS modulates the parameters of walking movements in patients with the consequences of cerebral circulation accidents and can be considered as a promising method of motor rehabilitation.

Keywords: spinal cord, electrical stimulation, stroke, walking, neuroprosthesis

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
АГОНИСТА $\alpha 2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МАФЕДИНА НА МОДЕЛИ
ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

© 2023 г. Ю. И. Сысоев^{1, 2, 3, 4, *}, М. В. Шустов¹, В. А. Приходько^{1, 4},
Д. Д. Шиц¹, М. М. Пучик¹, С. В. Оковитый^{1, 4}

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

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

⁴Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: susoyev92@mail.ru

Поступила в редакцию 18.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Неврологические нарушения, возникающие вследствие перенесенных травматических, сосудистых или нейродегенеративных заболеваний головного мозга, имеют высокую распространенность во всем мире. Среди таких нарушений можно выделить двигательные, когнитивные и ментальные расстройства, значительно снижающие трудовую и социальную активность больных. Это обуславливает необходимость поиска и разработки новых эффективных нейропротекторных препаратов. В ранее проведенных исследованиях показано, что пиримидиновый агонист $\alpha 2$ -адренорецепторов мафедина демонстрирует высокую эффективность в качестве средства коррекции неврологического дефицита на модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс. Несмотря на то, что результаты предыдущих исследований говорят в пользу активации этим фармакологическим агентом $\alpha 2$ -адренорецепторов как основного механизма нейропротекторного действия, поиск дополнительных молекулярных мишеней является важным этапом разработки лекарственного препарата, который мог бы использоваться в клинической практике. В настоящей работе с помощью метода ПЦР в реальном времени было изучено влияние курсового 7-дневного введения мафедина в дозе 2.5 мг/кг на уровень экспрессии генов нейротрофического фактора мозга (BDNF), медиаторов воспаления интерлейкинов ИЛ-1 β , -6 и фактора некроза опухоли ФНО- α , а также подтипов $\alpha 2$ -адренорецепторов $\alpha 2_A$, $\alpha 2_B$ и $\alpha 2_C$ в коре головного мозга крыс, перенесших ЧМТ. Травматическое поражение моделировали методом контролируемого кортикального удара по открытому участку зоны сенсомоторной коры левого полушария головного мозга. Поведенческие изменения травмированных животных оценивали в тесте “Открытое поле”, а двигательную функцию передних и задних конечностей – в тестах “Стимулирование конечностей”, “Цилиндр” и “Сужающаяся дорожка”. Проведенными исследованиями установлено, что ЧМТ вызывает у крыс выраженные двигательные нарушения, а также снижает поисково-исследовательскую активность. Также у травмированных животных на 7-е сутки после операции происходит снижение уровня экспрессии всех анализируемых генов, при этом снижение наиболее выражено в контрлатеральном (здоровом) полушарии. Курсовое введение мафедина в дозе 2.5 мг/кг оказывало умеренное стимулирующее действие на поведение крыс с ЧМТ, уве-

личивая их поисково-исследовательскую активность по сравнению с травмированными животными без лечения, а также снижало степень сенсомоторного дефицита задней контрлатеральной конечности в тесте “Сужающаяся дорожка”. Анализ уровня экспрессии генов показал, что изучаемое соединение способно подавлять экспрессию генов $\alpha_2\text{B}$ -адренорецепторов, ФНО- α и ИЛ-6 в травмированном полушарии. При этом, в отличие от животных с ЧМТ без лечения, у крыс, которым вводили мафедин, уровень экспрессии генов $\alpha_2\text{B}$ -адренорецепторов и ИЛ-1 β был выше в здоровом полушарии, чем в травмированном. Полученные результаты подтверждают ранее продемонстрированную нейропротекторную активность мафедина и позволяют предположить, что данное соединение может реализовывать свое действие через подавление экспрессии $\alpha_2\text{B}$ -адренорецепторов и провоспалительных цитокинов в травмированном полушарии при компенсаторном увеличении их экспрессии в здоровом.

Ключевые слова: нейропротекция, α_2 -адреномиметики, мафедин, ПЦР в реальном времени, крысы

DOI: 10.31857/S0869813923040118, **EDN:** VJVJRG

ВВЕДЕНИЕ

Травматические, сосудистые и нейродегенеративные заболевания головного мозга затрагивают миллионы людей ежегодно, являясь одной из главных причин инвалидизации населения во всем мире [1–3]. В результате этих заболеваний у больных снижается социальная и трудовая активность, что накладывает материальные обременения на их родственников и на общество в целом [4]. Для эффективного лечения таких пациентов необходимы нейропротекторные препараты, способные действовать на различные звенья патогенеза указанных заболеваний, тем самым предотвращая гибель нейронов и ускоряя функциональное восстановление двигательных, когнитивных и ментальных функций. Несмотря на большое разнообразие предложенных нейропротекторных препаратов, показавших эффективность в экспериментах на животных, только часть из них проходят клинические испытания, и еще меньшее количество оказывается эффективным в клинической практике [5]. Предполагается, что низкий трансляционный потенциал таких исследований связан с тем, что изучаемые средства действуют изолированно на тот или иной механизм патогенеза заболеваний, никак не влияя на параллельно происходящие патологические процессы [6]. Ввиду этого нейропротекторные препараты, имеющие разные молекулярные мишени в механизме действия, представляются наиболее перспективными для изучения и дальнейшей разработки.

Одной из таких групп, для которой показаны разные механизмы нейропротекторного действия, являются агонисты α_2 -адренорецепторов. В начале 70-х годов прошлого века эта группа активно использовалась в качестве антигипертензивных средств. Позже к их применению в этом качестве охладели, однако расширились перспективы использования их в качестве седативных, противотревожных и антиадиктивных агентов. В начале 90-х годов появились работы, в которых были продемонстрированы положительные эффекты клонидина на модели ишемического инсульта у крыс [7, 8]. Особенно важно, что его нейропротекторные эффекты блокировались при введении крысам антагониста α_2 -адренорецепторов атипамезола, это позволило предположить, что именно активация этих рецепторов является причиной наблюдаемых эффектов. В последующих работах на различных моделях ишемического инсульта у грызунов была показана нейропротекторная активность и для других агонистов α_2 -адренорецепторов, например, тизанидина и дексмедетомидина [9]. Последний из препаратов в настоящий момент является объектом детального изучения многих исследователей, и было неоднократно показано, что

при травматических и сосудистых повреждениях головного мозга он способен снижать выраженность воспалительных процессов и окислительного стресса, ингибировать апоптоз нейронов и глиальных клеток, нормализовать барьерную функцию гематоэнцефалического барьера, поддерживать баланс прокоагулянтных и антикоагулянтных систем, а также препятствовать развитию спазмирования церебральных сосудов [10]. Особенно важным является тот факт, что дексмететомидин показал эффективность в клинической практике, например, при ишемическом инсульте, о чем свидетельствуют результаты метаанализа с участием 879 пациентов [11]. Кроме того, нейропротекторное действие данного препарата было продемонстрировано при удалении глиомы [12] и хирургическом лечении височной эпилепсии [13].

Другой агонист α_2 -адренорецепторов мафедин, синтезированный в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете, показал способность снижать выраженность неврологического дефицита у крыс, перенесших черепно-мозговую травму (ЧМТ). Его курсовое 7-дневное введение в дозе 2.5 мг/кг увеличивало общую двигательную активность травмированных животных, положительно влияло на двигательную функцию передних и задних конечностей, уменьшало объем повреждения головного мозга и снижало выраженность воспалительных процессов в очаге травмы [14]. В последующих экспериментах нейропротекторная активность мафедина на модели ЧМТ у крыс была подтверждена с помощью электрофизиологических методов исследования (электрокортикография, а также анализ зрительных и соматосенсорных вызванных потенциалов). Было установлено, что введение этого соединения приводило к нормализации работы межполушарных связей отделов мозга, отдаленных от области повреждения, а также внутрислошарных связей здорового полушария к 7-му дню после травмы. Кроме того, у животных, которым вводили мафедин, были отмечены положительные изменения ответов коры на фото- и соматосенсорную стимуляцию [15].

Поскольку введение йохимбина в эквимолярных количествах отменяло большую часть положительных эффектов мафедина, можно сделать вывод, что нейропротекторное действие последнего реализуется за счет активации α_2 -адренорецепторов [14]. Однако для создания препарата, который в дальнейшем мог бы использоваться в клинической практике, необходимо изучение его молекулярных механизмов действия. В связи с этим целью настоящей работы было изучение молекулярно-генетических механизмов действия мафедина на модели ЧМТ у крыс с использованием метода количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (РРТ-кПЦР). В качестве потенциальных молекулярных мишеней действия изучаемого соединения нами были выбраны нейротрофический фактор мозга BDNF, медиаторы воспаления интерлейкин ИЛ-1 β , ИЛ-6 и фактор некроза опухоли ФНО- α , а также подтипы α_2 -адренорецепторов: α_{2A} , α_{2B} и α_{2C} .

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 30 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 3 мес. и массой 250–300 г, полученных из Питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия). Крыс содержали по 5 особей в клетке, при температуре в помещении 20–22°C и световом режиме 12 ч свет 750 лк/12 ч темнота. Все животные получали стандартный пищевой рацион (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм рецепт ПК-120, ООО “ЛАБОРОТОРКОРМ”, Россия) и имели доступ к пище и воде *ad libitum*. Крысы всех экспериментальных групп были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14 сут. Каждому животному присваивали свой идентификационный номер и проводили разделение на 3 группы – контрольные, ЧМТ и ЧМТ + мафедин,

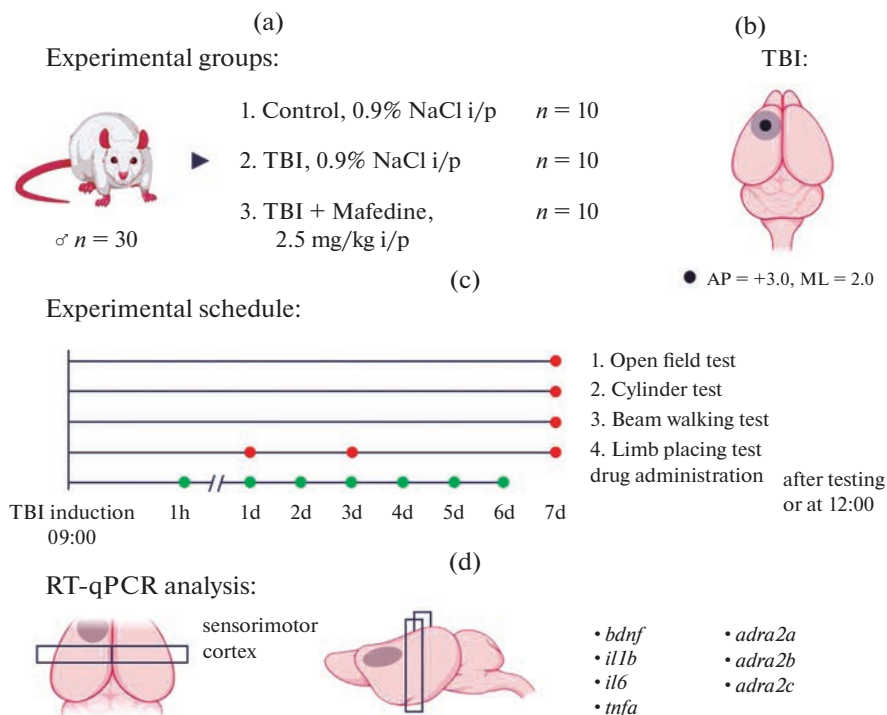


Рис. 1. Экспериментальные группы (а), координаты нанесения черепно-мозговой травмы (б), расписание проводимых экспериментов и процедур (с) и схема взятия биоматериала для молекулярно-генетического анализа (д). TBI – черепно-мозговая травма, i/p – внутривнутрибрюшинно, AP – ростокаудально, ML – медиолатерально, RT-qPCR – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

путем рандомизации методом случайных чисел. Во всех экспериментальных группах было по 10 животных (рис. 1а).

ЧМТ моделировали путем нанесения дозированного удара по участку сенсомоторной коры с помощью травматора (RWD Life Science Inc., США). Локализацию зоны сенсомоторной коры определяли по атласу стереотаксических координат Paxinos и Watson [6]. Перед операцией животных наркотизировали раствором тилетамина/золазепам (Золетил 50[®], Virbac, Франция; 30 мг/кг, внутримышечно), после чего проводили трепанацию в левой лобной части черепа над зоной сенсомоторной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 3.0 мм ростокаудальнее и 2.0 мм латеральнее брегмы (рис. 1б). После этого в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 4 мм с ходом 5 мм, по которому с высоты 22 см ударял скользящий в стальной трубке груз массой 60 г. Высверленную пластину возвращали на место и ушивали разрез кожи.

После выхода из наркоза крыс возвращали в домашние клетки со свободным доступом к воде и корму в течение всего периода исследования. Состояние животных отслеживали ежедневно утром и вечером, при необходимости обрабатывали швы раствором 10%-ного бетадина. Антибиотики, анальгетики и противовоспалительные препараты не использовались в настоящем исследовании ввиду того, что большинство из них в той или иной степени могут влиять на течение патологических

процессов при травматическом поражении головного мозга, тем самым искажая результаты исследования. Ввиду отсутствия признаков боли, дистресса и развития местных или системных воспалительных реакций, ни одно из животных не было преждевременно выведено из экспериментов.

Мафедин (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия) (2.5 мг/кг внутривенно (в/в)) [14, 15] или физиологический раствор (0.5 мл в/б) вводили соответствующим группам животных спустя 1 ч после нанесения травмы и далее каждый день согласно расписанию (рис. 1с) в течение 6 дней. Поведенческие и функциональные тесты у экспериментальных животных проводили на 1-е, 3-и и 7-е сутки после операции. Для объективизации полученных результатов была использована маскировка групп (“ослепление” операторов). После тестирования на 7-е сутки крыс эвтаназировали методом декапитации и осуществляли взятие участка коры головного мозга, расположенного каудальнее места травмы (зона сенсомоторной коры), для дальнейшего исследования (рис. 1д).

На 1-е, 3-и и 7-е сутки после травмы у животных оценивали выраженность неврологического дефицита в тесте “Стимулирование конечностей” (Limb placing test). Тест заключался в оценке ответа задних и передних конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию. Процесс тестирования состоял из 7 различных испытаний; результаты выражали в сумме баллов. Для оценки нарушений в работе конечностей использовалась следующая система подсчета: 2 балла – крыса полностью выполняла испытание; 1 балл – крыса выполняла испытание с задержкой в более чем 2 с и/или не полностью; 0 баллов – крыса не отвечала на стимулирование конечности. Максимально возможное суммарное количество баллов было равно 14. Результат выражали в сумме баллов [14].

На 7-е сутки оценивали общую двигательную и исследовательскую активность в тесте “Открытое поле” (ОП), фиксируя передвижения животных в установке (ООО “НПК Открытая наука”, Россия) при помощи видеокамеры (Canyon, ASBIS, Кипр) в течение 3 мин. Анализ полученных видеозаписей осуществляли с помощью программы VideoMot2 3.0.1 (TSE Systems, Германия). Оценивали пройденную дистанцию (см), среднюю скорость движения (см/с), число посещенных участков поля, число замираний, суммарное время замираний (с), время нахождения в центре поля (с), количество грумингов, стоек и заглядываний в отверстия – “норки” [17].

В тесте “Цилиндр” оценивали асимметрию использования животным передних конечностей в процессе исследования стенок цилиндра. Крысу помещали в прозрачный пластмассовый цилиндр (ООО “НПК Открытая наука”, Россия) и проводили видеорегистрацию ее движений. Время тестирования не ограничивали, добиваясь не менее 10 касаний стенок цилиндра. Просмотр видеозаписи проводили в покадровом режиме, подсчитывая количество актов независимого использования ипси- и контрлатеральной к месту повреждения конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема на задние лапы, а также одновременного использования обеих конечностей. Результаты представляли как процент использования контрлатеральной конечности от общего числа поведенческих актов (CL, %) и рассчитывали по формуле [17]: $CL = (\text{Контр} + 0.5 \text{ Одновр}) / (\text{Ипси} + \text{Контр} + \text{Одновр}) \times 100$, где Контр – контрлатеральная к месту повреждения конечность; Одновр – одновременное использование обеих передних конечностей; Ипси – ипсилатеральная к месту повреждения конечность.

Тест “Сужающаяся дорожка” (Beam walking) (СД) позволяет оценить выраженность сенсомоторного дефицита передних и задних конечностей. Установка (ООО “НПК Открытая наука”, Россия) представляет собой две плавно сужающиеся дорожки длиной 165 см, располагающиеся непосредственно друг под другом. Нижняя дорожка выполняет функцию платформы, на которой оказываются конечности животного во время соскальзывания с верхней дорожки. В конце доро-

жек находится черный ящик, который является конечной целью животного. Перед моделированием ЧМТ крыс обучали пересекать СД в течение 3 последовательных дней. Во время тестирования проводили запись движений животных на видеокамеру. Далее в покадровом режиме просмотра подсчитывали количество постановок контралатеральной к месту повреждения конечности на нижнюю дорожку (ошибок), количество соскальзываний с верхней дорожки на нижнюю и общее количество шагов. Подсчет количества ошибок, количества соскальзываний и общее количество шагов для передней и задней контралатеральных конечностей проводили отдельно. Полученные в результате трех попыток данные усредняли, степень сенсомоторного дефицита (SD, %) вычисляли по формуле и выражали в процентах: $SD = \text{Ошибки} + 0.5 \times \text{Соскальзывания} / \text{Общее количество шагов} \times 100$ [17].

После проведения всех поведенческих и сенсомоторных тестов на 7-е сутки после травмы животных, предварительно наркотизированных тилетамин/золазепамом, подвергали декаптации и извлекали область сенсомоторной коры левого и правого полушария головного мозга. Выбор данных областей коры для дальнейшего анализа был обусловлен тем, что в предыдущих исследованиях мафедин был изучен и показал положительные эффекты в большей степени в сенсомоторных тестах. Полученный материал хранили при температуре -80°C , после чего ткани гомогенизировали с помощью 3D-гомогенизатора роторного типа Precellys Evolution (Bertin Technologies, Франция) с целью последующего выделения из гомогенизата нуклеиновых кислот и проведения ПЦР. Для выделения рибонуклеиновой кислоты (РНК) использовали набор БиоМастер LRU-100-50 (ООО «Биолабмикс», Россия). Выделение РНК проводили согласно протоколу, указанному производителем. После этого измеряли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия), приводили ее к 0.1 нг/мкл и далее методом обратной транскрипции синтезировали комплементарную дезоксирибонуклеиновую кислоту ДНК (кДНК) с помощью набора реактивов БиоМастер ОТ M-MuLV-RN (ООО «Биолабмикс», Россия). Концентрацию кДНК после измерения приводили к 50 нг/мкл, затем методом РРТ-кПЦР (амплификатор CFX 96, Bio-Rad, США) определяли относительную степень экспрессии генов *bdnf* (BDNF), *il1b* (ИЛ-1 β), *il6* (ИЛ-6), *tnfa* (ФНО- α), *adra2a*, *adra2b* и *adra2c* (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} -адренорецептор соответственно) с помощью готовой смеси реактивов БиоМастер Hs-qPCR (2 \times) (ООО «Биолабмикс», Россия). Уровень экспрессии генов оценивали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Синтез праймеров (табл. 1) осуществляла фирма Beagle (Москва). Специфичность продуктов амплификации контролировали по кривым плавления.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 9.0.0. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро–Уилка, значимость различий между группами при нормальном распределении данных оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с post hoc тестом по Тьюки, а при распределении, отличном от нормального, – с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну. Для сравнения относительного уровня экспрессии генов между полушариями в пределах одной группы использовали критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Анализ статистической мощности не производили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Травматическое поражение сенсомоторной коры и нижележащих структур левого полушария приводило у крыс к выраженным поведенческим и двигательным нарушениям, регистрируемым на протяжении всего периода исследования. На 1-е сутки

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Ген	Праймеры	Ссылка
<i>bdnf</i>	FW: 5'-CCGGTATCCAAAGGCCAACT-3' RV: 5'-CTGCAGCCTTCCTTGGTGTA-3'	[18]
<i>il1b</i>	FW: 5'-GTTCTGTCCATTGAGGTG-3' RV: 5'-ATTGTGGCTGTGGAGAAG-3'	[19]
<i>il6</i>	FW: 5'-TACTTCACAAGTCCGGAG-3' RV: 5'-TCCAGAAGACCAGAGCAG-3'	[19]
<i>tnfa</i>	FW: 5'-CACGCTCTTCTGTCACTGA-3' RV: 5'-GGACTCCGTGATGTCTAAGT-3'	[20]
<i>adra2a</i>	FW: 5'-GGTAAGGTGTGGTGGGAGAT-3' RV: 5'-CAGCGCCCTTCTTCTCTATG-3'	[21]
<i>adra2b</i>	FW: 5'-GCACCACACAAAACCTGTTCCCT-3' RV: 5'-TTGTAGATGAGGGGCGGTAG-3'	[21]
<i>adra2c</i>	FW: 5'-TACTGTGCTGGTTCCCCTTC-3' RV: 5'-CAGAGGCCAGTTGTCTCTC-3'	[21]

после перенесенной травмы по одному животному из групп ЧМТ и ЧМТ + Мафедин погибли, ввиду этого в данных группах в экспериментах участвовало по 9 крыс.

В тесте ОП на 7-е сутки после операции животные группы ЧМТ реже совершали стойки ($p < 0.05$) и заглядывания в норки ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2). В тесте “Стимулирование конечностей” (рис. 3а) сумма баллов у травмированных животных была меньше ($p < 0.01$) во все дни тестирования (1-е, 3-и и 7-е сутки после операции) по сравнению со здоровой группой. Стоит отметить, что в данном тесте у животных с ЧМТ было отмечено спонтанное восстановление двигательной функции передних и задних конечностей ($p < 0.01$ для 1-х суток по сравнению с 3-ми), однако на 7-е сутки оно все еще было неполным, о чем свидетельствует тот факт, что результаты этой группы значимо отличались от результатов контрольных животных. В тесте “Цилиндр” (рис. 3б) травмированные крысы практически в 2 раза реже ($p < 0.05$) использовали контрлатеральную (правую) лапу в процессе изучения стенки цилиндра по сравнению с животными без травмы. Кроме того, выраженные двигательные нарушения в группе ЧМТ подтвердились в тесте “Сужающаяся дорожка” (рис. 3с), в котором степень их сенсомоторного дефицита была выше как для передней ($p < 0.05$), так и для задней ($p < 0.01$) контрлатеральных конечностей по сравнению с контрольной группой.

Анализ экспрессии генов методом РРТ-кПЦР (рис. 4) показал, что травматическое поражение левого полушария приводит к снижению относительного уровня экспрессии всех анализируемых генов (*bdnf*, *il1b*, *il6*, *tnfa*, *adra2a*, *adra2b* и *adra2c*) как в левом (травмированном), так и в правом (здоровом) полушарии на 7-е сутки после травмы. Общей закономерностью было также то, что для всех генов степень экспрессии была ниже в контрлатеральном полушарии, чем в ипсилатеральном ($p < 0.05$ для *tnfa* и $p < 0.01$ для *il6* и *adra2b*). Важно отметить, что у здоровых крыс мы наблюдали выраженную межполушарную асимметрию уровня экспрессии того или иного гена, однако при усреднении значений не было получено достоверных различий между полушариями.

Курсовое 7-дневное введение мафедина увеличивало среднюю скорость передвижения ($p < 0.01$) и число заглядываний в норки ($p < 0.05$) в тесте ОП у травмированных крыс по сравнению с животными без лечения. Кроме того, данной группой было совершено большее число переходов ($p < 0.01$), и у них была выше средняя скорость ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой. В тестах “Стимулирова-

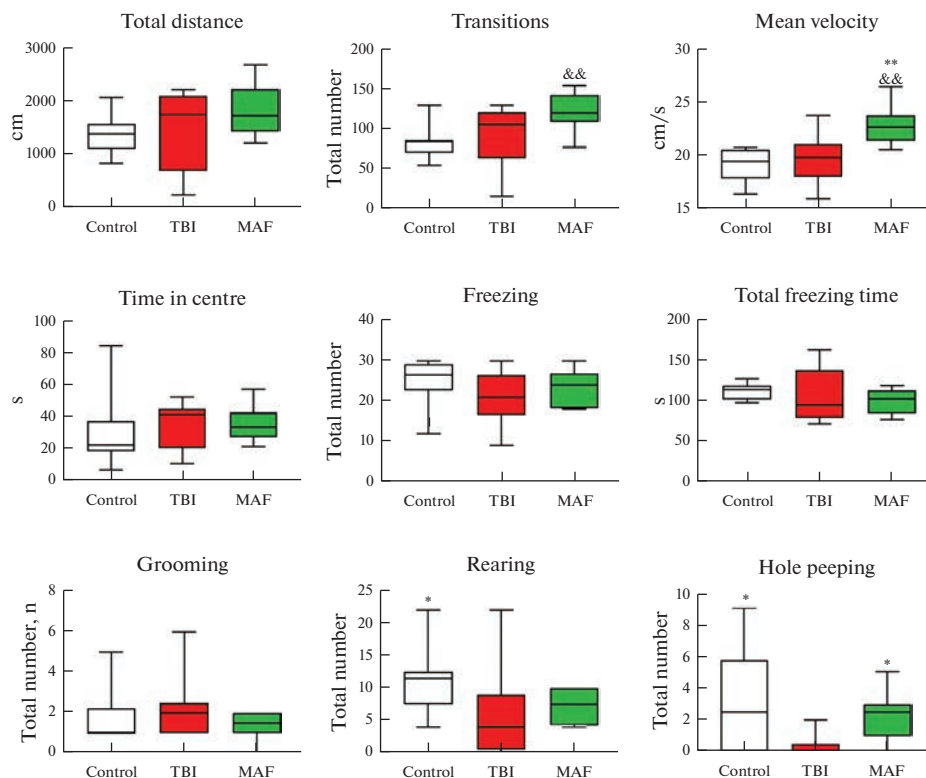


Рис. 2. Значения поведенческих показателей крыс контрольной группы (Control, $n = 10$), группы ЧМТ (TBI, $n = 9$) и группы ЧМТ + Мафедин (MAF, $n = 9$) в тесте “Открытое поле”. Данные представлены как медиана (минимальное значение; максимальное значение). Для показателей “число переходов” ($F_{2,25} = 3.972, p < 0.05$) и “средняя скорость” ($F_{2,25} = 7.453, p < 0.01$) был использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом по Тьюки, а для показателей “число стоек” ($H = 7.105, p < 0.05$) и “число заглядываний” ($H = 8.184, p < 0.05$) – критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверные различия по сравнению с группой ЧМТ; && $p < 0.01$ – достоверные различия по сравнению с контрольной группой.

ние конечностей” и “Цилиндр” не было отмечено значимого положительного эффекта мафедина, однако в последнем случае наблюдалась тенденция к увеличению частоты использования контрлатеральной конечности у группы, получавшей лечение. Степень сенсорного дефицита задней контрлатеральной конечности в тесте СД была ниже ($p < 0.05$) у крыс, которым вводили мафедин, по сравнению с группой ЧМТ.

Аналогично группе травмированных животных без лечения, у крыс, которым после травмы вводили мафедин, было выражено снижение уровня экспрессии всех анализируемых генов (рис. 4) в обоих полушариях по сравнению с контрольной группой. Однако в противоположность группе ЧМТ у животных, которым вводили мафедин, для большинства генов (за исключением *il6*) уровень экспрессии был выше в правом, здоровом, полушарии, чем в левом, травмированном ($p < 0.01$ для *adra2b* и *il1b*). При сравнении значений показателей между группами было получено, что уровень экспрессии *adra2b*, *tnfa* и *il6* в левом полушарии у группы мафедина был значимо ниже ($p < 0.05$ во всех случаях) по сравнению с группой без лечения.

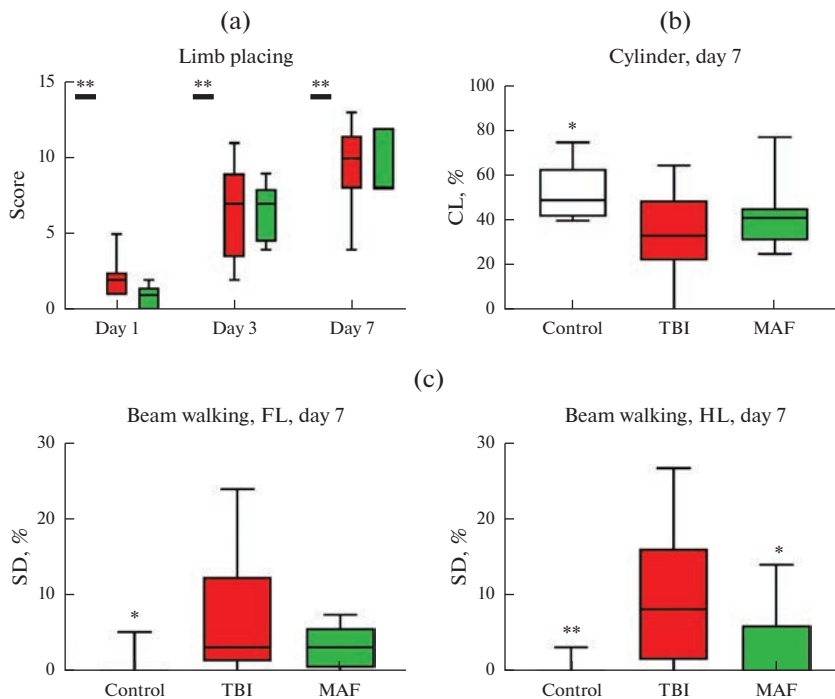


Рис. 3. Результаты оценки функции передней и задней контрлатеральных конечностей крыс контрольной группы (Control, $n = 10$), группы ЧМТ (TBI, $n = 9$) и группы ЧМТ + Мафедин (MAF, $n = 9$) в тестах “Стимулирование конечностей” (а), “Цилиндр” (б) и “Сужающаяся дорожка” (с). Данные представлены как медиана (минимальное значение; максимальное значение). CL – частота использования контрлатеральной (левой) передней конечности, FL – передняя конечность, HL – задняя конечность, SD – степень сенсомоторного дефицита, %; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверные различия по сравнению с группой ЧМТ (критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну). (а) – $H = 22.34$, $p < 0.01$, $H = 19.67$, $p < 0.01$ и $H = 20.19$, $p < 0.01$ для 1-, 3- и 7-го дня соответственно; (б) – $H = 7.158$, $p < 0.05$; (с) – $H = 8.964$, $p < 0.05$ и $H = 12.1$, $p < 0.01$ для передней и задней лап соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании было установлено, что курсовое 7-дневное введение мафедина крысам, перенесшим ЧМТ, увеличивает локомоторную и поисково-исследовательскую активность последних в тесте ОП на 7-е сутки после операции. Эти данные согласуются с результатами, полученными в ходе двух предыдущих серий экспериментов [14], в первой из которых была подобрана эффективная доза мафедина и было проведено сравнение с активностью другого агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов клонидина, а во второй оценивались эффекты мафедина на фоне введения антагониста $\alpha 2$ -адренорецепторов йохимбина. В обоих случаях мафедин в дозе 2.5 мг/кг увеличивал общую двигательную активность (вычисляемую как сумму пересечений квадратов, стоек, заглядываний в норки и грумингов) крыс с ЧМТ в тесте ОП по сравнению с контролем на 3-и сутки после операции.

Стоит отметить, что в данной работе поведение крыс с ЧМТ мало отличалось от такового контрольных животных, и значимые различия между группами были получены только по двум показателям: количеству стоек и заглядываний в норки. В прошлых сериях экспериментов [14] снижение общей двигательной активности

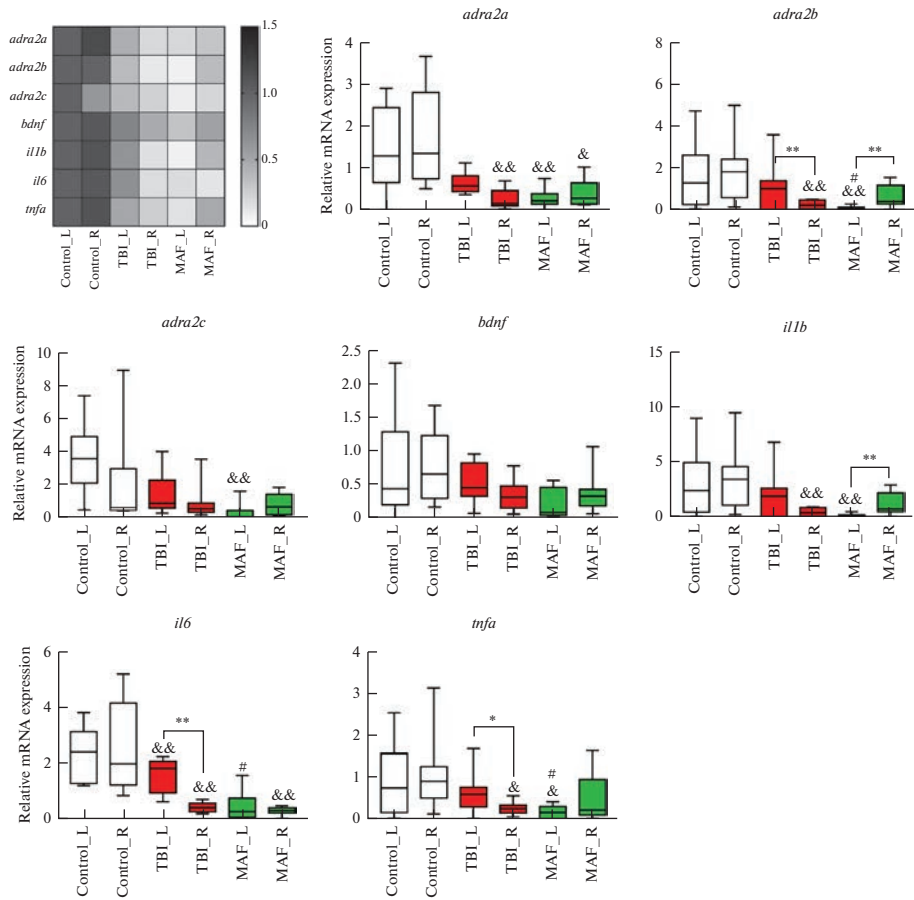


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *adra2a*, *adra2b*, *adra2c*, *bdnf*, *il6*, *il1b*, *tnfa* в левом (L) и правом (R) полушариях животных контрольной группы (Control, $n = 10$), ЧМТ (TBI, $n = 9$) и группы ЧМТ + Мафедин (MAF, $n = 9$). Слева представлена тепловая карта уровня экспрессии анализируемых генов, за 100% взяты соответствующие значения левого полушария контрольной группы. Данные на диаграммах представлены как медиана (минимальное значение; максимальное значение). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверные различия между полушариями (критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну); & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ – достоверные различия по сравнению с соответствующим полушарием контрольной группы (критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну), # $p < 0.05$ – достоверное отличие от значений группы ЧМТ в соответствующем полушарии (критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом по Данну). Для сравнения относительного уровня экспрессии генов между полушариями в пределах одной группы использовали критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

adra2a: $H = 12.35$, $p < 0.01$ и $H = 14.37$, $p < 0.01$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *adra2b*: $H = 18.83$, $p < 0.01$ и $H = 10.97$, $p < 0.01$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *adra2c*: $H = 16.44$, $p < 0.01$ и $H = 2.361$, $p = 0.3071$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *bdnf*: $H = 4.25$, $p = 0.119$ и $H = 4.816$, $p = 0.09$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *il1b*: $H = 8.352$, $p < 0.05$ и $H = 10.71$, $p < 0.01$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *il6*: $H = 16.47$, $p < 0.01$ и $H = 19.22$, $p < 0.01$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R; *tnfa*: $H = 8.998$, $p < 0.05$ и $H = 7.551$, $p < 0.05$ для Control_L vs. TBI_L vs. MAF_L и Control_R vs. TBI_R vs. MAF_R.

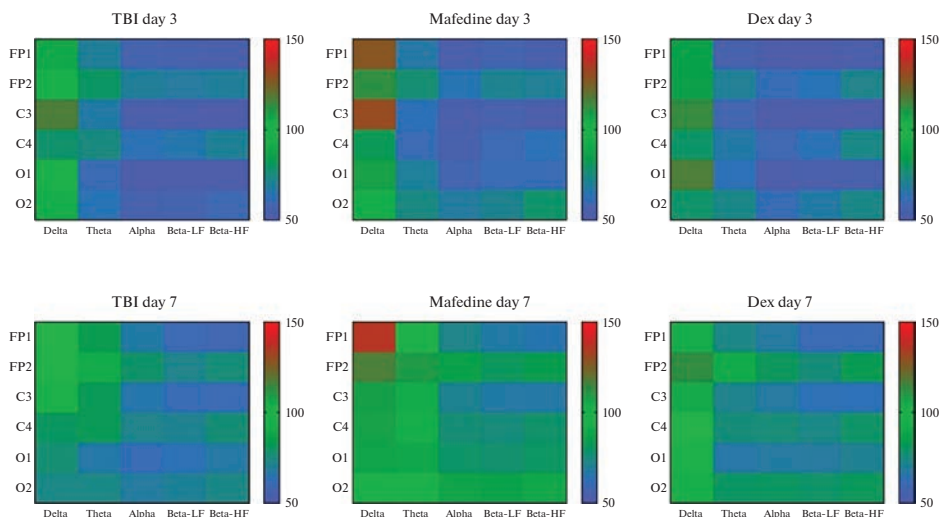


Рис. 5. Тепловая карта значений средней амплитуды δ -, θ -, α -, а также низко- и высокочастотных β -ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 у животных экспериментальных групп на 3-и и 7-е сутки после травмы. TBI – травмированные крысы без лечения, Mafedine – травмированные крысы, которым ежедневно вводили мафедин в дозе 2.5 мг/кг в течение 7 дней, Dex – травмированные крысы, которым ежедневно вводили агонист $\alpha 2$ -адренорецепторов дексмететомидин (препарат сравнения) в дозе 25 мкг/кг в течение 7 дней. За 100% приняты соответствующие значения группы условно здоровых крыс. Рисунок взят из ранее опубликованной работы авторов [15].

у травмированных крыс на 3-и сут после операции всегда было статистически значимо. Аналогичные изменения поведения травмированных животных были получены и при изучении других молекул [17, 21]. Вероятно, это связано с тем, что в настоящей серии мы тестировали крыс в ОП на 7-е, а не на 3-и сут после травмы, и спонтанное восстановление локомоторной активности, характеризуемой такими показателями, как пройденная дистанция, число пересеченных квадратов, средняя скорость, а также число замираний и их общее время, уже произошло [23].

Кроме того, в настоящей работе было еще два дополнительных отличия экспериментальных условий от прошлых серий. Во-первых, используемый инъекционный наркотик хлоралгидрат был заменен на менее токсичный тилетамин/золазепам [24, 25], и, во-вторых, было использовано новое устройство для нанесения дозируемого удара по области сенсомоторной коры (табл. 2). При сопоставлении параметров нанесения травмы можно сделать вывод, что в настоящем исследовании ЧМТ была более тяжелой, а значит, выраженность неврологического дефицита во всех тестах должна была быть выше, чем в прошлых экспериментах. Несмотря на то, что степень сенсомоторного дефицита у крыс с ЧМТ в тесте “Стимулирование конечностей” в данной работе была аналогична таковой в предыдущих сериях (результаты теста были использованы как критерий успешности моделирования ЧМТ), в тесте СД этот показатель был в несколько раз ниже для обеих лап, что свидетельствует о более быстром спонтанном восстановлении сенсомоторных функций. Можно сделать вывод, что в настоящем исследовании было большее повреждение левого полушария, однако к 7-му дню степень восстановления сенсомоторных функций передней и задней контрлатеральных лап была выше. Наиболее вероятным объяснением такой особенности является нейропротекторное действие тилетамина и золазепамы, используемых для наркотизации крыс перед операцией.

Таблица 2. Сравнение параметров устройств для моделирования черепно-мозговой травмы у крыс, используемых в прошлых экспериментальных сериях [14, 15, 17, 22] и в настоящем исследовании

Параметр	Прошлые экспериментальные серии	Настоящее исследование
Диаметр травмирующей поверхности, мм	3	4
Ход травмирующей поверхности, мм	4	5
Высота падения груза, см	10	22
Масса груза, г	50	60
Форма ударной поверхности	Цилиндрическая	Сферическая

Несмотря на то, что и хлоралгидрат, и тилетамин/золазепам обладают нейропротекторным действием [26, 27], при сравнении их эффективности на модели ишемии–реперфузии методом окклюзии среднемозговой артерии у крыс было показано, что второе средство является более активным [27]. У животных, которым вводили тилетамин/золазепам в дозе 40 мг/кг за 24 ч до моделирования ишемии, происходило более быстрое восстановление двигательных функций в тесте “Стимулирование конечностей”, а также был меньше объем инфаркта и выраженность отека мозга. Таким образом, менее выраженное нейропротекторное действие мафедина в настоящей серии можно связать с тем, что, во первых, тестирование травмированных крыс в тесте ОП проводилось в более поздний период после ЧМТ, а во вторых, используемый наркоз мог маскировать эффекты изучаемого соединения за счет собственного нейропротекторного действия.

Влияние агонистов $\alpha 2$ -адренорецепторов на течение патологических процессов при ишемическом или травматическом поражении головного мозга было неоднократно показано в экспериментах на грызунах [7–9, 28]. Первоначально в качестве предполагаемых механизмов нейропротекторного действия данной группы препаратов рассматривали: снижение избыточного выброса возбуждающих медиаторов за счет действия на пресинаптические $\alpha 2$ -адренорецепторы, блокаду потенциалзависимых кальциевых каналов, активацию G-белок-связанных K^+ -каналов внутреннего выпрямления, ингибирование аденилат- и гуанилатциклазы или развитие системной гипотермии [9, 29]. Позже множество работ продемонстрировали способность дексметомидина снижать интенсивность воспалительных процессов в области травмы, нормализовать функцию гематоэнцефалического барьера, уменьшать отек головного мозга, а также ингибировать процесс апоптоза нейронов и препятствовать аутофагии [10]. Особое внимание экспериментальные исследования уделили влиянию препарата на работу сигнального пути TLR4/MyD88/NF- κ B, продуцирующего цитокины, способные вызывать повреждение нервной системы, такие как ИЛ-1 β , ИЛ-6, и ФНО- α [30, 31]. В связи с этим в качестве потенциальных мишеней действия мафедина в настоящем исследовании были выбраны именно эти медиаторы воспаления.

В отличие от данной работы, в большинстве других исследований с использованием модели ЧМТ у крыс экспрессию ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α изучали в течение первых 3 дней после травмы. Это связано с тем, что выброс провоспалительных цитокинов происходит в острый период после ЧМТ, что было наглядно продемонстрировано в работе Dalgard и соавт. [33]. В этом исследовании также было показано, что увеличение количества провоспалительных цитокинов происходит в большей степени в травмированном полушарии. Аналогично в экспериментах на мышьях линии C57BL/6 [33] ЧМТ вызывала увеличение уровня ИЛ-1 β , ИЛ-6 (и экспрессии генов, и белков) в травмированном полушарии с 1-го по 7-й дни после травмы,

однако этот подъем был выше в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контрлатеральным. Кроме того, в последней работе было отмечено некоторое снижение уровня мРНК ИЛ-1 β к 20-му дню после травмы.

Неожиданное снижение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов у крыс с ЧМТ по сравнению с контрольной группой в настоящей работе может быть связано с нейропротекторным действием используемого наркотозного агента, о котором было упомянуто ранее. Dalgard и соавт. [33] и Laggaoui и соавт. [34] использовали в своей работе смесь 2% изофлурана и 98% кислорода, которая, вероятно, не оказывает выраженного влияния на экспрессию провоспалительных цитокинов. Тем не менее, несмотря на некоторые отличия в настоящей работе изменений экспрессии ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α у крыс после травмы от результатов работ других авторов, эффекты мафедина являются выраженными и в большинстве случаев статистически значимыми. Изучаемое соединение подавляло уровень ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α в травмированном полушарии у крыс по сравнению с животными без лечения, при этом экспрессия ИЛ-1 β в контрлатеральном полушарии увеличивалась по сравнению с ипсилатеральным. Данную особенность действия мафедина, безусловно, нельзя однозначно трактовать как положительный или отрицательный эффект. Тем не менее, полученные данные позволяют предположить, что изучаемое соединение может оказывать влияние на воспалительные процессы в коре головного мозга у крыс после травмы.

Нейротрофические факторы, в особенности нейротрофический фактор мозга BDNF, играют важную роль в восстановительных процессах после ЧМТ, обеспечивая выживание нейронов, аксональный спраутинг и синаптогенез [34]. Ввиду этого данный трофический фактор стал объектом пристального изучения исследователей, занимающихся нейропротекцией. В экспериментальных работах на грызунах была выявлена положительная корреляция между индукцией (белка или мРНК) BDNF в тканях мозга, а также снижением степени неврологического дефицита у животных в поведенческих или функциональных тестах (Neurological severity score, водный лабиринт Морриса, "Сужающаяся дорожка" и др.) [34]. Также было показано, что у людей полиморфизм гена BDNF может влиять на исход перенесенной травмы мозга [35, 36], однако механизмы этого влияния остаются неизученными. Ввиду этого увеличение экспрессии BDNF при терапевтическом или фармакологическом воздействии принято рассматривать как проявление нейропротекторного эффекта. Стоит отметить, что экспрессия BDNF может меняться с течением времени после травмы, а также в зависимости от анализируемой области мозга [34]. Например, показано, что в первые несколько дней после ЧМТ (острый период) она увеличивается в областях коры и гиппокампа, расположенных ипсилатерально к месту повреждения. На 7-е сутки (хронический период) уровень BDNF в указанных областях снижается, что было продемонстрировано и в данном исследовании. Несмотря на то, что в настоящей работе не было получено достоверных различий между экспериментальными группами и полушариями, из приведенных диаграмм видно, что ЧМТ приводит к снижению экспрессии BDNF в обоих полушариях, причем у крыс с травмой без лечения это снижение более выражено в контрлатеральном полушарии. Введение мафедина крысам после ЧМТ обращает данную закономерность, и делает характер изменения экспрессии BDNF схожим с таковым ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , что можно рассматривать как следствие влияния изучаемого соединения также на BDNF-зависимые нейропластические процессы в головном мозге у крыс после ЧМТ.

На сегодняшний день известно, что различные подтипы α 2-адренорецепторов принимают участие в регуляции артериального давления, передачи болевых импульсов на разных уровнях, реализации седативного эффекта агонистов α 2-адренорецепторов и в некоторых других физиологических функциях [37]. С точки зре-

ния центральной нервной системы, поведения и когнитивных функций наибольший интерес представляют α_2 -адренорецепторы, так как показано, что они участвуют в регуляции локомоторной активности [38], обработке сенсорной информации [39], пространственной и непространственной памяти [40]. Также было показано, что мыши с нокаутом гена α_2 -адренорецепторов имеют усиленный стартл-рефлекс, сниженное препульсивное ингибирование и большую агрессию, индуцированную изоляцией [41]. Ввиду вышеперечисленного наиболее вероятно, что нейропротекторные эффекты агонистов α_2 -адренорецепторов могут быть реализованы за счет активации именно 2_C -подтипа. Однако если рассматривать основной нейропротекторного действия данных препаратов блокаду глутаматной эксайтотоксичности, то в таком случае предполагаемыми мишенями становятся не только 2_C -рецепторы, но и 2_A -, поскольку оба подтипа являются пресинаптически расположенными ауторецепторами [42]. Несмотря на это, в настоящей работе характер экспрессии всех трех подтипов α_2 -адренорецепторов в головном мозге у крыс после ЧМТ был одинаковым и более того, аналогичен таковому ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и BDNF. Вероятно, это сходство обусловлено тем, что α_2 -адренорецепторы, медиаторы воспаления и BDNF патогенетически связаны между собой, и индукция их экспрессии происходит последовательно в рамках общего патологического каскада. При этом, исходя из полученных данных, все 3 подтипа практически в равной степени участвуют в данном каскаде. Влияние мафедина было статистически значимо на уровень экспрессии 2_B -подтипа, тем не менее для других подтипов общая закономерность также прослеживалась.

В экспериментальной серии, посвященной влиянию мафедина на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс, перенесших ЧМТ [15], прослеживалась закономерность, при которой у крыс, которым ежедневно вводили мафедин в дозе 2.5 мг/кг в течение 7 дней была выше средняя амплитуда δ -ритмов в травмированной области (отведения FP1 и C3). При этом к 7-му дню после операции в отдаленных областях от травмы (отведения FP2, C4, O1 и O2) значения регистрируемых ритмов приближались к значениям здоровых крыс. Выраженный подъем активности δ -ритма является индикатором органических поражений (например, ЧМТ или инсульта) головного мозга у крыс [14, 43]. Таким образом, полученные данные показали, что мафедин, с одной стороны, улучшает состояние областей головного мозга, отдаленных от места травмы, а с другой стороны, вероятно, усугубляет течение патологических процессов в области повреждения. Это предположение согласуется с изменениями экспрессии анализируемых генов, представленными в настоящем исследовании. Представляется вероятным вывод, что мафедин способен ухудшать состояние травмированной области головного мозга у крыс при ЧМТ, при этом активируя компенсаторные механизмы в областях, отдаленных от места травмы, например, каудальные области коры травмированного полушария, либо противоположное, нетравмированное полушарие. Возможности функциональной реорганизации и аксонального спраутинга здоровых, сохраненных областей головного мозга грызунов при органических повреждениях были неоднократно показаны, например, на моделях ишемического инсульта [44, 45]. Однако, безусловно, для доказательства способности мафедина влиять на нейропластические процессы в головном мозге после травмы требуются дополнительные исследования с использованием иммуногистохимических методов исследований и применения специальных методов окраски и мечения новых синаптических связей.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что мафедин при введении в дозе 2.5 мг/кг в течение 7 дней после ЧМТ у крыс уменьшает степень неврологического дефицита у травмированных животных, проявляющегося в снижении исследовательской активности, а также нарушении двигательной функции

передних и задних конечностей. При анализе уровня экспрессии генов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , BDNF, а также подтипов α 2-адренорецепторов в коре травмированного и здорового полушарий головного мозга было получено, что изучаемое соединение подавляет экспрессию всех анализируемых генов в травмированном полушарии. При этом в противоположном, здоровом полушарии экспрессия данных генов увеличивается, это, вероятно, связано с развитием компенсаторных механизмов нейропластичности, что в некоторой степени согласуется с ранее полученными данными о влиянии мафедина на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс после ЧМТ. Полученные результаты позволяют аргументированно предположить, что дальнейшее изучение молекулярных механизмов действия мафедина должно быть направлено на изучение способности соединения влиять на количество и функциональную активность белков, кодируемых изучаемыми в настоящее время генами, у крыс при травматическом поражении головного мозга. Особый интерес представляет изучение способности мафедина инициировать в головном мозге после ЧМТ нейропластические изменения, приводящие к положительному функциональному исходу у травмированных животных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с использованием лабораторных животных были выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и “Правилами лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №708н от 23.08.2010 г. Протокол эксперимента был утвержден биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол-заявка R-MAF-SA-21 от 10.01.2021). Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ 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 (Ю.И.С., С.В.О.), проведение экспериментов и обработка данных (Ю.И.С., М.В.Ш., В.А.П., Д.Д.Ш., М.М.П.), подготовка иллюстраций (Ю.И.С., В.А.П.), подготовка и редакция рукописи (Ю.И.С., В.А.П., С.В.О.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Faul M, Coronado V* (2015) Epidemiology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* 127: 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52892-6.00001-5>
2. *Saini V, Guada L, Yavagal DR* (2021) Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology* 97(20 Suppl 2): S6–S16. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000012781>
3. *Gao Z, Pang Z, Chen Y, Lei G, Zhu S, Li G, Shen Y, Xu W* (2022) Restoring After Central Nervous System Injuries: Neural Mechanisms and Translational Applications of Motor Recovery. *Neurosci Bull* 38(12): 1569–1589. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00959-x>

4. *Rochmah TN, Rahmawati IT, Dahlui M, Budiarto W, Bilqis N* (2021) Economic Burden of Stroke Disease: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 18(14): 7552. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147552>
5. *Xu SY, Pan SY* (2013) The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy. *Med Sci Monit Basic Res* 19: 37–45. <https://doi.org/10.12659/msmbr.883750>.
6. *Marklund N, Hillered L* (2011) Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *Br J Pharmacol* 164(4): 1207–1229. <https://doi.org/10.12659/msmbr.883750>
7. *Hoffman WE, Cheng MA, Thomas C, Baughman VL, Albrecht RF* (1991) Clonidine decrease plasma catecholamines and improves outcome from incomplete ischemia in the rat. *Anesth Analg* 73: 460–464. <https://doi.org/10.1213/00000539-199110000-00016>
8. *Hoffman WE, Kochs E, Werner C, Thomas C, Albrecht RF* (1991) Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat: Reversal by the alpha-2 – adrenergic antagonist atipamezole. *Anesthesiology* 75: 328–332. <https://doi.org/10.1097/00000542-199108000-00022>
9. *Zhang Y, Kimelberg HK* (2005) Neuroprotection by alpha 2-adrenergic agonists in cerebral ischemia. *Curr Neuropharmacol* 3(4): 317–323. <https://doi.org/10.2174/157015905774322534>
10. *Hu Y, Zhou H, Zhang H, Sui Y, Zhang Z, Zou Y, Li K, Zhao Y, Xie J, Zhang L* (2022) The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* 13: 965661. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965661>
11. *Jiang L, Hu M, Lu Y, Cao Y, Chang Y, Dai Z* (2017) The protective effects of dexmedetomidine on ischemic brain injury: A meta-analysis. *J Clin Anesth* 40: 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2017.04.003>
12. *Luo X, Zheng X, Huang H* (2016) Protective effects of dexmedetomidine on brain function of glioma patients undergoing craniotomy resection and its underlying mechanism. *Clin Neurol Neurosurg* 146: 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.05.004>
13. *Bindra A, Kaushal A, Prabhakar H, Chaturvedi A, Chandra PS, Tripathi M, Subbiah V, Sathianathan S, Banerjee J, Prakash C* (2019) Neuroprotective role of dexmedetomidine in epilepsy surgery: A preliminary study. *Neurol India* 67(1): 163–168. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.253616>
14. *Сысоев ЮИ, Дагаев СГ, Кубарская ЛГ, Гайкова ОН, Узугбунам БЧ, Модисе К, Маквана ТЛ, Оковитый СВ* (2019) Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина* 15(1): 62–77. [*Sysoev YuI, Dagaev SG, Kubarskaja LG, Gaikova ON, Uzuqgunam BC, Modise K, Makwana TL, Okovityi SV* (2019) Study of the neuroprotective activity of mafedine, an alpha-2 adrenergic receptor agonist, by modeling a traumatic brain injury in rats. *J Biomed* 15(1): 62–77. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-62-77>
15. *Sysoev YI, Prikhodko VA, Chernyakov RT, Idiyatullin RD, Musienko PE, Okovityi SV* (2021) Effects of Alpha-2 Adrenergic Agonist Mafedine on Brain Electrical Activity in Rats after Traumatic Brain Injury. *Brain Sci* 11(8): 981. <https://doi.org/10.3390/brainsci11080981>
16. *Paxinos G, Watson C* (2013) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th ed. Cambridge. MA. USA. Acad Press.
17. *Приходько ВА, Кан АВ, Сысоев ЮИ, Титович ИА, Анисимова НА, Оковитый СВ* (2021) Оценка нейропротекторной активности нового производного аллилморфолина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. Разработка и регистрация лекарственных средств 10(4–1): 179–187. [*Prikhodko VA, Kan AV, Sysoev YuI, Titovich IA, Anisimova NA, Okovityi SV* (2021) Evaluation of the neuroprotective activity of a new allylmorpholine derivative in a rat model of traumatic brain injury. *Drug development & registrat* 10(4–1): 179–187. (In Russ)]. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-179-187](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-179-187)
18. *Rouhani F, Khodarahmi P, Naseh V* (2019) NGF, BDNF and Arc mRNA Expression in the Hippocampus of Rats After Administration of Morphine. *Neurochem Res* 44(9): 2139–2146. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02851-z>
19. *Lu H, Zhou J* (2008) HBV X gene transfection upregulates IL-1beta and IL-6 gene expression and induces rat glomerular mesangial cell proliferation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 28(3): 247–250. <https://doi.org/10.1007/s11596-008-0304-5>
20. *Wang AL, Yu AC, He QH, Zhu X, Tso MO* (2007) AGEs mediated expression and secretion of TNF alpha in rat retinal microglia. *Exp Eye Res* 84(5): 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.01.011>

21. Zhang Y, Kolli T, Hivley R, Jaber L, Zhao FI, Yan J, Herness S (2010) Characterization of the expression pattern of adrenergic receptors in rat taste buds. *Neuroscience* 169(3): 1421–1437. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.021>
22. Sysoev YI, Uzequnam BC, Okovityi SV (2019) Attenuation of neurological deficit by a novel ethanolamine derivative in rats after brain trauma. *J Exp Pharmacol* 11: 53–63. <https://doi.org/10.2147/JEP.S199464>
23. Niskanen JP, Airaksinen AM, Sierra A, Huttunen JK, Nissinen J, Karjalainen PA, Pitkänen A, Gröhn OH (2013) Monitoring functional impairment and recovery after traumatic brain injury in rats by fMRI. *J Neurotrauma* 30(7): 546–556. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2416>
24. Fleischman RW, McCracken D, Forbes W (1977) Adynamic ileus in the rat induced by chloral hydrate. *Lab Anim Sci* 27: 238–243.
25. Ogino K, Hobara T, Kobayashi H, Iwamoto S (1990) Gastric mucosal injury induced by chloral hydrate. *Toxicol Lett* 52: 129–133. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(90\)90146-d](https://doi.org/10.1016/0378-4274(90)90146-d)
26. Liu JH, Feng D, Zhang YF, Shang Y, Wu Y, Li XF, Pei L (2015) Chloral Hydrate Preconditioning Protects Against Ischemic Stroke via Upregulating Annexin A1. *CNS Neurosci Ther* 21(9): 718–726. <https://doi.org/10.1111/cns.12435>
27. Силачев ДН, Усатикова ЭА, Певзнер ИБ, Зорова ЛД, Бабенко ВА, Гуляев МВ, Пирогов ЮА, Плотников ЕЮ, Зоров ДБ (2017) Влияние наркотических препаратов на эффективность удаленного ишемического preconditionирования. *Биохимия* 82(9): 1296–1308. [Silachev DN, Usatikova EA, Pevzner IB, Zorova LD, Babenko VA, Gulyaev MV, Pirogov YA, Plotnikov EY, Zorov DB (2017) Impact of anesthetics on efficiency of remote ischemic preconditioning. *Biochemistry (Moscow)* 82(9): 1296–1308. (In Russ)].
28. Liu H, Li J, Jiang L, He J, Zhang H, Wang K (2022) Dexmedetomidine pretreatment alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting neuroinflammation through the JAK2/STAT3 pathway. *Braz J Med Biol Res* 55: e12145. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e12145>
29. Ma D, Rajakumaraswamy N, Maze M (2005) Alpha2-Adrenoceptor agonists: shedding light on neuroprotection? *Br Med Bull* 71: 77–92. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh036>
30. Wang D, Xu X, Wu YG, Lyu L, Zhou ZW, Zhang JN (2018) Dexmedetomidine attenuates traumatic brain injury: Action pathway and mechanisms. *Neural Regen Res* 13(5): 819–826. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.232529>
31. Huang GR, Hao FG (2021) Dexmedetomidine inhibits inflammation to alleviate early neuronal injury via TLR4/NF- κ B pathway in rats with traumatic brain injury. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 31(1): 41–47. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2021037390>
32. Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, Pollard HB, Watson WD (2012) The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Front Mol Neurosci* 5: 6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00006>
33. Lagraoui M, Latoche JR, Cartwright NG, Sukumar G, Dalgard CL, Schaefer BC (2012) Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics. *Front Neurol* 3: 155. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00155>
34. Gustafsson D, Klang A, Thams S, Rostami E (2021) The Role of BDNF in Experimental and Clinical Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 22(7):3582. <https://doi.org/10.3390/ijms22073582>
35. Wang YJ, Chen KY, Kuo LN, Wang WC, Hsu YW, Wong HS, Lin CM, Liao KH, Zhang YF, Chiang YH, Chang WC (2018) The association between BDNF Val66Met polymorphism and emotional symptoms after mild traumatic brain injury. *BMC Med Genet* 19(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0518-0>
36. Treble-Barna A, Wade SL, Pilipenko V, Martin LJ, Yeates KO, Taylor HG, Kurowski BG (2022) Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and neuropsychological functioning after early childhood traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc* 25: 1–11. <https://doi.org/10.1017/S1355617722000194>
37. Philipp M, Brede M, Hein L (2002) Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R287–R295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00123.2002>
38. Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK, Scheinin M (1998) D-Amphetamine and L-5-hydroxytryptophan-induced behaviours in mice with genetically-altered expression of the alpha2C-adrenergic receptor subtype. *Neuroscience* 86: 959–965. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00100-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00100-6)

39. Scheinin M, Sallinen J, Haapalinna A (2001) Evaluation of the 2C-adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target studies in transgenic mouse models. *Life Sci* 68: 2277–2285. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01016-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01016-5)
40. Bjorklund M, Sirvio J, Puolivali J, Sallinen J, Jakala P, Scheinin M, Kobilka BK, Riekkinen P Jr (1998) Alpha2C-Adrenoceptor-overexpressing mice are impaired in executing nonspatial and spatial escape strategies. *Mol Pharmacol* 54: 569–576. <https://doi.org/10.1124/mol.54.3.569>
41. Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK, Scheinin M (1998) Adrenergic Alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci* 18: 3035–3042. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-03035.1998>
42. Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999) Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402: 181–184. <https://doi.org/10.1038/46040>
43. Sysoev YI, Prikhodko VA, Kan AV, Titovich IA, Karev VE, Okovityi SV (2022) Changes in Brain Electrical Activity after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Neurol Int* 14(3): 547–560. <https://doi.org/10.3390/neurolint14030044>
44. Okabe N, Shiromoto T, Himi N, Lu F, Maruyama-Nakamura E, Narita K, Iwachidou N, Yagita Y, Miyamoto O (2016) Neural network remodeling underlying motor map reorganization induced by rehabilitative training after ischemic stroke. *Neuroscience* 339: 338–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.008>
45. Okabe N, Shiromoto T, Himi N, Lu F, Maruyama-Nakamura E, Narita K, Iwachidou N, Yagita Y, Miyamoto O (2016) Neural network remodeling underlying motor map reorganization induced by rehabilitative training after ischemic stroke. *Neuroscience* 339: 338–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.008>

Exploring the Molecular and Genetic Mechanisms of Action of the α 2-Adrenergic Agonist Mafedine in Experimental Traumatic Brain Injury in Rats

Yu. I. Sysoev^{a, b, c, d, *}, M. V. Shustov^a, V. A. Prikhodko^{a, d}, D. D. Shite^a,
M. M. Puchik^a, and S. V. Okovityi^{a, d}

^aSaint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia

^bPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

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

^dBechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russia

*e-mail:susoyev92@mail.ru

Neurological impairments due to traumatic, vascular, or neurodegenerative brain diseases have a high prevalence worldwide. Among them are motor, cognitive, and mental disorders, which have a serious negative impact on the working and social activities of the patients. This calls for the search and development of novel effective neuroprotective agents. Previous studies have shown the pyrimidine-derived α 2-adrenergic agonist mafedine to be highly effective for the amelioration of neurological deficits in experimental traumatic brain injury (TBI) in rats. Despite the results of the previous works favouring the major role of the α 2 adrenergic receptor activation in the mechanism of action of mafedine, the search for additional molecular targets is an important part of the development of any drug to be used in clinical practice. In this work, we evaluated the effects of 7 day-long course administration of mafedine (2.5 mg/kg b.w.) on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , -6, tumour necrosis factor (TNF)- α , and the α 2A, α 2B, and α 2C α 2-adrenergic receptor subtypes in the brain cortex of rats subjected to TBI, using the reverse-transcription real-time polymerase chain reaction method. TBI was modelled by the controlled cortical impact technique in an open area of sensorimotor cortex of the left brain hemisphere. Behavioural alterations in the injured animals were assessed in the Open field test, and the fore- and hindlimb motor function, in the Limb placing, Cylinder, and Beam walking tests. Our experiments show that TBI causes severe motor impairments as well as decreases exploration in rats. Besides, at post-TBI day 7, a reduction in the expression of all analyzed genes is seen, which is the most pronounced in the con-

tralateral (uninjured) hemisphere. Course administration of mafedine (2.5 mg/kg b.w.) resulted in moderate stimulation of the injured rats' behaviour, increased exploratory activity compared to controls, and improved sensorimotor deficit as assessed by the Beam walking test. Gene expression analysis results indicated that mafedine decreased α_2 -adrenergic receptor, TNF- α , and IL-6 expression in the injured hemisphere. At the same time, compared to rats with TBI having received no treatment, mafedine-treated animals exhibited higher α_2 -adrenergic receptor and IL-1 β expression in the injured rather than the intact hemisphere. These results confirm the previously observed neuroprotective activity of mafedine and imply that it may exert its effects via suppression of α_2 -adrenergic receptor and proinflammatory cytokine expression in the injured brain hemisphere, at the same time increasing their expression in the intact one.

Keywords: neuroprotection, α_2 -adrenergic agonists, mafedine, real-time PCR, rats

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СКОРОСТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА КРЫС НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СТАРЕНИЯ

© 2023 г. О. П. Горшкова*

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

**E-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 16.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Изменение скорости мозгового кровотока может вносить значительный вклад в формирование возрастных цереброваскулярных заболеваний. В работе изучалось изменение скоростных показателей церебрального кровотока у крыс на разных этапах старения. Проводился сравнительный анализ состояния кровотока коры и подкорковых структур полушарий головного мозга по величине линейных скоростей, измеренных методом ультразвуковой доплерографии, и индексов кровотока у молодых крыс линии Sprague-Dawley в возрасте 4-х мес. и стареющих крыс в возрасте 18-ти и 23-х мес. Установлено, что старение сопровождается изменениями параметров мозгового кровотока в коре и подкорковых структурах головного мозга крыс, которые развиваются постепенно и отличаются на разных этапах старения. К 18 месяцам увеличивается перфузия в лобной и теменной области полушарий головного мозга за счет повышения пиковых и средней за сердечный цикл скоростей кровотока и снижения уровня сопротивления мозговых сосудов. Эти процессы предшествуют развитию последующих гипоперфузионных нарушений кровотока, наблюдаемых на более поздних этапах старения. Гипоперфузионные изменения у 23-месячных крыс наиболее выражены в лобной области полушарий головного мозга и характеризуются снижением пиковых скоростей и увеличением показателей индексов кровотока.

Ключевые слова: скорость мозгового кровотока, ультразвуковая доплерография, старение

DOI: 10.31857/S0869813923040052, **EDN:** VJAVLQ

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание адекватной перфузии ткани головного мозга имеет большое значение для его нормального функционирования [1–3]. Старение сопровождается изменениями в строении и функциональной активности мозговых сосудов, что может нарушать мозговую гемодинамику и способствовать изменению метаболизма мозга, развитию нейродегенеративных процессов, ишемии и цереброваскулярных заболеваний [4–8]. Среди количественных показателей мозговой гемодинамики, которые коррелируют с метаболизмом мозга в состоянии покоя, выделяют давление крови, сопротивление сосудов и скорость кровотока [9]. Данные, полученные на людях и экспериментальных животных, в подавляющем большинстве свидетельствуют о возрастном уменьшении скорости мозгового кровотока [7, 10–12]. Однако также имеются сведения об отсутствии изменений скоростных показателей кровотока в мозговых артериях при старении [11, 13] или их увеличении [14]. Различия

в получаемых результатах могут быть связаны как с методологическими особенностями измерения скорости кровотока и видовыми или регионарными отличиями [13], так и с существованием различий в изменении мозгового кровотока на разных этапах старения [15]. Целью данной работы было исследование скоростных показателей церебрального кровотока методом ультразвуковой доплерографии у молодых крыс и крыс на разных этапах старения. В задачи исследования входило проведение сравнительного анализа состояния кровотока коры и подкорковых структур полушарий головного мозга по величине линейных скоростей и индексов кровотока у молодых крыс линии Sprague-Dawley в возрасте 4-х месяцев и стареющих крыс в возрасте 18-ти и 23-х месяцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Sprague-Dawley в возрасте 4-х ($n = 19$, массой 358 ± 11 г), 18-ти ($n = 11$, массой 450 ± 65 г) и 23-х месяцев ($n = 9$, массой 525 ± 33 г). Использовались крысы из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург). До проведения эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Крысы наркотизировались золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). Среднее артериальное давление (АД), измеренное с помощью прибора для неинвазивного измерения АД (“Систола”, Netrobotics, Россия) в хвостовой артерии, у наркотизированных крыс в возрасте 4-х мес. составляло 128 ± 4 мм рт. ст., 18-ти мес. — 133 ± 4 мм рт. ст., 23 мес. — 134 ± 2 мм рт. ст.

Измерение скорости мозгового кровотока проводилось методом ультразвуковой доплерографии [16] через высверленное в теменной области черепа отверстие ($S \approx 1$ см²). Использовался ультразвуковой компьютеризированный доплерограф ММ-Д-К (Minimax Doppler v.1.7, УЗДП-009-02, Россия) с рабочей частотой датчика 25 МГц. Датчик устанавливался на область измерения через проводящий гель без сдавливания поверхности измерения. Глубина прохождения ультразвукового сигнала для датчика данной частоты составляет примерно 3–4 мм, что обеспечивало исследование кровотока в коре и подкорковых структурах полушарий головного мозга крыс. Оценка состояния кровотока проводилась по данным спектрального анализа доплеровского сигнала преимущественно с артериальных участков сосудистой сети обоих полушарий головного мозга [16]. С помощью программного обеспечения доплерографа автоматически рассчитывались величины линейных скоростей кровотока (пиковой (V_{ps}) и средней систолической (V_s), конечной (V_d) и средней диастолической (V_{pd}) и средней за сердечный цикл (V_m)). Также программа доплерографа рассчитывала индексы кровотока: индекс пульсации (Гослинга), отражающий упруго-эластические свойства артерий (PI) и индекс периферического сопротивления (Пурсело), отражающий состояние сопротивления кровотоку дистальнее места измерения (RI). Межполушарной асимметрии скоростей и индексов кровотока обнаружено не было.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Проверка экспериментальных данных на нормальное распределение проводилась с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Во всех случаях исследование на нормальность распределения показало его отсутствие хотя бы для одной из сравниваемых выборок, поэтому статистический анализ полученных данных проводился с использованием непараметрических методов. Сравнение сред-

Таблица 1. Параметры мозгового кровотока у крыс разного возраста

Линейная скорость кровотока, см/с	Крысы в возрасте 4-х месяцев ($n = 19$)	Крысы в возрасте 18-ти месяцев ($n = 11$)	Крысы в возрасте 23-х месяцев ($n = 9$)
Пиковая систолическая, V_{ps}	37.58 [24.6; 46.93]	45.03 [35.82; 62.16]**	34.51 [16.71; 42.44]**
Средняя систолическая, V_s	0.51 [0.35; 0.71]	0.42 [0.29; 0.51]*	0.50 [0.33; 0.68]
Средняя за сердечный цикл, V_m	10.79 [5.69; 19.03]	20.77 [9.71; 30.27]*	9.86 [5.62; 20.12]
Конечная диастолическая, V_d	2.06 [0.71; 4.07]	3.48 [0.35; 7.63]*	2.44 [0.79; 3.42]
Средняя диастолическая, V_{pd}	0.08 [- 0.03; 0.18]	0.06 [- 0.02; 0.18]	0.07 [- 0.08; 0.14]

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ различия достоверны на двустороннем уровне значимости.

них данных независимых выборок при сравнении 2 групп проводилось с использованием U -критерия Манна–Уитни. Данные в таблице и на графиках представлены как медиана [25-й перцентиль; 75-й перцентиль]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значения скоростных показателей кровотока у крыс в возрасте 4-х мес. представлены в табл. 1. У 18-месячных крыс по сравнению с 4-месячными животными было отмечено увеличение пиковых скоростей кровотока: систолической (в среднем на 33.8%, $p = 0.01$, $U = 700$, критерий Манна–Уитни) и конечной диастолической (в среднем в 2 раза, $p = 0.02$, $U = 532$, критерий Манна–Уитни, табл.1). Средняя за сердечный цикл скорость кровотока также была увеличена (в среднем на 70.7%, $p = 0.02$, $U = 707$, критерий Манна–Уитни, табл. 1). Показатели средней систолической скорости кровотока снижались до 0.42 [0.29; 0.51] см/с по сравнению с 0.51 [0.35; 0.71] см/с у 4-месячных крыс (табл. 1).

Сравнительный анализ скоростей кровотока в различных участках полушарий головного мозга у молодых и 18-месячных крыс показал существование различий в лобной и теменной области полушарий. В лобной области увеличивалась пиковая систолическая (до 60.56 [35.19; 71.01] см/с по сравнению с 41.26 [28.56; 51.21] см/с у 4-месячных крыс), средняя за сердечный цикл (в среднем в 2 раза, $p = 0.02$, $U = 123.5$, критерий Манна–Уитни) и конечная диастолическая (до 4.53 [3.23; 8.26] см/с по сравнению с 2.69 [1.18; 5.67] см/с у крыс в возрасте 4-х мес.) скорости кровотока (рис. 1). Показатели средней систолической скорости кровотока снижались (0.54 [0.38; 0.98] см/с у крыс в возрасте 4-х мес.; 0.42 [0.33; 0.61] см/с у крыс в возрасте 18-ти месяцев).

В теменной области полушарий у животных в возрасте 18-ти месяцев по сравнению с более молодыми крысами увеличивались показатели пиковой систолической (до 60.88 [43.11; 67.94] см/с по сравнению с 35.59 [23.86; 55.97] см/с у 4-месячных крыс) и средней за сердечный цикл (в среднем на 27.46%, $p = 0.01$, $U = 108$, критерий Манна–Уитни) скоростей кровотока (рис. 1).

Показатели индекса RI к 18 мес. не изменялись (рис. 2). В то же время в лобной и теменной областях полушарий у 18-месячных крыс было отмечено снижение показателя индекса RI в среднем на 30% (рис. 3).

У 23-месячных крыс по сравнению с крысами в возрасте 4-х мес. отмечалось общее снижение пиковой систолической скорости кровотока (табл. 1). Изменение этого показателя было отмечено только в теменной и затылочной областях полушарий головного мозга. В теменной области V_{ps} снижалась в среднем на 35% ($p = 0.012$, $U = 110$, критерий Манна–Уитни), а в затылочной – в среднем на 20.11% ($p = 0.02$, $U = 192$, критерий Манна–Уитни) (рис. 1). В затылочной области также изменя-

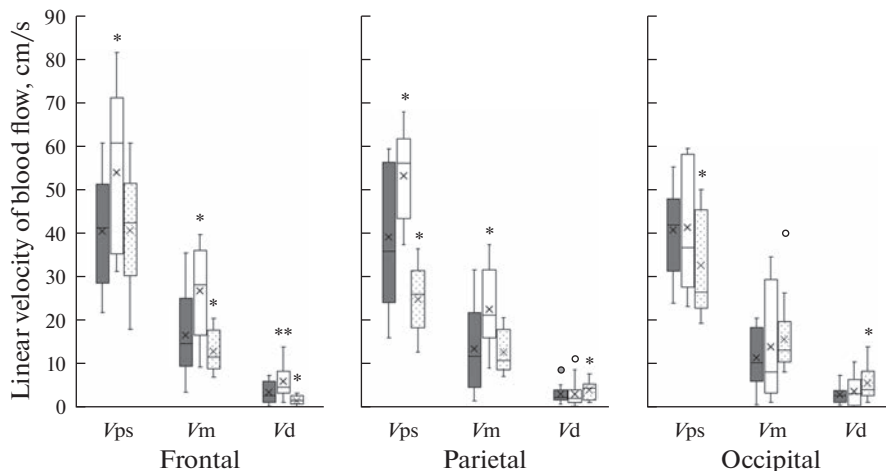


Рис. 1. Показатели линейных скоростей кровотока в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4-х мес., белая заливка – крысы в возрасте 18-ти месяцев, точечная штриховка – крысы в возрасте 23-х мес. Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля) соответственно, поперечная линия внутри – медиана (50-й процентиль), крестик внутри – среднее арифметическое, концы отрезков 10-й и 90-й процентиля, точки – выбросы. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4-х месяцев (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U -критерий Манна–Уитни).

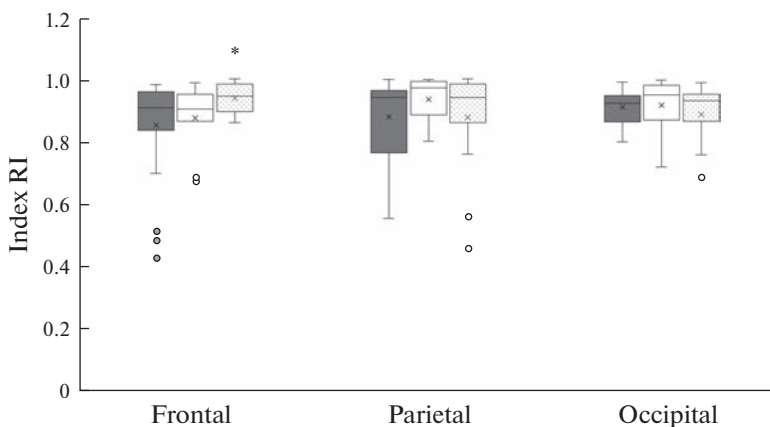


Рис. 2. Показатели индекса резистентности в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4-х мес., белая заливка – крысы в возрасте 18-ти мес., точечная штриховка – крысы в возрасте 23-х мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4-х месяцев (* $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Остальные обозначения как на рис. 1.

лись показатели конечной диастолической скорости кровотока (увеличение до 4.01 [2.72; 8.27] см/с по сравнению с 2.78 [1.24; 3.86] см/с у крыс в возрасте 4-х месяцев, рис. 1).

В лобной области было выявлено снижение средней за сердечный цикл (до 11.55 [8.86; 17.63] см/с по сравнению с 14.67 [9.46; 24.96] см/с у крыс в возрасте 4-х мес.) и

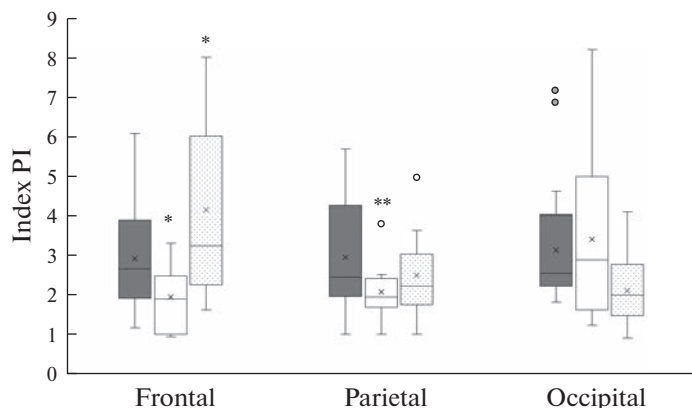


Рис. 3. Показатели пульсационного индекса в различных участках полушарий головного мозга: лобном (frontal), теменном (parietal) и затылочном (occipital). Темная заливка – крысы в возрасте 4-х мес., белая заливка – крысы в возрасте 18-ти мес., точечная штриховка – крысы в возрасте 23-х мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4-х мес. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U -критерий Манна–Уитни). Остальные обозначения как на рис. 1.

конечной диастолической скорости кровотока (в среднем в 2 раза, $p = 0.04$, $U = 88$, критерий Манна–Уитни) (рис. 1). Показатели индексов кровотока в этом участке полушарий головного мозга также увеличивались: RI увеличился до 0.94 [0.89; 0.98] отн. ед. по сравнению с 0.91 [0.83; 0.95] отн. ед. у крыс в возрасте 4-х мес. (рис. 2); PI – в среднем на 21.32%, $p = 0.04$, $U = 168$, критерий Манна–Уитни (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование показало, что скоростные параметры кровотока в коре и подкорковых структурах головного мозга крыс при старении меняются. У 18-месячных крыс по сравнению с более молодыми животными увеличиваются пиковые и средняя за сердечный цикл скорости кровотока. Изменения церебрального кровотока при старении связывают с возрастными нарушениями метаболизма и атрофией головного мозга [13]. Области мозга, в которых наблюдается наиболее высокий метаболизм глюкозы и кислорода являются лобная, височная и теменная. И именно эти области наиболее уязвимы к дегенеративным изменениям при старении [17–19]. В нашем исследовании у крыс в возрасте 18-ти мес. изменения наблюдались в лобной и теменной области, в то время как в затылочном регионе достоверных изменений кровотока обнаружено не было. Как в лобной, так и в теменной области полушарий у 18-месячных крыс по сравнению с более молодыми животными отмечалось увеличение пиковой систолической и средней за сердечный цикл скоростей кровотока. В лобной области также повышалась конечная диастолическая скорость. Такие изменения свидетельствуют о гиперперфузии этих участков полушарий головного мозга и развитии стенозирующих процессов, вероятно, связанных со снижением тонуса и сужением церебрального микроциркуляторного русла [5, 8, 20].

Изменение показателей средних скоростей кровотока были отмечены только в лобной области. В этом участке у крыс в возрасте 18-ти мес. снижалась средняя систолическая скорость кровотока. В то же время и в лобной, и в теменной областях полушарий головного мозга у 18-месячных крыс было обнаружено снижение пока-

зателя индекса пульсации в среднем на 20% (рис. 3). Наряду с увеличением конечной диастолической скорости кровотока снижение индекса пульсации и средней систолической скорости могут косвенно свидетельствовать о снижении сосудистого сопротивления [21] и активации коллатеральных путей кровотока [22], вероятно, связанных с увеличением числа капилляров [17], диаметра и извитости дистальных участков мелких артерий на данном этапе старения [17, 23]. Активация коллатерального кровотока, возможно, является компенсаторным путем восстановления нормальной перфузии коры головного мозга в условиях развития стенозирующих процессов.

У крыс в возрасте 23-х мес. показатели пиковых скоростей кровотока по сравнению со значениями у 4-месячных животных были снижены. В лобной области отмечалось снижение конечной диастолической скорости кровотока, а в теменной и затылочной – пиковой систолической. В лобной области также снижалась средняя систолическая скорость кровотока. Такие изменения скоростных показателей могут свидетельствовать о развитии гипоперфузионных процессов во всех участках полушарий головного мозга. Снижение пиковых скоростей кровотока в лобной области полушарий у 23-месячных крыс в наших экспериментах сопровождалось увеличением показателей индекса резистентности и индекса пульсации (в среднем на 20%). Сочетание низкой скорости с высокими показателями индексов кровотока может указывать на снижение объема кровотока в этом участке мозга, связанное с диффузным стенозом артериол и мелких артерий [24, 25].

Следовательно, гиперперфузия лобных и теменных областей полушарий головного мозга, наблюдаемая у 18-месячных крыс, предшествует развитию последующих гипоперфузионных нарушений кровотока на более поздних этапах старения. К 23 мес. гипоперфузионные изменения охватывают уже все исследованные нами участки полушарий головного мозга крыс. Для сохранения нормальной функции мозга большое значение имеет поддержание адекватной церебральной перфузии через плотную микроваскулярную сеть [2, 3]. В настоящее время появляются доказательства того, что старение вызывает многогранные функциональные нарушения в микроциркуляции головного мозга. На ранних этапах старения для поддержания адекватной оксигенации мозга необходимо увеличение мозгового кровотока [26], что обеспечивается увеличением плотности капиллярного русла и извилистости коллатеральных путей мозгового кровотока [23]. Но длительная гиперперфузия и дальнейшее старение могут приводить к повреждению сосудов микроциркулярного русла [27, 28] и общему уменьшению числа капилляров в коре головного мозга [23]. При длительном старении развивается эндотелиальная дисфункция, способствующая снижению NO-опосредованного ингибирования пролиферации, окислительного стресса и воспаления, что, в свою очередь, также приводит к апоптозу, уменьшению длины, диаметра и количества коллатеральных сосудов [2, 23, 29]. Кроме того, старение сопровождается нарушениями в системе эндотелина, приводящими к повышению миогенного тонуса и сужению просвета сосудов в микроциркуляторном участке мозгового сосудистого русла [30]. Все эти изменения могут являться причиной развития гипоперфузии и значительно увеличивать величину сосудистого сопротивления [2, 23].

Таким образом, установлено, что старение сопровождается изменением параметров мозгового кровотока в коре и подкорковых структурах головного мозга крыс. Изменения развиваются постепенно и отличаются на разных этапах старения. Первоначальное увеличение перфузии в лобной и теменной области полушарий головного мозга за счет повышения пиковых и средней за сердечный цикл скоростей кровотока и снижение уровня сопротивления мозговых сосудов, к 23 мес. сменяются гипоперфузионными процессами, наиболее выраженными в лобной области полушарий головного мозга.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 12/26 от 26.12.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Iadecola C* (2013) The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80(4): 844–866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>
2. *De Silva TM, Faraci FM* (2016) Microvascular dysfunction and cognitive impairment. *Cell Mol Neurobiol* 36: 241–258. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0308-1>
3. *Wang N, Allali G, Kesavadas C, Noone ML, Pradeep VG, Blumen HM, Verghese J* (2015) Cerebral small vessel disease and motoric cognitive risk syndrome: results from the Kerala-Einstein Study. *J Alzheimers Dis* 50: 699–707. <https://doi.org/10.3233/JAD-150523>
4. *Fulop GA, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Molnar A, Prodan CI, Kiss T, Csipo T, Lipecz A, Balasubramanian P, Farkas E, Toth P, Sorond F, Csiszar A, Ungvari Z* (2019) Role of age-related alterations of the cerebral venous circulation in the pathogenesis of vascular cognitive impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 316(5): H1124–H1140. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00776.2018>
5. *Diaz-Otero JM, Garver H, Fink GD, Jackson WF, Dorrance AM* (2016) Aging is associated with changes to the biomechanical properties of the posterior cerebral artery and parenchymal arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310(3): H365–H375. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00562.2015>
6. *Kalaria RN* (2012) Cerebrovascular disease and mechanisms of cognitive impairment: evidence from clinicopathological studies in humans. *Stroke* 43(9): 2526–2534. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.655803>
7. *Staffaroni AM, Cobigo Y, Elahi FM, Casaletto KB, Walters SM, Wolf A, Lindbergh CA, Rosen HJ, Kramer JH* (2019) A longitudinal characterization of perfusion in the aging brain and associations with cognition and neural structure. *Hum Brain Mapp* 40(12): 3522–3533. <https://doi.org/10.1002/hbm.24613>
8. *Toth P, Tarantini S, Csiszar A, Ungvari Z* (2017) Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 312(1): H1–H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2016>
9. *Hshieh TT, Dai W, Cavallari M, Guttmann CR, Meier DS, Schmitt EM, Dickerson BC, Press DZ, Marcantonio ER, Jones RN, Gou YR, Trivison TG, Fong TG, Ngo L, Inouye SK, Alzop DC, SAGES Study Group* (2017) Cerebral blood flow MRI in the nondemented elderly is not predictive of post-operative delirium but is correlated with cognitive performance. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(4): 1386–1397. <https://doi.org/10.1177/0271678X16656014>

10. *Aanerud J, Borghammer P, Chakravarty MM, Vang K, Rodell AB, Jónsdóttir KY, Møller A, Ashkanian M, Vafaei MS, Iversen P, Johannsen P, Gjedde A* (2012) Brain energy metabolism and blood flow differences in healthy aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7): 1177–1187. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.18>
11. *Nemati M, Bavit AS, Taheri N* (2009) Comparison of normal values of Duplex indices of vertebral arteries in young and elderly adults. *Cardiovasc Ultrasound* 7: 2. <https://doi.org/10.1186/1476-7120-7-2>
12. *Zhang N, Gordon ML, Goldberg TE* (2017) Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI at resting state in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 72: 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.11.023>
13. *Claassen JAHR, Thijssen DHJ, Panerai RB, Faraci FM* (2021) Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. *Physiol Rev* 101(4): 1487–1559. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2020>
14. *Филатова ОВ, Сидоренко АА* (2015) Возрастные и половые особенности гемодинамических характеристик артерий головного мозга. *Acta Biol Sibirica* 3–4. [*Filatova OV, Sidorenko AA* (2015) Age and sex characteristics of hemodynamic characteristics of cerebral arteries. *Acta Biol Sibirica* 3–4. (In Russ)].
15. *Alwatban MR, Aaron SE, Kaufman CS, Barnes JN, Brassard P, Ward JL, Miller KB, Howery AJ, Labrecque L, Billinger SA* (2021) Effects of age and sex on middle cerebral artery blood velocity and flow pulsatility index across the adult lifespan. *J Appl Physiol* 130(6): 1675–1683. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00926.2020>
16. *Gorshkova OP* (2022) Age-related changes in the indices of cerebral blood flow velocity in rats. *J Evol Biochem Phys* 58(3): 894–900. <https://doi.org/10.1134/S0022093022030231>
17. *Chen JJ, Rosas HD, Salat DH* (2013) The relationship between cortical blood flow and sub-cortical white-matter health across the adult age span. *PLoS One* 8(2): e56733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056733>
18. *Mander BA, Rao V, Lu B, Saletin JM, Lindquist JR, Ancoli-Israel S, Jagust W, Walker MP* (2014) Prefrontal atrophy, disrupted NREM slow waves and impaired hippocampal-dependent memory in aging. *Nat Neurosci* 16: 357–364. <https://doi.org/10.1038/nn.3324>
19. *Oh H, Madison C, Villeneuve S, Markley C, Jagust WJ* (2014) Association of gray matter atrophy with age, β -amyloid, and cognition in aging. *Cereb Cortex* 24: 1609–1618. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht017>
20. *Heyer EJ, Mergeche JL, Connolly ES Jr* (2014) Middle cerebral artery pulsatility index and cognitive improvement after carotid endarterectomy for symptomatic stenosis. *J Neurosurg* 120(1): 126–131. <https://doi.org/10.3171/2013.8.JNS13931>
21. *Albina G, Fernandez Cisneros L, Laiño R, Nobo UL, Ortega D, Schwarz E, Barja L, Lagos R, Gíngier A, Ameriso SF* (2004) Transcranial Doppler monitoring during head up-tilt testing in patient with suspected neurocardiogenic syncope. *Europace* 6(1): 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.eupc.2003.09.009>
22. *Guan J, Zhang S, Zhou Q, Li C, Lu Z* (2013) Usefulness of transcranial Doppler ultrasound in evaluating cervical-cranial collateral circulations. *Interv Neurol* 2(1): 8–18. <https://doi.org/10.1159/000354732>
23. *Faber JE, Zhang H, Lassance-Soares RM, Prabhakar P, Najafi AH, Burnett MS, Epstein SE* (2011) Aging causes collateral rarefaction and increased severity of ischemic injury in multiple tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(8): 1748–1756. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.227314>
24. *Sharma VK, Tsvigoulis G, Lao AY, Malkoff MD, Alexandrov AV* (2007) Noninvasive detection of diffuse intracranial disease. *Stroke* 38(12): 3175–3181. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.490755>
25. *Vagli C, Fiscicaro F, Vinciguerra L, Puglisi V, Rodolico MS, Giordano A, Ferri R, Lanza G, Bella R* (2020) Cerebral Hemodynamic Changes to Transcranial Doppler in Asymptomatic Patients with Fabry's Disease. *Brain Sci* 10(8): 546. <https://doi.org/10.3390/brainsci10080546>
26. *Wierenga CE, Hays CC, Zatar ZZ* (2014) Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI as a preclinical marker of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 42: S411–S419. <https://doi.org/10.3233/JAD-141467>
27. *Ghaffari M, Alaraj A, Du X, Zhou XJ, Charbel FT, Linninger AA* (2018) Quantification of near-wall hemodynamic risk factors in large-scale cerebral arterial trees. *Int J Numer Method Biomed Eng* 34(7): e2987. <https://doi.org/10.1002/cnm.2987>

28. O'Rourke MF, Safar ME (2005) Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 46: 200–204. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000168052.00426.65>
29. Moore SM, Zhang H, Maeda N, Doerschuk CM, Faber JE (2015) Cardiovascular risk factors cause premature rarefaction of the collateral circulation and greater ischemic tissue injury. *Angiogenesis* 18(3): 265–281. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9465-6.0.1007/s10456-015-9465-6>
30. Young AP, Zhu J, Bagher AM, Denovan-Wright EM, Howlett SE, Kelly MEM (2021) Endothelin B receptor dysfunction mediates elevated myogenic tone in cerebral arteries from aged male Fischer 344 rats. *Geroscience* 43(3): 1447–1463. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00309-7>

Features of Changes in the Velocity Indicators of Cerebral Blood Flow in Rats at Different Stages of Aging

O. P. Gorshkova*

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

**e-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Changes in the velocity of cerebral blood flow can make a significant contribution to the formation of age-related cerebrovascular diseases. The age-related changes in the velocity indicators of cerebral blood flow in rats at different stages of aging were studied. Using Doppler ultrasound the state of blood flow in the cortex and subcortical structures of the cerebral hemispheres was analyzed by the value of linear velocities and blood flow indexes in young Sprague-Dawley 4-month-old and aging 18 and 23-month-old rats. It has been established that aging is accompanied by changes in the parameters of cerebral blood flow in the cortex and subcortical structures of the rat brain. Changes develop gradually and differ at different stages of aging. By 18 months, perfusion in the frontal and parietal regions hemispheres of the brain increases due to an increase in peak and mean velocity per cardiac cycle and a decrease in the level of resistance of cerebral vessels. These processes precede the development of subsequent hypoperfusion disorders of blood flow observed at later stages of aging. Hypoperfusion changes in 23-month-old rats are most pronounced in the frontal region of the cerebral hemispheres and are characterized by a decrease in peak velocities and an increase in blood flow indexes.

Keywords: cerebral blood flow velocity, Doppler ultrasound, aging

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОФАГОВ
СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ
И СУБПЕРИНЕВРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

© 2023 г. Е. С. Петрова¹, *, Е. А. Колос¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iempes@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.02.2023 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 07.03.2023 г.

Изучена динамика изменений процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крыс Вистар-Киото после травмы (наложения лигатуры, 40 с): исследованы плотность Iba-1⁺ макрофагов и состояние миелиновых волокон, окрашенных люксолевым прочным синим, в дистальном сегменте нерва в разные сроки после повреждения. Части крыс субпериневрально трансплантировали мезенхимные стволовые клетки костного мозга крыс той же линии. Показано, что наибольшая плотность распределения макрофагов в дистальном сегменте нерва наблюдается через 7 сут после операции. Применение клеточной терапии приводит к снижению числа макрофагов в этот срок и к задержке демиелинизации поврежденных нервных волокон. Через 60 сут после операции плотность популяции макрофагов и количество ремиелинизированных регенерирующих нервных волокон дистального сегмента нерва не отличается у контрольных (лигатура) и подопытных (лигатура и введение мезенхимных стволовых клеток) животных. Молекулярные механизмы отмеченных изменений в ранние сроки после повреждения требуют дальнейших исследований.

Ключевые слова: нерв крысы, регенерация, мезенхимные стволовые клетки, макрофаги, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0869813923040076, EDN: VJJZZ

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий в экспериментальных нейробиологических исследованиях активно ведется разработка способов стимуляции регенерации нервных проводников с применением мезенхимных стволовых клеток (МСК), полученных из разных тканей [1, 2]. МСК рассматривают как источник ростовых факторов и цитокинов, которые влияют на репаративные процессы в поврежденных нервах. Известно, что МСК вырабатывают такие биологически активные вещества, как ростовые (эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста β , тромбоцитарный фактор роста, фактор роста гепатоцитов и др.), ангиогенные (bFGF, VEGF), антиоксидантные, иммуносупрессивные и другие факторы, способные оказывать репаративное, антиапоптотическое, противовоспалительное и антифибротическое влияние на ткани, а также комплекс цитокинов и хемокинов [3]. В исследованиях, выполненных на различных экспериментальных моделях повре-

жденного нерва с использованием генной терапии, доказано, что некоторые из них оказывают воздействие на рост нервных волокон: например, нейротрофический фактор головного мозга [4], фактор роста гепатоцитов [5], фактор роста фибробластов (FGF2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [6]. Кроме того, МСК могут оказывать влияние на шванновские клетки (нейролеммоциты) и фибробласты эндоневрия, на ангиогенез микрососудов эндоневрия [7], на клетки соединительнотканной оболочки нерва. Влияние экзогенных МСК на изменение клеточных взаимодействий, происходящих в нерве в ответ на травму, остается малоизученным. Удобной моделью для изучения межклеточных коммуникаций, происходящих в нерве после повреждения, является субпериневральная трансплантация МСК.

Известно, что после травмы нерва в его дистальном сегменте начинается валлеровская дегенерация (WD), включающая в себя распад нервных волокон, их демиелинизацию, миграцию гематогенных макрофагов, дедифференцировку шванновских клеток и ряд других клеточных и молекулярных изменений [8–10]. Практически одновременно из проксимального отдела нерва начинают расти на периферию регенерирующие аксоны. Большое значение для осуществления их регенерации имеют макрофаги [11]. Резидентные и гематогенные макрофаги принимают участие в уборке продуктов распада миелина, а также модулируют шванновские клетки и, вырабатывая факторы роста, цитокины, белки экстрацеллюлярного матрикса, создают необходимое для регенерации нервных волокон микроокружение [12]. Каскад событий, развивающихся в дистальном сегменте поврежденного нерва, достаточно сложен, многие вопросы, касающиеся взаимодействия клеток эндоневрия и их регуляции, до сих пор неясны [3, 10]. Целью настоящей работы явилось исследование $I\beta\alpha-1^+$ макрофагов в седалищном нерве крысы после травмы и однократной трансплантации МСК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали крыс инбредной линии Вистар-Киото массой 200–250 г ($n = 50$). Повреждение седалищных нервов крыс и трансплантацию МСК осуществляли по методу, описанному в предыдущих исследованиях [13, 14]. У крыс-реципиентов под эфирным наркозом после эпиляции делали разрез кожи размером 1–1.5 см на уровне верхней трети бедра, раздвигали подлежащие мышцы и повреждали седалищный нерв путем наложения лигатуры в течение 40 с. Части животных субпериневрально в крупный нервный ствол седалищного нерва вводили взвесь МСК (5×10^4 в 5 мкл культуральной среды). Животным контрольной группы повреждали седалищный нерв аналогичным образом и вводили субпериневрально культуральную среду в объеме 5 мкл. МСК костного мозга крыс Вистар-Киото получали в ООО Транс-Технологии (ген. директор к. б. н. Д.Г. Польшинцев). Выделение МСК и их характеристика представлены в работе Зиньковой и соавт. [15]. МСК выделяли из костного мозга бедренной кости крыс Вистар-Киото и культивировали в стандартных условиях. Проведенное фенотипирование показало, что 97% клеток полученной взвеси экспрессирует на поверхности $CD90^+$. Ранее показано, что используемые для трансплантации клетки в условиях *in vitro* обладают свойствами, характерными для МСК: адгезивностью, морфологическим сходством с фибробластами и экспрессией виментина [13].

После операции крыс содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к корму и воде. Через 1, 7, 21 и 60 сут после операции животных умерщвляли передозировкой паров этилового эфира, выделяли фрагменты седалищного нерва и фиксировали в течение 1 суток в растворе цинк-этанол-формальдегида [16]. Для дальнейших гистологических исследований материал обезжизивали в этиловом спирте и ксилоле и заливали в парафин. Срезы седалищных нервов

изготавливали на ротационном микротоме фирмы Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). Толщина срезов составляла 5 мкм.

Для идентификации макрофагов проводили иммуногистохимическую реакцию на белок Iba-1. Первичные антитела наносили на депарафинированные срезы. В качестве первичных антител использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (разведение 1 : 800, AbCam, Великобритания). При выявлении комплекса антиген–антитело применяли вторичные антикозы биотинилированные антитела и стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit (R&D Systems, США). Визуализацию продукта иммуногистохимической реакции проводили при помощи диаминобензидинового хромогена (DAB+) (Agilent, США; ранее Dako, Дания). После проведения реакций часть срезов подкрашивали толуидиновым синим для обзорного гистологического анализа препаратов.

Для изучения изменений миелиновых оболочек применяли гистохимическое окрашивание люксолевым прочным синим (Luxol fast blue) (LFB). При отработке протокола окрашивания основывались на рекомендациях Niemі и соавт. [17] и Коржевского и соавт. [18].

Области с Iba-1⁺ или LFB-реакцией измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ. Площадь, занятую структурами с положительной реакцией, выражали в процентах от общей исследованной площади. Измерения проводили на 4–5 изображениях при увеличении микроскопа $\times 400$ (для миелина) и при увеличении $\times 100$ (для макрофагов). При проведении статистического анализа применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Парное сравнение показателей производилось по *U*-критерию. Данные гистограмм приведены как среднее значение в группе со стандартным отклонением. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологический анализ продольных срезов седалищного нерва показал, что в интактном нерве крысы структуры, содержащие белок Iba-1, в большем количестве встречаются в эпинеуральной соединительнотканной оболочке, в эндоневрии они представлены в незначительном числе. Выявленные в интактном нерве крысы отдельные Iba-1⁺ клетки являются резидентными макрофагами. Они присутствуют в эндоневрии среди нервных волокон, нейролеммоцитов, фибробластов и других клеточных элементов. Это небольшие отростчатые клетки неправильной формы, большинство из них вытянуты вдоль нервных волокон. Нередко они встречаются вблизи кровеносных микрососудов. Через 1 сут после операции в дистальном сегменте нерва крысы плотность популяции макрофагов достоверно не меняется по сравнению с нервом интактных животных ни в контрольной, ни в опытной группе. Однако некоторые Iba-1⁺ клетки становятся более заметными, увеличиваясь в размерах.

Через 7 сут после повреждения на срезах дистального сегмента нервного ствола определяли площадь, занимаемую Iba-1⁺ клетками. Оказалось, что в этот период в его эндоневрии резко увеличивается количество макрофагов по сравнению с интактным нервом. Об этом свидетельствует достоверное увеличение площади среза, занятой структурами с положительной реакцией на Iba-1 (рис. 1). В настоящем исследовании показано, что через 7 сут Iba-1⁺ макрофаги выстраиваются цепочками вдоль погибших нервных волокон и фагоцитируют продукты распада нейритов и их миелиновых оболочек (рис. 2а). В более поздние сроки наблюдений их число снижается и через 60 сут не отличается от контроля (рис. 1).

Сравнительное исследование площади, занимаемой иммунореактивными клетками в группе крыс с лигатурой и в группе крыс, которым после наложения лигатуры

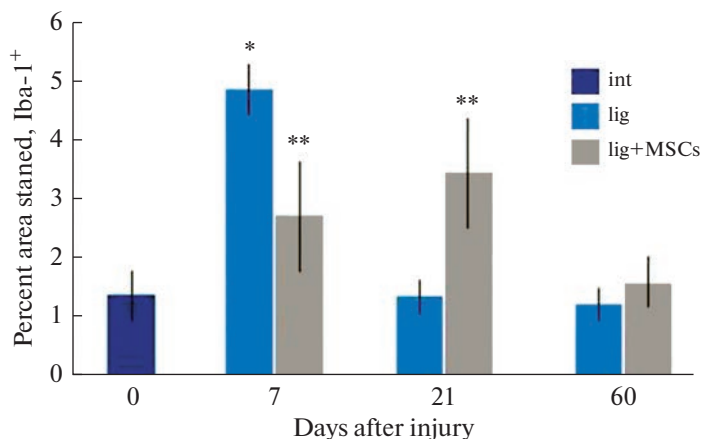


Рис. 1. Изменение плотности распределения Iba-1⁺ макрофагов в седалищном нерве крысы в разные сроки после повреждения. По оси ординат – доля площади, занимаемой Iba-1⁺ структурами, %. * $p < 0.05$ по сравнению с интактным нервом; ** $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (лигатура).

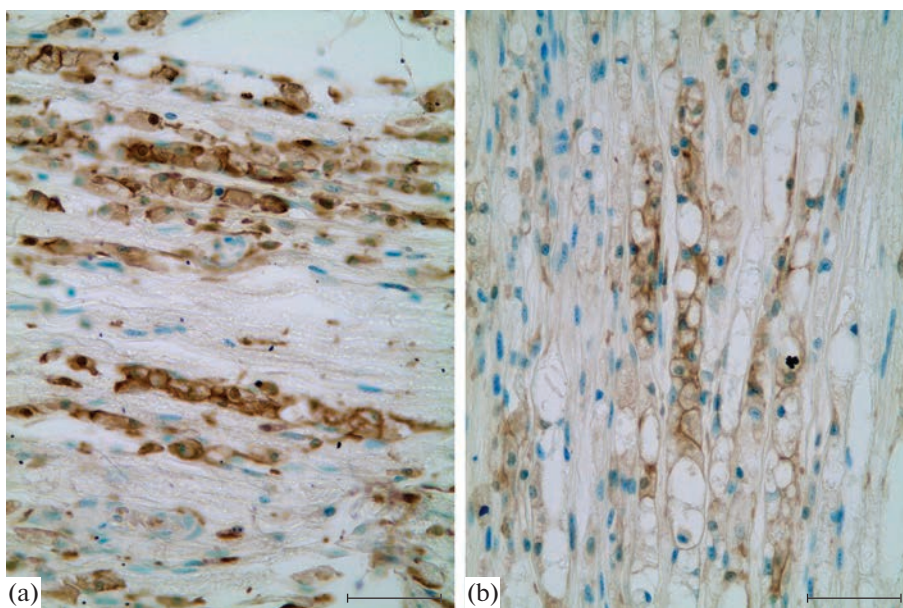


Рис. 2. Iba-1⁺ макрофаги в нервном стволе крысы через 7 суток после наложения лигатуры (a) и после наложения лигатуры и введения МСК (b). Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 (макрофаги коричневого цвета), подкраска толуидиновым синим. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

трансплантировали МСК, показало, что однократное введение суспензии МСК приводило к заметному снижению количества Iba-1⁺ макрофагов (рис. 1, 2b). Через 21 сут число макрофагов в дистальном сегменте после введения МСК превышало их количество в контрольной группе (лигатура без введения клеток) (рис. 1). Через 60 сут в эндоневрии дистального сегмента поврежденного нерва число макрофагов на единицу площади снижалось до уровня интактного нерва.

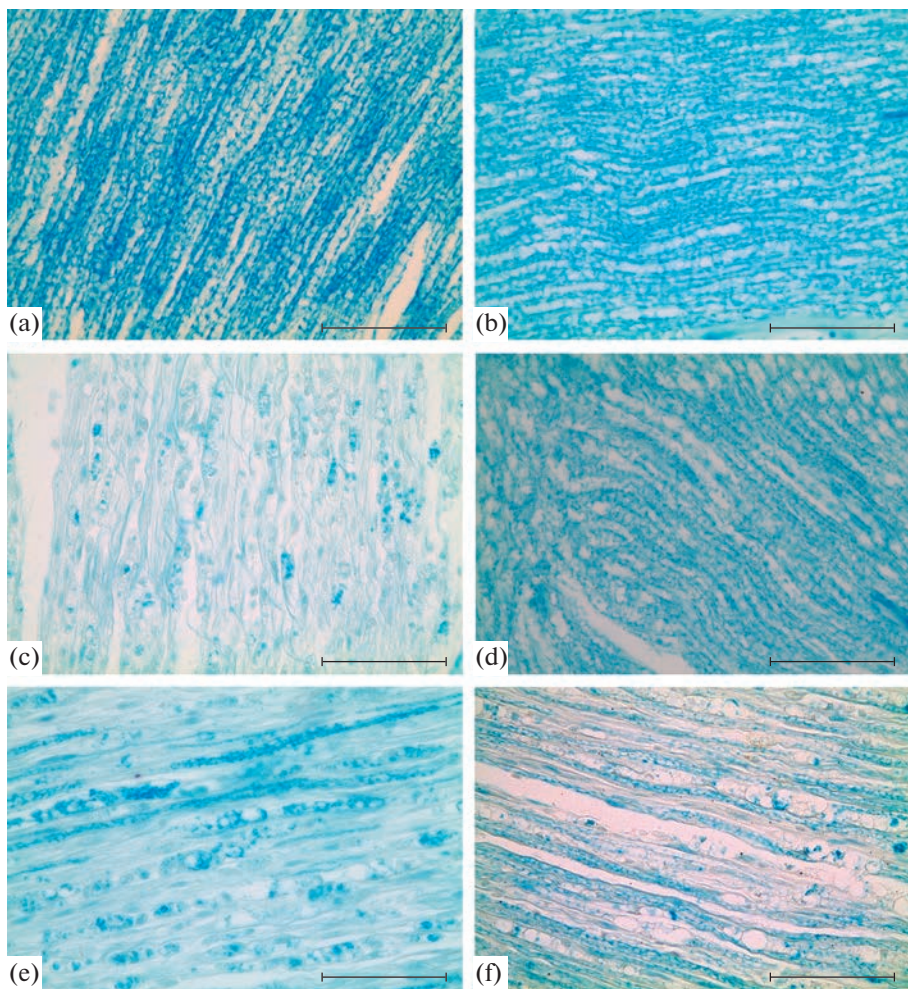


Рис. 3. Изменение плотности миелиновых нервных волокон в седалищном нерве крысы после наложения лигатуры и введения МСК. (а) – интактный нерв, (б) – проксимальный отдел нерва после травмы через 7 суток, (с) – дистальный сегмент нерва через 7 суток после травмы, (д) – дистальный сегмент нерва через 21 сутки после травмы, (е) – дистальный сегмент через 7 суток после лигатуры и введения МСК, (ф) – дистальный сегмент через 21 сутки после лигатуры и введения МСК. Окраска Luxol fast blue. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Для того, чтобы сопоставить полученные данные об изменении плотности популяции макрофагов в дистальном сегменте поврежденного нерва с процессами WD, мы исследовали состояние миелиновых волокон в изученные сроки после травмы и применения клеточной терапии. Для этого был использован метод визуализации миелина с помощью гистохимического окрашивания люксолевым прочным синим (рис. 3).

Подсчет окрашенной LFB площади нерва показал, что количество миелиновых волокон после травмы резко снижается к 7 сут и постепенно возрастает через 21 сут (рис. 3, 4). Что касается эксперимента с введением МСК, установлено, что через

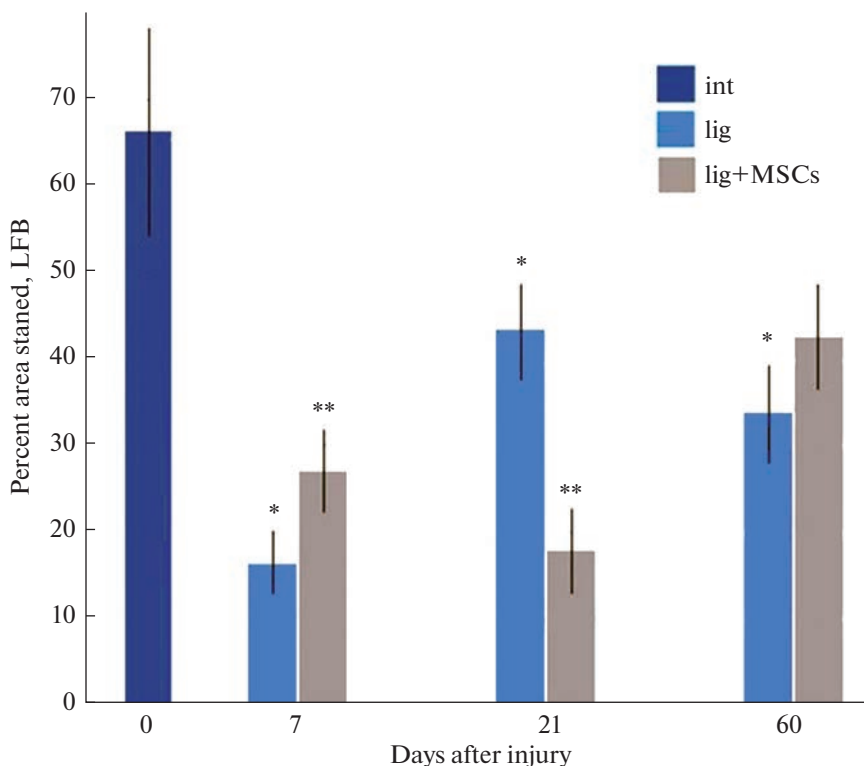


Рис. 4. Изменение плотности распределения LFB⁺ миелина в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в разные сроки после повреждения. По оси ординат – доля площади, занимаемой LFB⁺ структурами, %. * $p < 0.05$ по сравнению с интактным нервом; ** $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (лигатура).

7 сут после травмы в дистальном сегменте нерва сохраняется больше миелиновых волокон, чем в контроле. Однако через 21 сут после операции плотность миелиновых волокон ниже, чем в контрольных нервах. Через 60 сут в нервах животных контрольной и опытной группы процент миелинизации достоверно не отличается и возрастает по сравнению с предыдущим сроком (рис. 4). При этом процент миелинизации не достигает уровня интактного нерва.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что экспериментальная клеточная терапия с применением МСК может способствовать регенеративным процессам, протекающим в поврежденных тканях, однако ее роль в регуляции локального воспаления, возникающего в нервных проводниках в ответ на механическое повреждение, изучена недостаточно. В настоящей работе исследованы изменения, происходящие в седалищном нерве крысы после травмы и трансплантации МСК в период развития WD. Проведено сопоставление двух процессов: реакции макрофагов и реорганизации миелиновых оболочек нервных волокон дистального сегмента нерва.

Следует отметить, что макрофаги периферических нервных проводников являются малоизученной гетерогенной популяцией. Макрофаги, выявленные нами в

интактном нерве и в нерве через 1 сутки после травмы, представляют собой резидентные клетки, которые по данным литературы составляют 2–9% всех клеток нерва [19] и выполняют ряд важных функций. Во-первых, они участвуют в процессе фагоцитоза продуктов распада миелина в первые сутки после повреждения нерва, в период, предшествующий миграции в нерв гематогенных моноцитов/макрофагов [11]. Во-вторых, предположительно именно эти клетки ответственны за асептический статус воспалительной реакции, которая развивается в нерве после травмы в период, соответствующий WD. В-третьих, наряду с нейрореммоцитами они способствуют рекрутированию гематогенных макрофагов, миграции в дистальный сегмент нерва моноцитов из кровеносного русла. В нашем исследовании показано, что число резидентных макрофагов в интактном нерве крысы невелико и через 1 сут после повреждения их количество достоверно не меняется.

В последующие сроки после операции (7–60 сут) мы исследовали плотность распределения всех макрофагов, как резидентных, так и гематогенных, поскольку используемый в настоящей работе ИГХ-маркер – кальций-связывающий белок Iba-1 – не позволяет разделить различные субпопуляции мононуклеарных фагоцитов. Он применяется для идентификации макрофагов различных органов и тканей, в том числе микроглиоцитов ЦНС [20, 21] и макрофагов периферических нервных проводников [22–24].

Показано, что через 7 сут после операции в дистальном сегменте поврежденного нерва наблюдается наиболее высокая плотность распределения Iba-1⁺ клеток по сравнению с другими изученными сроками. Это наблюдение согласуется с ранее полученными данными гистологических и электронномикроскопических исследований [8]. Считается, что пик миграции моноцитов/макрофагов приходится на 7–14-е сутки после передавливания и зависит от степени поврежденности нерва и степени нарушения гемато-неврального барьера.

В настоящей работе плотность распределения макрофагов сопоставляли с изменением миелиновых нервных волокон в дистальном сегменте нерва. Для изучения состояния миелиновых волокон применяли метод визуализации миелина с помощью гистохимического окрашивания красителем LFB. LFB имеет свойство связываться с липопротеинами миелиновой оболочки и считается простым и надежным методом измерения клиренса миелина [17, 25].

Сопоставление данных, полученных при оценке популяции макрофагов и миелиновых нервных волокон в поврежденном нерве, показало, что в его дистальном сегменте наблюдается процесс WD, гибель части аксонов и разрушение их миелиновых оболочек. Через 7 сут выявлено увеличение числа макрофагов и снижение количества миелина. В дальнейшем наблюдается ремиелинизация регенерирующих нервных волокон, число макрофагов уменьшается.

Установлено, что под влиянием клеточной терапии последовательность событий меняется. Оказалось, что через 7 сут наблюдается замедление демиелинизации в дистальном сегменте нерва, часть тонких миелиновых волокон сохраняется, не подвергаясь WD. Плотность распределения миелина в этот срок у подопытных животных выше, чем у контрольных (повреждение нерва без введения МСК) в полтора раза. При этом плотность популяции макрофагов в группе животных с трансплантацией МСК ниже, чем в контроле. Через 21 сут у животных контрольной группы отмечена ремиелинизация большинства регенерирующих нервных волокон, в то время как у подопытных животных в этот срок доля площади, занятой миелином, оказывается значительно ниже, чем в контроле. Выравнивание процента миелинизации у контрольных и подопытных животных наблюдается через два месяца после операции и свидетельствует о том, что отмеченное воздействие МСК (в использованной концентрации) носит непродолжительный характер.

Полученный результат согласуется с данными японских исследователей Miyano и соавт. [27], которые изучали влияние однократного введения полученных из пуговины МСК на поврежденный седалищный нерв и соответствующие спинномозговые ганглии крысы. Было показано, что после применения МСК количество поврежденных вследствие травмы нерва нейронов спинномозговых ганглиев, а также Iba-1⁺ макрофагов в них значительно снижается. Работа Miyano и соавт. явилась первым исследованием, в котором изучено влияние клеточной терапии на процесс демиелинизации аксонов нерва. Впервые было установлено, что клеточная терапия может способствовать сохранности миелиновых волокон в дистальном сегменте нерва после повреждения [27].

Как отмечалось ранее, МСК оказывают влияние на репаративные процессы, происходящие в поврежденных нервных проводниках, благодаря секреции комплекса нейротрофических и ростовых факторов, цито- и хемокинов [3, 28]. Показано, что применение МСК (а также экзосом МСК или кондиционированной среды культуры МСК) может приводить к уменьшению нейропатической боли [29], способствовать сохранности нейронов реципиента [30, 31], влиять на демиелинизацию аксонов за счет уменьшения уровня провоспалительных цитокинов [27].

Экзогенные МСК, вырабатывая биологически активные вещества, а также непосредственно контактируя с эндогенными клетками реципиента, способны изменять микроокружение регенерирующих нервных волокон и влиять на популяции макрофагов и нейроремиеоцитов [29]. Дальнейшее изучение воздействия экзогенных МСК на функциональную активность макрофагов поврежденного нерва и на их поляризацию (трансформацию провоспалительных макрофагов М1 в иммуносупрессорные противовоспалительные клетки М2) могут прояснить механизм их влияния на процессы де- и ремиелинизации нервных волокон дистального конца поврежденного нерва.

Таким образом, в настоящей работе впервые изучена динамика Iba-1⁺ макрофагов в поврежденном седалищном нерве крысы в разные сроки после наложения лигатуры и однократной субперинеуральной трансплантации МСК костного мозга. Установлено, что при применении экспериментальной клеточной терапии наблюдается задержка миграции гематогенных макрофагов, что коррелирует с задержкой процесса демиелинизации поврежденных нервных волокон. Показано, что через 60 сут после операции плотность популяции макрофагов и количество ремиелинизированных регенерирующих нервных волокон дистального сегмента нерва не отличается у контрольных (лигатура) и подопытных (лигатура и введение МСК) животных. Молекулярные механизмы отмеченных на ранних сроках после повреждения нерва изменений требуют дальнейших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины” (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы государственного задания ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование и проведение экспериментов, получение и обработка данных, написание статьи (Е.С.П., Е.А.К).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ООО “Транс-Технологии” (ген. директор — к. б. н. Д.Г. Полянцев) за предоставленные мезенхимные стволовые клетки, а также к. б. н. Е.И. Исаевой (НИИОЧБ, Санкт-Петербург) за помощь и консультации при работе с культивируемыми МСК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lavorato A, Raimondo S, Boido M, Muratori L, Durante G, Cofano F, Vincitorio F, Petrone S, Titolo P, Tartara F, Vercelli A, Garbossa D* (2021) Mesenchymal stem cell treatment perspectives in peripheral nerve regeneration: systematic review. *Int J Mol Sci* 22 (2): 572. <https://doi.org/10.3390/ijms22020572>
2. *Siemionow M, Strojny MM, Kozłowska K, Brodowska S, Grau-Kazmierczak W, Cwykiel J* (2022) Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration. *Stem Cell Rev Rep* 18(2): 642–659. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10301-z>
3. *Петрова ЕС* (2022) Клеточные технологии в экспериментальной терапии повреждений нерва (проблемно-аналитический обзор). *Успехи совр биол* 142(6): 638–649. [*Petrova ES* (2022) Cell technologies in experimental damage therapy nerve (problem-analytical review). *Succes Modern Biol* 142(6): 638–649. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0042132422060060>
4. *Karagyaur M, Makarevich P, Semina E, Stambolsky D, Plekhanova O, Tkachuk V, Dyikanov D, Kalinina N* (2015) Non-viral transfer of BDNF and UPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed & Pharmacother* 74: 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.002>
5. *Boldyreva MA, Bondar IV, Stafeev IS, Makarevich PI, Beloglazova IB, Zubkova ES, Shevchenko EK, Molokotina YD, Karagyaur MN, Rainer EI, Parfyonova YV* (2018) Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury. *Biomed Pharmacother* 101: 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.138>
6. *Masgutov R, Zeinalova A, Masgutova G, Salafutdinov I, Garanina E, Syromiatnikova V, Idrisova K, Mul-lakhmetova A, Andreeva D, Mukhametova L, Rizvanov A, Bogov A, Kadyrov A, Pankov I* (2021) Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of PLASMID PBUD-COVEGF165-COFGF2 into the intact rat sciatic nerve. *Neural Regenerat Res* 16(9): 1882–1889. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306090>
7. *Petrova ES, Isaeva EN, Kolos EA, Korzhhevskii DE* (2018a) Vascularization of the damaged nerve under the effect of experimental cell therapy. *Bull Exp Biol Med* 165(1): 161–165. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4120-z>
8. *Ноздрачев АД, Чумасов ЕИ* (1999) Периферическая нервная система. СПб. Наука. [*Nozdrachev AD, Chumasov EI* (1999) Peripheral nervous system. St. Petersburg. Nauka. (In Russ)].
9. *Koeppen AH* (2004) Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220: 115–117. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.03.008>
10. *Kerns JM, Walter JS, Patetta MJ, Sood A, Hussain AK, Chung JJ, Deshpande A, DesLaurier JT, Dieter RA, Siemionow M, Seiler FA, Amirouche FML, Gonzalez MH* (2021) Histological assessment of Wallerian degeneration of the rat tibial nerve following crush and transection injuries. *J Reconstr Microsurg* 37(5): 391–404. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1716870>
11. *Kolter J, Kierdorf K, Henneke P* (2020) Origin and differentiation of nerve-associated macrophages. *J Immunol* 204 (2): 271–279. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901077>

12. *Chen P, Piao X, Bonaldo P* (2015) Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* 130(5): 605–618.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>
13. *Petrova E, Isaeva E, Kolos E, Korzhevskii D* (2018) Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in the epineurium and perineurium of the recipient rat. *Biol Communicat* 63(2): 123–132.
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.205>
14. *Petrova ES, Kolos EA* (2021) Nerve fiber regeneration in the rat sciatic nerve after injury and administration of mesenchymal stem cells. *Neurosci Behav Physiol* 51(4): 513–518.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01098-y>
15. *Zinkova NN, Sokolova IB, Shvedova EV, Bilibina AA, Kruglyakov PV, Polyntsev DG, Gilerovitch EG* (2007) Dynamics of morphological changes after transplantation of mesenchymal stem cells in rat brain provoked by stroke. *Cell Tissue Biol* 1(6): 482–490.
16. *Grigorev IP, Korzhevskii DE* (2018) Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (Review). *Modern Technol Med* 10(2): 156–165.
<https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
17. *Niemi JP, DeFrancesco-Lisowitz A, Roldán-Hernández L, Lindborg JA, Mandell D, Zigmund RE* (2013) A critical role for macrophages near axotomized neuronal cell bodies in stimulating nerve regeneration. *J Neurosci* 33(41): 16236–16248.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3319-12.2013>
18. *Коржевский ДЭ, Григорьев ИП, Колос ЕА, Сухорукова ЕГ, Кирик ОВ, Алексеева ОС, Гусельникова ВВ* (2015) Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация и оценка реакции нервных клеток на повреждение. Санкт-Петербург. СпецЛит. [*Korzhevskii DE, Grigoriev IP, Kolos EA, Sukhorukova EG, Kirik OV, Alekseeva OS, Gusel'nikova VV* (2015) Molecular neurodegeneration and evaluation of the response of nerve cells to damage. St. Petersburg. SpecLit. (In Russ)].
19. *DeFrancesco-Lisowitz A, Lindborg JA, Niemi JP, Zigmund RE* (2015) The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neuroscience* 302: 174–203.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.027>
20. *Kolos EA, Korzhevskii DE* (2020) Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae* 12(1(44)): 4–17.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>
21. *Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S* (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 (17): 3073–3084.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>
22. *Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E* (2011) Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *Neuroreport* 22: 911–917.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32834cd76a>
23. *Старинец АА, Пономаренко АИ, Манжуло ИВ, Манжуло ОС* (2019) Активность М1/М2-макрофагов при повреждении седалищного нерва у крыс. Нац научн центр морск биол им АВ Жирмунского ДВО РАН. Владивосток. 90–95. [*Starinets AA, Ponomarenko AI, Manzhulo IV, Manzhulo OC* (2019) M1/M2 macrophage activity in rats with sciatic nerve injury. Nat Res Center for Marine Biol AV Zhirmunsky FEB RAS. Vladivostok. 90–95. (In Russ)].
24. *Петрова ЕС, Колос ЕА* (2022) Iba-1-иммунопозитивные клетки в седалищном нерве крысы в норме и при патологии. Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практические аспекты. Уфа. Изд-во Башкирск гос универ. 226–230. [*Petrova ES, Kolos EA* (2022) Iba-1-immunopositive cells in the sciatic nerve of rats in normal and pathological conditions. Modern neurobiology: fundamental research and practical aspects. Ufa. Publisher: Bashkir State Univer. 226–230. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33184/snfipa-2022-10-19.24>
25. *Lindborg JA, Mack M, Zigmund RE* (2017) Neutrophils are critical for myelin removal in a peripheral nerve injury model of Wallerian degeneration. *J Neurosci* 37(43): 10258–10277.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2085-17.2017>
26. *Otake K, Toriumi T, Ito T, Okuwa Y, Moriguchi K, Tanaka S, Isobe Y, Saku T, Kurita K, Honda M.* (2020) Recovery of sensory function after the implantation of oriented-collagen tube into the resected rat sciatic nerve. *Regen Ther* 14: 48–58.
<https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.12.004>
27. *Miyano K, Ikehata M, Ohshima K, Yoshida Y, Nose Y, Yoshihara S-I, Oki K, Shiraishi S, Uzu M, Nonaka M, Higam Y, Uezono Y* (2022) Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats. *PLoS One* 17(2): e0262892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262892>
28. *Li X, Guan Y, Li C, Zhang T, Meng F, Zhang J, Li J, Chen S, Wang Q, Wang Y, Peng J, Tang J* (2022) Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in peripheral nerve injury. *Stem Cell Res Ther* 13(1): 18.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02690-2>

29. Shiue SJ, Rau RH, Shiue HS, Hung YW, Li ZX, Yang KD, Cheng JK (2019) Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats. *Pain* 160(1): 210–223. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001395>
30. Masgutov R, Masgutova G, Mullakhmetova A, Zhuravleva M, Shulman A, Rogozhin A, Syromiatnikova V, Andreeva D, Zeinalova A, Idrisova K, Allegrucci C, Kiyasov A, Rizvanov A (2019) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Applied in Fibrin Glue Stimulate Peripheral Nerve Regeneration. *Front Med* 6: 68. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00068>
31. Demyanenko SV, Pitinova MA, Kalyuzhnaya YN, Khaitin AM, Batalshchikova SA, Dobaeva NM, Shevtsova YA, Goryunov KV, Plotnikov EY, Pashkevich SG, Sukhikh GT, Silachev DN (2022) Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhance Neuroregeneration in a Rat Model of Sciatic Nerve Crush Injury. *Int J Mol Sci* 23: 8583. <https://doi.org/10.3390/ijms23158583>

Immunohistochemical Study of Macrophages of Sciatic Rat Nerve after Damage and Subperineural Injection of Mesenchymal Stem Cells

E. S. Petrova^a, * and E. A. Kolos^a

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

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

The dynamics of the processes of Wallerian degeneration in the Wistar-Kyoto rat sciatic nerve after injury (ligation, 40 s) was studied. The density of Iba-1⁺ macrophages and the state of myelin fibers stained with Luxol strong blue in the distal segment of the nerve at different times after injury were studied. Parts of rats were subperineurally transplanted with MSCs from the bone marrow of Wistar-Kyoto rats. It was shown that the highest distribution density of macrophages in the distal segment of the nerve was observed 7 days after surgery. The use of cell therapy leads to a decrease in the number of macrophages during this period and to a delay in the demyelination of damaged nerve fibers. Sixty days after the operation, the macrophage population density and the number of remyelinated regenerating nerve fibers of the distal nerve segment did not differ in control (ligature) and experimental (ligature and MSC injection) animals. The molecular mechanisms of the noted changes in the early stages after injury require further research.

Keywords: rat nerve, regeneration, mesenchymal stem cells, macrophages, immunohistochemistry

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И УРОВНЯ
ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ МОЗГА КРЫС
DAT-NET В РЕЖИМЕ СВОБОДНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ**

© 2023 г. И. В. Антонова^{1, *}, Е. О. Кучер^{1, 2}, Е. В. Филатова¹, А. Е. Веракса¹,
И. Ю. Морина¹, В. А. Завьялов², А. Ю. Егоров^{1, 2, 3}

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

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

³Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: risha.irina999@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 04.03.2023 г.

Принята к публикации 07.03.2023 г.

Формирование алкогольной зависимости связано с нарушением функционирования системы награды, центром которой является мезолимбическая часть дофаминовой системы. Крысы линии DAT-NET с их базовой гипердофаминергией являются перспективной моделью для исследования нейropsychических заболеваний, в основе которых лежат нарушения дофаминовой нейротрансмиссии, в том числе алкоголизма. Целью работы была оценка влияния свободной алкоголизации на питьевое, локомоторное, исследовательское поведение, тревогу и уровень тирозингидроксилазы у крыс с нарушением функционирования дофаминовой системы (DAT-NET). Исследование проведено на половозрелых самцах крыс линии DAT-NET ($n = 15$) и Wistar ($n = 13$), которые были разделены на 4 группы: “DAT-NET ethanol” ($n = 10$) и “Wistar ethanol” ($n = 9$), которые на протяжении 112 дней эксперимента находились в режиме свободной алкоголизации. Контрольные группы “DAT-NET water” ($n = 5$) и “Wistar water” ($n = 4$) не имели доступа к раствору этанола, не участвовали в поведенческих тестах. Для оценки предпочтения и потребления алкоголя использовали тест “Двустаканная проба” и еженедельно фиксировали массу потребляемого раствора этанола в домашних клетках. Для оценки поведения использовали тесты “Открытое поле” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. После алкоголизации для оценки уровня тирозингидроксилазы проводилось иммуногистохимическое исследование серии фронтальных срезов мозга, содержащих область прилежащего ядра. Обнаружено, что при свободной алкоголизации крысы линии DAT-NET не формируют предпочтения этанола. На фоне малого потребления этанола изначальная гиперактивность у крыс DAT-NET нивелируется. DAT-NET модель приводит к увеличению уровня тирозингидроксилазы в прилежащем ядре. Кроме этого, режим свободной алкоголизации приводит к снижению уровня тирозингидроксилазы в прилежащем ядре при развитии патологического увеличения тирозингидроксилазы, наблюдающегося у крыс DAT-NET, но не оказывает эффекта на контрольных животных.

Ключевые слова: крысы линии DAT-NET, дофамин, этанол, алкоголизация, алкогольная зависимость, прилежащее ядро, тирозингидроксилаза, поведение

DOI: 10.31857/S0869813923040027, **EDN:** VIVTZX

ВВЕДЕНИЕ

Начальное предпочтение алкоголя, приводящее к формированию алкогольной зависимости, связано с нарушением функционирования системы награды. Мезолимбическая часть дофаминовой системы головного мозга является центром награды и подкрепления и напрямую вовлечена в механизм алкогольной зависимости [1]. Мезолимбический путь системы награды и подкрепления в основном составляют дофаминергические нейроны, локализованные в области вентральной покрышки среднего мозга (VTA), проекции которых приходят в область прилежащего ядра [2]. Тирозингидроксилаза (ТГ) – основной фермент, лимитирующий скорость синтеза катехоламинов, содержится во всех дофаминовых нейронах. С помощью ТГ аминокислота L-тирозин превращается сначала в 3,4-дигидрокси-фенилаланин и далее в дофамин [3]. Одним из механизмов регуляции активности ТГ является механизм обратной связи, в ходе которого продукты распада катехоламинов подавляют активность этого фермента [4]. ТГ является общепризнанным маркером для изучения локализации, дифференцировки и развития катехоламинергических нейронов.

Крысы линии DAT-NET – это гетерозиготы линии DAT-KO, у которых с помощью методики для редактирования генома “нуклеаза цинковые пальцы” уменьшили число сайтов рестрикции белка-переносчика дофамина (DAT) только на одной аллели гена. В результате у крыс DAT-NET количество внеклеточного дофамина повышено на 50% по сравнению с животными дикого типа. В связи с этим данная линия обладает рядом поведенческих характеристик, таких как повышенная возбудимость, локомоторная активность и нестабильный уровень тревожности [5]. Модель DAT-NET подходит для изучения таких заболеваний как синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), шизофрения и аддиктивные расстройства [6].

В некоторых исследованиях на животных было показано, как употребление алкоголя в различных режимах алкоголизации влияет на дофаминергическую систему и вызывает изменения в поведении. Так, этанол снижал уровень дофамина в вентральном стриатуме у крыс Wistar, потребляющих раствор этилового спирта в умеренном количестве в режиме свободной алкоголизации, а также оказывал анксиолитический эффект, который выражался в снижении актов дефекации у крыс в тесте “Открытое поле” [7]. Хроническое потребление алкоголя в течение 365 дней приводило к снижению содержания фермента ТГ и дофамина, а также к увеличению количества DAT в вентральном стриатуме у крыс линии Sprague-Dawley [8]. При прерывистом полупринудительном спаивании у крыс Wistar с высоким потреблением этанола снижался уровень дофамина в прилежащем ядре [9]. У крыс линии Long-Evans через 48 ч после окончания длительной прерывистой алкоголизации с 20%-ным этанолом наблюдалось депрессивное поведение и ангедония [10]. Вместе с тем отмечалось и агрессивное поведение, коррелирующее с повышением уровня дофамина в прилежащем ядре, если крысы получали 10%-ный этанол перед социальными тестами [11]. Транспортёр DAT также вовлечен в формирование алкогольной зависимости. В режиме свободного выбора при увеличении концентрации раствора этанола до 32% самцы мышей DAT-NET употребляли больше этанола по сравнению с самцами DAT-KO [12]. У крыс линии Wistar Kyoto, потреблявших большое количество алкоголя при свободном выборе, увеличивалось количество сайтов связывания DAT в нейронах многих областей головного мозга, в том числе в прилежащем ядре [13]. Алкоголь распространяет свое влияние также на активность ТГ. При остром воздействии перорально введенного 20%-ного этанола у крыс линии Sprague-Dawley было отмечено повышение уровня ТГ во многих областях мозга, в том числе в черной субстанции, которая является частью мезолимбической системы [14]. У этой же линии крыс при хроническом потреблении 5%-ного рас-

творя этанола в условиях свободного выбора было обнаружено увеличение экспрессии мРНК ТГ в вентральном стриатуме [15]. У крыс Wistar после непрерывного потребления раствора этанола в течение 20 дней наблюдалось снижение иммунореактивности к ТГ в дендритных шипиках в области прилежащего ядра [16].

Несмотря на большое количество исследований, изучающих связь между потреблением алкоголя, его влиянием на дофаминергическую систему и поведение, механизмы предпочтения этанола при гипердофаминергии до конца не изучены. Использование крыс DAT-NET в качестве модели нарушения функционирования дофаминергической системы дает возможность оценить изменение поведенческих характеристик под влиянием этанола и получить новые данные для изучения воздействия этанола на уровень ТГ, который является важным звеном в синтезе дофамина. Методы прерывистой и полупринудительной алкоголизации обычно направлены на формирование мотивации предпочтения алкоголя и включают дополнительный фактор стресса, который может оказывать сильное воздействие на крыс DAT-NET. Ранее в пилотном исследовании нами было показано, что при полупринудительной алкоголизации крысы DAT-NET формируют предпочтение этанола быстрее, чем крысы Wistar, и при этом у них снижается уровень тревожности [17].

Режим свободной алкоголизации включает в себя свободный доступ к любой жидкости в домашней клетке без дополнительного стрессового воздействия, поэтому более всего подходит для изучения предпочтения алкоголя и связанных с этим первичных изменений в поведении животных в данной модели. Таким образом, целью работы была оценка влияния свободной алкоголизации на питьевое, локомоторное, исследовательское поведение, тревогу и уровень ТГ у крыс с нарушением функционирования дофаминергической системы (DAT-NET).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Исследование проведено на половозрелых самцах крыс линии DAT-NET ($n = 15$) и популяции Wistar ($n = 13$) в возрасте двух месяцев, массой тела не менее 180 г на начало эксперимента. Крысы линии DAT-NET были получены и верифицированы в виварии Санкт-Петербургского государственного университета. Верификация наличия нокаутного гена проводилась с помощью генотипирования классическим методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Крысы Wistar были получены в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Все животные были разделены на 4 группы. Экспериментальные группы “DAT-NET ethanol” ($n = 10$) и “Wistar ethanol” ($n = 9$) на протяжении 112 дней эксперимента находились в режиме свободной алкоголизации, где имели постоянный доступ к поилке с 10%-ным раствором этанола и к поилке с водой, участвовали во всех поведенческих тестах. Спустя 30 дней после окончания алкоголизации (142-й день эксперимента) из этих групп были отобраны произвольным образом 5 крыс для иммуногистохимического исследования. Контрольные группы: “DAT-NET water” ($n = 5$) и “Wistar water” ($n = 4$) имели постоянный доступ к воде и еде, но не имели доступа к раствору этанола, не участвовали в поведенческих тестах, и через 142 дня эксперимента были взяты для иммуногистохимического исследования мозга.

Содержание животных

Все крысы содержались на стандартном рационе по три (две) особи в клетке размером $570 \times 350 \times 250$ мм со свободным доступом к пище и поилкам с водой и с этанолом в условиях освещенности 12 ч свет, 12 ч темнота, температура воздуха —

20 ± 3°C и влажность 50–55%. В качестве пищи животные получали сбалансированный полнорационный корм ЛБК “Тосненский комбикормовый завод” в гранулированной форме, энергетическая ценность 11.39 МДж/кг.

Тест “Двухстаканная проба”

Для оценки предпочтения алкоголя крыса помещалась в клетку, аналогичную домашней, с двумя одинаковыми поилками. Одна из поилок содержала воду, другая – 10%-ный раствор этилового спирта. Локализацию поилок меняли при каждом следующем тестировании. Перед тестированием крысы подвергались пищевой депривации в течение 24 ч. Оценивали долю (%) выпитого раствора этанола по отношению к общему количеству выпитой жидкости в течение 10 мин наблюдения.

Производили оценку потребления массы раствора этанола, выпитого за неделю. Каждую неделю определяли массу выпитого из поилки раствора этанола. Для каждой клетки определяли массу выпитого этанола в г на кг массы тела животного в пересчете на 100%-ный этанол, затем рассчитывали среднее для одной крысы за один день недели.

Тест “Открытое поле”

Тестирование проводили в установке, которая представляет собой арену размером 600 × 600 мм, снабженную пятью “норковыми” отверстиями и освещенную лампой накаливания 720 люксов, на расстоянии 1.5 м от пола. В течение 5 мин регистрировали следующие параметры: длину пройденного пути, вертикальные стойки (количество), заглядывания в “норки” (количество), груминг (продолжительность, с), болюсы (количество), уринации (количество).

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”

Тестирование проводили на установке, имеющей два закрытых и два открытых рукава, в месте пересечения которых находится открытая площадка. Лабиринт был установлен на высоте 1 м от пола. Размер каждого рукава составлял 50 × 10 см, размер центра лабиринта – 10 × 10 см. Крысу помещали в центр установки носом к открытому рукаву и в течение 5 мин регистрировали время нахождения в открытых и в закрытых рукавах, время нахождения в центре лабиринта, а также вертикальные стойки, свешивания с лабиринта, акты дефекации и уринации.

Иммуногистохимическое исследование

Всем отобраным крысам в качестве наркоза внутрибрюшинно вводили хлоралгидрат (400 мг/кг) и декапитировали. Мозг фиксировали с помощью погружения в 4%-ный раствор параформальдегида в течение 6 дней (при 4°C). После криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной в фосфатно-солевом буфере с 0.9% NaCl (pH 7.4) мозг замораживали с помощью изопентана (Sigma, США) при –42°C и хранили при –80°C. С помощью криостата (Leica CM-1520, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов мозга (толщина 20 мкм) из области прилежащего ядра (nAcc – nucleus accumbens) согласно атласу мозга крысы [18]. Каждый шестой срез монтировали на стекла Super Frost/plus (Menzel, Германия), высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. Для исследования использован протокол, описанный ранее [19]. Для предварительной демаскировки антигена срезы на стеклах кипятили в цитратном буфере (pH 6.0) в течение 5 мин. Для реакции использовали первичные антитела мыши против ТГ (ТГ, Sigma, США), разведенные 1 : 1500, вторичные антитела козы против IgG мыши,

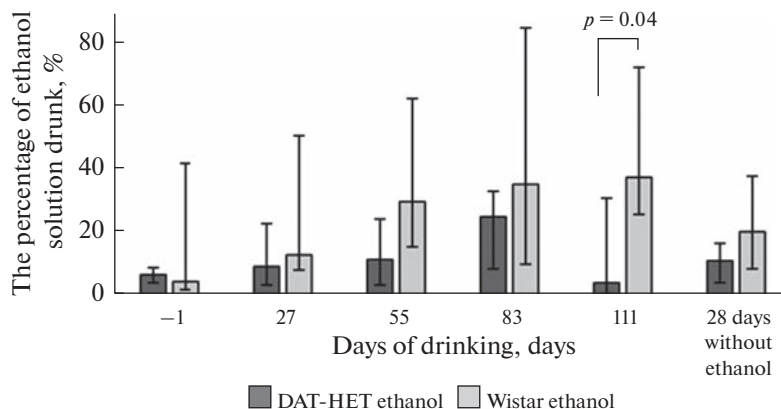


Рис. 1. Предпочтение этанола в тесте “Двухстаканная проба”. По оси абсцисс – дни алкоголизации, по оси ординат – доля (%) выпитого алкоголя. Здесь и далее указана значимость отличий ($p < 0.05$) по Mann–Whitney U test.

конъюгированные с биотином (VectorLabs., Великобритания), разведенные 1 : 600 и раствор стрептовидин-пероксидазы (BioLegend, США), разведенный 1 : 700. Стекляла подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в прозрачную среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия). Специфичность реакции проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных антител). Изображения из области nAcc были получены в проходящем свете с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1 (Германия) со встроенной видеокамерой AxioCam 712, программного обеспечения для захвата изображения Zen 3.4 (blue edition). С помощью программы Image J (NIH, США) оценивали оптическую плотность ТГ в иммунопозитивных отростках. Результаты представлены в условных единицах (у. е.).

Протокол исследования: массу выпитого раствора этанола в домашних клетках у крыс оценивали еженедельно. Тест “Двухстаканная проба” проводили на (–1-й), 27-, 55-, 83- и 111-й дни и через 28 дней после окончания алкоголизации. Тест “Крестовый лабиринт” – на (–2-й), 54- и 110-й дни алкоголизации, тест “Открытое поле” – на (–4-й), 52- и 108-й дни. Взвешивание крыс проводили каждую неделю эксперимента.

Статистическая обработка результатов

Результаты иммуногистохимического исследования оценивали с помощью H -критерия Крускала–Уоллиса и последующего апостериорного анализа межгрупповых различий по U -критерию Манна–Уитни с поправкой Холма–Бонферрони. Результаты представлены в виде бокс-плотов с медианой (М) 50% с интерквартильными размахами. Достоверность различий в поведенческих тестах оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни. Полученные результаты поведенческих тестов представляли в виде графиков с медианой с межквартильным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценивании предпочтения этанола в тесте “Двухстаканная проба” было обнаружено, что все животные на протяжении эксперимента в условиях свободного выбора в домашней клетке не предпочитали этанол воде (доля выпитого этанола в тестах не превышала 50% от общего количества выпитой жидкости). Крысы “DAT-НЕТ

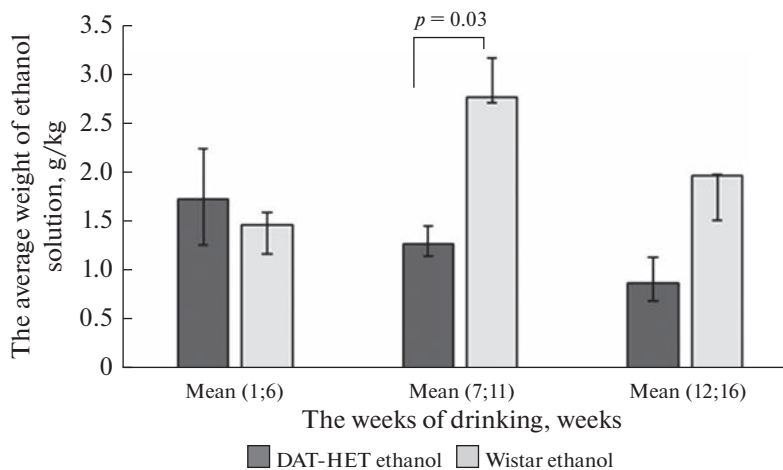


Рис. 2. Средняя масса раствора этилового спирта, выпитого одной крысой из группы за один день (в перерасчете на чистый этанол) в домашних клетках. По оси абсцисс – недели алкоголизации, по оси ординат – средняя масса раствора этилового спирта, выпитого одной крысой из группы за один день, в г/кг массы тела животного.

ethanol” достоверно меньше предпочитали этанол по сравнению с крысами “Wistar ethanol” на 111-й день алкоголизации. Через 28 дней после окончания алкоголизации доля выпитого этанола не превышала 30% для обеих групп (рис. 1).

Анализ еженедельных измерений массы выпитого раствора этанола в домашних клетках показал, что крысы группы “DAT-HET ethanol” употребляли достоверно меньше алкоголя в середине спаивания [среднее (7-я–11-я) неделя] по сравнению с крысами “Wistar ethanol” и не отличались от них в первые [среднее (1-я–6-я) неделя] и последние [среднее (12-я–16-я) неделя] недели алкоголизации (рис. 2).

В среднем по всем пятнадцати измерениям крысы “DAT-HET ethanol” также выпили достоверно меньше алкоголя по сравнению с крысами “Wistar ethanol” 1.3 ± 0.2 и 2.0 ± 0.2 г/кг соответственно ($p = 0.03$).

В тесте “Открытое поле” крысы “DAT-HET ethanol” демонстрировали высокую локомоторную и вертикальную активность (длина пройденного пути, стойки) по сравнению с крысами “Wistar ethanol” до начала алкоголизации и не отличались по исследовательской активности (заглядывания). После начала алкоголизации двигательная активность крыс “DAT-HET ethanol” снизилась, и поведение животных обеих групп не различалось (рис. 3). Исследовательская активность снизилась в середине и конце спаивания у крыс обеих групп, различий между группами не наблюдали. По вегетативным актам и грумингу крысы не различались на протяжении всего эксперимента.

В тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” крысы “DAT-HET ethanol”, в отличие от крыс “Wistar ethanol”, предпочитали открытые рукава в начале и спустя 54 дня после начала алкоголизации. Крысы “DAT-HET ethanol” проводили достоверно меньше времени в центре крестообразного лабиринта до начала и на 54-й день алкоголизации по сравнению с животными из группы “Wistar ethanol”. Крысы “DAT-HET ethanol” проводили достоверно меньше времени в закрытых рукавах лабиринта до начала алкоголизации. В конце алкоголизации между группами достоверных отличий не обнаружено. Количество свешиваний с открытых рукавов у группы “DAT-HET ethanol” в начале опыта было больше (8.3 ± 4.6 против 3.0 ± 1.0 , $p < 0.01$), однако в последующих тестах различия между группами не достоверны.

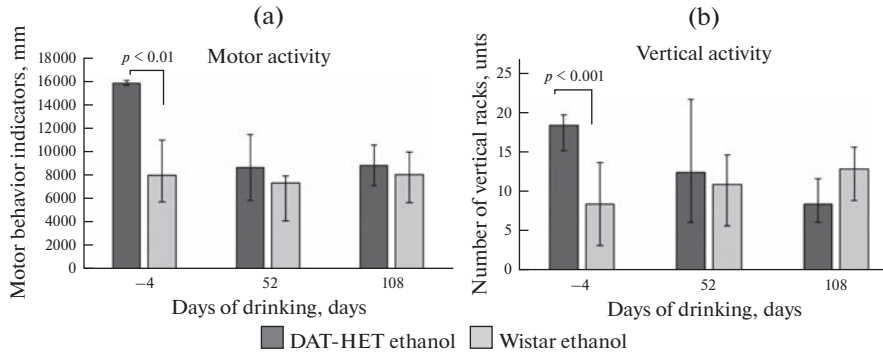


Рис. 3. Двигательная и вертикальная активность у крыс на протяжении алкоголизации. По оси абсцисс: дни алкоголизации; по оси ординат: длина пройденного пути, в мм (а), вертикальные стойки, количество (б).

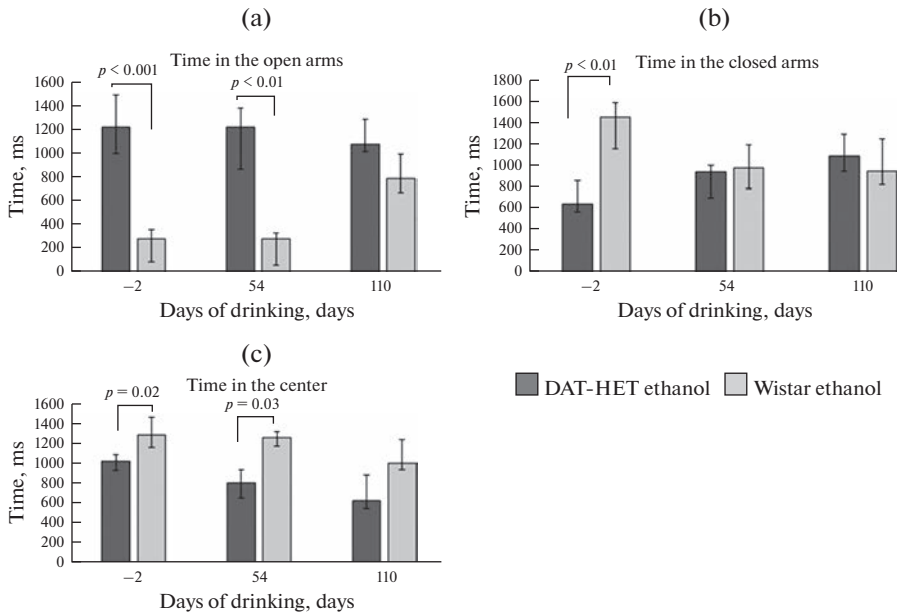


Рис. 4. Время, проведенное в закрытых (а), открытых рукавах (б) и в центре (с) приподнятого крестообразного лабиринта. По оси абсцисс: дни алкоголизации; по оси ординат: время в мс.

Также не обнаружено достоверных различий между группами по времени, проведенному в открытых рукавах.

В данном исследовании проведено измерение оптической плотности ТГ- иммунопозитивного материала в отростках дофаминергических нейронов в области прилежащего ядра (nucleus accumbens) (рис. 5) во всех группах крыс линий DAT-HET и Wistar.

Отмечена исходно более высокая оптическая плотность ТГ-иммунопозитивных отростков в области прилежащего ядра у крыс “DAT-HET water”: $M = 113$ (0.108; 0.126) по сравнению с группой “Wistar water”: $M = 108$ (0.103; 0.115). После алкоголизации у крыс “DAT-HET ethanol” отмечается снижение уровня ТГ: $M = 109$

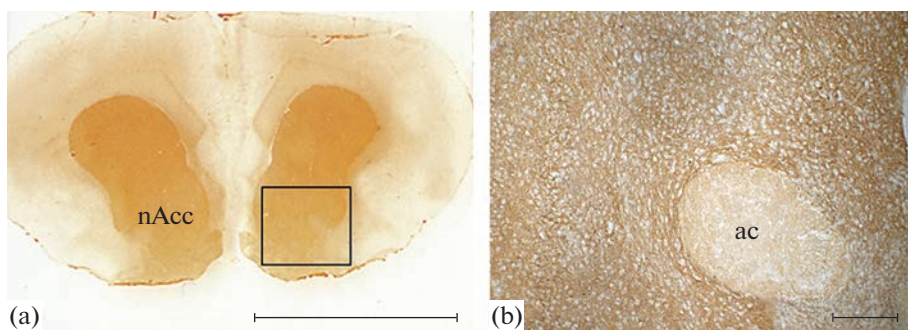


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция к тирозингидроксилазе на фронтальном срезе мозга крысы Wistar с областью прилежащего ядра (nAcc). При малом увеличении область nAcc выделена квадратом, при большем увеличении в nAcc расположены тирозингидроксилаза-иммунопозитивные отростки. Обозначение: ac – anterior commissure, масштаб: 5 мм (a) и 200 мкм (b).

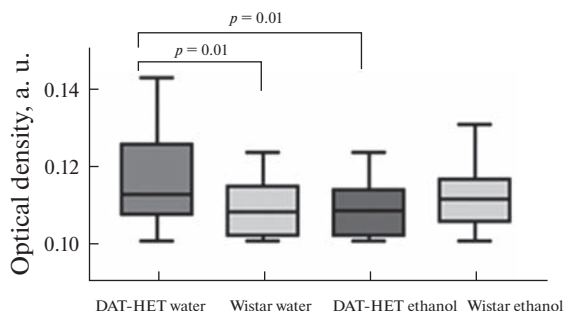


Рис. 6. Оптическая плотность ТГ-иммунопозитивных отростков в области прилежащего ядра у исследуемых групп крыс линий DAT-HET и Wistar. По оси ординат: оптическая плотность в условных единицах (у. е.). Обозначения: черная линия внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах. Достоверность отличий при $p < 0.05$, по Mann–Whitney U test.

(0.103; 0.114) по сравнению с группой “DAT-HET water” (рис. 6). Снижение оптической плотности ТГ у крыс “DAT-HET ethanol” отмечается и по сравнению с группой “Wistar ethanol”: $M = 112$ (0.106; 0.117) ($p = 0.04$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном эксперименте крысы DAT-HET не показали предпочтения этанола в условиях свободной алкоголизации в “Двухстаканной пробе” и демонстрировали низкий уровень его потребления в домашних клетках в течение недели. Ранее было показано, что в условиях полупринудительной алкоголизации крысы DAT-HET по сравнению с Wistar увеличивают потребление и предпочтение этанола [17]. Полученные в данном эксперименте результаты перекликаются с более ранними исследованиями о роли DAT в формировании предпочтения к этанолу именно в условиях свободной алкоголизации. Так, в аналогичных условиях у самцов мышей DAT-KO и DAT-HET снижалось потребление и предпочтение этанола [20]. Следует отметить, что крысы Wistar, потребляющие больше этанола в недельных пробах в сере-

дине эксперимента, тоже не демонстрировали достоверно устойчивого предпочтения в процессе алкоголизации и спустя месяц после нее. Наши данные согласуются с результатами работ, показавших, что подобная динамика потребления этанола характерна для животных, которые получают этанол при свободном выборе [21].

Локомоторная активность у крыс DAT-НЕТ до начала алкоголизации достоверно выше, чем у крыс линии Wistar, что неоднократно отмечалось ранее [5, 6]. В дальнейшем на фоне алкоголизации к середине эксперимента локомоторная активность животных линии DAT-НЕТ снизилась и не отличалась от показателей алкоголизирующихся крыс Wistar. Различий в исследовательской активности крыс DAT-НЕТ по сравнению с Wistar не было обнаружено, она была высокой в первом тестировании до начала спаивания и снизилась в последующих тестах. Эти же результаты отмечаются и в конце эксперимента. Возможно, на фоне свободной алкоголизации, при отсутствии формирования предпочтения этанола, уменьшение локомоторной и исследовательской активности у крыс DAT-НЕТ связано с седативным эффектом этанола, который снижает гиперреактивность этой группы животных. Также можно высказать предположение, что на это могут влиять такие факторы, как привыкание к тестовой арене открытого поля и старение животных в процессе эксперимента.

Гиперреактивность крысы DAT-НЕТ демонстрируют и в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”, что также соответствует поведенческим характеристикам линии [6]. До алкоголизации они статистически значимо больше по сравнению с Wistar проводят времени в открытых рукавах и меньше в центре лабиринта. Такое соотношение нахождения в открытых рукавах и в центре, возможно, свидетельствует о высокой реактивности крыс данной линии. На фоне алкоголизации эта тенденция сохраняется до середины эксперимента, однако в конце эксперимента различия с крысами Wistar нивелируются.

Проекция дофаминергических нейронов, локализованных в области вентральной покрышки среднего мозга (VTA), приходят в область прилежащего ядра и составляют мезолимбический путь, контролирующей систему награды и подкрепления [2, 22]. Поэтому оценка уровня ТГ проводилась в иммунопозитивных отростках дофаминергических нейронов в области прилежащего ядра. Несмотря на невысокое потребление раствора этанола у крыс “DAT-НЕТ ethanol”, уровень ТГ в проекциях дофаминергических нейронов в области прилежащего ядра был ниже у крыс “DAT-НЕТ water”, но не отличался от крыс “Wistar ethanol”. Также имел тенденцию к снижению уровень ТГ у крыс DAT-НЕТ по сравнению с алкоголизированными крысами Wistar, однако при статистической обработке после поправки Холма–Бонферрони различия нивелируются, вероятно, из-за небольшой выборки.

Известно, что DAT регулирует передачу сигналов на всех пре- и постсинаптических рецепторах дофамина, удаляя нейротрансмиттер из внеклеточного пространства, методом обратного захвата [23], его плотность наиболее высока в стриатуме и прилежащем ядре [24]. У всех крыс с нокаутом DAT нарушение обратного захвата приводит к дисбалансу синтеза дофамина, в частности, у DAT-KO снижается уровень мРНК ТГ в среднем мозге и уровень белка ТГ в стриатуме, а у DAT-НЕТ увеличен внеклеточный уровень дофамина в стриатуме [5]. По этой причине у крыс DAT-НЕТ изначально повышенное количество ТГ в проекциях дофаминергических нейронов в области прилежащего ядра может быть связано с высоким содержанием внеклеточного дофамина в стриатуме. Можно предположить, что даже малые дозы этанола могут воздействовать на дофаминергических нейроны, вызывая снижение общего уровня ТГ в их проекциях в прилежащем ядре, и, вероятно, снижают уровень внеклеточного дофамина в вентральном стриатуме и других структурах мезолимбической системы. При этом у крыс DAT-НЕТ не возникает предпочтения к этанолу по причине работы компенсаторных механизмов в дофаминерги-

ческой системе. Как следствие, это приводит к снижению содержания дофамина и изменению характерного поведения для данной модели животных, прежде всего их гиперактивности.

Таким образом, можно сделать вывод, что у крыс линии DAT-НЕТ наблюдается увеличение уровня ТГ в прилежащем ядре. Кроме этого, режим свободной алкоголизации снижает уровень ТГ в прилежащем ядре при развитии патологического увеличения содержания ТГ, наблюдающегося у животных линии DAT-НЕТ, но не оказывает эффекта на животных в контрольных группах. Данный вывод хорошо согласуется с полученными поведенческими данными, при которых у крыс DAT-НЕТ снижается избыточная локомоторная активность в условиях алкоголизации. Однако необходимо учесть тот факт, что крысы DAT-НЕТ не сформировали предпочтения этанола в условиях свободной алкоголизации и потребляли меньше алкоголя, чем животные контрольной группы. Таким образом, сравниваемые группы были подвергнуты воздействию разного объема этанола, что вызывает трудности при интерпретации данных с позиции нейрхимического и фармакологического подходов. Однако эти трудности могут быть преодолены в следующих экспериментах, например, с использованием принудительного воздействия одинаковыми низкими объемами этанола.

Ограничения исследования

Был исследован только показатель общего фермента ТГ в волокнах прилежащего ядра. Разное количество животных в группах. Не производилась оценка уровня отдельных катехоламинов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты были выполнены согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/EEC) и согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-01052-22-00. Генотипирование нокаутной линии крыс проведено в лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ при поддержке гранта № 94030300.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента, обсуждение результатов (Е.В.Ф., А.Ю.Е., Е.О.К., И.В.А.), сбор экспериментальных данных (А.Е.В., Е.О.К., И.В.А.), генотипирование нокаутной линии животных, обсуждение результатов (З.В.А.), статистическая обработка результатов, подготовка иллюстративного материала (И.В.А., И.Ю.М., Е.О.К.), проведение иммуногистохимического исследования (И.Ю.М., И.В.А., А.Е.В.), написание и редактирование статьи (И.В.А., А.Ю.Е., Е.О.К., Е.В.Ф.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность зав. лабораторией интегративной нейроэндокринологии, д. б. н. И.В. Романовой за ценные советы по обсуждению дизайна эксперимента и организацию иммуногистохимического исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jörger AE, Jerlhag E* (2014) Alcohol: mechanisms along the mesolimbic dopamine system. *Prog Brain Res* 211: 201–233.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00009-X>
2. *Wise RA, Rompre PP* (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 40: 191–225.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ps.40.020189.001203>
3. *Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham M, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson WP* (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91: 1025–1043.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02797.x>
4. *Daubner CS, Le T, Wang S* (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
5. *Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, Messa G, Emanuele M, Esposito A, Dorofeikova M, Budygin EA, Mus L, Efimova EV, Niello M, Espinoza S, Sotnikova TD, Hoener MC, Laviola G, Fumagalli F, Adriani W, Gainetdinov RR* (2018) Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats. *J Neurosci* 38(8): 1959–1972.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018>
6. *Gainetdinov AR, Fesenko ZS, Khismatullina ZR* (2020) Behavioural Changes in Heterozygous Rats by Gene Knockout of the Dopamine Transporter (DAT). *J Biomed* 16 (1): 82–88.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-82-88>
7. *Conte R, Zangirolame C, Gobbo RD, Pereira L DA S, Panfilio CE, Reginato R, Maluf LS, Scerni DA, Céspedes IC* (2022) Effects of moderate alcohol consumption on behavior and neural systems of Wistar rats. *An Acad Bras Ciênc* 94(3): e20210673.
<https://doi.org/10.1590/0001-376520220210673>
8. *Rothblat DS, Rubin E, Schneider JS* (2001) Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci Lett* 300(2): 63–66.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01548-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01548-8)
9. *Ericson M, Ulenius L, Andrén A, Jonsson S, Adermark L, Söderpalm B* (2020) Different dopamine tone in ethanol high- and low-consuming Wistar rats. *Addict Biol* 25(3): e12761.
<https://doi.org/10.1111/adb.12761>
10. *Fu R, Zuo W, Shiwalkar N, Mei Q, Fan Q, Chen X, Li J, Bekker A, Ye JH* (2019) Alcohol withdrawal drives depressive behaviors by activating neurons in the rostromedial tegmental nucleus. *Neuropsychopharmacology* 44(8): 1464–1475.
<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0378-8>
11. *Van Erp A MM, Miczek KA* (2007) Increased accumbal dopamine during daily alcohol consumption and subsequent aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 191(3): 679–688.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0637-3>
12. *Hall FS, Sora I, Uhl GR* (2003) Sex-dependent modulation of ethanol consumption in vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 28: 620–628.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300070>
13. *Jiao X, Paré WP, Tejani-Butt SM* (2006) Alcohol consumption alters dopamine transporter sites in Wistar-Kyoto rat brain. *Brain Res* (1073-1074): 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.009>
14. *Masserano JM, Takimoto GS, Weiner N* (1983) Tyrosine hydroxylase activity in the brain and adrenal gland of rats following chronic administration of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 7(3): 294–298.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1983.tb05463.x>
15. *Ortiz J, Fitzgerald WL, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ* (1995) Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 21(4): 289–298.
<https://doi.org/10.1002/syn.890210403>
16. *Spiga S, Talani G, Mulas G, Licheri V, Fois GR, Muggironi G, Masala N, Cannizzaro C, Biggio G, Sanna E, Diana M* (2014) Hampered long-term depression and thin spine loss in the nucleus accumbens of ethanol-dependent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(35): 3745–3754.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1406768111>
17. *Антонова ИВ, Веракса АЕ, Егоров АЮ* (2020) Особенности полупринудительной алкоголизации у крыс гетерозигот по нокауту гена дофаминавого транспортера (DAT-HET):

- Пилотное исследование. *Вопр наркол* 10: 5–15. [Antonova IV, Veraksa AE, Egorov AU (2020) Features of semi-forced alcoholization in rats heterozygous for dopamine transporter gene knockout (DAT-HET): A pilot study. *Addict Issues* 10: 5–15. (In Russ)]. https://doi.org/10.47877/0234-0623_2020_10_5
18. Paxinos GT, Watson Ch (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. (Fourth Edition). Acad Press. San Diego, California. USA. Int Standard Book Number: 0-12-547617-5 CD-ROM. <http://www.apnet.com>
 19. Mikhrina AL, Saveleva LO, Alekseeva OS, Romanova IV (2020) Effects of Active Fragments AgRP 83–132 and 25-51 on Dopamine Biosynthesis in the Brain. *Neurosci Behav Physiol* 50(3):367–373. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-00908-z>
 20. Savelieva VK, Caudle MW, Findlay SG, Caron MG, Miller GW (2002) Decreased ethanol preference and consumption in dopamine transporter female knock-out mice. *Alcohol Clin Exp Res* 26(6): 758–764.
 21. Майский АИ, Салимов РМ (1999) Доклиническое изучение препаратов, предлагаемых для клинической апробации в качестве средств для лечения алкоголизма. *Вед фармакол комитета* 2: 26–31. [Maisky AI, Salimov RM (1999) Preclinical research of drugs proposed for clinical validation as a treatment for alcoholism. *Bull Pharmacol Commit* 2: 26–31. (In Russ)].
 22. Урюмов МВ (1999) Механизмы нейроэндокринной регуляции. М. Наука. 82–122. [Ugryumov MV (1999) Mechanisms of neuroendocrine regulation. М. Наука. 82–122. (In Russ)].
 23. Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63(1): 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
 24. Brooks DJ (2016) Molecular imaging of dopamine transporters. *Age Res Rev* 30: 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.009>

Changes in Behavioral Characteristics and Tyrosine Hydroxylase Levels in the Nucleus Accumbens of the Brain of DAT-HET Rats during Free Alcoholization

I. V. Antonova^{a, *}, E. O. Kucher^{a, b}, E. V. Filatova^a, A. E. Veraksa^a, I. Yu. Morina^a, V. A. Zavyalov^b, and A. Yu. Egorov^{a, b, c}

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

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

^c*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: risha.irina999@mail.ru

DAT-HET rats with their underlying hyperdopaminergia are a promising model for the investigation of neuropsychiatric diseases, which are based on impaired dopamine neurotransmission, including alcoholism. The aim of the work was to evaluate the effect of free alcoholization on drinking, locomotor, exploratory behavior, anxiety, and Tyrosine hydroxylase (TH) levels in rats with impaired functioning of the DA system (DAT-HET). The study was carried out on adult male rats of the DAT-HET ($n = 15$) and Wistar ($n = 13$), which were divided into 4 groups: “DAT-HET ethanol” ($n = 10$) and “Wistar ethanol” ($n = 9$), who were in the mode of free alcoholization for 112 days of the experiment. The DAT-HET water ($n = 5$) and Wistar water ($n = 4$) groups did not have access to an ethanol solution and did not participate in behavioral tests. Ethanol preference and consumption was assessed in the “Two-bottle test”. The amount of ethanol consumed in the cells was recorded weekly. Behavior was assessed using the Open Field and Elevated Plus Maze tests. After alcoholization, to assess the level of TH, an immunohistochemical (IHC). It was found that during free alcoholization, DAT-HET rats do not form preferences for ethanol. Under the low ethanol consumption, the initial hyperactivity in DAT-HET rats is leveled. The DAT-HET model leads to an increase in TH levels in NAcc. In addition, the free alcoholization reduces the level of TG in NAcc with the development of a pathological increase in TH, observed in the DAT-HET model, but has no effect on healthy animals.

Keywords: DAT-HET rat, dopamine, ethanol, nucleus accumbens, tyrosine hydroxylase, free alcoholization, alcohol dependence, behavior

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРДИНАЛЬНЫХ ГЛАСНЫХ ЗВУКОВ
КАК ПОКАЗАТЕЛИ СЛУХОРЕЧЕВОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ У ПАЦИЕНТОВ
С ПОСТЛИНГВАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ
ТУГОХОСТЬЮ II и III СТЕПЕНИ**

© 2023 г. К. С. Штин¹, *, А. М. Луничкин¹, А. П. Гвоздева¹,
Л. Е. Голованова², И. Г. Андреева¹

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

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

*E-mail: misery01@ya.ru

Поступила в редакцию 29.09.2022 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

Хроническая сенсоневральная тугоухость (СНТ) характеризуется снижением слуха на основных речевых частотах, что предполагает ухудшение слухоречевой обратной связи и, как следствие, изменение характеристик речи. Выполнена проверка гипотезы о том, что это ухудшение может проявиться в повышении частоты формант F0, F1, F2 гласных звуков речи у пациентов с постлингвальной СНТ II и III степени. Выполнены записи вызванной речи у женщин молодого и среднего возраста (36–59 лет): 7 дикторов-женщин с СНТ II степени, которые не носили слуховые аппараты; 5 дикторов-женщин с СНТ III степени при снятых слуховых аппаратах; контрольной группы из 12 нормально слышащих дикторов-женщин. Проведены оценки F0, F1, F2 ударных гласных звуков [a], [i], [u] и расчеты показателей централизации гласных – площади формантных треугольников, формантного коэффициента централизации и коэффициента вторых формант. Все изученные спектральные показатели в группах пациентов с постлингвальной СНТ оказались сходными с контрольной группой, достоверных различий выявлено не было.

Ключевые слова: слухоречевой контроль, обратная связь, сенсоневральная тугоухость, характеристики гласных звуков, частота основного тона голоса

DOI: 10.31857/S0869813923040106, EDN: VJRVTV

ВВЕДЕНИЕ

Контроль собственного голоса играет важную роль в организации движений речевых мышц для точного воспроизведения звуков, в формировании произношения отдельных слов и развитии речи в целом. Слуховая система обеспечивает контроль собственного голоса диктора двумя способами – через прямую (feedforward control) и обратную связь (feedback control). Прямая связь активирует сохраненную ранее программу для органов артикуляционного аппарата, тогда как обратная связь дает информацию о достижении речевой цели на данный момент [1, 2]. В случае прелингвальной глухоты оба вида связи утрачиваются, что влечет за собой значительные изменения голоса пациента и процессов формирования речи. Влияние глухо-

ты на речь достаточно подробно исследовано как у детей [3, 4], так и у взрослых [5, 6]. Изменения вокальной речи наиболее четко проявляются в структуре гласных звуков, особенно значений первой и второй формант, поскольку отсутствие слуховой обратной связи приводит к ограничению горизонтальных и вертикальных движений языка [5, 7]. Ряд авторов считает, что нарушение слуховой обратной связи влияет на сегментарные и надсегментарные характеристики речи, поскольку именно этот вид связи дает информацию о тонких движениях речевых мышц [8, 9]. Вместе с тем изменение спектральных показателей речи при нарушении обратной связи может оказаться незначительным при сформированных ранее артикуляторных программах речи.

При сенсоневральной тугоухости (СНТ), развивавшейся уже в постлингвальный период, артикуляторные программы речи сформированы при нормальном контроле голоса. В результате возникают отличные от прелингвальной глухоты условия говорения. В этом случае прямая связь продолжает работать, а обратная связь испытывает дефицит, обусловленный частичной потерей слуха, что должно сопровождаться ухудшением контроля собственного голоса. В случае длительного снижения слуха можно также допустить некоторое ухудшение прямой слухоречевой связи при отсутствии слухопротезирования. Изучение функционирования нейросетей у постлингвальных пациентов с умеренной и умеренно-тяжелой (II–III степень) тугоухостью выявило их глубокую перестройку, включая изменения в обработке эмоциональных звуковых сигналов, изменения уровня слухового внимания, межсенсорного взаимодействия и сенсомоторного контроля [10, 11]. Эти результаты предполагают наличие стойких изменений в контроле голоса уже при умеренной степени тугоухости. Артикуляция пациентов с СНТ характеризуется наличием ряда искажений и фонологических нарушений. Эти искажения речи оцениваются разнообразными спектральными показателями: частотой основного тона (F0), спектральной и амплитудной неравномерностью звучания (jitters and shimmers), соотношением гармонических и шумовых компонент [12].

Среди всех акустических показателей голоса, спектральные характеристики, связанные с фонацией (F0) и артикуляцией (F1, F2), дают наиболее объективную информацию для выявления и оценки изменений, ведущих к ухудшению качества голоса и снижению разборчивости речи при нарушении слуховой обратной связи [13–15]. Голос и артикуляция тесно связаны, поскольку звук, исходящий из гортани, трансформируется в слова путем его сочетания с динамическими и статическими структурами верхних голосовых путей. Эта трансформация в спектре голоса отражается в значениях первой и второй формант гласных звуков. В русском языке базовые гласные звуки [a], [i], [u] в координатной плоскости F1–F2 образуют вершины фонетического “треугольника гласных”, внутри которого расположены остальные гласные фонемы [16, 17].

У пациентов с долингвальной глухотой неоднократно была продемонстрирована выраженная централизация гласных европейских языков, в результате которой область (треугольник) гласных при патологии оказывалась внутри области гласных нормы и размерами была значительно меньше последней [5, 6, 18]. При постлингвальной глухоте аналогичных работ не выполнялось. В единственной обнаруженной нами работе [19] была выполнена оценка спектральных характеристик нескольких гласных звуков [a], [e], [i], однако их формантный анализ не проводили.

Целью работы была проверка гипотезы о том, что при II и III степени постлингвальной СНТ перечисленные выше спектральные показатели голоса, характеризующие процессы фонации и артикуляции, будут свидетельствовать об ухудшении слухоречевой обратной связи и нарушении контроля голоса в текущем моменте. Изучение формантных характеристик гласных звуков [a], [i], [u] позволяет оценить изменения, которые в целом происходят при голосообразовании и артикуляции

вокальных звуков русской речи. При такой оценке необходимо учитывать положение гласного в речевом сигнале, в частности, ударность его позиции в слогоритмической структуре слова (словесное ударение), когда формантные максимумы спектра гласных звуков наиболее выражены благодаря четкости артикуляции [17]. Поэтому для оценки спектральных характеристик мы использовали только ударные гласные в разных положениях, имевшие достаточный для точной количественной оценки стационарный интервал.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дикторы

В исследовании приняли участие женщины-дикторы молодого и среднего возраста (36–59 лет), носительницы русского языка. Экспериментальные группы составили пациенты Сурдологического отделения Городского гериатрического медико-социального центра г. Санкт-Петербурга с диагностированной симметричной хронической СНТ продолжительностью более 5 лет, которые имели тимпанограмму типа “А” или “Ad” (“As”). В первую группу вошли 7 дикторов с СНТ II степени, при которой средние пороги слуха на частотах 0,5, 1, 2 и 4 кГц составляли от 41 до 55 дБ для обеих ушей. Дикторы этой группы, средний возраст которых был равен 46 ± 6 лет, не носили слуховые аппараты. Во вторую экспериментальную группу вошли 5 дикторов в возрасте 47 ± 6 лет с СНТ III степени со средней потерей слуха на основных аудиометрических частотах в диапазоне от 56 до 70 дБ. Все дикторы этой группы использовали слуховые аппараты в повседневной жизни. Контрольную группу составили 12 дикторов с нормальным слухом (средний возраст – 50 ± 8 лет). Пороги слуха по воздушной тональной пороговой аудиометрии на основных аудиометрических частотах в контрольной группе были не выше 25 дБ для обеих ушей, что соответствует диапазону нормального слуха для данной возрастной группы.

У дикторов всех групп отсутствовали: генетические и врожденные заболевания; острая и хроническая бактериальная или вирусная инфекция наружного и среднего уха; острые инфекции верхних дыхательных путей; органическое поражение голосовых связок; анатомические аномалии верхних дыхательных путей; неврологические расстройства; применение ототоксических препаратов в анамнезе; акустическая травма или внезапная потеря слуха в анамнезе; пре- или перилингвальная потеря слуха; речевая профессия (певцы, актеры, учителя, ораторы).

Речевой материал

Для записи использовали 9 слов русского языка с гласными [a], [i], [u] в разных ударных позициях: в начале слова – рУчка, Армия, мИна; в середине – бумАга, малИна, посУда; в конце – кредИт, шалУн, строкаА.

Оборудование и экспериментальное помещение

Исследование проводили в комнате, заглушенной при помощи акустического поролонa. Запись голоса диктора выполняли с применением ноутбука Lenovo V570 и программного обеспечения Cool Edit Pro 2.1. Для записи голоса использовали микрофон Sennheiser E845 с суперкардиоидной диаграммой направленности и звуковую карту Creative E-MU 0202 (44 100 Гц, 16 Бит).

Экспериментальная процедура

Обследование пациентов с СНТ III степени осуществлялось при снятых слуховых аппаратах после 20 мин нахождения без них (адаптации). Во время записи речи диктор располагался на стуле. В 20 см от диктора, на уровне его рта, устанавливали микрофон на стойке. Положение головы не фиксировалось жестко, однако диктору была дана инструкция не поворачивать и не наклонять голову. Таким образом, поддерживалось постоянное расстояние между губами диктора и микрофоном. Поскольку микрофон имел суперкардиоидную диаграмму направленности, отражения звука голоса от стены кабинета, которая находилась перед диктором, не улавливались микрофоном и не могли существенно повлиять на качество записей. Отражения звука голоса от других стен минимизировали при помощи трехсекционной ширмы, покрытой акустическим поролоном, которую располагали за спиной диктора.

Каждый диктор участвовал в трех сессиях, в каждой из которых записывали по три из девяти слов. Сессии различались по набору слов, в которых ударная гласная занимала одну из трех возможных позиций. В течение одной сессии диктор произносил слова друг за другом четыре раза. Для того, чтобы уменьшить различия в интонировании слов, дикторов просили перед каждым словом добавлять местоимение “это”: “Это – ручка, это – армия, это – мина” и т.д.

Для каждого диктора контрольной и экспериментальных групп было записано 36 слов (9 слов × 4 повтора). Общий объем записанного материала для всех 24 дикторов составил 864 слова: 432 слова для контрольной группы, 252 слов для группы с СНТ II и 180 слов для группы с СНТ III степени. После окончания сессии записи голоса сохраняли в формате wav для дальнейшего анализа.

Анализ записей и методы статистического анализа

Из полученных записей при помощи программы Cool Edit Pro 2.1 были вырезаны фрагменты, содержащие слова. Далее эти фрагменты анализировали в программе Praat Version 6.2.05 (свободно распространяемое программное обеспечение, www.praat.org). Анализ ударных гласных звуков включал выделение стационарного участка гласного (не менее 50 мс) для определения частоты основного тона (F0), первой (F1) и второй (F2) форманты. Частотный диапазон для оценки F0 составлял 75–500 Гц. Для определения значений формант использовали авторегрессионный метод Берга (Burg Linear Predictive Coding Autoregressive Method), реализованный в Praat. Шаг по времени составлял 0.01 с, длительность окна интегрирования 0.025 с, максимальное искомое значение формант 5.5 кГц, коррекция предсказания (pre-emphasis) выполнялась на частотах выше 50 Гц.

Результаты формантного анализа использовали для оценок централизации гласных. Определяли три показателя – площадь формантных треугольников, формантный коэффициент централизации и коэффициент вторых формант. Площадь формантных треугольников (ПФТ) рассчитывали по формуле, предложенной Vorperian и Kent [20] и модифицированной для русского языка [16]:

$$\text{ПФТ} = 0.5 ((F2[i] \times F1[a] + F2[a] \times F1[u] + F2[u] \times F1[i]) - (F1[i] \times F2[a] + F1[a] \times F2[u] + F1[u] \times F2[i]));$$

где F1 и F2 значения первой и второй форманты соответствующих гласных звуков в Гц.

Формантный коэффициент централизации (ФКЦ) гласных звуков, который был предложен Sapig и соавт. [21], определяли по формуле:

$$\text{ФКЦ} = (F2[u] + F2[a] + F1[i] + F1[u]) / (F2[i] + F1[a]).$$

Таблица 1. Частота основного тона голоса и расчетные спектральные характеристики гласных для группы дикторов-женщин с нормальным слухом (контрольная группа)

№	F0*, Гц	ПФТ**, у.е.	КВФ***	ФКЦ****
1	203	351658	3.09	0.86
2	167	487144	2.94	0.86
3	148	385617	2.34	0.95
4	175	354874	1.71	1.21
5	178	359876	2.14	1.02
6	166	222752	2.44	0.96
7	219	336583	1.74	0.98
8	186	585099	2.97	0.80
9	220	347541	2.57	0.97
10	205	280775	2.73	0.95
11	176	377592	3.58	0.78
12	224	328407	2.33	0.96
Среднее	169 ± 25	376782 ± 93998	2.58 ± 0.51	0.93 ± 0.11

*F0 – частота основного тона голоса, получена как среднее для 9 слов и 4 их повторений ($n = 36$) по всем анализируемым гласным.

**ПФТ – площадь формантных треугольников (формулу расчета см. в разделе Методы исследования);

***КВФ – коэффициент вторых формант – соотношение вторых формант соответствующих гласных звуков ($F2[i]/F2[u]$), данных в Гц;

****ФКЦ – формантный коэффициент централизации (формулу расчета см. в разделе Методы исследования).

Коэффициент вторых формант (КВФ), применяемый при различных речевых нарушениях [7, 22, 23], рассчитывали по формуле:

$$\text{КВФ} = F2[i]/F2[u].$$

Статистическую обработку данных проводили в программах Excel (Microsoft Office 2013) и Statistica Application 10 (StatSoft Inc.). Для сравнения параметров речи дикторов экспериментальной и контрольной групп использовали непараметрический непарный U -критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной группе дикторов индивидуальные значения F0, характеризующие фонацию при норме слуха, находились в диапазоне 148–224 Гц. Результаты оценки значений F0, усредненные по трем гласным звукам в разных ударных позициях, для отдельных дикторов представлены в табл. 1.

Аналогичные расчеты были выполнены в экспериментальных группах с СНТ. Результаты представлены в табл. 2. Дикторы с диагностированной СНТ II степени имели F0 в диапазоне 163–238 Гц, с СНТ III степени – 157–220 Гц. Таким образом, диапазоны F0 в норме и при сенсоневральной тугоухости практически совпадали. В то же время отметим, что в обеих экспериментальных группах среднее значение F0 было заметно выше – на 25–30 Гц по сравнению с контролем. Сравнение групп с СНТ II и СНТ III степени с контролем по величине F0 показало отсутствие достоверных различий ($p1 = 0.37$, $p2 = 0.59$, здесь и далее непараметрический U -критерий Манна–Уитни, если не указано иного).

Достоверных различий по значениям F0 между двумя группами дикторов с СНТ обнаружено не было ($p = 1.00$, $n1 = 7$; $n2 = 5$). Это позволило объединить две груп-

Таблица 2. Частота основного тона голоса и расчетные спектральные характеристики гласных для пациентов женского пола с сенсоневральной тугоухостью II–III степени (экспериментальные группы)*

№	Степень потери слуха	F0, Гц	ПФТ, у.е.	КВФ	ФКЦ
1	II**	169	390189	2.90	0.92
2	II	232	259730	2.10	0.98
3	II	200	446958	2.03	0.98
4	II	238	620432	3.13	0.84
5	II	192	440905	2.87	0.79
6	II	201	378316	2.89	0.84
7	II	163	236534	2.93	0.93
СРЕДНЕЕ СНТ II		199 ± 28	396152 ± 128665	2.69 ± 0.44	0.90 ± 0.07
8	III***	209	349689	2.20	1.02
9	III	180	378878	2.73	0.87
10	III	203	395595	3.63	0.75
11	III	220	180423	1.68	1.15
12	III	157	439299	3.16	0.80
СРЕДНЕЕ СНТ III		194 ± 25	348777 ± 99544	2.68 ± 0.77	0.92 ± 0.16
СРЕДНЕЕ ПО СНТ II–III		197 ± 26	376412 ± 115014	2.69 ± 0.57	0.90 ± 0.11

* Обозначения те же, что в табл. 1;

** пациенты с СНТ II степени, не использующие слуховой аппарат;

*** пациенты с СНТ III степени, использующие слуховой аппарат в повседневной жизни.

пы для дальнейшего анализа. Отметим, что в объединенной экспериментальной группе были выявлены обладатели как достаточно низкого голоса (дикторы №№ 1, 7 и 12), так и более высокого (дикторы №№ 2, 4 и 11) и аналогичная ситуация выявлялась в группе нормы. Диапазон частоты основного тона голоса в группах СНТ и контроля составил 81 и 75 Гц соответственно. Достоверных статистических различий между контрольной и объединенной экспериментальной группами по величине F0 также не было обнаружено ($p = 0.58$, $n_1 = 12$; $n_2 = 12$). Таким образом, наблюдали ожидаемое, но статистически не значимое увеличение F0 в обеих группах с СНТ по сравнению с группой дикторов с нормальным слухом.

Помимо F0, были определены основные показатели артикуляции гласных звуков — F1 и F2, а также расчетные показатели, которые характеризуют централизацию гласных звуков на формантной плоскости F1–F2. Индивидуальные данные для двух экспериментальных групп дикторов (рис. 1a, 1b) и контрольной группы (рис. 1c) представлены на формантной плоскости F1–F2 в виде формантных треугольников, вершины которых образованы гласными звуками [a], [i], [u]. Причем для каждого гласного показано среднее значение по трем ударным позициям, что позволяло устранить влияние его интонирования при произнесении в начале, середине и конце слова.

Для всех трех групп дикторов была характерна высокая вариативность положений индивидуальных треугольников гласных звуков, на фоне которой особенности спектральных значений формант F1 и F2 гласных звуков для отдельных групп не обнаруживались. Вершины треугольников гласных звуков, построенных по средним данным для контрольной группы и дикторов с СНТ II и III степенями, демонстрируют их близкое расположение и сходную площадь (рис. 1d). Таким образом,

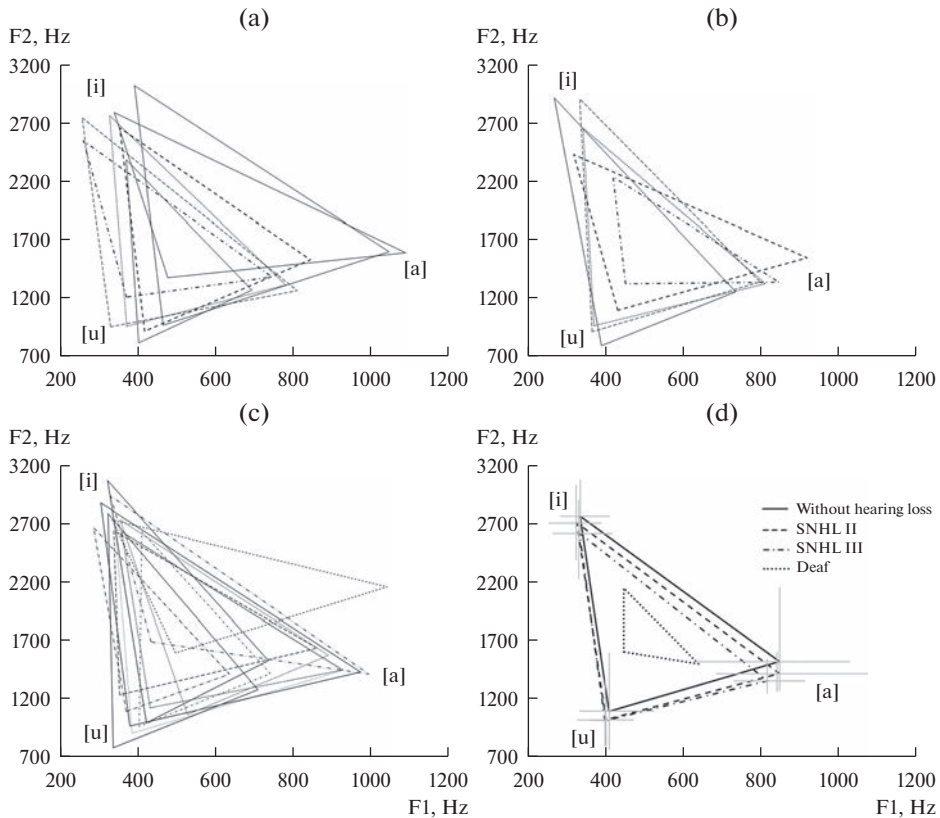


Рис. 1. Треугольники гласных звуков на плоскости формант F1–F2 для дикторов-женщин с нормальным слухом и с постлингвальной хронической сенсоневральной тугоухостью II и III степени. (a) – дикторы с СНТ II степени; (b) – дикторы с СНТ III степени; (c) – дикторы с нормальным слухом; (d) – средние данные, полученные для трех групп дикторов в нашей работе, и для долингвальных глухих дикторов по данным работы [24].

По оси абсцисс – форманта F1, Гц; по оси ординат – форманта F2, Гц.

На панелях рисунка (a–c) разными линиями показаны индивидуальные данные дикторов; (d) – тонкие горизонтальными и вертикальными линиями показаны диапазоны min–max формант F1 и F2.

положения вершин и размеры треугольников, построенных по средним данным, оказались сходны.

Значения F1 и F2 гласных звуков у дикторов с СНТ II и СНТ III степени статистически не различались (для [a] F1 $p = 1.00$, F2 $p = 0.62$; для [i] F1 $p = 1.00$, F2 $p = 0.74$; для [u] F1 $p = 0.74$; F2 $p = 1.00$, $n_1 = 7$, $n_2 = 5$). Это позволило объединить данные, полученные для двух групп дикторов с СНТ.

Для выявления нарушения артикуляции, обусловленного ухудшением слуховой обратной связи при речепродукции у пациентов с СНТ II–III степени, мы рассчитывали ряд показателей, которые характеризуют централизацию гласных звуков на формантной плоскости F1–F2. Одним из наиболее часто используемых является площадь формантных треугольников (ПФТ). Индивидуальные и усредненные по группам значения ПФТ в контрольной и экспериментальной группах представлены в табл. 1 и 2 соответственно. Вариабельность этого показателя оказалась высо-

кой как в контрольной, так и в экспериментальной группах. Минимальное и максимальное индивидуальные ПФТ различались внутри контрольной группы более чем в два раза: 280775 и 585099 у.е. соответственно, в то время как для объединенной экспериментальной группы – более чем в три раза: 180423 и 620432 у.е. соответственно. Достоверных различий между двумя этими группами по данному показателю не было выявлено ($p = 0.62$, $n = 12$).

Еще одним показателем возможной централизации гласных звуков является коэффициент вторых формант (КВФ), результаты расчетов которого приведены в табл. 1 и 2. В контрольной группе значения этого показателя варьировали в диапазоне от 1.71 до 3.58; в объединенной экспериментальной – от 1.68 до 3.63. Достоверных различий между группами не было выявлено ($p = 0.70$, $n = 12$).

Последний из расчетных показателей – формантный коэффициент централизации (ФКЦ), так же, как и КВФ представляет собой безразмерную величину. Этот коэффициент отличался наименьшей вариабельностью в обеих группах и по средним данным был близок к 1. Для контрольной и экспериментальной групп величина ФКЦ не различалась ($p = 0.54$). Все четыре рассчитанные нами показателя – F0, ПФТ, КВФ и ФКЦ, значительно варьировали от диктора к диктору, по средним данным имели близкие значения в контрольной и объединенной экспериментальной группах и достоверно не различались. Таким образом, спектральные показатели, характеризующие фонацию и артикуляцию, не различались в контрольной группе и в группе постлингвальной хронической сенсоневральной тугоухости II–III степени.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что пациенты с тяжелыми нарушениями слуха обычно демонстрируют изменение качества голоса и контроля работы мышц гортани. Это свидетельствует о неспособности регулировать напряжение голосовых связок и подсвязочное давление, т.е. процесс фонации [25]. Вместе с тем в литературе, посвященной речепродукции у людей с постлингвальной сенсоневральной потерей слуха, данные об изменениях частоты основного тона голоса (F0) неоднозначны [19, 26, 27]. Наши результаты показали отсутствие достоверных различий по этому показателю в экспериментальных и контрольной группах. Вместе с тем среднее значение F0 в обеих группах с СНТ II и III степени было на 30 и 25 Гц выше, чем в контрольной группе.

Полученный нами результат об отсутствии достоверных различий с группой нормы согласуется с выводами работ [26, 27], в которых исследовали гласный звук [a] у пациентов с СНТ без слухопротезирования. Заметим, что в исследовании [26] были обследованы женщины пожилого и старческого возраста, тогда как в работе [27] группы пациентов составляли и женщины, и мужчины преимущественно пожилого возраста. В еще одной работе [19] была исследована речь (гласные [a], [e], [i]) пациентов только мужского пола среднего возраста с СНТ III степени также без слухопротезирования, как и в двух упомянутых выше работах. Для этой группы с СНТ были обнаружены достоверные различия по величине F0 с группой нормы. Все четыре работы, включая нашу, различаются как подбором испытуемых, так и методологическими подходами (пол и возраст дикторов, наличие или отсутствие слухопротезирования, речевой материал).

Небольшой состав обследованных групп пациентов может также объяснить то обстоятельство, что в одних работах была выявлена лишь незначительная тенденция к увеличению F0 в группах с частичной потерей слуха по сравнению с контролем, тогда как в других исследованиях это изменение было оценено как достоверное. В цитируемых нами работах индивидуальные данные не были представлены.

Во всех трех обследованных нами группах – контроль, СНТ II и III степени, отмечена высокая индивидуальная вариабельность F_0 . Хорошо известно, что F_0 указывает на длину, размер, напряжение и частоту вибрации голосовых связок и отражает резонансные характеристики надгортанного голосового тракта, связанные с артикуляцией и расположением языка [17]. Таким образом, на величину этого показателя влияет множество факторов, и отсутствие слуховой обратной связи является лишь одним из них. Возможно, именно случайный подбор мужских голосов в работе [19] привел к достоверным различиям с контрольной группой. Вместе с тем во всех четырех работах наблюдалась тенденция по средним данным F_0 к увеличению при СНТ III степени по сравнению с нормой, что согласуется с повышением F_0 при глубокой глухоте [5, 6].

В нашем исследовании участвовали пациенты двух экспериментальных групп. Первую составляли дикторы с СНТ II степени, при которой уровень остаточного слуха был достаточен для поддержания обратной связи и сохранения сформированных ранее речевых навыков. Дикторы с СНТ III степени постоянно носили слуховые аппараты, которые обеспечивали поддержание обратной связи. Для этой группы при речепродукции в эксперименте, во время которого пациенты не использовали слуховой аппарат, обратная связь была затруднена по сравнению с повседневной жизнью. Тем не менее, по средним данным величина F_0 оказалась выше на 5 Гц (недостоверное увеличение) у группы с СНТ III степени по сравнению с пациентами с СНТ II степени, у которых ситуация говорения не отличалась от обычной практики. Таким образом, отсутствие обратной связи при сформированных (постлингвальная глухота) и поддерживаемых (слухопротезирование) навыках не приводило к существенному изменению показателя фонации.

Как было упомянуто во введении, нарушения слухоречевого контроля проявляются в централизации гласных на плоскости F_1 – F_2 [24] (рис. 1d). Таким образом, можно было бы ожидать уменьшение ПФТ в экспериментальных группах с частичной потерей слуха по сравнению с контрольной группой. Однако по средним данным для женщин с СНТ II–III степени такое снижение области гласных ПФТ было незначительным – менее 5%. Эти изменения по сравнению с контрольной группой не являлись достоверными. Отметим, что ранее при долингвальной глухоте были неоднократно выполнены исследования, демонстрирующие выраженную централизацию гласных европейских языков, в результате которой область (треугольник) гласных при патологии оказывалась внутри области гласных нормы и размерами была значительно меньше последней [5, 6, 28]. В работе [5] эффект уменьшения площади формантных треугольников (ПФТ) был продемонстрирован для гласных звуков [e], [a], [o] немецкого языка для большой группы пациентов разного пола и возраста с глубокой потерей слуха. При этом значения F_1 увеличивались в среднем на 60–80 Гц для всех трех изученных гласных звуков, а F_2 – только для одного. В работе [28] по изучению гласных греческого языка ПФТ была сопоставлена с учетом пола пациентов, при этом анализ речи проводили у дикторов с глухотой (порог слуха >99 дБ для лучше слышащего уха) и с нормой слуха. Полученные данные свидетельствовали о том, что при глухоте площадь формантных треугольников уменьшалась примерно в 1.5 раза. Оценка ПФТ в работе [6] не выполнялась, но представленные авторами иллюстрации также свидетельствовали об уменьшении их размеров при глухоте.

В отличие от исследований речи при долингвальной потере слуха, оценка речевых изменений при постлингвальной СНТ выполнялась в ограниченном числе работ. Кроме того, эти немногочисленные работы характеризуются разными методологическими подходами с применением различных речевых материалов (включая языки разных групп, одиночные фонемы, спонтанную речь и т.д.), разных экспериментальных дизайнов и речевых показателей, часто с ограниченными группами

участников из различных возрастных диапазонов и с разной степенью и длительностью потери слуха. Это обстоятельство позволяет считать наше исследование существенным вкладом в оценку состояния речевой функции при СНТ, несмотря на выявленное отсутствие значимых изменений первых трех формант гласных звуков русской речи.

В поисках возможного критерия для оценки изменений спектральных характеристик речи пациентов с постлингвальной СНТ II–III степени мы применили еще два безразмерных показателя – формантный коэффициент централизации и коэффициент вторых формант, которые были предложены для оценки централизации гласных при речевых нарушениях [21–23]. Особенностью этих показателей является то, что они нивелируют изменения F1 и F2, связанные с разными F0 у разных дикторов. Эти показатели были успешно применены в группах детей с долингвальным снижением слуха от умеренного до тяжелого и глубокой глухоты [7]. В нашем исследовании у взрослых с постлингвальной СНТ эти показатели достоверно не отличались от таковых в группе с нормой слуха. Формантный коэффициент централизации оказался стабильной величиной, которая практически не изменялась ни в контрольной, ни в экспериментальных группах. Таким образом, несмотря на то, что повышение формантных частот при глухоте, в том числе постлингвальной, было неоднократно отмечено в работах разных авторов, нам не удалось в случае постлингвальной симметричной СНТ II–III степени выявить достоверные критерии спектральных изменений голоса. Ни по одному из четырех проанализированных показателей спектральных характеристик голоса мы не получили значимых различий в экспериментальной и контрольной группах. Спектральные характеристики голоса зависят от множества факторов, прежде всего от индивидуальных анатомических особенностей речевого тракта. По-видимому, индивидуальная вариабельность характеристик голоса оказывается велика для того, чтобы можно было обнаружить начальные изменения этих характеристик, которые могут быть обусловлены ухудшением слухоречевого контроля по типу обратной связи.

У здоровых дикторов нарушение слуховой обратной связи, а, следовательно, и контроля собственного голоса, происходит в маскирующем речь шуме [29, 30] и имеет сходный с потерей слуха характер изменений спектральных характеристик голоса. Значения F0 увеличиваются в зависимости от уровня шума на 5–40 Гц [13, 31], что согласуется с полученным по средним данным приростом F0 15–30 Гц при частичной потере слуха. В этих исследованиях было возможно парное сравнение при оценке изменений речи в условиях ухудшения контроля голоса, поэтому индивидуальные различия F0 не влияли на оценку эффекта.

Можно предположить, что изменения спектральных характеристик голоса одного и того же пациента с СНТ при разных условиях формирования слуховой обратной связи (при использовании слухового аппарата и без него) смогут дать полезную информацию об успешности слухопротезирования. Заметим, что F1 [13, 14] в условиях шума по сравнению с тишиной увеличивается, а F2 изменяется разнонаправленно [14]. При этом изменение площади области гласных звуков в шуме не носит однозначного характера: она увеличивалась относительно тишины в работе [14] и уменьшалась в работе [15]. Аналогично с работами, посвященными величине ПФТ при утрате слуха, такое расхождение результатов можно объяснить высокой индивидуальной вариативностью ПФТ и малым числом дикторов, принимавших участие в исследованиях.

Сопоставление спектральных характеристик голоса при различных условиях ухудшения обратной связи приводит к следующему заключению. Значения F0 связаны непосредственно с процессом фонации, то есть с работой голосовых связок. Звук, возникающий при фонации благодаря структуре верхнего голосового тракта и артикуляции, формирует формантную структуру гласных. Таким образом, изме-

нение значений F0 на фоне ухудшения контроля голоса дает наиболее прямое свидетельство о качестве речеобразования в моменте по сравнению с величинами формант и их производных, которые обусловлены в значительной мере моторным навыком на основе прямой слуховой связи [1, 2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Контроль собственного голоса диктором с диагностированной хронической сенсоневральной тугоухостью II–III степени может до определенной степени обеспечиваться сформированными ранее речевыми навыками (прямая связь), на что указывает отсутствие достоверных различий между показателями фонации и артикуляции экспериментальных и контрольной групп. Вместе с тем тенденция к росту F0 у пациентов с СНТ II–III степени по сравнению с нормально слышащими дикторами свидетельствует об ухудшении контроля голоса в режиме реального времени (обратная связь). Поэтому особый интерес представляет оценка изменений речи дикторов с СНТ при использовании слуховых аппаратов как средства восстановления слуховой обратной связи, и без них.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании с участием людей, соответствовали требованиям Этического комитета Санкт-Петербургского городского гериатрического центра (Протокол № 9 от 14 октября 2021 г.), Этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова и Хельсинкской декларации 1964 г. с ее последующими изменениями (Протокол № 3-02 от 26 февраля 2021 г.). Перед началом эксперимента каждый испытуемый подписывал информированное согласие.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами государственного бюджета по госзаданию (тема № 075-00967-23-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.Е.Г., И.Г.А., К.С.Ш.), подготовка методики (И.Г.А., А.П.Г.), сбор данных (К.С.Ш., А.М.Л.), обработка данных (К.С.Ш., А.М.Л.), написание и редактирование манускрипта (К.С.Ш., И.Г.А., А.М.Л., А.П.Г., Л.Е.Г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Л.Г. Зайцевой за консультации при обработке речевого материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Selleck MA, Sataloff RT* (2014) The impact of the auditory system on phonation: a review. *J Voice* 28: 688–693.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2014.03.018>
2. *Perkell JS* (2012) Movement goals and feedback and feedforward control mechanisms in speech production. *J Neurolinguistics* 25: 382–407.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroling.2010.02.011>

3. *Bolfan-Stosic N, Simunjak B* (2007) Effects of hearing loss on the voice in children. *J Otolaryngol* 36: 120–123.
<https://doi.org/10.2310/7070.2007.0009>
4. *Dehqan A, Scherer RC* (2011) Objective voice analysis of boys with profound hearing loss. *J Voice* 25: 61–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2010.08.006>
5. *Schenk BS, Baumgartner WD, Hamzavi J-S* (2003) Effect of the loss of auditory feedback on segmental parameters of vowels of postlingually deafened speakers. *Auris Nasus Larynx* 30: 333–339.
[https://doi.org/10.1016/S0385-8146\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0385-8146(03)00093-2)
6. *Subtelny JD, Whitehead RL, Samar VJ* (1992) Spectral study of deviant resonance in the speech of woman who are deaf. *J Speech Lang Hear Res* 35: 574–579.
<https://doi.org/10.1044/jslr.3503.574>
7. *Naderifar E, Ghorbani A, Moradi N, Ansari H* (2019) Use of formant centralization ratio for vowel impairment detection in normal hearing and different degrees of hearing impairment. *Lopoped Phoniatr Vocol* 44: 159–165.
<https://doi.org/10.1080/14015439.2018.1545867>
8. *Hilger AI, Kim SJ, Lester-Smith R, Larson CR* (2019) Auditory feedback control of vocal intensity during speech and sustained-vowel production. *J Acoust Soc Am* 146: 3052
<https://doi.org/10.1121/1.5137580>
9. *Weerathunge HR, Voon T, Tardif M, Cilento D, Stepp CE* (2022) Auditory and somatosensory feedback mechanisms of laryngeal and articulatory speech motor control. *Exp Brain Res* 240: 2155–2173.
<https://doi.org/10.1007/s00221-022-06395-7>
10. *Luan Y, Wang C, Jiao Y, Tang T, Zhang J, Teng G-J* (2019) Dysconnectivity of multiple resting-state networks associated with higher-order functions in sensorineural hearing loss. *Front Neurosci* 13: 55.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00055>
11. *Husain FT, Carpenter-Thompson JR, Schmidt SA* (2014) The effect of mild-to-moderate hearing loss on auditory and emotion processing networks. *Front Neurosci* 8: 10.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00010>
12. *Coelho AC, Medved DM, Brasolotto AG* (2015) Hearing loss and the voice. *Update On Hearing Loss* 103–128.
<https://doi.org/10.5772/61217>
13. *Garnier M, Henrich N* (2014) Speaking in noise: How does the Lombard effect improve acoustic contrasts between speech and ambient noise? *Comput Speech & Language* 28: 580–597.
<https://doi.org/10.1016/j.csl.2013.07.005>
14. *Tang P, Rattanason NX, Yuen I, Demuth K* (2017) Phonetic enhancement of Mandarin vowels and tones: Infant-directed speech and Lombard speech. *J Acoust Soc Am* 142: 493–503.
<https://doi.org/10.1121/1.4995998>
15. *Kawase S, Smith ML, Wright R* (2019) Exploring the Lombard Effect in first language Japanese speakers of English. *J Acoust Soc Am* 146: 2843–2843.
<https://doi.org/10.1121/1.5136861>
16. *Ляксо ЕЕ, Григорьев АС* (2013) Динамика длительности и частотных характеристик гласных на протяжении первых семи лет жизни детей. *Рос физиол журн* 99: 1097–1110. [*Lyakso EE, Grigorev AS* (2013) Dynamics of duration and frequency characteristics the vowels over the first seven years of life of children. *Russ J Physiol* 99: 1097–1110. (In Russ)].
17. *Бондарко ЛВ* (1998) Фонетика современного русского языка. СПб. С-Петербург универ. [*Bondarko LV* (1998) Phonetics of the modern russian language. SPB. S-Peterburg Univer. (In Russ)].
18. *Nicolaidis K, Sfakianaki A* (2016) Acoustic characteristics of vowels produced by Greek intelligible speakers with profound hearing impairment I: Examination of vowel space. *Int J Speech-Lang Pathol* 18: 378–387.
<https://doi.org/10.3109/17549507.2015.1101155>
19. *Mora R, Crippa B, Cervoni E, Santomauro V, Guastini L* (2012) Acoustic features of voice in patients with severe hearing loss. *J Otolaryngol-Head & Neck Surg* 41: 8–13.
<https://doi.org/10.2310/7070.2011.110150>
20. *Vorperian H, Kent RD* (2007) Vowel acoustic space development in children: A synthesis of acoustic and anatomic data. *J Speech Lang Hear Res* 50: 1510–1545.
[https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2007\)104](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2007)104)
21. *Sapir S, Ramig LO, Spielman JL, Fox C* (2010) Formant centralization ratio: a proposal for a new acoustic measure of dysarthric speech. *J Speech Lang Hear Res* 53: 114–125.
[https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2009\)08-0184](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2009)08-0184)
22. *Sapir S, Spielman J, Ramig L, Story BH, Fox C* (2007) Effects of intensive voice treatment (the Lee Silverman Voice Treatment [LSVT]) on vowel articulation in dysarthric individuals with idiopathic Parkinson disease: acoustic and perceptual findings. *J Speech Lang Hear Res* 50: 899–

912.
[https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2007/064\)](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2007/064))
23. *Moura C, Cunha L, Vilarinho H, Cunha MJ, Freitas D, Palha M, Pueschel S, Pais-Clemente M* (2008) Voice parameters in children with Down syndrome. *J Voice* 22: 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2006.08.011>
24. *Leder SB, Spitzer JB* (1993) Speaking fundamental frequency, intensity, and rate of adventitiously profoundly hearing-impaired adult women. *J Acoust Soc Am* 93: 2146–2151.
<https://doi.org/10.1121/1.406677>
25. *Langereis MC, Bosman AJ, van Olphen AF, Smoorenburg GF* (1998) Effect of cochlear implantation on voice fundamental frequency in post-lingually deafened adults. *Audiology* 37: 219–230.
<https://doi.org/10.3109/00206099809072976>
26. *Baraldi GS, Almeida LC, Calais LL, Borges AC, Gielow I, Cunto MR* (2007) Study of the fundamental frequency in elderly women with hearing loss. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73: 378–383.
[https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)30082-3](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)30082-3)
27. *Lee GS, Lin SH* (2009) Changes of rhythm of vocal fundamental frequency in sensorineural hearing loss and in Parkinson's disease. *Chin J Physiol* 52: 446–450.
<https://doi.org/10.4077/CJP.2009.AMH074>
28. *Nicolaidis K, Sfakianaki A* (2016) Acoustic characteristics of vowels produced by Greek intelligible speakers with profound hearing impairment I: Examination of vowel space. *Int J Speech-Lang Pathol* 18: 378–387.
<https://doi.org/10.3109/17549507.2015.1101155>
29. *Hotchkin C, Parks S* (2013) The Lombard effect and other noise-induced vocal modifications: insight from mammalian communication systems. *Biol Rev* 88: 809–824.
<https://doi.org/10.1111/brv.12026>
30. *Luo J, Hage SR, Moss CF* (2018) The Lombard effect: from acoustics to neural mechanisms. *Trends Neurosci* 41: 938–949.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.07.011>
31. *Kleczkowski P, Żak A, Król-Nowak A* (2017) Lombard effect in Polish speech and its comparison in English speech. *Arch Acoust* 42: 561–569.
<https://doi.org/10.1515/aoa-2017-0060>

Spectral Characteristics of Cardinal Vowels as Indicators of the Auditory Speech Feedback Control in Patients with Moderate and Moderately Severe Chronic Postlingual Sensorineural Hearing Loss

K. S. Shtin^{a, *}, A. M. Lunichkin^a, A. P. Gvozdeva^a, L. E. Golovanova^b, and I. G. Andreeva^a

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

^b*North-Western Mechnikov State Medical University, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: misery01@ya.ru*

Chronic sensorineural hearing loss (SNHL) is characterized by an increase in hearing thresholds at basic speech frequencies, which implies the auditory speech feedback control worsening and, as a result, changes of speech characteristics. A hypothesis was tested that such worsening can manifest itself in an increase of F0, F1, F2 formants of speech vowel sounds in patients with moderate and moderately severe postlingual SNHL. Recordings of elicited speech were performed for young and middle age women (36–59 years): 7 women speakers with moderate SNHL who did not use hearing aids; 5 women speakers with moderately severe SNHL who were hearing aid users but were not using them during the recordings; a control group of 12 normally hearing women speakers. An assessment of F0, F1 and F2 of stressed vowels [a], [i], [u] and calculations of vowels' centralization indices – vowel space area, vowel formant centralization ratio and the second formant ratio (F2i/F2u), were performed. All the studied spectral indices in groups of patients with postlingual SNHL were similar to those in the control group, no statistically reliable differences were revealed.

Keywords: audiomotor control, feedback control, sensorineural hearing loss, vowel sounds characteristics, fundamental frequency

**ПОДДЕРЖАНИЕ НОРМАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АМРК УСТРАНЯЕТ
АНОМАЛЬНО УСКОРЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПЕРВИЧНЫХ
МИОБЛАСТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АТРОФИРОВАННОЙ
M. SOLEUS КРЫСЫ**

© 2023 г. Н. А. Вильчинская¹, *, Т. М. Мирзоев¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: vilchinskayanatalia@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

Функциональная разгрузка скелетных мышц приводит к развитию атрофических процессов и снижению общего числа сателлитных клеток, осуществляющих регенерацию этих мышц. В исследованиях *in vitro* было выявлено усиление дифференцировки миобластов камбаловидной мышцы на фоне снижения активности АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) после действия функциональной разгрузки. АМРК необходима для активации сателлитных клеток, участвует в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки. Можно предположить, что снижение активности АМРК после действия механической разгрузки способствует усилению/ускорению дифференцировки миобластов и усиленному формированию миотуб. Основная цель данного исследования состояла в изучении участия АМРК в регуляции процессов дифференцировки миобластов камбаловидной мышцы у крыс, подвергшихся действию гравитационной разгрузки. Для проверки этой гипотезы применили специфический активатор АМРК – АICAR для предотвращения снижения фосфорилирования АМРК при дифференцировке миобластов *in vitro*, выделенных из камбаловидных мышц крыс, подвергшихся 7-суточному воздействию функциональной разгрузки. Для оценки процессов дифференцировки миобластов применили методы иммуноцитохимии, ПЦР-РТ и Вестерн-блоттинга. В дифференцирующихся миобластах камбаловидной мышцы после действия функциональной разгрузки наблюдалось значительное снижение уровня фосфорилирования АМРК и ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС), повышенный индекс дифференцировки миотуб, повышение экспрессии миогенных регуляторных факторов (МРФ) и факторов слияния миобластов, снижение экспрессии “медленной” изоформы тяжелых цепей миозина и усиление экспрессии “быстрых” изоформ тяжелых цепей миозина. Применение АICAR при дифференцировке миобластов, полученных из атрофированной мышцы, предотвращало снижение фосфорилирования АМРК и АСС, возвращало уровень экспрессии МРФ и “быстрых” изоформ тяжелых цепей миозина к уровню контрольных значений, поддерживало экспрессию “медленной” изоформы тяжелых цепей миозина. Таким образом аномально ускоренная дифференцировка миобластов, выделенных из атрофированной камбаловидной мышцы крыс, компенсируется поддержанием контрольного уровня активности АМРК с помощью АICAR.

Ключевые слова: гравитационная/функциональная разгрузка, камбаловидная мышца, миобласты, миотубы, миогенные регуляторные факторы, миозины, АМФ-активируемая протеинкиназа

DOI: 10.31857/S086981392304012X, **EDN:** VJZPXH

ВВЕДЕНИЕ

Деструктивное влияние гравитационной/функциональной разгрузки на структуру и функцию скелетных мышц (преимущественно постуральных) многократно показано в литературных источниках и достаточно обширно изучено [1–4]. Как известно, регенерация скелетных мышц осуществляется при помощи особого типа одноядерных клеток, расположенных рядом с сарколеммой мышечного волокна, но под его базальной мембраной – сателлитных клеток мышц [5, 6]. При повреждении мышц происходит активация сателлитных клеток, они выходят из фазы клеточного цикла G_0 , начинают пролиферировать, а затем вступают в стадию дифференцировки. При регенерации мышечной ткани дифференцированные миобласты могут сливаться с поврежденными мышечными волокнами или друг с другом, формируя новые мышечные волокна [7, 8]. Процессы регенерации скелетных мышц при действии гравитационной разгрузки до сих пор мало изучены. Отмечено снижение общего числа сателлитных клеток мышц при механической разгрузке и при бездействии мышц [9–11]. Литературные данные об изменении регенеративного потенциала сателлитных клеток мышц в этих условиях противоречивы. Одни авторы утверждают о снижении пролиферации и дифференцировки сателлитных клеток в условиях механической разгрузки и при бездействии мышц, атрофиях, дистрофиях [10–12], другие, наоборот, отмечают увеличение активности этих клеток [13, 14].

Ранее было показано, что гравитационная разгрузка влияет на активность АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК) в волокнах камбаловидной мышцы: при кратковременном воздействии механической разгрузки наблюдалось снижение активности этой киназы, при более длительном действии, наоборот, активность АМРК была повышена [15].

АМРК – это ключевой регулятор энергетического метаболизма клетки, активация данной киназы происходит при изменении соотношения АМФ/АТФ в сторону накопления АМФ [16, 17]. АМРК участвует в регуляции процессов клеточного роста, белкового синтеза, катаболизма, метаболизма, аутофагии, апоптоза [18]. При повреждении мышц АМРК необходима для активации сателлитных клеток, участвует в регуляции процессов их пролиферации и дифференцировки [19].

В поврежденной мышце при активации сателлитных клеток АМРК α 1 обеспечивает переход клетки на анаэробный гликолиз (“эффект Варбурга”), который необходим для активации сателлитных клеток и дальнейшего развития регенеративных процессов [20]. В данных процессах задействована преимущественно АМРК α 1. При нокауте гена белка АМРК α 1 развития регенеративных процессов при повреждении мышцы не происходило [20, 21]. В миобластах c2c12 после нокаута гена АМРК α 1 происходило снижение экспрессии миозинов, ряда миогенных регуляторных факторов (МРФ), было затруднено формирование миотуб. Определенный уровень активности АМРК требуется для нормального миогенеза при регенерации мышц [21]. Сниженная регенерация мышц вследствие пониженной активности АМРК была выявлена при таких метаболических нарушениях, как ожирение, сахарный диабет, старение [22, 23]. Однако чрезмерная активация АМРК приводит к ослаблению процессов пролиферации и дифференцировки сателлитных клеток [24, 25].

При исследовании регенеративного потенциала сателлитных клеток камбаловидной мышцы *in vitro* обнаружено значительное снижение уровня пролиферации этих клеток после действия функциональной разгрузки [26]. Помимо этого была выявлена ускоренная дифференцировка миобластов, выделенных из камбаловидной мышцы, подвергшейся действию гравитационной разгрузки [26]. На более поздних этапах дифференцировки таких миобластов наблюдалось снижение активности основного субстрата АМРК – ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) [27].

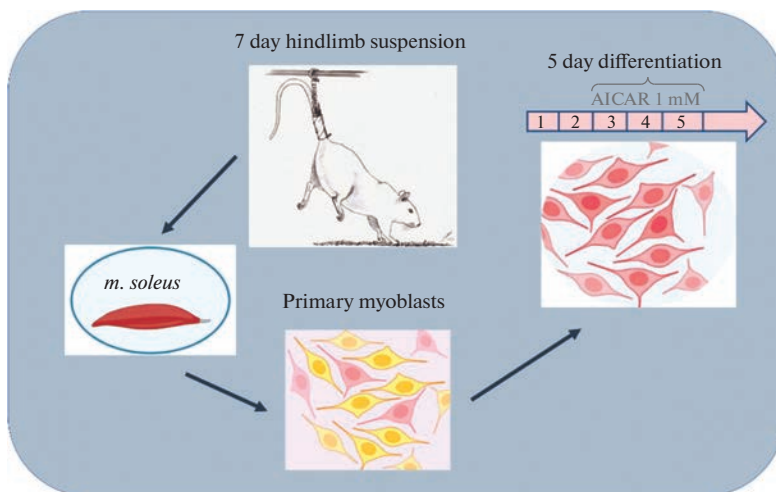


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Можно предположить, что снижение активности AMPK после действия механической разгрузки способствует усилению/ускорению дифференцировки таких миобластов и усиленному формированию миотуб. Для проверки этой гипотезы мы применили специфический активатор AMPK (аналог АМФ – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид, AICAR) для предотвращения снижения фосфорилирования AMPK при дифференцировке миобластов *in vitro*, выделенных из камбаловидных мышц крыс, подвергшихся 7-суточному воздействию моделируемой гравитационной разгрузки.

Основная цель данного исследования состояла в изучении участия AMPK в регуляции процессов дифференцировки миобластов камбаловидной мышцы, подвергшихся действию функциональной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для моделирования гравитационной разгрузки применяли модель антиортостатического вывешивания задних конечностей крыс по методу Новикова–Ильина в модификации Morey-Holton и соавт. [28, 29]. Подробный дизайн эксперимента представлен на рис. 1. Для эксперимента было отобрано 30 самцов крыс линии Wistar массой 180–200 г: интактный контроль (С), 7-суточное вывешивание (HS), 7-суточное вывешивание + AICAR (HSA). Животные содержались при температуре 20–22°C, вода и корм грызунам давались без ограничения (*ad libitum*) в соответствии с рационом для лабораторных животных. После завершения эксперимента у каждого животного под наркозом из обеих ног была выделена камбаловидная мышца. Далее камбаловидные мышцы использовались для выделения сателлитных клеток. Выделение сателлитных клеток из *m. soleus* проводилось по методике, описанной в наших предыдущих работах [26]. В полученной культуре первичных миобластов более 90% клеток экспрессировали Pax7. После получения “чистой” культуры миобласты культивировались в ростовой среде (DMEM с добавлением 1% L-glutamine (Invitrogen, США), 1% антибиотика penicillin-streptomycin (Invitrogen, США) и 20% Fetal Bovine Serum (Gibco, США)) до достижения субконфлюентного состояния (в культуре появляются признаки спонтанной дифференцировки).

После этого проводилась их миогенная дифференцировка путем замены ростовой среды на дифференцировочную, состоящую из DMEM с добавлением 1% L-glutamine (Invitrogen, США), 1% антибиотика penicillin-streptomycin (Invitrogen, США) и 2% Horse Serum (Gibco, США). С 3-го по 5-й день дифференцировки миобласты группы HSA инкубировались в дифференцировочной среде, содержащей 1мМ AICAR (ab120358, Abcam, Великобритания) (рис. 1). Все измерения проводились на 5-й день дифференцировки миобластов (рис. 1).

Гель-электрофорез и иммуноблоттинг

Для получения тотальной фракции белков миобласты камбаловидной мышцы лизировались с помощью RIPA буфера согласно рекомендациям производителя (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, США). Содержание белка в полученных пробах определяли при помощи набора Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, США). Электрофорез проводился в 10%-ном ПААГ при 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводился на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). По окончании электропереноса мембраны блокировались в EveryBlot Blocking Buffer (#12010020, Bio-Rad Laboratories, США), а затем инкубировались с первичными антителами на протяжении ночи. Инкубация со вторичными антителами проводилась в течение 1 ч при комнатной температуре. В данной работе были использованы первичные антитела к p-AMPK (Thr172) (1 : 500, Cell Signaling Technology, США, #2531), t-AMPK (1 : 1000, Cell Signaling Technology, США, #2523), p-ACC (S79) (1 : 1000, Cell Signaling Technology, США, #3661), t-ACC (1 : 1000, Cell Signaling Technology, США, #3662), p-rpS6 (S240/244) (1 : 2000, Cell Signaling Technology, США, #5364), rpS6 (1 : 2000, Cell Signaling Technology, США, #2217), вторичные антитела goat-anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 60000, # 111-035-003, Jackson Immuno Research, Великобритания). Выявление белковых полос осуществлялось с помощью набора ImmunStar Substrate Kit (BioRad Laboratories) и сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Белковые полосы анализировали с использованием программного обеспечения Studio Digits Ver. 4.0. Статистический анализ полученных экспериментальных данных был проведен с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Результаты приведены в виде минимума, максимума, медианы и интерквартильных разбросов. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Иммуноцитохимия

Недифференцированные миобласты камбаловидной мышцы высевали на покровные стекла. Часть препаратов фиксировали на следующий день, другую часть миобластов после достижения 80%-ной конфлюентности запускали в миогенную дифференцировку и фиксировали на 5-й день. Клетки фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 10 мин, а затем пермеабилizировали 0.02%-ным тритоном X-100 в течение 5 мин. Затем клетки блокировали 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (# A9647, Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин, далее инкубировали с первичными антителами против PAX7 (Developmental Studies Hybridoma Bank, США), МНС fast (# M8421, Sigma; Sigma-Aldrich, США), реагентом Phalloidin-iFluor 488 (# ab176753, Abcam, Великобритания) и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 546 (# A28175, ThermoFisher Scientific, США). Ядра контрастировали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (кат. D1306, Molecular Probes, США). Микроскопические изображения были получены с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX83P2ZF3 с камерой DP74

Таблица 1. Последовательности использованных в работе праймеров

Ген	Последовательность (5'–3')	Ссылка на GenBank
<i>Myog</i>	5'-gggtccaaccaggagatca-3' 5'-acatatcctccaccgtgatgc-3'	NM_017115.3
<i>Myod1</i>	5'-tgctctgatggcatgatgga-3' 5'-ctggacgcctcactgtagta-3'	NM_176079.2
<i>Mymx</i>	5'-gatcgctgctatcacgcct-3' 5'-ctcacgtcttgggagctcag-3'	NM_001399466.1
<i>Mymk</i>	5'-tctttgtggcgttctcccat-3' 5'-caggcgtgtcccatagatgc-3'	NM_001399315.1
<i>Myh7</i>	5'- agaggagagggcggacatt-3' 5'- actcttcattcaggcccttg-3'	NM_017240.2
<i>Myh4</i>	5'- agagaacaagaatctacagcagga-3' 5'-ccagagacgcctgaattcact-3'	NM_019325.1
<i>Myh2</i>	5'-tcatttgccaataagggtctgt-3' 5'-cctcgattcgctcctttca-3'	NM_001135157.1
<i>Myh1</i>	5'-tgcatccctaaaggcagactc-3' 5'-gactcctggaggaaggagc-3'	NM_001135158.1
<i>Ywhaz</i>	5'-cccactccggacacagaata-3' 5'-tgtcatcgtatcgctctgcc-3'	NM_013011.4
<i>Gapdh</i>	5'-cggtgtgaacggattggc-3' 5'- ttgaggccaatgaagggtgc-3'	NM_017008.4

(Olympus, Токуо, Япония) и объективом 20X. Анализ изображений проводился с помощью программы Cell Sens Imaging (Olympus, Токуо, Япония).

ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК из миобластов *t. soleus* проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием 0.5 мкг РНК и набора для проведения обратной транскрипции RevertAid RT Kit (# K1691, Thermo Fisher Scientific, США) согласно стандартному протоколу. Полученные образцы кДНК использовались для проведения ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I в амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры, последовательности которых представлены в табл. 1. В качестве референсного гена использовали ген *GAPDH* и *Ywhaz*. Анализ полученных данных осуществлялся по методу Ливака (2- $\Delta\Delta Ct$). Статистический анализ полученных экспериментальных данных был проведен с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Результаты приведены в виде минимума, максимума, медианы и интерквартильных разбросов. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела крыс и масса камбаловидных мышц

В результате 7-суточного вывешивания наблюдалось незначительное снижение массы тела крыс по сравнению с контролем (табл. 2). Сырая и нормированная масса камбаловидной мышцы в группе вывешивания была значительно снижена по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Таблица 2. Изменения массы тела крыс и камбаловидных мышц

Группа	Масса тела крыс, г	Масса <i>m. soleus</i> , мг	Масса <i>m. soleus</i> /масса крысы, мг/г
C	235 ± 4	78 ± 3	0.33 ± 0.01
HS	213 ± 5*	49 ± 3*	0.23 ± 0.01*

C – контроль, HS – вывешивание 7 сут. Данные представлены в виде *means* ± *SEM*. * – $p < 0.05$ vs. C.

Уровень фосфорилирования АМРК (Thr172), АСС (Ser79) и rpS6 (Ser 240/244) в дифференцирующихся миобластах камбаловидной мышцы после действия гравитационной разгрузки

Выявлено снижение уровня фосфорилирования АМРК у миобластов группы HS на 57% по сравнению с контрольными миобластами (рис. 2а). Применение АICAR в миобластах камбаловидной мышцы после вывешивания предотвращает снижение активности АМРК (рис. 2а). Фосфорилирование АСС по сайту (S79) было снижено в культурах миобластов после вывешивания, применение АICAR предотвратило это снижение (рис. 2б).

Помимо этого было исследовано фосфорилирование рибосомального белка S6 по сайту (S240/244). Обнаружено увеличение фосфорилирования рибосомального белка S6 на 28% по сравнению с контрольными значениями в культурах дифференцирующихся миобластов после вывешивания. Применение АICAR в культурах дифференцирующихся миобластов после вывешивания предотвращает повышение фосфорилирования рибосомального белка S6 (рис. 2с).

Экспрессия миогенных регуляторных факторов в миобластах камбаловидной мышцы после действия гравитационной разгрузки

Выявлено увеличение экспрессии мРНК MyoD в 1.5 раза в миобластах группы HS по сравнению с группой контроля (рис. 3а), при применении АICAR уровень

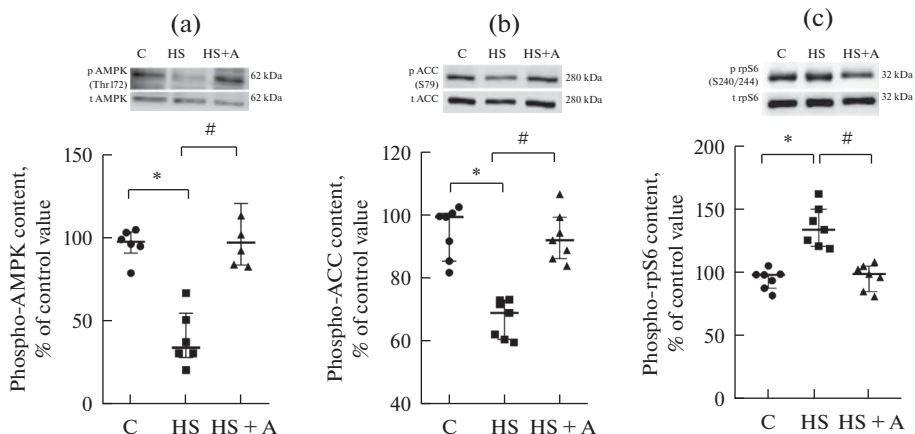


Рис. 2. Уровень фосфорилирования АМРК, АСС и рибосомального белка S6 в дифференцирующихся миобластах камбаловидной мышцы после функциональной разгрузки и применения АICAR (стимулятора активности АМФ-активируемой протеинкиназы). (а) – фосфо-АМРК (Thr 172)/АМРК, (б) – фосфо-АСС (Ser79)/АСС и (с) – фосфо-рpS6 (S240/244)/рpS6. C – контроль; HS – антигравитационное вывешивание, HS + А – антигравитационное вывешивание + АICAR. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от HS ($p < 0.05$).

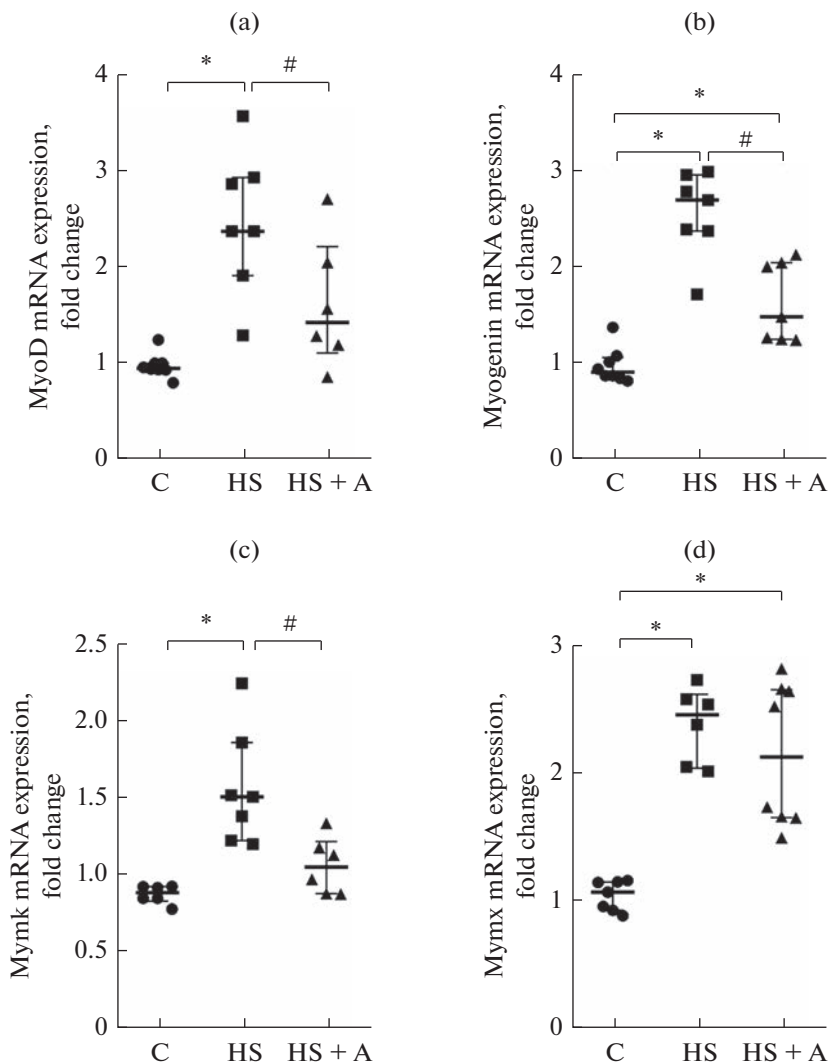


Рис. 3. Экспрессия МРФ и факторов слияния миотуб в дифференцирующихся миоблестах камбаловидной мышцы после действия функциональной разгрузки и применения AICAR. (a) – MyoD, (b) – Myogenin, (c) – Myomk, (d) – Myomx. C – контроль; HS – антиортостатическое вывешивание, HS + A – антиортостатическое вывешивание + AICAR. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от HS ($p < 0.05$).

экспрессии мРНК MyoD не отличался от контрольных значений (рис. 3а). Экспрессия мРНК миогенина достоверно увеличена в 2.9 раз в группе миобластов HS по сравнению с контрольной группой миобластов (рис. 3б). В группе миобластов HS + A уровень экспрессии мРНК миогенина значительно снижился (рис. 3б). В миоблестах, выделенных из камбаловидной мышцы после действия гравитационной разгрузки, наблюдалось увеличение экспрессии мРНК Myomaker (фактор, регулирующий слияние миобластов) по сравнению с контрольной группой (рис. 3с), при инкубации таких миобластов с AICAR экспрессия мРНК Myomaker возвраща-

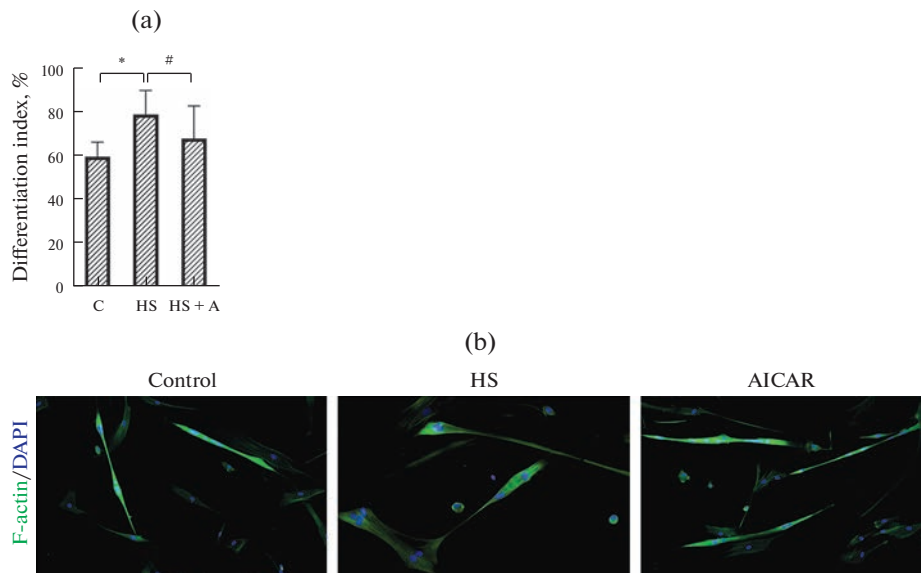


Рис. 4. Индекс дифференцировки миотуб камбаловидной мышцы крысы после действия функциональной разгрузки и применения AICAR. (a) – диаграмма; (b) – репрезентативные микрофотографии миотуб. C – контроль; HS – антиортостатическое вывешивание, HS + A – антиортостатическое вывешивание + AICAR. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от HS ($p < 0.05$).

лась к уровню контрольных значений (рис. 3c). Уровень экспрессии мРНК Myomixer, фактора, регулирующего слияние миобластов, был также повышен у миобластов группы HS (рис. 3d), применение AICAR не предотвращало увеличение экспрессии этого фактора (рис. 3d).

Помимо этого, в данной работе был оценен индекс дифференцировки миотуб. Выявлено достоверное увеличение значений индекса дифференцировки в миобластах группы HS (рис. 4a). Применение AICAR возвращает уровень дифференцировки миотуб к контрольным значениям (рис. 4b).

Экспрессия различных изоформ тяжелых цепей миозина в дифференцирующихся in vitro миобластах камбаловидной мышцы после действия гравитационной разгрузки

Изменений экспрессии мРНК эмбриональной изоформы тяжелых цепей миозина не обнаружено (рис. 5a). Уровень экспрессии мРНК медленной (I) изоформы тяжелых цепей миозина в миобластах группы HS достоверно снижен по сравнению с контрольной группой (рис. 5b), при инкубации миобластов с AICAR уровень экспрессии мРНК медленной (I) изоформы тяжелых цепей миозина значительно увеличивался (рис. 5b). Экспрессия мРНК тяжелых цепей миозина IIa была снижена в группе миобластов HS (рис. 5c), при применении AICAR экспрессия мРНК миозина IIa не отличалась от группы контроля (рис. 5c). Выявлено увеличение экспрессии мРНК быстрых изоформ тяжелых цепей миозина IIb и IIcx в группе дифференцирующихся миобластов HS (рис. 5d–5e), при инкубации таких миобластов с AICAR экспрессия мРНК быстрых изоформ тяжелых цепей миозина возвращается к контрольным значениям (рис. 5d–5e).

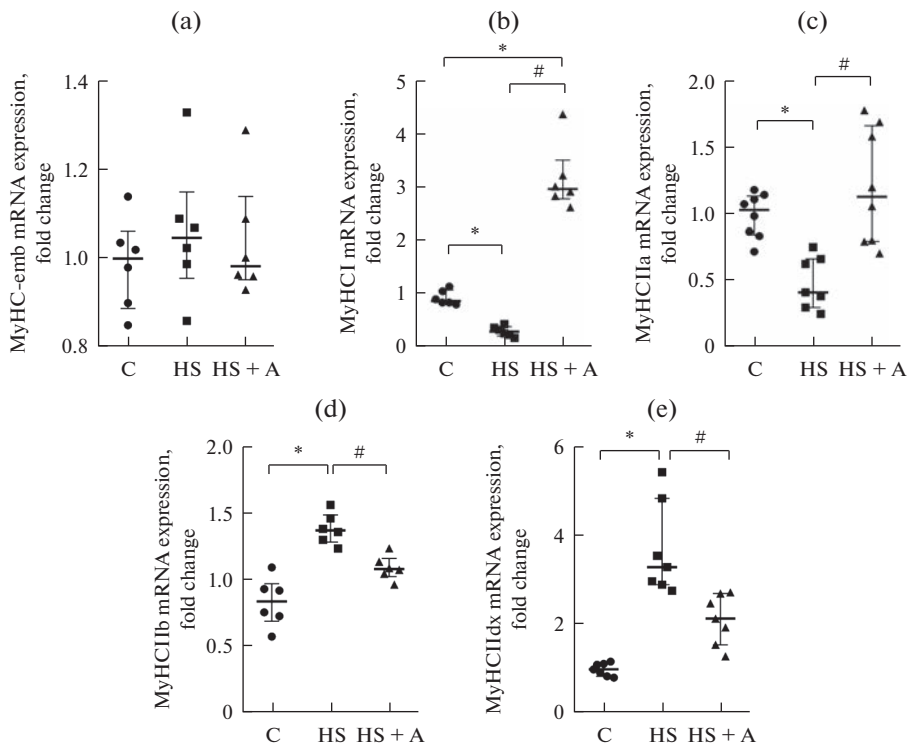


Рис. 5. Экспрессия различных изоформ тяжелых цепей миозина в дифференцирующихся миообластах камбаловидной мышцы после действия гравитационной разгрузки и после применения AICAR. (a) – MyHC-emb, (b) – MyHC I, (c) – MyHC IIa, (d) – MyHC IIb, (e) – MyHC IIcx. C – контроль; HS – антиортостатическое вывешивание, HS + A – антиортостатическое вывешивание + AICAR. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$); # – достоверное отличие от HS ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В недавних исследованиях нашей лаборатории был обнаружен феномен аномально ускоренного (“преждевременного”) процесса слияния и дифференцировки миообластов, полученных из *m. soleus* крысы после периода функциональной разгрузки задних конечностей продолжительностью 7 и 14 сут [26, 27]. Так, миообласты, выделенные из *m. soleus* крысы после 7-суточной функциональной разгрузки, начинали образовывать миотубы раньше, чем контрольные миообласты [27]. При этом аномально ускоренный процесс миогенной дифференцировки сопровождался повышенной экспрессией мРНК MyoD и миогенина (транскрипционных факторов, определяющих дифференцировку), а также цитоскелетного белка десмина [27]. Не исключено, что наблюдавшийся аномально ускоренный процесс дифференцировки миообластов ведет к образованию мышечных волокон с функциональными нарушениями [27], что может негативно влиять на регенерацию мышечной ткани после повреждений. Однако внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за ускоренную миогенную дифференцировку и слияние миообластов, выделенных из атрофированной скелетной мышцы, оставались неисследованными. Исходя из литературных данных, фермент AMPK, являющийся ключевым регулятором ряда метаболических сигнальных путей в клетке, является одним из потенциальных претендентов на роль регулятора самообновления сателлитных кле-

ток [30], а также процесса миогенеза посредством влияния на экспрессию миогенина [22, 31]. Кроме того, была показана важная роль АМПК в активации сателлитных клеток и регуляции процессов пролиферации и дифференцировки при регенерации скелетной мышцы после повреждения [22]. При этом следует отметить, что стимулирование активности АМПК с помощью аналога АМФ АICAR может значительно подавлять миогенную дифференцировку миобластов и образование миотуб, а также вызывать снижение содержания MyoD и миозина, приводя к атрофии миотуб [24]. В связи с этим настоящее исследование было посвящено проверке гипотезы о роли поддержания активности АМПК в нормализации процесса дифференцировки первичных миобластов, выделенных из атрофированной в результате функциональной разгрузки камбаловидной мышцы крысы. В культуре исследованных миобластов нами было обнаружено достоверное снижение фосфорилирования АМПК (Thr 172) и АСС (Ser 79), что свидетельствовало о пониженной киназной активности АМПК. Эти данные вполне согласуются с ранее опубликованными результатами исследований, в которых было показано достоверное снижение экспрессии мРНК АМПК и фосфорилирования АСС (Ser 79) в культуре дифференцирующихся миобластов, полученных из атрофированной *m. soleus* крысы [27]. Интересно также отметить, что пониженная активность АМПК ранее наблюдалась непосредственно в камбаловидной мышце крыс на ранних стадиях функциональной разгрузки (6 ч, 12 ч, 1 сут, 3 сут антиортостатического вывешивания) [15, 32–34]. Однако на более поздних этапах функциональной разгрузки (14 суток и более) регистрировалось повышенное фосфорилирование АМПК (Thr 172) в *m. soleus* крыс [35]. При этом хорошо известна роль данной киназы в подавлении анаболических сигнальных путей и синтеза белка в клетке. АМПК может ингибировать ключевой mTORC1 (mammalian target of rapamycin, complex 1)-зависимый анаболический сигнальный путь посредством фосфорилирования TSC2 (негативный регулятор mTORC1) [36] или белка raptor (ключевой компонент mTORC1) [37]. Роль АМПК в качестве негативного регулятора mTORC1-зависимого сигнального пути и синтеза белка была подтверждена в экспериментах на скелетной мышце [38] и культивируемых мышечных клетках [39, 40]. Одним из маркеров активности протеинкиназного комплекса mTORC1 является рибосомальный белок S6 (pS6). Фосфорилирование pS6 по Ser240/244 свидетельствует об активации mTORC1-зависимого сигнального пути [41]. В нашем исследовании пониженное фосфорилирование АМПК (Thr 172) и АСС (Ser 79) сопровождалось повышенным фосфорилированием pS6 (Ser240/244), что могло свидетельствовать об активации mTORC1-зависимого сигнального пути в дифференцирующихся миоблестах, полученных из атрофированной камбаловидной мышцы. При этом восстановление контрольного уровня фосфорилирования АМПК и АСС в культуре мышечных клеток с помощью АICAR привело к возвращению фосфорилирования pS6 (Ser240/244) к контрольным значениям. Эти данные подтверждают имеющиеся в литературе данные о способности АМПК подавлять mTORC1-зависимый путь в мышечных клетках [39, 40]. Аналогичная взаимосвязь между пониженной активностью АМПК и одновременно повышенной активностью сигнального пути mTORC1/p70S6K ранее была описана в *m. soleus* крыс на ранних стадиях вывешивания задних конечностей [15, 33, 34]. Возникает закономерный вопрос о возможности сигнального пути mTORC1/p70S6K влиять на процесс миогенной дифференцировки. Ряд литературных данных говорит в пользу того, что определенный уровень активности mTORC1-зависимого пути необходим для поддержания пролиферации и дифференцировки миобластов. Так, было показано, что ингибирование mTORC1 с помощью рапамицина приводит к значительному снижению экспрессии креатинкиназы, миогенина и тяжелых цепей миозина в клетках C2C12 на 3-й день дифференцировки [42]. Добавление в среду дифференцирующихся мышечных клеток C2C12 рапамицина также приво-

дит к подавлению процесса формирования миотуб [42]. Pollard и соавт. показали, что ингибирование mTORC1 эверолимузом (RAD001) (производное рапамицина) значительно снижало фосфорилирование pS6 и приводило к задержке дифференциации миобластов [43]. Rion и соавт. обнаружили, что селективная инактивация mTORC1 (путем удаления из данного комплекса белка Raptor) в сателлитных клетках приводит не только к ухудшению способности скелетных мышц регенерировать после повреждения, но также к частичному подавлению процессов пролиферации и дифференцировки миобластов в культуре [44]. Важно также отметить, что фармакологическое ингибирование mTORC1 в культивируемых миобластах способно значительно снижать содержание транскрипционного фактора MyoD [45]. Исходя из данных литературы, данный транскрипционный фактор играет важную роль в положительной регуляции экспрессии тяжелых цепей миозина “быстрого” типа (MyHC II_d/x, MyHC II_B) в скелетных мышцах грызунов [46–49]. В частности, Seward и соавт. продемонстрировали, что у мышей, нокаутных по гену MyoD, содержание “быстрой” изоформы миозина (MyHC II_B) в *m. soleus* после функциональной разгрузки значительно меньше, чем у мышей дикого типа [48]. В нашем исследовании наблюдались схожие изменения экспрессии мРНК MyoD и тяжелых цепей миозина “быстрого” типа (MyHC II_d/x, MyHC II_B) в дифференцирующихся миобластах как в группе “HS”, так и в группе “HS + A”. Таким образом, можно предположить, что регуляция экспрессии тяжелых цепей миозина “быстрого” типа в ответ на действие AICAR в нашем эксперименте осуществлялась посредством сигнального пути AMPK/mTORC1/MyoD. Что касается изменения экспрессии “медленной” изоформы ТЦМ (MyHC I β) в настоящем исследовании, то один из возможных механизмов мог быть связан с сигнальным путем AMPK/HDAC4/MEF-2D [32, 50], так как на ранних сроках функциональной разгрузки (24 ч) снижение экспрессии пре-РНК MyHC I β) в *m. soleus* крыс было связано со снижением фосфорилирования AMPK (Thr 172) и последующим накоплением диацетил-гистонов 4 (HDAC4) в миоцитах (где HDAC4 формирует комплекс с транскрипционным фактором MEF-2D) [32, 50]. При этом поддержание фосфорилирования AMPK (Thr 172) в камбаловидной мышце крыс на контрольном уровне с помощью AICAR предотвращает снижение экспрессии MyHC I β) и MyHC II_a [32]. Таким образом, полученные в настоящем исследовании изменения активности AMPK и экспрессии мРНК различных изоформ тяжелых цепей миозина в дифференцирующихся миобластах, выделенных из атрофированной мышцы, схожи с изменениями, ранее наблюдавшимися в камбаловидной мышце взрослых крыс после функциональной разгрузки. Конкретные механизмы, которые могли бы объяснить данный феномен неясны, однако можно предположить, что мышечные волокна камбаловидной мышцы могли оказывать непосредственное влияние на окружающие их сателлитные клетки посредством паракринного воздействия. Такого рода воздействие могло бы “корректировать” миогенную “программу” сателлитных клеток в ответ на изменившиеся внешние условия (в нашем случае – это функциональная разгрузка камбаловидной мышцы). Возможность существования такого механизма подтверждается недавним исследованием японских авторов, которые впервые показали, что миокин R-spondin 3 (Rspo3), селективно экспрессирующийся в “медленных” мышечных волокнах, воздействует на сателлитные клетки, способствуя их дифференцировке исключительно в волокна “медленного” типа посредством сигнального пути Wnt/ β -catenin [51].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты впервые обнаружили, что аномально ускоренная дифференцировка миобластов, выделенных из атрофированной камбаловидной мышцы крысы, компенсируется поддержанием контрольного уровня активности AMPK с помощью AICAR. При этом норма-

лизуется повышенная экспрессия МРФ, факторов слияния миобластов, а также ряда изоформ тяжелых цепей миозина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 579 от 28.05.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10080).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.А.В. и Б.С.Ш.), сбор данных (Н.А.В.), обработка данных (Н.А.В. и Т.М.М.), написание и редактирование манускрипта (Н.А.В., Т.М.М., Б.С.Ш.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность С.В. Рожкову за оказанную помощь при проведении данного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Oganov VS, Skuratova SA, Murashko LM, Guba F, Takach O* (1988) Effect of short-term space flights on physiological properties and composition of myofibrillar proteins of the skeletal muscles of rats. *Kosm Biol Aviakosm Med* 22 (4): 50–54.
2. *Shenkman BS* (2016) From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype. *Acta Naturae* 8 4(31): 47–59.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-4-47-59>
3. *Ohira Y, Yoshinaga T, Nomura T, Kawano F, Ishihara A, Nonaka I, Roy RR, Edgerton VR* (2002) Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv Space Res* 30(4): 777–781.
[https://doi.org/10.1016/s0273-1177\(02\)00395-2](https://doi.org/10.1016/s0273-1177(02)00395-2)
4. *Thomason DB, Biggs RB, Booth FW* (1989) Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol* 257(Pt 2): R300–R305.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R300>
5. *Yin H, Price F, Rudnicki MA* (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93(1): 23–67.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
6. *Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA* (2015) Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol* 5(3): 1027–1059.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>
7. *Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA* (2014) Muscle stem cells at a glance. *J Cell Sci* 127(Pt 21): 4543–4548.
<https://doi.org/10.1242/jcs.151209>
8. *Wagers AJ, Conboy IM* (2005) Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122(5): 659–667.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.021>
9. *Shenkman BS, Turtikova OV, Nemirovskaya TL, Grigoriev AI* (2010) Skeletal muscle activity and the fate of myonuclei. *Acta Naturae* 2(2): 59–66.

10. *Nakanishi R, Hirayama Y, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H* (2016) Nucleoprotein supplementation enhances the recovery of rat soleus mass with reloading after hindlimb unloading-induced atrophy via myonuclei accretion and increased protein synthesis. *Nutr Res* 36(12): 1335–1344.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.10.007>
11. *Mitchell PO, Pavlath GK* (2004) Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(6): C1753–C1762.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00292.2004>
12. *Matsuba Y, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Hashimoto N, Sugiura T, Ohira Y, Beppu M, Yoshioka T* (2009) Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 196(3): 329–339.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01943.x>
13. *Ferreira R, Neuparth MJ, Ascensao A, Magalhaes J, Vitorino R, Duarte JA, Amado F* (2006) Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol* 97(3): 340–346.
<https://doi.org/10.1007/s00421-006-0197-6>
14. *Guitart M, Lloreta J, Manas-Garcia L, Barreiro E* (2018) Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *J Cell Physiol* 233(5): 4360–4372.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26282>
15. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading. *Cell Physiol Biochem* 39(3): 1011–1020.
<https://doi.org/10.1159/000447808>
16. *Hardie DG* (2005) New roles for the LKB1→AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17 (2): 167–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.01.006>
17. *Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B* (2009) Important role for AMPKα1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J* 23(7): 2264–2273.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-119057>
18. *Villanueva-Paz M, Cotan D, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Delgado-Pavon A, de Lavera I, Alcocer-Gomez E, Alvarez-Cordoba M, Sanchez-Alcazar JA* (2016) AMPK Regulation of Cell Growth, Apoptosis, Autophagy, and Bioenergetics. *Exp Suppl* 107: 45–71.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_3
19. *Thomson DM* (2018) The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci* 19(10): 3125.
<https://doi.org/10.3390/ijms19103125>
20. *Fu X, Zhu MJ, Dodson MV, Du M* (2015) AMP-activated protein kinase stimulates Warburg-like glycolysis and activation of satellite cells during muscle regeneration. *J Biol Chem* 290 (44): 26445–26456.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.665232>
21. *Fu X, Zhao JX, Zhu MJ, Foretz M, Viollet B, Dodson MV, Du M* (2013) AMP-activated protein kinase α1 but not α2 catalytic subunit potentiates myogenin expression and myogenesis. *Mol Cell Biol* 33 (22): 4517–4525.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01078-13>
22. *Fu X, Zhu M, Zhang S, Foretz M, Viollet B, Du M* (2016) Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK. *Diabetes* 65 (1): 188–200.
<https://doi.org/10.2337/db15-0647>
23. *Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE* (2006) Tumor necrosis factor α-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4(6): 465–474.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.005>
24. *Williamson DL, Butler DC, Alway SE* (2009) AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1α-dependent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (2): E304–E314.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.91007.2008>
25. *Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V* (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell* 14(5): 661–673.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.02.004>
26. *Komarova MY, Rozhkov SV, Ivanova OA, Turtikova OV, Mirzoev TM, Dmitrieva RI, Shenkman BS, Vilchinskaya NA* (2022) Cultured Myoblasts Derived from Rat Soleus Muscle Show Altered Regulation of Proliferation and Myogenesis during the Course of Mechanical Unloading. *Int J Mol Sci* 23(16): 9150.
<https://doi.org/10.3390/ijms23169150>

27. *Vilchinskaya NA, Rozhkov SV, Komarova MY, Dmitrieva RI, Shenkman BS* (2022) Effect of simulated gravitational unloading on m. Soleus satellite cells. *Aviakosm Ekol Med (Russia)* 56(1): 20–29.
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2022-56-2-20-29>
28. *Novikov VE, Ilyin EA* (1981) Age-related reactions of rat bones to their unloading. *Avia Space Environ Med* 52(9): 551–553.
29. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* (1985) 92(4): 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
30. *Theret M, Gsaier L, Schaffer B, Juban G, Ben Larbi S, Weiss-Gayet M, Bultot L, Collodet C, Foretz M, Desplanches D, Sanz P, Zang Z, Yang L, Vial G, Viollet B, Sakamoto K, Brunet A, Chazaud B, Mounier R* (2017) AMPKalpha1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. *EMBO J* 36(13): 1946–1962.
<https://doi.org/10.15252/embj.201695273>
31. *Fu X, Zhao JX, Liang J, Zhu MJ, Foretz M, Viollet B, Du M* (2013) AMP-activated protein kinase mediates myogenin expression and myogenesis via histone deacetylase 5. *Am J Physiol Cell Physiol* 305 (8): C887–C895.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2013>
32. *Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Nemirovskaya TL, Mirzoev TM, Turtikova OV, Shenkman BS* (2017) Rapid decline in MyHC I(beta) mRNA expression in rat soleus during hindlimb unloading is associated with AMPK dephosphorylation. *J Physiol* 595 (23): 7123–7134.
<https://doi.org/10.1113/jp275184>
33. *Belova SP, Vilchinskaya NA, Mochalova EP, Mirzoev TM, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2019) Elevated p70S6K phosphorylation in rat soleus muscle during the early stage of unloading: Causes and consequences. *Arch Biochem Biophys* 674: 108105.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108105>
34. *Chibalin AV, Benziane B, Zakyranova GF, Kravtsova VV, Krivoi II* (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J Cell Physiol* 233(10): 6329–6336.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26594>
35. *Hilder TL, Baer LA, Fuller PM, Fuller CA, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM* (2005) Insulin-independent pathways mediating glucose uptake in hindlimb-suspended skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 99(6): 2181–2188.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00743.2005>
36. *Inoki K, Zhu T, Guan KL* (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5): 577–590.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2)
37. *Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ* (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30(2): 214–226.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
38. *Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS* (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277(27): 23977–23980.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200171200>
39. *Williamson DL, Bolster DR, Kimball SR, Jefferson LS* (2006) Time course changes in signaling pathways and protein synthesis in C2C12 myotubes following AMPK activation by AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(1): E80–E89.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00566.2005>
40. *Nakashima K, Ishida A* (2022) AMP-activated Protein Kinase Activation Suppresses Protein Synthesis and mTORC1 Signaling in Chick Myotube Cultures. *J Poult Sci* 59 (1): 81–85.
<https://doi.org/10.2141/jpsa.0210021>
41. *Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O* (2005) Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 19(18): 2199–2211.
<https://doi.org/10.1101/gad.351605>
42. *Cuenda A, Cohen P* (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* 274(7): 4341–4346.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4341>
43. *Pollard HJ, Willett M, Morley SJ* (2014) mTOR kinase-dependent, but raptor-independent regulation of downstream signaling is important for cell cycle exit and myogenic differentiation. *Cell Cycle* 13(16): 2517–2525.
<https://doi.org/10.4161/15384101.2014.941747>
44. *Rion N, Castets P, Lin S, Enderle L, Reinhard JR, Eickhorst C, Rugg MA* (2019) mTOR controls embryonic and adult myogenesis via mTORC1. *Development* 146(7): 172460.
<https://doi.org/10.1242/dev.172460>
45. *Zhang P, Liang X, Shan T, Jiang Q, Deng C, Zheng R, Kuang S* (2015) mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*

- 463(1-2): 102–108.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.032>
46. Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN, Swoap SJ (1999) An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol* 276(5): C1069–C1078.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C1069>
47. Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM (1997) MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev* 61(1-2): 151–163.
[https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(96\)00631-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(96)00631-4)
48. Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA, Swoap SJ (2001) bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(2): C408–C413.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.C408>
49. Ekmark M, Rana ZA, Stewart G, Hardie DG, Gundersen K (2007) De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle. *J Physiol* 584 (Pt 2): 637–650.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.141457>
50. Paramonova II, Vilchinskaya NA, Shenkman BS (2021) HDAC4 Is Indispensable for Reduced Slow Myosin Expression at the Early Stage of Hindlimb Unloading in Rat Soleus Muscle. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(11): 1167.
<https://doi.org/10.3390/ph14111167>
51. Mita Y, Zhu H, Furuichi Y, Hamaguchi H, Manabe Y, Fujii NL (2022) R-spondin3 is a myokine that differentiates myoblasts to type I fibres. *Sci Rep* 12(1): 13020.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-16640-2>

The Maintenance of AMPK Activity Eliminates Abnormally Accelerated Differentiation of Primary Myoblasts Isolated from Atrophied Rat Soleus Muscle

N. A. Vilchinskaya^a*, T. M. Mirzoev^a, and B. S. Shenkman^a

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

*e-mail: vilchinskayanatalia@gmail.com

Mechanical unloading of skeletal muscles leads to the development of atrophic processes and a decrease in the total number of satellite cells (SCs) that are involved in muscle regeneration. In vitro studies revealed an increased differentiation of myoblasts derived from rat soleus muscle after an unloading-induced decrease in AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK is necessary for the activation of SCs and also participates in the regulation of myoblast proliferation and differentiation. It can be assumed that a decrease in the activity of AMPK after mechanical unloading can contribute to the acceleration of myoblast differentiation. The main purpose of this study was to elucidate a possible role of AMPK in the regulation of differentiation of myoblasts isolated from rat soleus muscle after mechanical unloading. To test this hypothesis, a specific AMPK activator, AICAR, was used to prevent a decrease in AMPK activity during differentiation of myoblasts isolated from rat soleus muscle after 7-day unloading. Immunocytochemistry, PCR-RT and Western blotting were used to assess changes during myoblast differentiation. In differentiating myoblasts derived from the unloaded soleus muscle there was a significant decrease in AMPK (Thr172) and ACC (Ser 79) phosphorylation levels, an increase in myotube differentiation index, myoblast fusion factors and the expression of myogenic regulatory factors (MRF). Furthermore, there was a decrease in the expression of slow myosin heavy chains (MyHC) and an increase in the expression of fast MyHC isoforms. AICAR treatment of differentiating myoblasts obtained from the unloaded soleus muscle prevented a decrease in AMPK and ACC phosphorylation, returned the expression levels of MRF and fast isoforms of MyHC to the control levels as well as maintained the expression of slow MyHC. Thus, abnormally accelerated differentiation of myoblasts isolated from atrophied rat soleus muscle can be compensated by maintaining the control levels of AMPK activity using AICAR.

Keywords: gravitational/mechanical unloading, soleus muscle, myoblasts, myotubes, myogenic regulatory factors, myosin, AMPK

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ L-ТИПА В ПОВЫШЕННОЙ
УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНЫХ МЫШЦ КРЫС НА ФОНЕ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2023 г. К. А. Шарло¹, *, И. Д. Львова¹, С. А. Тыганов¹,
Д. А. Сидоренко¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: sharlokris@gmail.com

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

Избыточное долговременное накопление ионов кальция в миоплазме скелетных мышц может негативно влиять на митохондрии и приводить к нарушению функционирования мышцы. Целью настоящего исследования стало выявление роли кальциевых каналов L-типа в развитии повышенной утомляемости камбаловидной мышцы крыс в условиях функциональной разгрузки. Самцы крыс Вистар были разделены на три группы по 8 животных в каждой: группа виварного контроля (С), группа, подвергнутая разгрузке задних конечностей на протяжении 7 сут (7НС), и группа, подвергнутая 7-суточной разгрузке задних конечностей с ежедневным внутрибрюшинным введением нифедипина (7 мг/кг массы тела). Введение нифедипина на фоне вывешивания предотвратило рост кальций-зависимого фосфорилирования кальций-кальмодулин киназы II и повышение утомляемости и способствовало сохранению митохондриальных белков, ДНК и экспрессии мРНК ряда генов-регуляторов биогенеза митохондрий в камбаловидных мышцах животных.

Ключевые слова: скелетная мышца, гравитационная разгрузка, утомляемость, биогенез митохондрий

DOI: 10.31857/S086981392304009X, EDN: VJOVIZ

ВВЕДЕНИЕ

Состояние функциональной (механической) разгрузки скелетных мышц наблюдается при иммобилизации в травматологии, длительном постельном режиме или ограничении двигательной активности человека или животного, а также в условиях космического полета [1]. Это состояние приводит к изменениям молекулярных регуляторных путей в скелетной мышце, что в свою очередь уже после 3–7 сут механической разгрузки мышц ведет к снижению экспрессии мРНК “медленной” изоформы тяжелых цепей миозина, снижению окислительных способностей мышц и повышению утомляемости, что негативно отражается на качестве жизни и работоспособности людей и осложняет реабилитацию [1]. В наибольшей степени негативным изменениям, вызванным механической разгрузкой, подвержены позно-тонические мышцы, в частности, камбаловидная мышца, у человека принимающая участие в поддержании вертикального положения тела, ходьбе и беге [2]. Параллельно с описанными изменениями в миоплазме камбаловидной мышцы уже

после вторых суток функциональной разгрузки наблюдается накопление ионов кальция, которое сохраняется как минимум до 14 сут воздействия [3, 4]. По данным ряда работ, ключевым событием, приводящим к избытку кальция в миоплазме в условиях функциональной разгрузки мышц, является деполяризация сарколеммы и последующее открытие кальциевых каналов L-типа (дигидропиридиновых каналов) [5, 6].

Известно, что избыточное долговременное накопление ионов кальция в миоплазме скелетных мышц может приводить к истощению депо саркоплазматического ретикулула и повышению утомляемости мышцы [7], а также за счет увеличения содержания внутримитохондриального кальция может происходить нарушение митохондриальных функций и активация митофагии [8]. В связи с этим, целью настоящего исследования стало выявление роли активации кальциевых каналов L-типа в развитии повышенной утомляемости камбаловидной мышцы крыс в условиях функциональной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Самцы крыс Вистар в возрасте 1.5–2 мес. и массой тела 180–200 г были разделены на три группы по 8 животных в каждой: группа виварного контроля (С), группа, подвергнутая разгрузке задних конечностей на протяжении 7 сут с ежедневным внутрибрюшинным введением плацебо (2%-ный диметилсульфоксид в физрастворе) (7НС), и группа, подвергнутая 7-суточной разгрузке задних конечностей с ежедневным внутрибрюшинным введением нифедипина (7 мг/кг массы тела, в 2%-ном диметилсульфоксиде в физрастворе). В исследовании использовалась общепринятая модель антиортостатического вывешивания, позволяющая имитировать эффекты гипогравитации [9]. После проведения эксперимента у каждого животного под бромэтанольным наркозом из обеих ног были выделены камбаловидные мышцы, после чего одна из мышц подвергалась анализу утомляемости *ex vivo*, а вторая замораживалась в жидком азоте. Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*.

Анализ утомляемости

Камбаловидные мышцы экспериментальных животных были помещены в охлажденный раствор Рингера–Кребса с постоянным продуванием 95%-ным карбогеном и инкубированы в течение 15 мин. В это время на сухожилиях были завязаны узлы, необходимые для крепления мышцы. После 15 мин мышца была помещена в ванночку для теста с фиксированной температурой 37°C, прикреплена за сухожилия к датчику силы с одного конца и к фиксированному крючку с другого, после чего была определена оптимальная длина мышцы с помощью подачи короткого электрического импульса (супра-максимальные квадратные импульсы 0.5 мс, 20 В) и замера силы сокращения мышцы (наибольшая сила одиночного сокращения соответствует оптимальной длине мышцы (L_0) [10]. L_0 была измерена с помощью цифрового штангенциркуля. После одиночных сокращений был проведен тест на тетаническое изометрическое сокращение. Мышца была установлена на длину L_0 , после чего начиналась стимуляция (1-миллисекундные квадратные импульсы, 40 Гц, продолжительность стимуляции 2 с), в процессе чего фиксировалась максимальная сила тетанического сокращения. Для тестирования индекса утомления камбаловидной мышцы проводилась серия из 20 тетанических сокращений за одну минуту, с перерывом в 1 с между сокращениями. За индекс утомления брали силу сокращения после 20 повторений, деленную на максимальную силу сокращения, измеренную в течение всего теста [11, 12]. Показатели нормировали на физиологи-

Таблица 1. Механические свойства камбаловидной мышцы

	С	7HS	7HS + N
Длина мышцы, мм	18.4 ± 0.4	19.2 ± 0.3	17.3 ± 0.4
pCSA, мм ²	5.2 ± 0.2	3.5 ± 0.2*	3.9 ± 0.1*
Сила одиночного сокращения, мН	69.6 ± 4.8	52.5 ± 6.0*	45.7 ± 4.1*
Удельная сила одиночного сокращения, мН/мм ²	13.8 ± 1.5	15.3 ± 1.4	11.8 ± 1.1
ТТР одиночного сокращения, мс	78.9 ± 7.3	62.6 ± 6.5	63.6 ± 8.5
HRT одиночного сокращения, мс	105.9 ± 12.9	91.7 ± 9.0	95.4 ± 14.0
Сила тетанического сокращения, мН	618.6 ± 63.7	291.8 ± 57.0*	304.4 ± 57.3*
Удельная сила тетанического сокращения, мН/мм ²	120.3 ± 12.0	81.7 ± 14.1	77.3 ± 14.3
HRT тетанического сокращения в начале теста, мс	210.8 ± 10.7	172.0 ± 18.2	223.9 ± 32.1
HRT тетанического сокращения в конце теста, мс	288.0 ± 136.6 (+37%)	236.0 ± 18.7 (+37%)	291.5 ± 29.5 (+30%)
F/T интеграл, мН*с	1217.1 ± 135.2	554.7 ± 107.6*	566.7 ± 103.8*

pCSA – физиологическая (расчетная) площадь поперечного сечения, ТТР – время сокращения, HRT – время полурасслабления. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С. Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего.

ческое поперечное сечение мышцы (pCSA). Измерение силовых показателей проводили с помощью Aurora Scientific Dual Mode Lever System 305C-LR (Aurora Scientific, США) с частотой сбора данных 10 кГц. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Aurora Scientific 615A Analysis Software Suite. Репрезентативные графики сокращений представлены на рис. 2а, 2б, данные с характеристиками одиночных и тетанических сокращений представлены в табл. 1.

Анализ экспрессии генов

Для выделения нуклеиновых кислот из камбаловидных мышц экспериментальных животных был использован набор AllPrep DNA/RNA/miRNA extraction (Qiagen, Германия). Выделение проводили согласно рекомендациям производителя. Содержание тотальной РНК и ДНК в образцах определяли путем измерения оптической плотности образца на 260 и 280 нм. Чистоту образцов определяли по соотношению длин волн на 260 и 280 нм. Для проведения обратной транскрипции тотальной РНК и синтеза кДНК использовали набор для обратной транскрипции ОТ-1 (Синтол, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Для определения содержания митохондриальной ДНК в образцах 120 нг фракции ДНК брали в качестве матрицы для ПЦР-анализа в реальном времени.

Для определения уровня экспрессии генов кДНК, полученную из фракции тотальной РНК, также брали в качестве матрицы для ПЦР-анализа в реальном вре-

мени. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (pH 8.8), 0.06 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы, Синтол, Россия). Для анализа содержания нуклеиновых кислот в пробах использовали метод анализа данных ПЦР по Pffaf1 [13]. Нормирование уровня экспрессии проводили по экспрессии гена “домашнего хозяйства” *RPL13*. В работе использовались следующие праймеры: PGC1 α F: 5'-GTGCAGCCAAGACTCTGTATGG-3', R: 5'-GTCCAGGT-CATTCACATCAAGTTC-3'; Myh7 (MyHC I(β)) R: 5'-ACAGAGGAAGACAG-GAAGAACCTAC-3', F: 5'-GGGCTTCACAGGCATCCTTAG-3'; Myh2 (MyHC IIa) F: 5'-TATCCTCAGGCTTCAAGATTTG-3', R: 5'-TAAATAGAATCACATGGGGACA-3'; Myh4 (MyHC IIb) F: 5'-CTGAGGAACAATCCAACGTC-3', R: 5'-TTGTGT-GATTTCTTCTGTACCT-3'; Myh1 (MyHC IIc/d/x) R: 5'-CGCGAGGTTTCACAC-CAAA-3', F: 5'-TCCCAAAGTCGTAAGTACAAAATGG-3'; COXI F: 5'-ATTGGAG-GCTTCGGGAACTG-3', R: 5'-AGATAGAAGACACCCCGGCT-3'; COXII F: 5'-ATTG-GAGGCTTCGGGAACTG-3', R: 5'-AGATAGAAGACACCCCGGCT-3'; COXIV F: 5'-TGGGAGTGTGTGAAGAGTGA-3', R: 5'-GCAGTGAAGCCGATGAAGAAC-3'; TFAM1 F: 5'-CGCCTGTCAGCCTTATCTGTA-3', R: 5'-TGCATCTGGGTGTTTAGCTTA-3'; NRF2 α F: 5'-AAGTGACGAGATGGGGCCGC-3', R: 5'-CGTTGTCCCCATTTTGTG-3'; NRF1 F: 5'-TТАCTCTGCTGTGGCTGATGG-3', R: 5'-CCTCTGATGCTTGCGTC-GTCT-3'; RPL19 F: 5'-GTACCCTTCTTCCCTATGC-3', R: 5'-CAATGC-CAACTCTCGTCAACAG-3'.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы

Для выделения тотальной белковой фракции и последующей оценки содержания в ней PGC1 α был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz, США), 10 мкг/мл апротинина (SIGMA, США), 10 мкг/мл леупептина (SIGMA, США), 10 мкг/мл пепстатина (SIGMA, США), complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Швейцария) 20 мкл, фосфоингибиторный коктейль (Santa Cruz, США), 40 мкл.

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 V при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела против PGC1 α (Abcam, США, 1 : 2000), тотальной CaMK IIb (CSB-PA061493, Kusabio, Китай 1 : 1000), фосфо-CaMK IIb (CSB-PA283993, Kusabio, Китай, 1 : 1000), MOTS-C (MBS542112, Mybiosource, США, 1 : 1000), GAPDH (Cell Signaling Technology, США, 1 : 10000), COX1/MT-CO1 (1 : 1000, Cell Signaling Technology, США), TOM20 (4F3, BioRad, Германия, 1 : 500). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit или goat-anti-mouse, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 30000. Определение тотальной формы белка проводилось на той же мембране, что и определение фосфорилированной формы: комплекс антител к фосфорилированной форме белка снимали с помощью инкубации в Restore buffer (Thermo

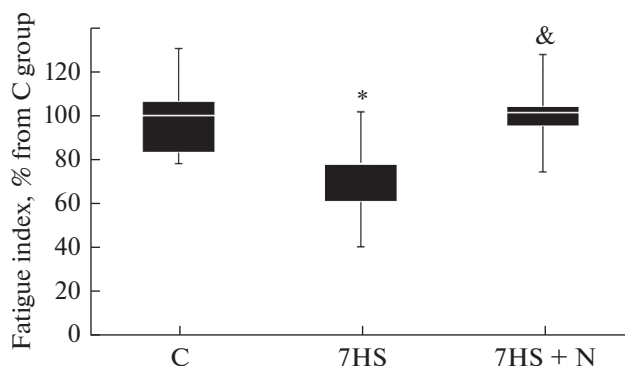


Рис. 1. Функциональные параметры камбаловидной мышцы экспериментальных животных. Индекс утомления – данные представлены в виде диаграмм размаха. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С, & – достоверные отличия от группы 7HS.

Fisher, США), после чего проводили инкубацию с антителами против тотальной формы белка.

Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Выявление белковых полос осуществляли с помощью набора ImmunStar Substrate Kit (BioRad Laboratories, США). Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Нормирование содержания белков проводили по содержанию GAPDH, уровень фосфорилирования определяли по соотношению содержания фосфорилированной и тотальной форм белка.

Статистическая обработка данных

Данные представлены в виде диаграмм размаха (на графике присутствуют медиана, первая и третья квартили, а также максимум и минимум, все значения представлены в процентах от медианы контрольной группы. Достоверность отличий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Краскелла–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна. Достоверными считали различия между группами, если значение $p < 0.05$. Количество животных составляло 8 для каждой группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После 7 сут вывешивания задних конечностей индекс утомления камбаловидных мышц животных в группе 7HS был достоверно снижен на 22% в сравнении с группой С, при этом в группе с введением нифедипина индекс утомления мышц был достоверно выше, чем в группе 7HS и составлял 101% от значений группы С (рис. 1).

Уровень фосфорилирования кальций-кальмодулин киназы II по Thr287 был достоверно повышен на 33% в группе 7HS в сравнении с группой С, при этом в группе 7HS + N составлял 101% от группы С и был достоверно ниже значений группы 7HS (рис. 3).

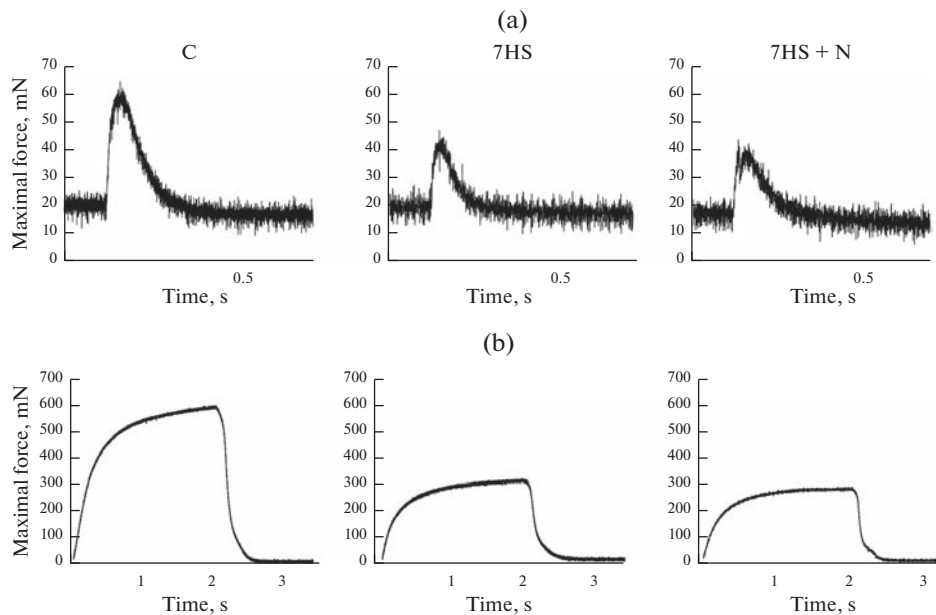


Рис. 2. Графики одиночных (а) и тетанических (б) сокращений для каждой группы. Выбраны сокращения, наиболее близко соответствующие средним в группах. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина.

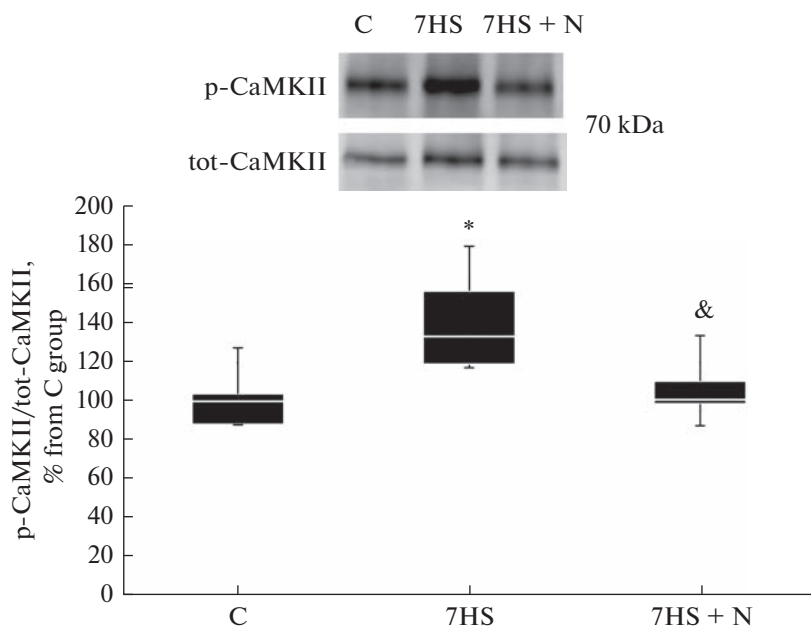


Рис. 3. Уровень фосфорилирования кальций-кальмодулин киназы II в тотальной белковой фракции камбаловидных мышц экспериментальных животных. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С, & – достоверные отличия от группы 7HS.

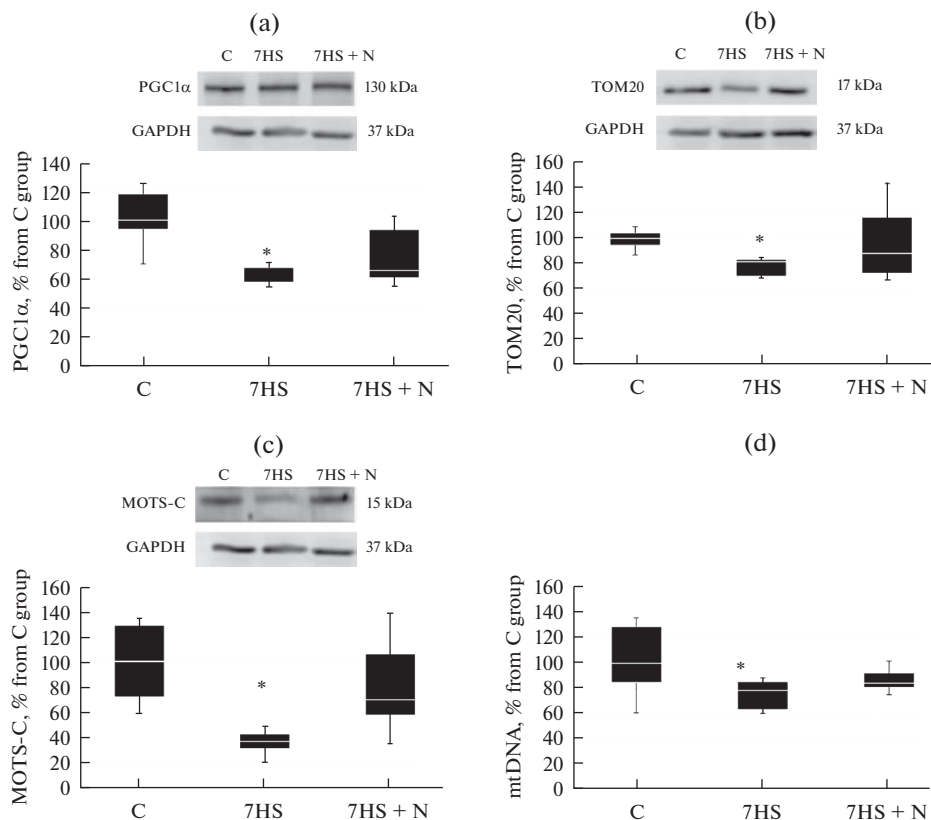


Рис. 4. Содержание PGC1 α (a), TOM20 (b), MOTS-C (c) в тотальной белковой фракции, а также митохондриальной ДНК (d) в камбаловидных мышцах экспериментальных животных. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С, & – достоверные отличия от группы 7HS.

Содержание регулятора биогенеза митохондрий PGC1 α , TOM20, митокина MOTS-C и митохондриальной ДНК было достоверно снижено в группе 7HS в сравнении с группой С, при этом достоверных отличий между группами С и 7HS + N для перечисленных параметров обнаружено не было (рис. 4).

Экспрессия мРНК субъединицы I IV комплекса дыхательной цепи (COXI) в группе 7HS была достоверно снижена на 60% в сравнении с группой С, такое же снижение наблюдалось и для содержания COXI в тотальной белковой фракции (рис. 5a, 5b). В группе 7HS + N экспрессия мРНК COXI и ее содержание в тотальной белковой фракции не имели достоверных отличий от группы С, и содержание COXI в этой группе было достоверно выше, чем в группе 7HS. Экспрессия мРНК субъединиц IV комплекса дыхательной цепи COXII и COXIV также была достоверно снижена в группе 7HS, тогда как в группе 7HS + N их содержание было достоверно выше значений группы 7HS, хотя и достоверно ниже чем в группе С (рис. 5c, 5d).

Экспрессия мРНК PGC1 α была достоверно снижена в группах 7HS и 7HS + N в сравнении с группой С, а группы 7HS и 7HS + N не различались между собой (рис. 6a). Экспрессия мРНК Tfam была достоверно снижена на 60% в группе 7HS в сравнении

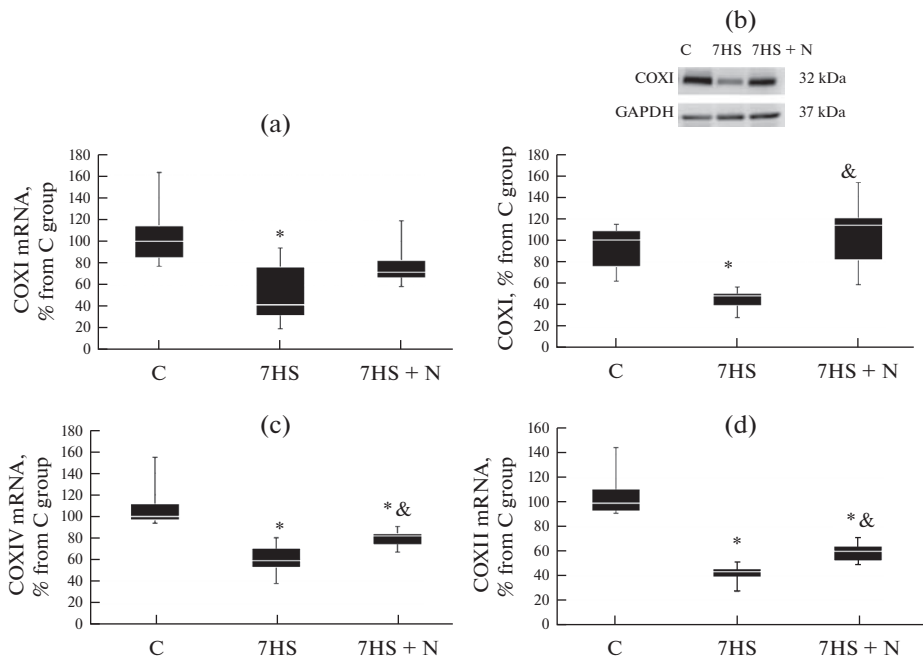


Рис. 5. Экспрессия мРНК COXI (а), содержание COXI (б), экспрессия мРНК COXIV (с) и экспрессия мРНК COXII (д) в камбаловидных мышцах экспериментальных животных. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С, & – достоверные отличия от группы 7HS.

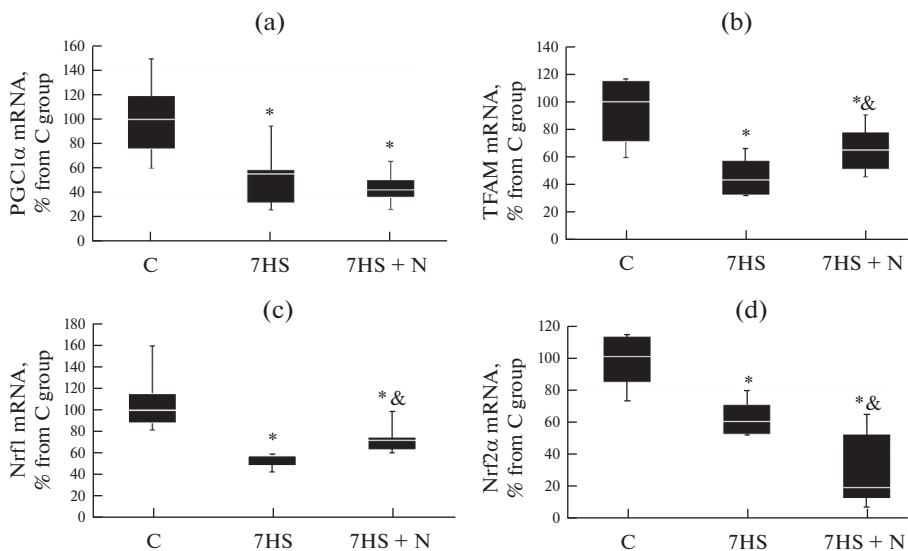


Рис. 6. Экспрессия мРНК PGC1α (а), TFAM (б), Nrf1 (с) и Nrf2α (д) в камбаловидных мышцах экспериментальных животных. С – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы С, & – достоверные отличия от группы 7HS.

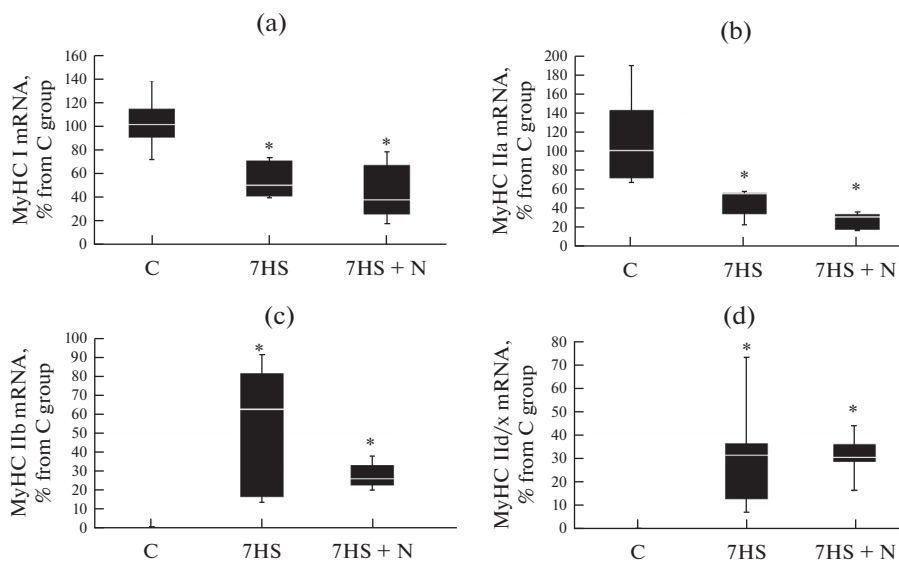


Рис. 7. Экспрессия мРНК MyHC I (a), MyHC IIa (b), MyHC IIb (c) и MyHC IIc/x (d) в камбаловидных мышцах экспериментальных животных. C – контрольная группа, 7HS – группа 7-суточного вывешивания, 7HS + N – группа 7-суточного вывешивания с введением нифедипина. * – достоверные отличия от группы C, & – достоверные отличия от группы 7HS.

с группой C и на 35% в группе 7HS + N, при этом значения группы 7HS + N были достоверно выше чем в группе 7HS (рис. 6b). Экспрессия *Nrf1* и *Nrf2 α* была достоверно снижена в обеих вывешенных группах в сравнении с группой C, однако экспрессия мРНК *Nrf1b* в группе 7HS + N было достоверно выше, чем в группе 7HS, а содержание *Nrf2 α* – достоверно ниже, чем в группе 7HS (рис. 6c, d).

Экспрессия мРНК изоформы тяжелых цепей миозина “медленного” типа MyHC I и “быстрого окислительного” типа MyHC IIa была достоверно снижена в обеих вывешенных группах в сравнении с контролем, и между этими двумя группами различий не было. Экспрессия “быстрых” миозиновых изоформ MyHC IIb и MyHC IIc/x была достоверно повышена в обеих вывешенных группах в сравнении с группой C, при этом между группами 7HS и 7HS + N различий не было (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдаемое в данной работе увеличение утомляемости камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки хорошо согласуется с предыдущими данными, полученными как на животных, так и на человеке [14, 15]. В литературе также было описано предотвращение повышения утомляемости камбаловидных мышц на фоне вывешивания путем введения непрямого активатора АМПК бета-гуанидинпропионовой кислоты и путем механической стимуляции опорных зон стопы вывешенных животных [14, 16]. Предотвращение утомляемости камбаловидных мышц на фоне функциональной разгрузки при блокировании кальциевых каналов L-типа наблюдается впервые; такой эффект может быть связан с вызванным нифедипином снижением содержания миоплазматического кальция. Известно, что в условиях функциональной разгрузки в миоплазме мышечных волокон происходит избыточное накопление кальция [4, 17]. Ранее было показано, что введение

нифедипина приводит к снижению содержания кальция в миоплазме мышечных волокон камбаловидных мышц [18]. Это хорошо согласуется с повышением уровня кальций-зависимого фосфорилирования СаМК II при вывешивании и его предотвращении в группе с введением нифедипина (рис. 2).

Известно, что избыточное накопление кальция в миоплазме может приводить к увеличению утомляемости скелетных мышц при старении, а также при ряде патологических состояний [7, 19]. Ряд авторов связывает такой эффект избыточного миоплазматического кальция с повышением генерации активных форм кислорода митохондриями, которое приводит к окислению рианодиновых рецепторов, утечке (leakage) кальция из саркоплазматического ретикулума и истощению кальциевого депо саркоплазматического ретикулума [7, 20]. Нельзя исключать, что аналогичный механизм может действовать и в условиях функциональной разгрузки.

Отдельно следует отметить, что в данном исследовании было обнаружено, что введение нифедипина на фоне вывешивания предотвращает снижение содержания митохондриальных белков и ДНК, а также экспрессии мРНК ряда генов-регуляторов биогенеза митохондрий. В частности, введение нифедипина предотвращает снижение содержания TOM20, компонента транслоказного комплекса внешней мембраны митохондрий. Изменения содержания данного белка, как и изменение содержания митохондриальной ДНК, коррелируют с изменением массы митохондрий [21], таким образом можно предположить, что введение нифедипина предотвращает снижение митохондриальной массы в камбаловидных мышцах на фоне функциональной разгрузки. Этот эффект, вероятно, также вносит свой вклад в предотвращение повышенной утомляемости в группе с введением нифедипина. Введение нифедипина привело к предотвращению снижения содержания регулятора биогенеза PGC1 α в тотальной белковой фракции, однако не предотвратило снижение экспрессии мРНК данного гена. Известно, что PGC1 α является мишенью ряда убиквитинлигаз и количество PGC1 α в мышечном волокне может регулироваться в том числе за счет протеолиза [22]. Предотвращение избыточного накопления кальция, по-видимому, приводит к снижению уровня протеолитической деградации PGC1 α , что ведет к усилению его транскрипционной активности и активации экспрессии мРНК его генов-мишеней, таких как COX I и COX IV. Наряду с этим, предотвращение снижения содержания митохондриальных белков и ДНК может объясняться снижением уровня митофагии, которая также может активироваться накоплением избыточного кальция в миоплазме [23].

Также следует обратить внимание на тот факт, что введение нифедипина привело к разнонаправленным изменениям ядерных эритроид-связанных факторов (Nrf) 1 и 2. Известно, что Nrf2 регулирует метаболизм активных форм кислорода, в то время как Nrf1 является регулятором генов, связанных с митохондриальными функциями [24]. Экспрессия Nrf α может, в частности, активироваться накоплением активных форм кислорода [25]. Таким образом, подавление экспрессии Nrf2 α в группе с введением нифедипина может косвенно свидетельствовать о меньшем количестве активных форм кислорода в данной группе.

Введение нифедипина также привело к предотвращению снижения содержания митокина MOTS-C — этот пептид вырабатывается в митохондриях при упражнениях на выносливость и способствует повышенной устойчивости к утомлению, активируя ряд регуляторов биогенеза митохондрий и экспрессию медленной изоформы тяжелых цепей миозина [26]. Тем не менее, введение нифедипина на фоне 7 суток вывешивания не привело к предотвращению трансформации паттерна экспрессии миозиновых генов, характерного для функциональной разгрузки, что противоречит данным о предотвращении трансформации миозинового фенотипа камбаловидной мышцы при введении нифедипина на фоне 14-суточной функцио-

нальной разгрузки [27]. Это противоречие может быть вызвано недостаточной продолжительностью введения препарата в данном эксперименте.

Таким образом, введение нифедипина на фоне 7 сут функциональной разгрузки камбаловидных мышц крыс предотвращает избыточное накопление миоплазматического кальция, предотвращает повышение утомляемости и способствует сохранению митохондриальных белков, ДНК и экспрессии мРНК ряда генов-регуляторов биогенеза митохондрий.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 629, от 06.12.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 21-75-00063).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента Б.С.Ш., К.А.Ш., сбор данных И.Д.Л., Д.А.С., С.А.Т., обработка данных И.Д.Л., К.А.Ш., написание и редактирование манускрипта Б.С.Ш., К.А.Ш., И.Д.Л., Д.А.С., С.А.Т.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sharlo K, Tyganov SA, Tomilovskaya E, Popov DV, Saveko AA, Shenkman BS* (2021) Effects of Various Muscle Disuse States and Countermeasures on Muscle Molecular Signaling. *Int J Mol Sci* 23(1): 468. <https://doi.org/10.3390/ijms23010468>
2. *Shenkman BS, Kozlovskaya IB* (2019) Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front Physiol* 10: 187. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00187>
3. *Ingalls CP, Warren GL, Armstrong RB* (1999) Intracellular Ca^{2+} transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading. *J Appl Physiol* 87(1): 386–390. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.386>
4. *Ingalls CP, Wenke JC, Armstrong RB* (2001) Time course changes in $[Ca^{2+}]_i$, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviat Space Envir Med* 72 (5): 471-476.
5. *Krivoi II, Kravtsova VV, Altaeva EG, Kubasov IV, Prokof'ev AV, Drabkina TM, Nikol'skii EE, Shenkman BS* (2008) Decrease in the electrogenic contribution of Na,K-ATPase and resting membrane potential as a possible mechanism of calcium ion accumulation in filaments of the rat musculus soleus subjected to the short-term gravity unloading. *Biofizika* 53 (6): 1051-1057.
6. *Kravtsova VV, Matchkov VV, Bouzjinova EV, Vasiliev AN, Razgovorova IA, Heiny JA, Krivoi II* (2015) Isoform-specific Na,K-ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. *Biomed Res Int* 2015: 720172. <https://doi.org/10.1155/2015/720172>
7. *Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, Shiomi T, Zalk R, Lacampagne A, Marks AR* (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 14 (2): 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014>

8. Yu Z, Wang H, Tang W, Wang S, Tian X, Zhu Y, He H (2021) Mitochondrial Ca(2+) oscillation induces mitophagy initiation through the PINK1-Parkin pathway. *Cell Death & Disease* 12 (7): 632. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03913-3>
9. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92(4): 1367–1377. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
10. Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol* 184(1): 170–192.
11. Burke RE, Levine DN, Saleman M, Tsairis P (1974) Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. *J Physiol* 238(3): 503–514. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010540>
12. Roy RR, Zhong H, Monti RJ, Vallance KA, Edgerton VR (2002) Mechanical properties of the electrically silent adult rat soleus muscle. *Muscle & Nerve* 26(3): 404–412. <https://doi.org/10.1002/mus.10219>
13. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
14. Matoba TWY, Ohira Y (1993) β -Guanidinopropionic acid suppresses suspension-induced changes in myosin expression in rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exer* 25: 157.
15. Mulder ER, Kuebler WM, Gerrits KH, Rittweger J, Felsenberg D, Stegeman DF, de Haan A (2007) Knee extensor fatigability after bedrest for 8 weeks with and without countermeasure. *Muscle Nerve* 36(6): 798–806. <https://doi.org/10.1002/mus.20870>
16. Sharlo K, Lvova I, Turtikova O, Tyganov S, Kalashnikov V, Shenkman B (2022) Plantar stimulation prevents the decrease in fatigue resistance in rat soleus muscle under one week of hindlimb suspension. *Arch Biochem Biophys* 718: 109150. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109150>
17. Алтаева ЕГ, Огнева ИВ, Шенкман БС (2010) Динамика уровня кальция и изменения содержания SERCA в мышечных волокнах крыс и монгольских песчанок при разгрузке задних конечностей различной продолжительности. *Цитология* 52(9): 770–775. [Altaeva EG, Ogneva IV, Shenkman BS (2010) Dynamics of calcium levels and changes SERCA content in muscle fibers of rats and Mongolian gerbils during hind limb unloadings of various duration. *Tsitologiya* 52 (9): 770–775. (In Russ)].
18. Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, Jaimovich E (2013) Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS One* 8(12): e81222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081222>
19. Andersson DC, Meli AC, Reiken S, Betzenhauser MJ, Umanskaya A, Shiomi T, D'Armiento J, Marks AR (2012) Leaky ryanodine receptors in beta-sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2(1): 9. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-9>
20. Yutaka Kano TS, Inagaki T, Sudo M, Poole DC (2012) Mechanisms of exercise-induced muscle damage and fatigue: Intracellular calcium accumulation. *J Phys Fitness Sports Med* 1 (3): 505–512. <https://doi.org/10.7600/jpfs.1.505>
21. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J (2013) Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 8(10): e77077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077077>
22. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93(4): 884S–890S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>
23. Perrone M, Patergnani S, Di Mambro T, Palumbo L, Wieckowski M, Giorgi C, Pinton P (2022) Calcium homeostasis in the control of mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 38(7-9): 581–598. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0122>
24. Walsh M. ZQ, Musci RV, Hamilton KL (2022) The combination of NRF1 and Nrf2 activators in myoblasts stimulate mechanisms of proteostasis without changes in mitochondrial respiration. *Redox Muscle Physiol Exerc Sport* 1. <https://doi.org/10.1016/j.rimpes.2022.100001>
25. Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K (2020) Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules* 10 (2): 320. <https://doi.org/10.3390/biom10020320>

26. Reynolds JC, Lai RW, Woodhead JST, Joly JH, Mitchell CJ, Cameron-Smith D, Lu R, Cohen P, Graham NA, Benayoun BA, Merry TL, Lee C (2021) MOTS-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis. *Nat Commun* 12(1): 470. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20790-0>
27. Мухина АМ, Алтаева ЕГ, Немировская ТЛ, Шенкман БС (2006) Роль Са-каналов L-типа в накоплении Ca^{2+} и изменениях в распределении тяжелой цепи миозина и изоформ SERCA у M. soleus крысы при гравитационной разгрузке. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 92(11): 1285–1295. [Mukhina AM, Altaeva EG, Nemirovskaia TL, Shenkman BS (2006) Role of L-type Ca-channels in Ca^{2+} accumulation and changes in distribution of myosin heavy chain and SERCA isoforms in rat M. soleus under gravitational unloading. *Russ J Physiol* 92 (11): 1285–1295. (In Russ)].

Role of L-Type Calcium Channels in the Increased Fatigue of Rat Soleus Muscle under Functional Unloading

K. A. Sharlo^{a, *}, I. D. Lyova^a, S. A. Tyganov^a, D. A. Sidorenko^a, and B. S. Shenkman^a

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

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

Excessive long-term accumulation of calcium ions in the myoplasm of skeletal muscles can negatively affect mitochondria and lead to muscle dysfunction. The aim of our study was to identify the role of L-type calcium channels in the development of increased fatigue rat soleus muscle under functional unloading. Young male Wistar rats were divided into three groups of 8 animals each: the vivarium control group (C), the group subjected to hind limb unloading for 7 days (7HS) and the group with 7 days of hindlimb unloading with daily intraperitoneal injections of nifedipine (7 mg/kg body weight). The administration of nifedipine during hindlimb unloading prevented the upregulation of calcium-dependent phosphorylation of calcium-calmodulin kinase II (CaMK II), prevented the increase in fatigue and contributed to the preservation of mitochondrial proteins, DNA and mRNA expression of a number of genes that regulate mitochondrial biogenesis.

Keywords: skeletal muscle, gravity unloading, fatigue, mitochondrial biogenesis

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ИЛ-13, ГЕНОВ ИЛ-13R
В БРОНХАХ КРЫС С ОВАЛЬБУМИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

© 2023 г. Л. Е. Блажевич¹, *, О. Е. Смирнова¹, В. М. Кирилина¹, П. М. Маслоков²

¹Петрозаводский государственный университет, Республика Карелия, Петрозаводск, Россия

²Ярославский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Ярославль, Россия

*E-mail: lyu15041988@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2022 г.

После доработки 12.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

В статье представлены результаты исследований уровней экспрессии гена рецепторов интерлейкина-13 (ИЛ-13R) и уровней экспрессии ИЛ-13R в бронхах контрольных крыс и крыс с овальбумин-индуцированной астмой. Выбор этих рецепторов обусловлен большим значением данных структур в патогенезе аллергической бронхиальной астмы. Были исследованы биологические материалы 64 крыс линии Вистар при помощи метода ПЦР в режиме реального времени и иммуногистохимическим методом. Установлено, что в условиях развития астмы в тканях бронхов крыс происходит выраженная экспрессия генов *IL13R*, значительная экспрессия рецептора к ИЛ-13. В участках бронхов, содержащих интрамуральные ганглии (область бифуркации), уровень экспрессии генов *IL13R* и уровень экспрессии рецептора ИЛ-13R были значительно выше, чем в образцах трахеи без ганглиев. Кромогликат натрия, введенный в организм крыс через 5 ч после последней ингаляции овальбумином, приводил к снижению содержания мРНК в бронхах животных по сравнению с животными, не получавшими обработку стабилизатором тучных клеток.

Ключевые слова: интерлейкин-13, модель овальбумин-индуцированной бронхиальной астмы, рецептор, интрамуральный ганглий, кромогликат натрия

DOI: 10.31857/S0869813923040039, EDN: VIWGPC

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма является гетерогенным хроническим воспалительным заболеванием дыхательных путей. Исследования молекулярных и клеточных механизмов бронхиальной астмы установили, что в ее патогенезе участвует широкий спектр иммунных (Т- и В-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги и др.) и структурных (эпителиальные и эндотелиальные) клеток [1].

Интерлейкин-13 (ИЛ-13) и его рецептор являются важными участниками хронического воспаления дыхательных путей. В модели бронхиальной астмы у мышей отмечается повышенный уровень ИЛ-13 в бронхоальвеолярной жидкости [2].

Цитокин ИЛ-13 был идентифицирован в качестве терапевтической мишени при лечении астмы. Два различных человеческих моноклональных антитела против ИЛ-13 (тралокинумаб и лебрикизумаб) блокируют этот цитокин и, соответственно, делают невозможной передачу сигналов ИЛ-13 его рецепторам – ИЛ-13Ra1 и ИЛ-13Ra2 [3].

При блокаде рецепторов к IL-13 уменьшается бронхиальная гиперреактивность у мышей [3, 4]. Например, блокируют рецептор к IL-13 моноклональные антитела препарата дупилумаб [5]. Дупилумаб — это моноклональное антитело против α -субъединицы рецептора IL-13. Дупилумаб снижает частоту тяжелых обострений астмы, улучшает функцию легких и качество жизни. Важно отметить, что эти эффекты также наблюдаются при снижении поддерживающих доз пероральных кортикостероидов [6].

У многих пациентов с бронхиальной астмой хроническое воспаление дыхательных путей вызывается IL-13, продуцируемым Th2-клетками и тучными клетками [7].

Lentsch и соавт. в экспериментах на животных установили, что IL-13 способен вызывать аллергическую астму, острое воспалительное повреждение легких и образование легочной гранулемы [8]. IL-13 участвует в гиперсекреции слизи в нижних и верхних дыхательных путях, в развитии воспалительных реакций и гиперреактивности [9].

Первый тип рецепторов — IL-13Ra1. Рецептор этого типа состоит из субъединиц IL-4Ra в комплексе с IL-13Ra1 и обнаруживается во многих негемопоэтических клетках (например, эпителиальных клетках бронхов, гладкомышечных клетках, фибробластах, кератиноцитах). Через этот тип рецепторов опосредуют свои сигналы IL-13 и IL-4, что объясняется большим сходством между этими цитокинами на генетическом уровне. Munitz и соавт. обнаружили, что рецептору IL-13Ra1 принадлежит решающая роль в базовой продукции IgE, развитии гиперчувствительности, выработке слизи и продукции эотаксина [10].

IL-13Ra1 содержат богатые пролином области, которые могут связывать янускиназы JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 [11, 12]. Связывание IL-13 с этим типом рецепторов активирует JAK1, JAK2 и TYK2. Следствием активации молекул JAK является фосфорилирование цитоплазматических тирозинов, что приводит к привлечению STAT6 и STAT3 к рецептору с последующим их фосфорилированием и активацией [13]. Фосфорилированные мономеры STAT6 и STAT3 димеризуются, а затем перемещаются в ядро, связываются со специфическими элементами ДНК для регуляции транскрипции [12]. Активация STAT6 является основным сигнальным событием в ответе на IL-13 [14]. Мыши, у которых отсутствовал STAT6, были защищены от гиперреактивности, индуцированной IL-13 [13]. Выяснено, что STAT1 и STAT3 также могут быть активированы IL-13 [8, 11, 12]. Цитоплазматический домен человеческого IL-13Ra1 содержит два остатка тирозина, которые могут служить сайтами стыковки для STAT3 [11].

IL-13Ra2 является *вторым типом рецепторов* для IL-13. Передача сигналов IL-13 через IL-13Ra2 приводит к фосфорилированию ERK1/2 и не зависит от STAT6. Результатом активации ERK1/2-сигнального пути является образование димерного фактора транскрипции AP-1. Фосфорилированный AP-1 транслоцируется в ядро и связывается со специфическими элементами ДНК.

С рецептором IL-13Ra2 связывается только IL-13, в то время как цитокин IL-4 не способен к взаимодействию с ним [15, 16]. Первоначально этот рецептор считался рецептором-приманкой [17], участвующим в удалении IL-13 путем интернализации [18, 19]. Хотя IL-13Ra2 не обладает стандартной сигнальной активностью JAK–STAT, эта гипотеза была поставлена под сомнение, поскольку несколько исследований показали, что при определенных обстоятельствах IL-13Ra2 может опосредовать передачу сигналов IL-13 [20, 21]. В дыхательных путях человека было обнаружено, что IL-13Ra2 участвует в передаче сигналов IL-13 через белок-активатор фактора транскрипции-1 (AP-1), индуцируя активацию TGF- β [22].

У мышей с дефицитом IL-13Ra2 бронхиальная гиперчувствительность и воспаление в ответ на воздействие домашней пыли были ослаблены по сравнению с контрольными мышами [23].

Таким образом, рецепторы к IL-13 играют значительную роль в развитии астмы, и изучение их экспрессии относится к актуальным исследованиям. Исследований, выявляющих влияние стабилизации мембран тучных клеток хромогликатом натрия на степень экспрессии генов IL-13R, ранее не проводилось. При этом тучно-клеточные продукты, высвобождаемые при их дегрануляции, могут играть существенную роль в изменении экспрессии IL-13R. Также в литературе отсутствуют сведения о роли нейронов интрамурального ганглия в степени экспрессии этих рецепторов, в то время как нервные структуры способны участвовать в нейрогенном воспалении, внося вклад в развитие патологического процесса.

Целью данного исследования являлось изучение степени экспрессии генов IL-13R и количества IL-13R-содержащих клеток в бронхах с наличием интрамуральных метасимпатических ганглиев и без них у крыс в нормальных физиологических условиях и в условиях овальбумин-индуцированной бронхиальной астмы. Еще одной задачей исследования явилась оценка уровня экспрессии гена IL-13R в препаратах бронхов у крыс с астмой после обработки их хромогликатом натрия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема эксперимента

Исследования были проведены на 64 крысах линии Вистар, полученных из вивария Петрозаводского государственного университета. Возраст крыс – 2–3 мес., для экспериментов брались самцы и самки в период диэструса. Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами проведения лабораторных исследований (ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016”) [24]. Все животные были разделены на несколько групп: контрольная группа (получала физиологический раствор, $n = 8$), группа животных № 1 (взятие биологического материала после 72 ч с момента последней ингаляции овальбумином, $n = 8$), группа животных № 2 (забор биоматериала осуществляли после последней ингаляции овальбумином через 10 дней, $n = 8$), группа животных № 3 (взятие биологического материала производилось на 17-й день после последней ингаляции овальбумином, $n = 8$).

Для групп № 1, № 2 и № 3 были сформированы аналогичные группы животных, но получавшие хромогликат натрия, который способен снижать аллергический компонент воспаления ($n = 8$ для каждой из групп).

От каждого животного брали по 3 препарата с ганглиями (в области бифуркаций бронхов) и по 3 препарата без ганглиев (в прямых участках). Для данного исследования брались бронхи 2-го порядка во всех исследуемых образцах. Препараты бронхов были единообразны, выполненные по стандартной методике приготовления изолированных препаратов.

Виварий, где содержались животные, соответствовал требованиям СП 2.2.1.3218-14. С целью получения образцов респираторного тракта производилась декапитация с предварительной анестезией. Общую анестезию проводили при помощи инъекций золетила (Virbac S.A., Франция, 20 мг/кг, внутримышечно). Такой подход обеспечивал быструю эвтаназию животного (рекомендации по эвтаназии экспериментальных животных, Европейская комиссия).

Методика введения и расчет дозы хромогликата натрия

Для данного исследования важно было оценить, насколько стабилизация тучных клеток хромогликатом натрия повлияет на экспрессию исследуемых рецепторов [25]. Выбор препарата обоснован тем, что хромогликат натрия стабилизирует

мембраны тучных клеток, предотвращая их дегрануляцию с последующим выходом из них цитокинов, медиаторов, лейкотриенов, усиливающих воспаление в условиях аллергии.

Кромогликат натрия (Aventis Pharma Holmes Chapel, Великобритания) вводили ингаляционно в максимальной концентрации (0.2 мг на 1 кг массы тела), исходя из перерасчета дозы для человека, через 5 ч после последней ингаляции овальбумина. Количество ингаляций — 6 раз в сутки (также максимальное, исходя из инструкции по применению препарата), время каждой ингаляции — 15 мин.

Модель бронхиальной астмы

В исследовании применяли модифицированную методику, предложенную в работе Masakazu [26]. Модифицированная методика проходила верификацию в ранее проведенных научным коллективом сериях экспериментов, в которых исследования были проведены на контрольных крысах ($n = 30$ животных), на крысах, обработанных по методике Masakazu ($n = 30$ животных) и на крысах, обработанных по модифицированной методике ($n = 30$ животных). В тканях трахей и бронхов оценивали количество эозинофилов и тучных клеток, количество слизистого компонента в малых бронхах, количество тучных клеток в лаважной жидкости. Данные показатели в предложенной модификации статистически значимо не отличались от показателей, полученных в методике Masakazu. Поэтому было принято решение оставить предложенную в статье модифицированную методику, поскольку она вызывала развитие бронхиальной астмы у 98% животных (в то время как методика Masakazu вызывала развитие астмы у 86% животных).

Крысы были сенсibilизированы введением овальбумина (Sigma-Aldrich, Германия). Для одноразовой процедуры сенсibilизации 0.5 мг овальбумина растворяли в 1 мл физиологического раствора. Далее раствор овальбумина вводили подкожно по 0.1 мл в шею, спину, обе ступни, пах и 0.5 мл раствора овальбумина дополнительно вводили внутривентрально (общий объем раствора овальбумина, вводимого одному животному, равнялся 1 мл). Процедуру сенсibilизации инъекциями овальбумина проводили на 1-, 14- и 21-й день.

Параллельно с инъекциями осуществляли ингаляцию овальбумином при помощи небулайзера на 14-, 16-, 18-, 21- и 24-й день. Для этого крыс помещали в экспозиционную камеру, подключенную к небулайзеру (Omron, NE C29-E, Япония). Овальбумин в количестве 1 г растворяли в 100 мл физиологического раствора. Раствор овальбумина распыляли в течение 30 мин с выходом 3 мл/мин и со средним размером частиц 3.2 мкм. Последняя ингаляция раствором овальбумина проводилась за 72 ч до эвтаназии животных. Несенсibilизированной группе вводили физиологический раствор внутривентрально в качестве контроля [26].

Статистический анализ

Для оценки значимости различий между группами предварительно осуществляли проверку нормальности распределения данных с использованием W -критерия Шапиро–Уилка. Для оценки значимости различий количественных нормально распределенных признаков применяли параметрический t -критерий Стьюдента, а также критерий Фишера F в ходе однофакторного дисперсионного анализа.

Молекулярно-генетические методы

Для определения уровня транскриптов генов были использованы образцы тканей бронхов с ганглием и бронхов без ганглия. Выделение тотальной РНК осуществляли с помощью PureZOL™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad, США). После

центрифугирования (время 15 мин, при 4°C, 14000 g) осадок тотальной РНК промывали 80%-ным этанолом и снова центрифугировали (время 8 мин, при 4°C, 12000 g). Далее осадок тотальной РНК подсушивали. Количество и качество тотальной РНК определяли спектрофотометрически на приборе SmartSpecPlus (BioRad, США). Далее синтезировалась первая комплементарная цепь ДНК (кДНК) при помощи набора MMLVRT kit (Евроген, Россия). Прибор LightCycler®96 (Roche, Швейцария) позволял оценить уровень экспрессии генов с помощью ПЦР в режиме реального времени. Для амплификации использовали наборы qPCRmix HS SYBR (Евроген, Россия). Протокол ПЦР был следующим: кДНК денатурировалась при 95°C в течение 5 мин на протяжении 35 циклов; далее денатурация продолжалась при 95°C в течение 15 с; после денатурации производился отжиг при 60°C в течение 15 с; последним этапом была элонгация при 72°C в течение 15 с. Программа Beacon Designer помогла конструировать праймеры для ПЦР.

Нуклеотидные последовательности и размер ПЦР-фрагментов для гена *IL13RA* (CD231A1) был следующим: 5' ATGTGTCCTACTCCCCCATC 3' (exon 11) и 5' TTC-CCCCTCTCAAGCAAATAGG 3' (exon 11), 284 н. п. соответственно [27].

Иммуногистохимические методы

Для иммуногистохимических исследований с флуоресцентной меткой использовали парафиновые срезы бронхов, изготовленные по стандартной методике. Кусочки ткани после предварительной подготовки проходили дегидратацию в спиртах, далее помещались в ксилол и парафин и готовились срезы. Депарафинизацию, регидратацию и демаскировку антигенов проводили с применением раствора Trilogy™ (Cell Marque, Merck, США). Далее срезы промывались в дистиллированной воде и в фосфатно-солевом растворе (PBS). В исследовании использовались неконъюгированные первичные кроличьи поликлональные антитела против рецепторов к IL-13 (антитела кроличьи поликлональные IL-13RA1, IL-13RA1 Polyclonal Antibody, Catalog # PA5-86354, Species Reactivity: Human, Mouse, Rat; BioVitrum, США). Препараты бронхов были оставлены для реакции с первичными антителами в течение 18 ч при 4°C. После этого образцы бронхов промывались в PBS и инкубировались со вторичным антителом, конъюгированным с флуорохромом Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Ядра всех клеток препарата окрашивались Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Флуоресцентный микроскоп Olympus (Япония) позволил визуализировать полученные результаты, а программа ImageJ – произвести их количественный анализ [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты иммуногистохимических исследований

Образцы бронхов для иммуногистохимического исследования брались по истечению 72 ч после последней ингаляции овальбумином (группа крыс с астмой № 1). В препаратах бронхов с ганглиями количество клеток в перерасчете на 100 клеток, экспрессирующих рецептор к IL-13, в группе животных с астмой увеличилось на 160.3% по сравнению с контрольной группой (ошибка среднего арифметического (m) составила 0.36; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). В препаратах бронхов без ганглиев тоже наблюдались изменения в количестве IL-13R-содержащих клеток. Количество таких клеток увеличилось на 90.4% у животных с астмой по сравнению с контролем ($m = 0.38$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 1–4).

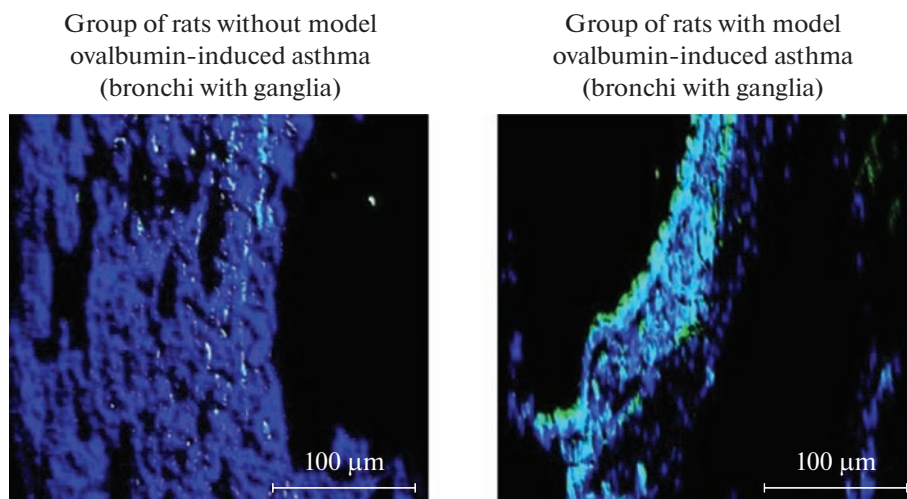


Рис. 1. Фотографии, полученные с помощью светового микроскопа. Зеленым свечением обозначены клетки, содержащие рецептор к IL-13.

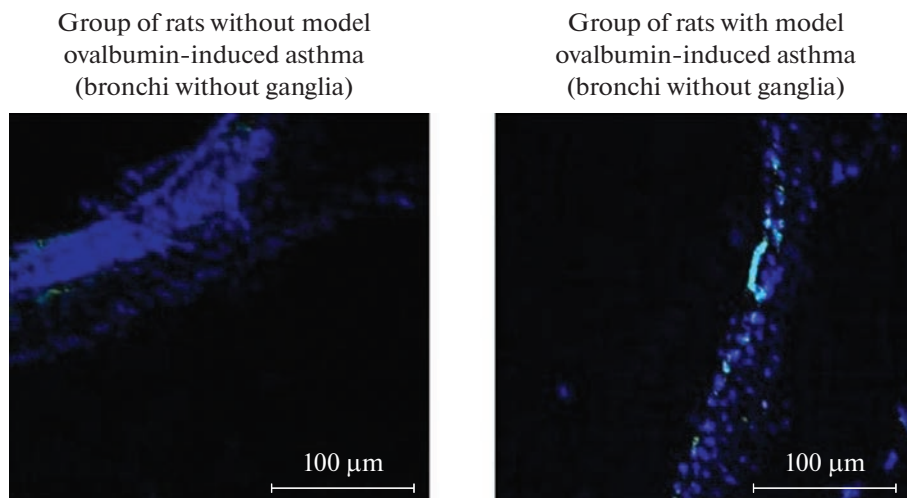


Рис. 2. Фотографии, полученные с помощью светового микроскопа. Зеленым свечением обозначены клетки, содержащие рецептор к IL-13.

Результаты молекулярно-генетических исследований

В препаратах бронхов с ганглиями экспрессия генов IL-13R была более выражена по истечению первых трех суток после последней ингаляции овальбумином. По сравнению с контрольными значениями содержание мРНК в группе крыс с астмой № 1 возросло на 1.4 отн. ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), в группе крыс с астмой № 2 – на 1.1 отн. ед. ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). К первоначальным значениям экспрессия генов IL-13R возвращалась на

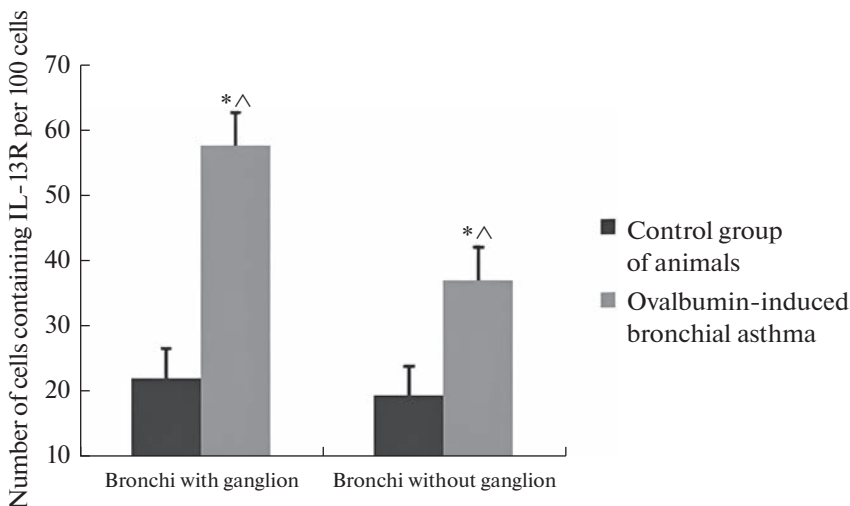


Рис. 3. Изменения в количестве IL-13R-содержащих клеток в контрольной и экспериментальной группах животных. По оси абсцисс обозначены биологические препараты. По оси ординат – количество клеток, содержащих IL-13R в перерасчет на 100 клеток. * – статистически значимое отличие в количестве клеток, содержащих рецептор к IL-13, между контрольными и экспериментальными препаратами. ^ – статистически значимое отличие в количестве клеток, содержащих рецептор к IL-13, между экспериментальными препаратами бронхов с ганглиями и бронхов без ганглиев.

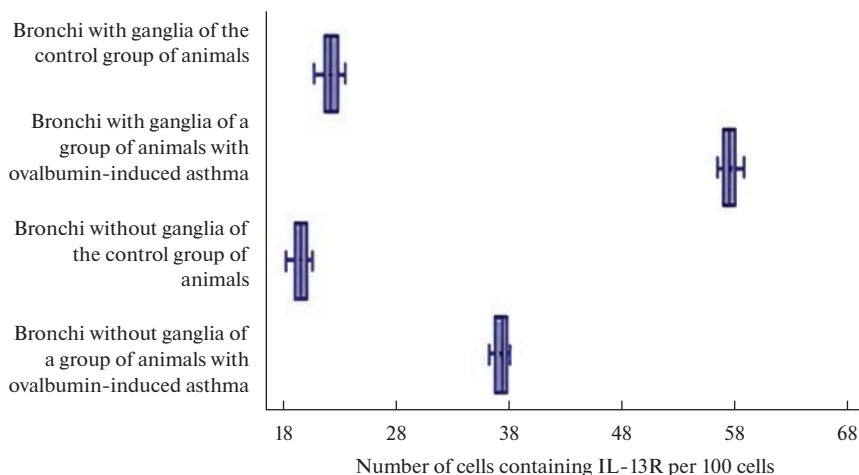


Рис. 4. Разброс данных, отражающих количество IL-13R-содержащих клеток в бронхах контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой. По оси абсцисс обозначено количество клеток, содержащих IL-13R, в перерасчете на 100 клеток. По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

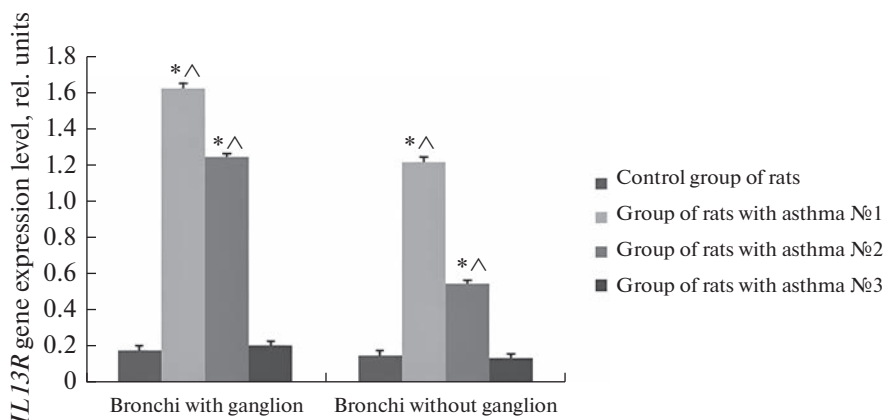


Рис. 5. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов контрольных крыс и крыс с овальбумин-индуцированной бронхиальной астмой. * – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между контрольными и экспериментальными препаратами. ^ – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между экспериментальными препаратами бронхов с ганглиями и бронхов без ганглиев.

17-й день после последней ингаляции и равнялась 0.2 отн. ед. (группа крыс с астмой №3) ($m = 0.05$).

В препаратах бронхов без ганглиев по истечении 72 ч экспрессия увеличилась на 1.1 отн. ед. (группа крыс с астмой № 1) ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), а по истечении 10 дней – на 0.4 отн. ед. (группа крыс с астмой № 2) ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$). К исходным значениям экспрессия генов IL-13R возвращалась на 17-й день (группа крыс с астмой № 3) ($m = 0.04$). Различия между препаратами бронхов с ганглиями и без них для групп крыс с астмой №1 и № 2 статистически значимы ($F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 5 и 6).

Группа экспериментальных животных с астмой, получавшая кромогликат натрия, продемонстрировала более низкие уровни экспрессии гена IL-13R по сравнению с группой крыс с астмой без обработки кромогликатом натрия. В препаратах бронхов с ганглиями у животных группы № 1, получавших кромогликат натрия, экспрессия гена *IL13R* была ниже на 0.2 отн. ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) по сравнению с группой крыс, не получавших кромогликат натрия. В группе животных № 2 это различие составляло 0.1 отн. ед. ($m = 0.04$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 7 и 8).

В препаратах без ганглиев разница между получавшими и не получавшими кромогликат животными по истечении первых трех суток составила 0.2 отн. ед. (группа № 1) ($m = 0.02$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$), по истечении 10 суток (группа № 2) – также 0.2 отн.ед. ($m = 0.03$; $F > F_{кр}$ при уровне значимости $\alpha = 0.05$) (рис. 9 и 10).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании была использована максимально выраженная и устойчивая модель астмы. Это связано с применяемой в исследовании методикой. Ингаляции овальбумином осуществляли в течение 30 мин, это определило возможность максимально равномерного оседания частиц овальбумина (исходя из принципа диффузии газа и размера частиц, растворенных в нем) на поверхности

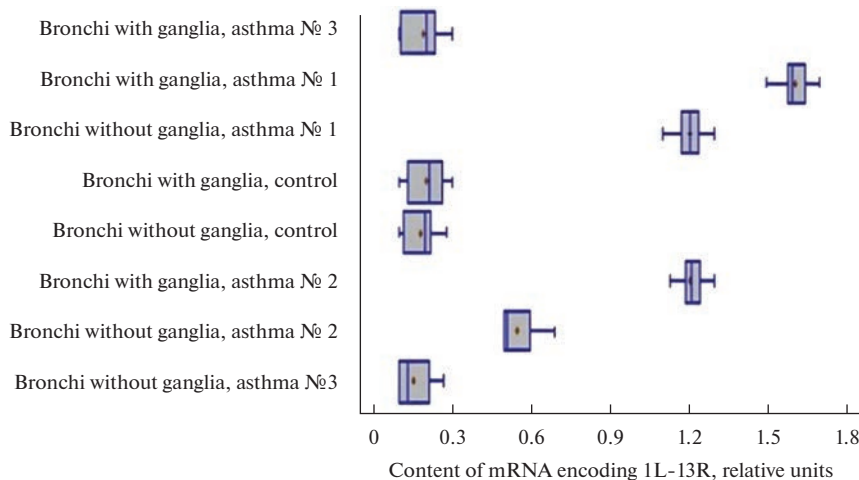


Рис. 6. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

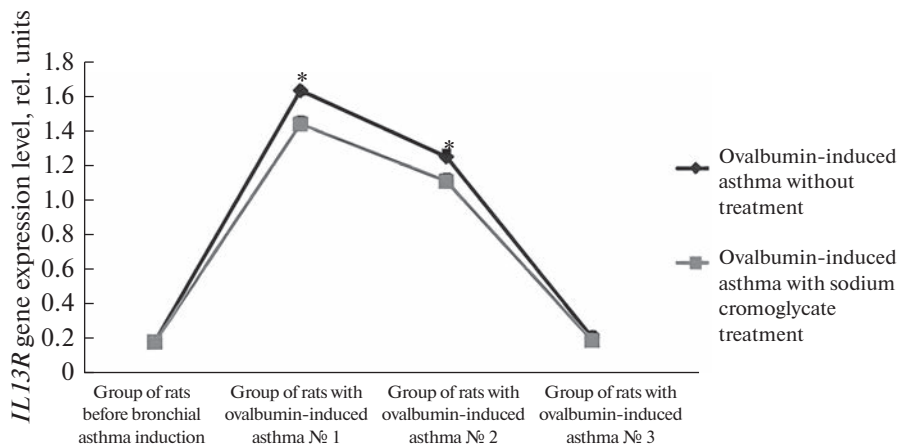


Рис. 7. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов с ганглиями контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после лечения кромогликатом натрия. * – статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между животными с астмой без лечения и животными с лечением кромогликатом натрия.

респираторного тракта. Продолжительность ингаляции по времени определила возможность равномерного распределения газовой смеси овальбумина по всему респираторному дереву. Также овальбумин дополнительно вводился подкожно и внутрибрюшинно, что является важным фактором, обуславливающим генерализацию аллергического процесса в организме. Для данного исследования важным было достижение именно максимально выраженной устойчивой аллергии. Поэтому

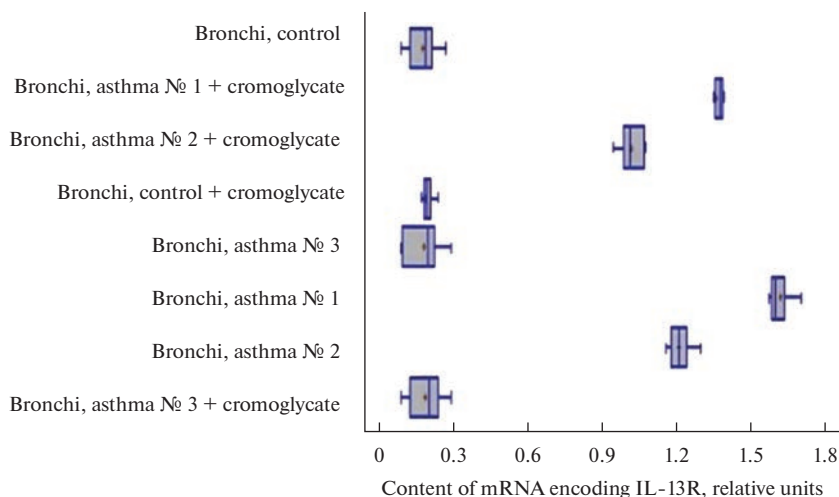


Рис. 8. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах с ганглиями контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после введения кромогликата натрия. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

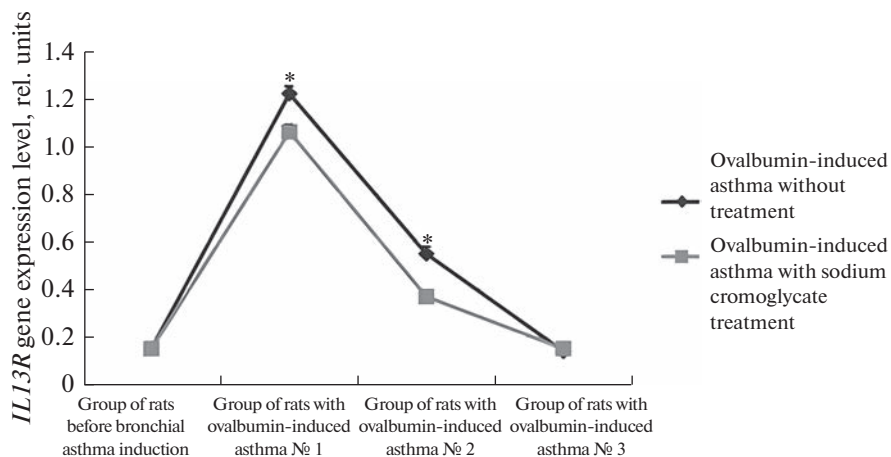


Рис. 9. Уровень экспрессии гена *IL13R* в препаратах бронхов без ганглиев контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после лечения кромогликатом натрия. * — статистически значимое отличие в уровне экспрессии гена *IL13R* между животными с астмой без лечения и животными с лечением кромогликатом натрия.

можно предположить, что максимально возможный эффект действия овальбумина был достигнут, а лабораторные условия по оседанию овальбумина были схожими для всех исследуемых образцов респираторного тракта. Таким образом, дальнейшее обсуждение экспрессии гена *IL13R* и количества клеток, содержащих рецептор IL-13R, будет рассмотрено для модели астмы, характеризующейся выраженными проявлениями.

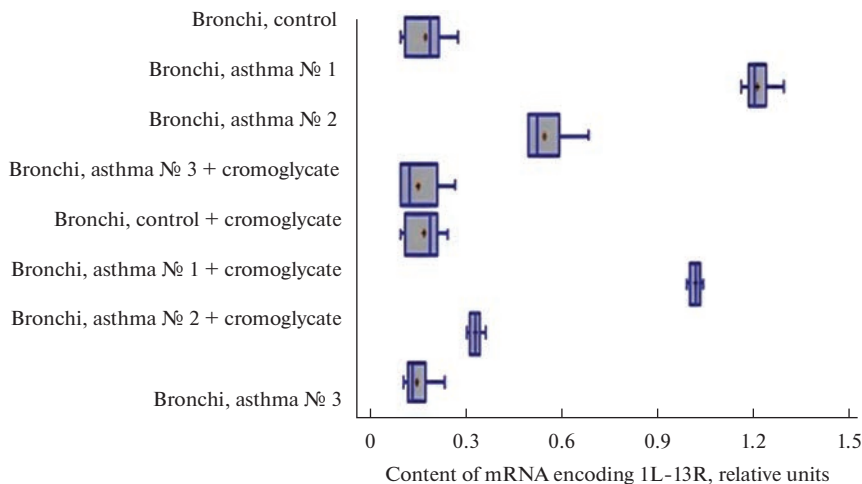


Рис. 10. Разброс данных, отражающих уровни экспрессии гена *IL13R* в бронхах без ганглиев контрольных крыс, крыс с астмой и крыс с астмой после введения кромогликата натрия. По оси абсцисс обозначено содержание мРНК, кодирующей IL-13R (в отн. ед.). По оси ординат обозначены препараты контрольной группы животных и группы животных с овальбумин-индуцированной астмой.

Экспрессия гена *IL13R* возрастала в препаратах бронхов крыс с овальбумин-индуцированной астмой по сравнению с контрольными животными. Максимальный уровень экспрессии был в препаратах с ганглиями группы животных № 1 (72 ч после последней ингаляции овальбумином). Затем экспрессия генов постепенно снижалась, и через 10 дней после последней ингаляции овальбумином содержание мРНК уменьшилось на 23.3% в препаратах бронхов с ганглиями и на 54.9% в препаратах бронхов без ганглиев.

Можно предположить, что присутствие интрамурального метасимпатического ганглия оказывает влияние на степень экспрессии гена *IL13R*. Это можно подтвердить данными Voshneg о способности влияния цитокина IL-13 на сенсорные нейроны [29], а так же способностью нейронов мыши и человека экспрессировать IL-13Ra1 и IL-4Ra [30].

Влияние ганглия прослеживается как на начальных этапах патогенеза аллергической астмы, так и на более поздних сроках (группа животных № 2, забор биоматериала 10 дней спустя последней ингаляции овальбумином). Полученные результаты можно объяснить участием нервных структур в нейрогенном воспалении в патогенезе астмы. Снижение экспрессии мРНК до значений, сопоставимых с контрольными, наблюдалось в группе животных № 3, у которых взятие биологического материала производилось на 17-й день после последней ингаляции овальбумином.

Воздействие кромогликатом натрия приводило к снижению экспрессии гена *IL13R*. По истечению 72 ч после последней ингаляции овальбумином в образцах бронхов с ганглиями, полученных от крыс, обработанных кромогликатом натрия, содержание мРНК снизилось на 11.7% по сравнению с аналогичными препаратами, полученными от крыс, не получавших кромогликат. В группе животных, у которых биологический материал брался по истечению 10 суток, также наблюдалась разница в экспрессии между препаратами. В препаратах крыс, получавших кромогликат натрия, уровень экспрессии был на 11.2% ниже, чем в бронхах крыс, не прошедших обработку кромогликатом.

В бронхах без ганглиев также наблюдался эффект кромогликата натрия. В группе крыс, эвтаназия которых производилась 72 ч спустя после последней ингаляции овальбумином, содержание мРНК на 13.1% было меньше, чем у тех крыс, которым вводили кромогликат натрия. В группе крыс, эвтаназия которых производилась спустя 10 суток после последней ингаляции овальбумином, воздействие кромогликата натрия приводило к снижению экспрессии исследуемого гена на 32.7%.

Таким образом, в бронхах с ганглиями и без них кромогликат натрия оказывал подавляющий эффект на экспрессию гена *IL13R*. Эффект препарата направлен на стабилизацию мембран тучных клеток и предотвращение тучно-клеточной дегрануляции с высвобождением медиаторов аллергии, лейкотриенов и цитокинов. Высвобождение этих веществ в организме индуцирует аллергическую реакцию в патогенез астмы и определяет один из основных ее этапов. IL-13 – один из высвобождаемых тучными клетками цитокинов, и вероятнее всего, появление его в тканях способствует индукции экспрессии адекватных ему рецепторов – IL-13R. Косвенно этот результат подтверждается работой Трулева и соавт. [31], которая свидетельствует о высвобождении IL-13 тучными клетками при их дегрануляции и роли тучно-клеточных продуктов в воспалении.

В нашем исследовании кромогликат натрия поступал в организм животных довольно поздно (после фактической индукции аллергии) по сравнению с рекомендациями по его применению (рекомендации предполагают стабилизацию мембран лаброцитов преимущественно до развития аллергической реакции). Тем не менее, даже при позднем введении кромогликата натрия в организм крыс, содержание мРНК в бронхах животных снижалось по сравнению с животными, не получавшими обработку тучно-клеточным стабилизатором (различие было статистически значимым). Такой результат может свидетельствовать о продолжительности тучно-клеточной дегрануляции на поздних этапах модели индуцирования аллергической астмы, а также о роли тучно-клеточных продуктов (в первую очередь IL-13) в индукции экспрессии генов IL-13R.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Все эксперименты были проведены в соответствии с правилами проведения лабораторных исследований (ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016”) [24]. Тема исследования была утверждена на заседании Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 46 от 23.09.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено на внебюджетные средства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Петрозаводский государственный университет”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Л.Е.Б., О.Е.С., В.М.К., сбор данных – О.Е.С., Л.Е.Б., обработка данных – Л.Е.Б., О.Е.С., В.М.К., написание и редактирование статьи – Л.Е.Б., О.Е.С., редактирование статьи – П.М.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nikolskii AA, Shilovskiy IP, Barvinskaia ED, Korneev AV, Sundukova MS, Khaitov MR* (2021) Role of STAT3 Transcription Factor in Pathogenesis of Bronchial Asthma. *Biochemistry (Mosc)* 86(11): 1489–1501.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110122>
2. *Duan W, Aguinaldo AM, Leung BP, Vlahos CJ, Wong WS* (2005) An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model. *Int Immunopharmacol J* 5: 495–502.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.10.015>
3. *Marone G, Granata F, Pucino V, Pecoraro A, Heffler E, Loffredo S, Scadding GW, Varricchi G* (2019) The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol* 10: 1387.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01387>
4. *Eum SY, Maghni K, Tolloczko B, Eidelman DH, Martin JG* (2005) IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. *Am Physiol Lung Cell Mol Physiol* J 288: 576–584.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00380.2003>
5. *Harb H, Chatila Talal A* (2019) Mechanisms of Dupilumab. *Clin Exp Allergy* 50(1): 5–14.
<https://doi.org/10.1111/cea.13491>
6. *Moran A, Pavord ID* (2020) Anti-IL-4/IL-13 for the treatment of asthma: the story so far. *Expert Opin Biol Ther* 20(3): 283–294.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1714027>
7. *Hammad H, Lambrecht BN* (2021) The basic immunology of asthma. *Cell Epub* 184(6): 1469–1485.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.016>
8. *Lentsch AB, Czermak BJ, Jordan JA, Ward PA* (1999) Regulation of acute lung injury by endogenous IL-13. *J Immunol* 162: 1071–1076. PMID: 9916735
9. *Amin K, Janson C, Boman G, Venge P* (2005) The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy J* 60: 1241–1247.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00823.x>
10. *Munitz A, Brandt EB, Mingle M, Finkelman FD, Rothenberg ME* (2008) Different roles of IL-13 and IL-4 via IL-13 alpha1 receptor and L-4 type II receptor in the pathogenesis of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7240–7245.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802465105>
11. *Hershey GK* (2003) IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 111: 677–690.
<https://doi.org/10.1067/mai.2003.1333>
12. *Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK* (2013) IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 54: 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.553>
13. *Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z* (2002) Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med* 8: 885–889.
<https://doi.org/10.1038/nm734>
14. *Cao H, Zhang J, Liu H, Wan L, Zhang H, Huang Q* (2016) IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7: 61183–61198.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11282>
15. *Wang IM, Lin H, Goldman SJ, Kobayashi M* (2004) STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types. *Mol Immunol* 41: 873–884.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.027>
16. *Pham TH, Bak Y, Oh JW, Hong J, Lee S, Hong JT* (2019) Inhibition of IL-13 and IL-13Ralpha2 Expression by IL-32theta in Human Monocytic Cells Requires PKCdelta and STAT3. *Assoc Int J Mol Sci* 20: 19–49.
<https://doi.org/10.3390/ijms20081949>
17. *Chen W, Sivaprasad U, Tabata Y, Gibson AM, Stier MT, Finkelman FD* (2009) IL-13R alpha 2 membrane and soluble isoforms differ in humans and mice. *J Immunol* 183: 7870–7876.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901028>

18. *Chen W, Sivaprasad U, Gibson AM, Ericksen MB, Cunningham CM, Bass SA* (2013) IL-13 receptor alpha2 contributes to development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 132: 951–958.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.016>
19. *Ingram JL, Kraft M* (2012) IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* 130: 829–842.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.034>
20. *Lupardus PJ, Birnbaum ME, Garcia KC* (2010) Molecular basis for hared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high ffinity complex between IL-13 and IL-13Ralpha2. *Structure* 18: 332–342.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.003>
21. *Kasaian MT, Raible D, Marquette K, Cook TA, Zhou S, Tan XY* (2011) IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13Ralpha2. *J Immunol* 187: 561–569.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100467>
22. *Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A* (2006) IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12: 99–106.
<https://doi.org/10.1038/nm1332>
23. *Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK* (2009) A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 69: 8678–8685.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2100>
24. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур от 01.07.2016. [GOST 33215-2014 Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures dated 01.07.2016. (In Russ)].
25. *Close B, Banister K, Baumans V, Warwick C* (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals. Part 2 DGXT of the Eur Commission Lab Animals *J* 31: 1–32.
<https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
26. *Masakazu Y, Osamu S, Kenji N, Tetsuji M, Koji S* (2006) Propofol Attenuates Ovalbumin-Induced Smooth Muscle Contraction of the Sensitized Rat Trachea: Inhibition of Serotonergic and Cholinergic Signaling. *Anesthesia & Analgesia J* 3: 594–600.
27. *Akin Yilmaz, Hacer Ilke Onen, Ebru Alp, Sevda Menevse* (2012) Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. *INTECH* 12: 229–254.
<https://doi.org/10.5772/37356>
28. *Masuda N, Mantani Y, Yoshitomi C, Yuasa H, Nishida M, Aral M, Kawano J, Yokoyama T, Hoshi N, Kitagawa H* (2018) Immunohistochemical study on the secretory host defense system with lysozyme and secretory phospholipase A2 throughout rat respiratory tract. *J Vet Med Sci* 80(2): 323–332.
<https://doi.org/10.1292/jvms.17-0503>
29. *Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, Schleimer RP* (1995) IL-13 selectively induces expression of the vascular cell adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *J Immunol* 154: 799–803.
30. *Oetjen LK, Mack MR, Feng J, Whelan TM, Niu H, Guo CJ* (2017) Sensory neurons co-opt classical immune signaling pathways to mediate chronic pruritus. *Cell* 171: 217–228.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.006>
31. *Трулев АС, Кудрявцев ИВ, Назаров ПГ* (2012) Факторы острой фазы воспаления как модуляторы взаимодействия тучных клеток и фибробластов. *Бюл ВСНЦ СО РАМН* 85(3): 319–322. [*Trulev AS, Kudryavisev IV, Nazarov PG* (2012) Factors of the acute phase of inflammation as modulators of the interaction between mast cells and fibroblasts. *Bull VSNC SO RAMS* 85(3): 319–322. (In Russ)].

Research of the Expression of IL-13 Receptors and IL-13R Genes in the Bronch of Rats with Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma

L. E. Blazhevich^{a, *}, O. E. Smirnova^a, V. M. Kirilina^a, and P. M. Maslyukov^b

^a*Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

^b*Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yaroslavl, Russia*

*e-mail: lyu15041988@yandex.ru

This article presents the results of studies of the levels of expression of the *IL13R* gene and the levels of expression of the molecular IL13R in the bronchi of control rats and rats with ovalbumin-induced asthma. The choice of these receptors is due to the great

importance of these structures in the pathogenesis of allergic bronchial asthma. Biological materials of 64 Wistar rats were studied using real-time PCR and immunohistochemical methods. As a result of the studies, it was found that under conditions of asthma development in the tissues of the bronchi of rats, a pronounced expression of the *IL13R* genes, a significant expression of the molecular receptor for interleukin-13, occurs. In bronchi with an intramural ganglion (bifurcation zone), the level of *IL13R* gene expression and the level of expression of the IL13R molecular receptor were significantly higher than in tracheal samples without ganglia. Sodium cromoglycate, administered to rats 5 hours after the last inhalation of ovalbumin, led to a decrease in the mRNA content in the bronchi of animals compared to animals that did not receive mast cell stabilizer treatment.

Keywords: interleukin-13, model of ovalbumin-induced bronchial asthma, intramural ganglion, sodium cromoglycate

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У КРЫС С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. И. Г. Шалагинова^{1, *}, О. П. Тучина¹, А. В. Туркин¹, А. Э. Вылегжанина¹,
А. Н. Нагуманова¹, Т. Г. Зачепило², М. Б. Павлова², Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shalaginova_i@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 14.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

Стресс играет важную роль в патогенезе тревожных и депрессивных расстройств. Нейровоспаление рассматривают как один из механизмов, с помощью которых стресс изменяет молекулярную и клеточную пластичность в нервной ткани, что приводит к нарушению функций ЦНС. Вклад генетически детерминированных особенностей нервной системы в развитие постстрессорного нейровоспаления изучен недостаточно. В данном исследовании оценена динамика постстрессорных изменений уровня мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов интерлейкина-1-бета (ИЛ-1β) и фактора некроза опухоли (ФНО) в крови и в головном мозге у двух линий крыс с высоким и низким порогом возбудимости нервной системы (ВП и НП). Изменения уровня мРНК ИЛ-1β и ФНО оценивали с помощью ПЦР в реальном времени через сутки, 7, 24 и 60 дней после длительного эмоционально-болевого стрессирования в крови и трех структурах мозга, вовлеченных в развитие постстрессорной патологии (префронтальная кора, гиппокамп, миндалина). У высоковозбудимых крыс линии НП уровень мРНК ИЛ-1β в гиппокампе и миндалине увеличился по сравнению с контролем через 24 дня после окончания стрессирования, у низковозбудимых животных линии ВП увеличение уровня мРНК ИЛ-1β обнаружено только в гиппокампе на том же сроке. Уровень мРНК ФНО не менялся ни у одной из линий ни в одной из временных точек после стресса. Генетически детерминированная возбудимость нервной системы является многообещающим маркером индивидуальной уязвимости к стрессу, проявляющейся в постстрессорных нарушениях, связанных с особенностями формирования и течения нейровоспаления.

Ключевые слова: нейровоспаление, провоспалительные цитокины, ИЛ-1β, ФНО, стресс, возбудимость нервной системы, постстрессорные расстройства, крысы

DOI: 10.31857/S0869813923040088, **EDN:** VJNHJJ

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность тревожных и депрессивных расстройств в мире колеблется от 3% до 18% по оценкам разных авторов [1, 2]. Эти показатели особенно возросли в последние два года из-за развития “постковидного синдрома” у пациентов, перенесших вирусную инфекцию COVID-19 [3].

Несмотря на социальную значимость и высокую распространенность этих расстройств, их нейробиологические механизмы в настоящее время до конца не изучены, поэтому доступные методы лечения не всегда эффективны. Одной из моделей для объяснения патогенеза данных психических расстройств является гипотеза “стресс–диатез”, где под диатезом понимают наличие биологической (генетической) уязвимости, которая может привести к проявлению заболевания под влиянием внешних стрессоров [4]. Однако точные механизмы того, каким образом стресс приводит к постстрессорным патологиям, не выяснены. В последние годы нейровоспаление рассматривают как один из таких механизмов, с помощью которых стрессорная реакция изменяет молекулярную, эпигенетическую и, в конечном счете, клеточную пластичность таким образом, что нарушаются функции ЦНС [5].

В крови умеренные концентрации глюкокортикоидов (ГК), эквивалентные обнаруживаемым в организме во время острой реакции на стресс, оказывают противовоспалительное действие, в то время как хронический стресс и высокие уровни ГК вызывают противовоспалительную реакцию. В центральной нервной системе хронический стресс и высокие уровни ГК, напротив, могут усиливать воспаление. Это проявляется как на клеточном уровне (активация микроглии, астроцитов), так и на уровне экспрессии медиаторов воспаления и активации факторов транскрипции [6, 7].

В последние годы все большее число исследований показало возможную вовлеченность постстрессорного воспаления в патогенез психических расстройств, таких как депрессия [8]. У пациентов с клинической депрессией было обнаружено увеличение количества лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в периферической крови и наблюдалось повышение уровней циркулирующих провоспалительных цитокинов и белков острой фазы [9]. Воспалительная реакция, наблюдаемая в крови, может затрагивать и ЦНС, приводя к активации микроглии и астроцитов в результате инфильтрации моноцитов или из-за проникновения провоспалительных молекул через поврежденный гематоэнцефалический барьер [10]. Медиаторы воспаления, выделяемые активированной микроглией и эндотелиальными клетками мозга, также могут подавлять нейротрансмиссию, способствовать окислительному стрессу и митохондриальным дисфункциям.

Вопросы о том, как нейро-иммунные дисфункции могут быть активированы в головном мозге в отсутствие явного воспаления или инфекции, и какие генетические факторы повышают риск развития постстрессорного нейровоспаления исследованы недостаточно.

Уровень возбудимости, являющийся ключевой характеристикой функционального состояния нервной системы, рассматривается как фактор риска развития постстрессорных расстройств [11]. В Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН в результате селекции были получены две линии крыс с разным уровнем возбудимости нервной системы [12]. Было показано, что линии различаются по своим поведенческим реакциям, молекулярным и клеточным изменениям в нервной ткани при развитии постстрессорных состояний. У крыс с низкой возбудимостью (высокий порог, линия ВП) в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие наблюдаются отставленные депрессивно-подобные поведенческие симптомы, в то время как у крыс с высокой возбудимостью (низкий порог, линия НП) наряду с депрессивно-подобными, развиваются компульсивные симптомы [13].

Ранее мы показали, что уровень возбудимости нервной системы влияет также на степень проявления и динамику постстрессорного воспаления как в крови, так и в головном мозге в ответ на длительный эмоционально-болевого стресс. У высоко-возбудимых животных увеличивается соотношение нейтрофилов/лейкоцитов и число клеток микроглии в гиппокампе по сравнению с контролем [13]. Необходимо уточнить молекулярные механизмы нейровоспаления на уровне экспрессии ге-

нов *il1 β* и *tnf* основных провоспалительных цитокинов интерлейкина-1-бета (ИЛ-1 β) и фактора некроза опухоли (ФНО).

Цель данной работы заключалась в оценке уровня мРНК генов *il1 β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО в крови и в головном мозге (в префронтальной коре, гиппокампе и миндалине, — структурах, вовлеченных в развитие постстрессорной патологии) у крыс двух линий, различающихся по уровню возбудимости нервной системы, в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 5-месячных взрослых самцах крыс двух линий с контрастным (4-кратные различия) уровнем возбудимости периферической и центральной нервной системы [11, 14]. Животные селектированы в течение 80 поколений по величине порога возбудимости большеберцового нерва (*n. tibialis*) к электрическому току. Линии с высоким порогом (ВП, низкая возбудимость) и низким порогом (НП, высокая возбудимость) включены в Биокolleкцию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ ГЗ 0134-2018-0003), патенты на селекционное достижение № 10769 и 10768 выданы Государственной комиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений, зарегистрированы в Государственном реестре охраняемых селекционных достижений 15 января 2020 г. (Патентообладатель: ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН).

Все животные содержались в стандартных условиях в виварии лаборатории генетики ВНД Института физиологии им. Павлова РАН. Экспериментальные животные подвергались длительному эмоционально-болевному стрессовому воздействию в соответствии со схемой К. Гехта [Hecht et al., 1972, цит. по: 12]: каждый день в течение 15 дней животные подвергались воздействию 6 неподкрепляемых (по 10 с каждое) и 6 подкрепляемых током (2.5 мА, 2 мс) световых сигналов. Согласно схеме, комбинации условных и безусловных раздражителей не повторялись, а чередовались с вероятностью 0.5, что не позволяло животным выработать условный рефлекс. В качестве контрольных использовали животных обеих исследуемых линий, не подвергавшихся процедуре стрессорного воздействия. Контрольные животные были декапитированы в те же временные сроки, что и экспериментальные.

После декапитации экспериментальных и контрольных животных кровь от каждого животного собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА — этилендиаминтетраацетат), извлекали мозг и проводили диссекцию исследуемых структур мозга (префронтальная кора, гиппокамп и миндалина) через 24 ч, 7, 24 и 60 дней после окончания стрессового воздействия. Экспериментальные группы в каждой временной точке включали по 6 животных каждой линии. Объединенная контрольная группа линии ВП (контрольные крысы — по 4–6 животных в каждой из 4 временных точек) включала 19 животных, линии НП — 22. Общее количество животных составило 89.

Выделенный биоматериал немедленно помещали в пробирки, содержащие 500 мкл реагента для экстракции суммарной РНК (ExtractRNA, Евроген, Россия). Выделение РНК проводили в соответствии с инструкциями производителя. После этапа выделения суммарной РНК проводили измерения концентрации экстрагированной РНК для каждого отдельного образца методом спектрофотометрии (NanoDrop IMPLen). Для обратной транскрипции использовали набор реагентов MMLV RT kit (Евроген, Россия). После обратной транскрипции реакционную смесь разбавляли деионизированной водой (5 мкл кДНК: 95 мкл воды).

Таблица 1. Праймеры к участкам генов

Ген	Последовательность праймеров	Длина праймера (пн)	Длина продукта (пн)
<i>il1β</i>	Прямой: 5'- GCAATGGTTCGGGACATAGTT-3'	20	242
	Обратный: 5'- GTAAGTGGTTGCCTGTCAGAG-3'	21	
<i>tnf</i>	Прямой: 5'- GAACAGCAACTCCAGAACA -3'	19	243
	Обратный: 5'- CACGAGCAGGAATGAGAAG-3'	19	
<i>gapdh</i>	Прямой: 5'-GTTTGTGATGGGTGTGAACC-3'	20	170
	Обратный: 5'-TCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'	20	

Относительное количество мРНК для генов *il1β* и *tnf* оценивали с помощью ПЦР в реальном времени на приборе Bio Rad CFX96 (Bio Rad, США) с использованием смеси qPCRMix HS SYBR (Евроген, Россия). В качестве референсного использовали ген *gapdh*. Изменения в уровне мРНК оценивали методом $\Delta\Delta C_t$, основанном на анализе экспрессии целевого гена по отношению к референсному.

В табл. 1 указаны ген-специфические праймеры для генов *il1β*, *tnf* и *gapdh*, подобранные с помощью литературы и проверенные в базе NCBI (BLAST primer).

Для проверки специфичности полученных продуктов амплификации производили анализ кривых плавления продуктов реакции.

Статистические методы

Для статистического анализа использовали программное обеспечение Prism 7. Нормальность распределения оценивали с применением критерия Шапиро–Уилка. Значимость межлинейных различий в уровне мРНК генов интереса у интактных животных оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. При сравнении контрольных и экспериментальных групп применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с post hoc тестом Манна–Уитни, использовали поправку на множественность сравнений FDR (false discovery rate).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов в крови интактных животных показывает значимо более высокий уровень мРНК гена *il1β* у высоковозбудимых животных НП по сравнению с низковоозбудимыми ВП, различия в уровне мРНК гена *tnf* не обнаружено (рис. 1).

Далее сравнение уровня мРНК в каждой структуре мозга в каждом временном сроке после стрессового воздействия проводили по отношению к объединенному контролю, так как контрольные животные, декапитированные в разные сроки не отличались по изучаемому параметру (тест Краскела–Уоллиса).

Анализ постстрессорных изменений в крови показал значимое снижение уровня мРНК гена *il1β* через 24 ч после окончания стрессорного воздействия и только у высоковозбудимых животных линии НП (рис. 2). Во всех остальных временных точках влияния стресса на уровень мРНК исследуемых провоспалительных цитокинов не обнаружено ни у одной из линий животных.

Сравнение уровня мРНК исследованных генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в трех структурах мозга у интактных животных двух линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы представлено на рис. 3.

Межлинейные различия в уровне мРНК ФНО выявлены в префронтальной коре и миндалине крыс с различной возбудимостью нервной системы. Высоковоозбудимые крысы линии НП имеют повышенный уровень экспрессии гена *tnf* по сравне-

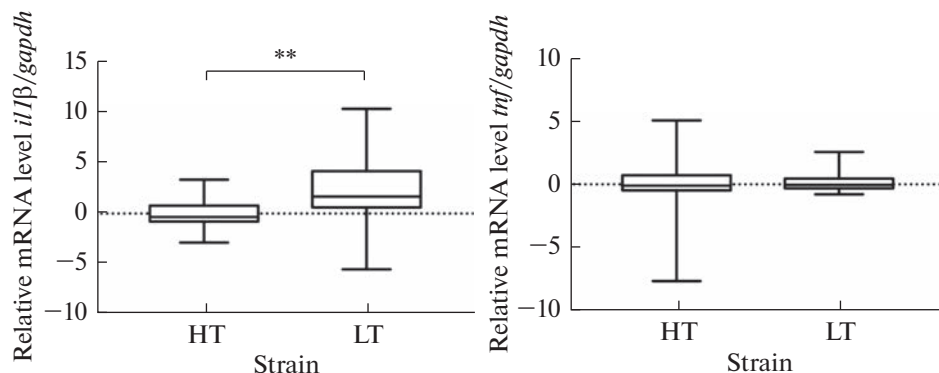


Рис. 1. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в крови интактных крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы. HT (high threshold, low excitable) – линия ВП (высокий порог, низкая возбудимость) ($n = 22$), LT (low threshold, high-excitability) – линия НП (низкий порог, высокая возбудимость) ($n = 19$) $**p < 0.01$ (критерий Манна–Уитни), по вертикальной оси показано относительное значение изменения уровня мРНК ($-\Delta\Delta C_t$), графики представляют медианы, границы квартилей, а также максимальные и минимальные значения анализируемых данных.

нию с низковозбудимыми крысами линии ВП в префронтальной коре, тогда как в миндалине, напротив, у высоковозбудимых животных линии НП уровень мРНК ФНО значимо ниже, чем у низковозбудимых линии ВП.

Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в гиппокампе крыс линий ВП и НП показал отсутствие статистически значимых различий.

Постстрессорные изменения в уровне экспрессии генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в мозге крыс с контрастным уровнем возбудимости нервной системы показаны на рис. 4–6.

В префронтальной коре значимых постстрессорных изменений уровня мРНК исследуемых цитокинов не обнаружено ни у одной из линий (рис. 4).

В гиппокампе через 1 и 7 дней после стресса не было обнаружено значимых различий в уровнях мРНК цитокинов по сравнению с контролем ни у одной из линий животных. Через 24 дня после стрессового воздействия уровень мРНК гена *il1β* в гиппокампе значимо повысился в экспериментальных группах по сравнению с контрольными у обеих линий, независимо от уровня возбудимости нервной системы крыс, однако к 60-му дню после стресса уровень мРНК гена *il1β* не отличался от контроля (рис. 5). Значимых постстрессорных изменений в экспрессии гена *tnf* у экспериментальных животных обеих линий по сравнению с контролем не наблюдали ни в одной временной точке.

У высоковозбудимых крыс линии НП стресс приводил к увеличению экспрессии гена *il1β* через 24 дня после окончания стрессового воздействия (рис. 6). У низковозбудимых животных линии ВП постстрессорных изменений уровня мРНК исследуемых цитокинов в миндалине не наблюдали ни в одной временной точке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании выявлены межлинейные различия в уровнях мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО у интактных крыс линий с контрастной возбудимостью нервной системы. Более высокий уровень экспрессии гена *il1β* был обнаружен в крови высоковозбудимых крыс линии НП по сравнению с низко-

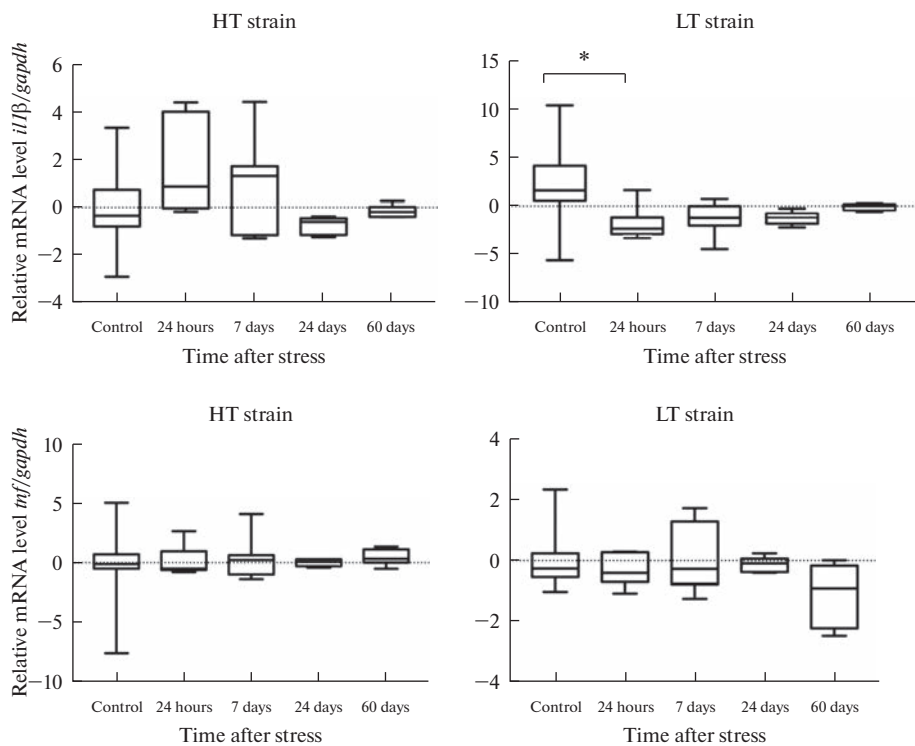


Рис. 2. Уровень мРНК генов *il1β* и *inf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в крови крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. Здесь и далее: HT strain (high threshold, low excitable – линия ВП – высокий порог, низкая возбудимость ($n = 22$ в контроле и $n = 6$ в экспериментальных группах в каждой временной точке), LT strain (low threshold, high excitable – линия НП – низкий порог, высокая возбудимость ($n = 18$ в контроле и $n = 6$ в экспериментальных группах в каждой временной точке), по вертикальной оси показано относительное значение изменения уровня мРНК ($-\Delta\Delta Ct$), графики представляют медианы, границы квартилей, а также максимальные и минимальные значения анализируемых данных (критерий Краскела–Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна–Уитни, поправка FDR); $*p < 0.05$.

возбудимыми крысами линии ВП. Это согласуется с нашими предшествующими данными о том, что у высоковозбудимых крыс развиваются признаки воспаления в крови в ответ на хронический стресс, что проявляется изменением лейкоцитарной формулы [13].

Мы не обнаружили влияния стресса на экспрессию генов изучаемых цитокинов в крови низковозбудимых крыс линии ВП ни сразу, ни в отдаленные сроки после окончания стрессирования. При этом у высоковозбудимых крыс линии НП значимое снижение уровня мРНК гена *il1β* в крови было выявлено через 24 ч после окончания стрессирования по сравнению с контролем. Последнее согласуется с данными о том, что длительный стресс вызывает противовоспалительную реакцию в периферической крови [7].

Известно, что связывание глюкокортикоидов (ГК) с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) приводит к изменениям транскрипции нескольких генов, ответственных за противовоспалительный эффект глюкокортикоидов. Было показано,

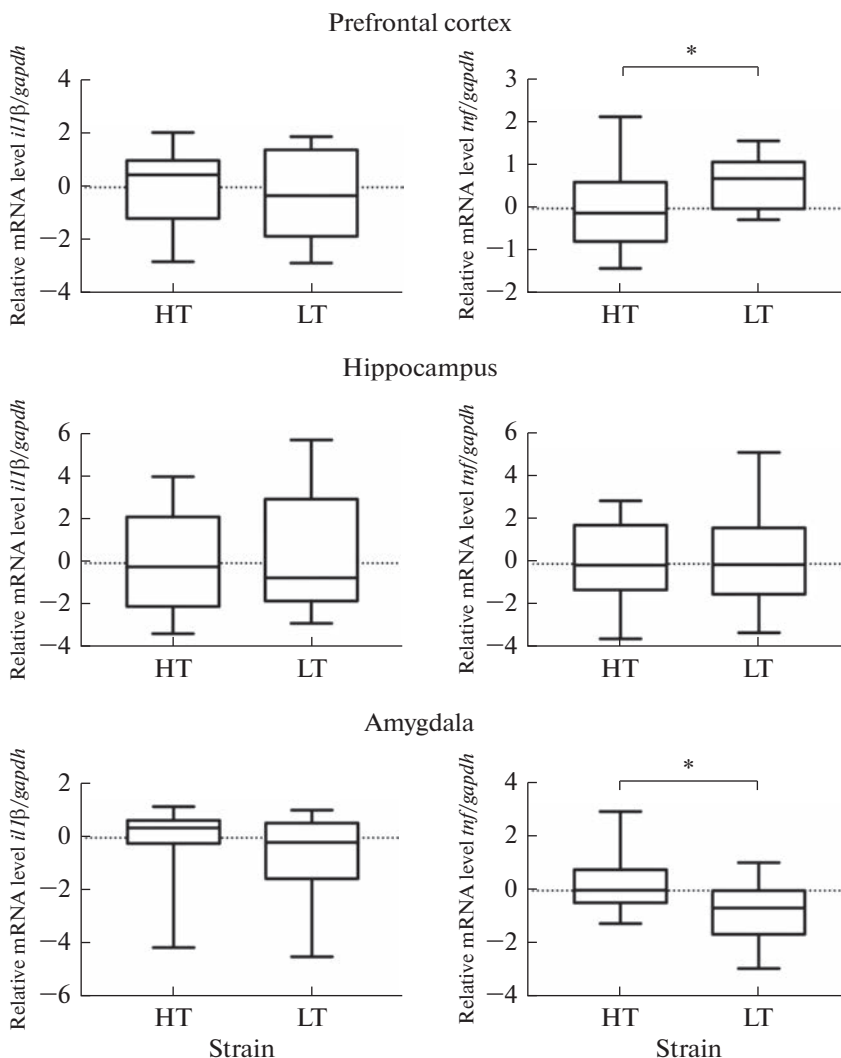


Рис. 3. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО в префронтальной коре, гиппокампе и миндалине intactных крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы. * $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

что противовоспалительный эффект комплекса ГК–ГР связан с репрессией таких факторов транскрипции, как NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), активирующий белок-1 (activating protein-1, AP1) и регуляторный фактор интерферона 3 (Interferon Regulatory Factor 3, IRF3) [6]. Подавление транскрипционной активности этих генов подавляет экспрессию провоспалительных молекул.

Действие гормонов ГК в головном мозге и на периферии неодинаково. Несмотря на то, что противовоспалительный эффект ГК в головном мозге неоднократно демонстрировался, имеются данные, показывающие, что в некоторых случаях ГК, напротив, усиливают воспаление в ЦНС [7].

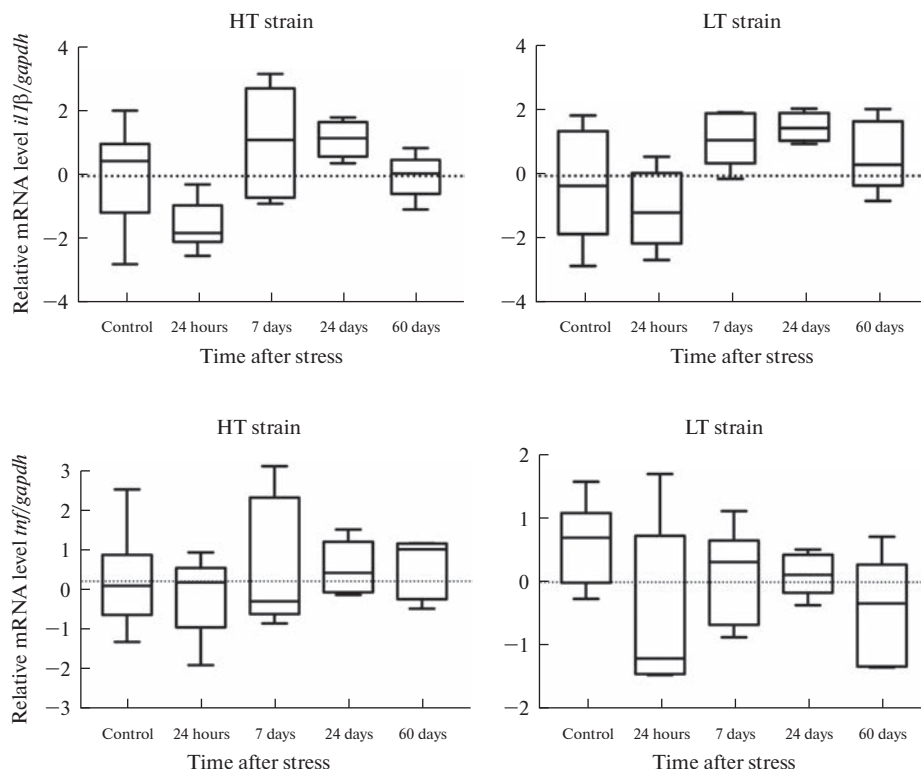


Рис. 4. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в префронтальной коре крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (критерий Краскела–Уоллиса, *post-hoc* анализ критерий Манна–Уитни, поправка FDR).

Длительный или очень интенсивный стресс и, соответственно, высокий уровень ГК, усиливают проявления воспаления в центральной нервной системе. Хроническое введение кортикостероидов в высоких дозах усиливает воспаление в гиппокампе животных [14]. Известно, что хронический стресс или повышенная циркуляция ГК оказывает провоспалительное действие и увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в префронтальной коре [14]. Существуют также доказательства того, что длительный стресс повышает уровни ИЛ-1β и ФНО и iNOS не только на уровне экспрессии генов, но и на уровне белка, как было продемонстрировано в гиппокампе и коре головного мозга грызунов [14, 16].

Проведенный нами анализ уровня мРНК провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в мозге животных с различным уровнем возбудимости нервной системы показал временную и региональную гетерогенность постстрессорных изменений. Мы не обнаружили различий в уровнях мРНК цитокинов в гиппокампе крыс двух линий на ранних сроках после стресса. Однако через 24 дня после окончания стрессового воздействия уровень мРНК ИЛ-1β в гиппокампе увеличился у экспериментальных животных обеих линий по сравнению с соответствующими контрольными группами. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что в центральной нервной системе, в отличие от периферии, высокие дозы ГК или длительный стресс приводят к повышенной выра-

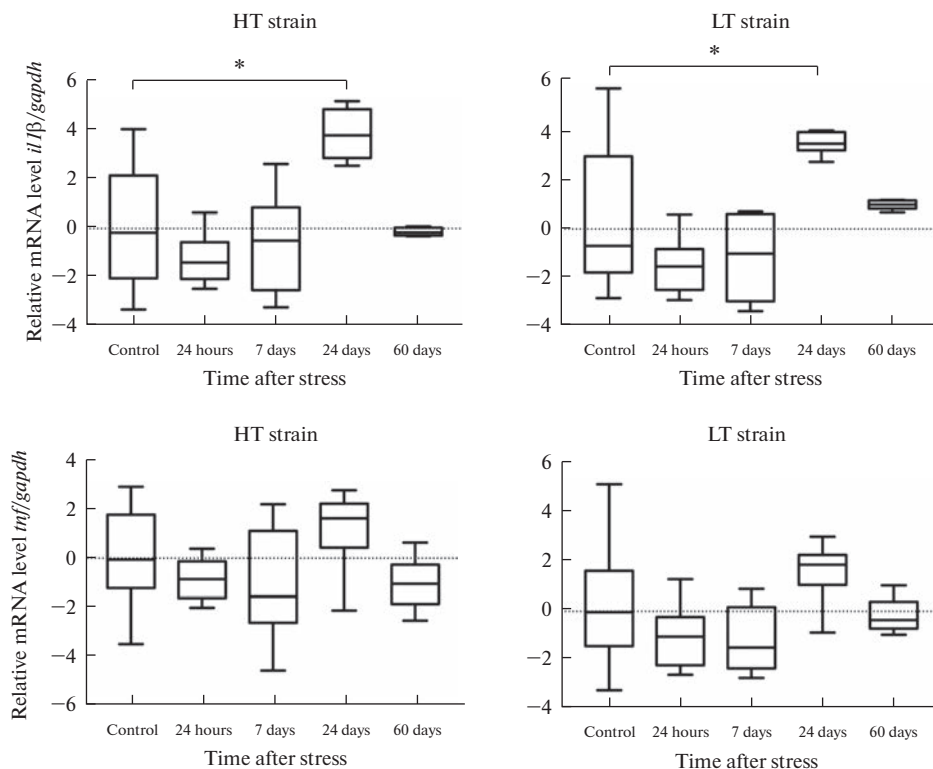


Рис. 5. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНО в гиппокампе крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (критерий Краскела–Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна–Уитни, поправка FDR), * $p < 0.05$.

ботке медиаторов воспаления и активации микроглии [7, 17]. Ранее нами показано [13], что увеличение количества клеток микроглии наблюдается через 7 дней после стресса в зубчатой извилине (DG), CA1 и CA3 полях гиппокампа у животных линии НП, и в поле CA1 у крыс линии ВП, что не совпадает по времени с увеличением уровня экспрессии гена *il1β* в данной работе, которое происходит только на 24-й день, на фоне нормализации количества клеток микроглии. Активация и пролиферация микроглии и трафик моноцитов из крови в мозг, являясь основными источниками ИЛ-1β и ФНО, происходят с некоторым латентным периодом. С этим может быть связана описанная выше задержка. С другой стороны, возможно на сроке 7 дней, несмотря на увеличение количества микроглии в гиппокампе, адаптивные механизмы позволяют сдерживать экспрессию провоспалительных цитокинов и тормозить развитие нейровоспаления через экспрессию микроРНК, регулирующих воспаление, и/или через экспрессию противовоспалительных цитокинов, например, ИЛ-10, который может стимулировать синтез антагониста ИЛ-1β (IL-1Ra). Для детального прояснения данного вопроса необходимо изучение постстрессорных изменений не только про-, но и противовоспалительных сигналов.

В других изученных областях мозга мы наблюдали линейные особенности в экспрессии генов цитокинов. Различия были обнаружены в префронтальной коре интактных крыс: высоковозбудимые животные имеют значимо более высокий уро-

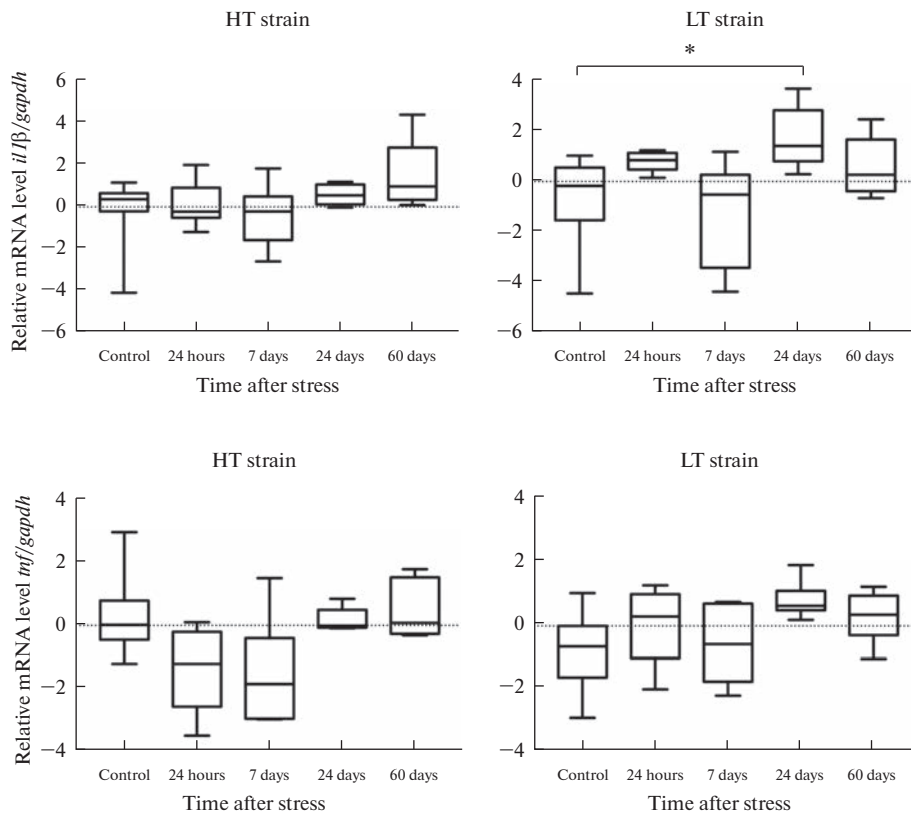


Рис. 6. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО в миндалине крыс линий ВП и НП с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (критерий Краскела–Воллиса, post-hoc анализ критерий Манна–Уитни, поправка FDR), * $p < 0.05$.

вень мРНК ФНО по сравнению с низковозбудимыми. В то же время в миндалине у крыс с высокой возбудимостью обнаружен более низкий уровень мРНК этого цитокина по сравнению с альтернативной линией. Известно, что ФНО, секретируемый в головном мозге глиальными клетками, участвует в регуляции экспрессии AMPA-рецепторов в нейронах гиппокампа и коры головного мозга. В культуре и на срезах гиппокампа было показано, что ФНО увеличивает количество AMPA-рецепторов на синаптической мембране [18]. Естественно, такое увеличение количества глутаматных рецепторов приводит к быстрым изменениям возбудимости и синаптической пластичности. ФНО также приводит к усилению эндоцитоза ГАМК-рецепторов, что приводит к снижению тормозных сигналов и также может влиять на возбудимость [19]. Эффекты, описанные выше, действительны для гиппокампа и кортикальных нейронов. Нейроны полосатого тела, напротив, демонстрируют интернализацию AMPA-рецепторов [19] в ответ на ФНО. Стереотаксические инъекции ФНО в миндалину крыс нарушают процессы запоминания страха, вероятно, действуя через NMDA-рецепторы [20].

Таким образом, в литературе описаны региональные различия в воздействии цитокинов на одни и те же физиологические процессы, и, возможно, что действие ФНО в префронтальной коре приводит к повышению возбудимости нейронов, а в

миндалине, напротив, к снижению возбудимости. В этом случае можно сформулировать гипотезу о том, что конститутивно более высокий уровень ФНО в коре и более низкий уровень в миндалине у животных линии НП по сравнению с ВП способствует более высокой возбудимости первых. Экспериментальная проверка этой гипотезы представляется многообещающей в связи с тем, что ранее у крыс высоко-возбудимой линии НП была обнаружена более высокая фоновая импульсация нейронов миндалины по сравнению с ВП [21].

В миндалине в ответ на стресс мы наблюдали повышенный по сравнению с контролем уровень мРНК ИЛ-1 β только у высоковозбудимых животных линии НП через 24 дня после стресса. В префронтальной коре значимых изменений уровня мРНК исследованных провоспалительных цитокинов в ответ на стресс не обнаружили ни у одной из линий.

Имеется информация о специфической экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов у двух линий крыс, различающихся по уровню агрессивности. В ответ на введение липополисахарида (ЛПС) у агрессивных крыс наблюдали повышенные уровни ИЛ-1 β в гипоталамусе и лобной коре по сравнению с неагрессивными крысами. В гиппокампе уровни ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-6 были ниже у агрессивных крыс, подвергшихся действию ЛПС, чем у неагрессивных животных [22]. Таким образом, генетически детерминированные индивидуальные различия могут быть связаны с региональными изменениями уровня экспрессии провоспалительных цитокинов и их временной изменчивостью.

Кроме того, известно, что в разных областях мозга проницаемость гематоэнцефалического барьера различается в зависимости от свойств эндотелиальных клеток сосудов мозга и клеточной гетерогенности в паренхиме головного мозга [23]. Поскольку стресс влияет на проникновение моноцитов из крови в мозг, этот процесс может в разной степени затрагивать различные области мозга.

Таким образом, результаты выполненного исследования позволили заключить:

1. В нормальных условиях уровень мРНК ИЛ-1 β в крови и ФНО в префронтальной коре выше у высоковозбудимых крыс линии НП по сравнению с низковозбудимыми крысами линии ВП. В миндалине, напротив, уровень мРНК ФНО крыс линии ВП превосходит таковой линии НП. Выявленные линейные особенности экспрессии генов провоспалительных цитокинов могут вносить вклад в детерминацию уровня возбудимости нервной системы и влиять на предрасположенность крыс к развитию нейровоспаления, в том числе и под действием стресса.

2. Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к специфическим изменениям экспрессии гена *il1 β* , но не *tnf* у каждой из исследуемых линий крыс. Генетически детерминированные особенности крыс с высоким уровнем возбудимости нервной системы могут повышать риск развития постстрессорных нейровоспалительных реакций за счет увеличения уровня мРНК провоспалительного ИЛ-1 β в гиппокампе и миндалине.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протокол 09/16 от 16.09.21 был одобрен Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование было поддержано из средств программы стратегического академического лидерства “Приоритет 2030” БФУ им. И. Канта и Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Г.Ш., Н.А.Д., О.П.Т.), сбор биологических материалов (И.Г.Ш., Т.Г.З., М.В.П.), проведение эксперимента (И.Г.Ш., А.Э.В., А.Н.Н., А.В.Т.) обработка данных (И.Г.Ш., А.В.Т., А.Э.В., А.Н.Н.), написание и редактирование манускрипта (И.Г.Ш., О.П.Т., Н.А.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Simpson HB, Neria Y, Lewis-Fernández R, Schneier F* (2010) Anxiety disorders: Theory, research and clinical perspectives. Cambridge University Press.
2. *Котова ОВ, Беллев АА, Акарачкова ЕС* (2021) Современные методы диагностики и лечения тревожных и депрессивных расстройств. РМЖ Мед обзор 5(10): 648–653. [*Kotova OV, Belyaev AA, Akarachkova EU* (2021) Modern methods of diagnosis and treatment of anxiety and depressive disorders. Breast cancer. Med obozr 5(10):648–653. (In Russ)]. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-10-648-653>
3. *Boldrini M, Canoll PD, Klein RS* (2021) How COVID-19 affects the brain. JAMA Psychiatry 78(6): 682–683.
4. *Baharikhooob P, Kolla NJ* (2020) Microglial dysregulation and suicidality: a stress-diathesis perspective. Front Psychiatry 11: 781.
5. *DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP* (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. J Neurochem 139: 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
6. *Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C* (2013) New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. Endocrinology 154(3): 993–1007. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2045>
7. *Sorrells SF, Sapolsky RM* (2007) An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. Brain Behav Immun 21(3): 259–272. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2006.11.006>
8. *Miller AH, Raison CL* (2016) The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. Nature Rev Immunol 16(1): 22–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
9. *Toben C, Baune BT* (2018) The Roles of T Cells in Clinical Depression. In Inflammation and Depression (pp. 115–133). Acad Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811073-7.00007-6>.
10. *Wohleb ES, Delpach JC* (2017) Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 79: 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.04.013>
11. *Binder MR* (2021) Neuronal hyperexcitability: significance, cause, and diversity of clinical expression. Am J Clin Exp Med 9(5): 157–167. <https://doi.org/10.11648/j.ajcem.20210905.16>
12. *Вайдо АИ, Ширяева НВ, Павлова МБ, Левина АС, Хлебаева ДА, Любашина ОА, Дюжикова НА* (2018) Селектированные линии крыс с высоким и низким порогом возбудимости: модель для изучения дезадаптивных состояний, зависящих от уровня возбудимости нервной системы. Лаб жив научн исслед (3): 12–22. [*Vaido A, Shiryaeva N, Pavlova M, Levina A, Khlebaeva D, Lyubashina O, Dyuzhikova NA* (2018) Selected rat strains HT, LT as a model for the study of dysadaptation states dependent on the level of excitability of the nervous system. Laboratory Anim Sci 205. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29296/2618723x-2018-03-02>
13. *Shalaginova IG, Tuchina OP, Sidorova MV, Levina AS, Khlebaeva DA, Vaido AI, Dyuzhikova NA* (2021) Effects of psychogenic stress on some peripheral and central inflammatory markers in rats with the different level of excitability of the nervous system. PloS One 16(7):e0255380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255380>

14. *Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM* (2003) Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J Neurochem* 84(4): 705–716.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01604.x>
15. *De Pablos RM, Villaran RF, Argüelles S, Herrera AJ, Venero JL, Ayala A, Machado A.* (2006) Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 26(21):5709–5719.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0802-06.2006>
16. *Munhoz, CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, de Sá Lima L, Avellar MC, Scavone C* (2006) Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* 26(14): 3813–3820.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4398-05.2006>
17. *Dantzer R* (2018) Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiol Rev* 98(1): 477–504.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>
18. *Beattie E C, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC* (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295(5563): 2282–2285.
<https://doi.org/10.1126/science.1067859>
19. *Lewitus GM, Pribrag H, Duseja R, St-Hilaire M, Stellwagen D* (2014). An adaptive role of TNF α in the regulation of striatal synapses. *J Neurosci* 34(18): 6146–6155.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3481-13.2014>
20. *Jing H, Hao Y, Bi Q, Zhang J, Yang P* (2015) Intra-amygdala microinjection of TNF- α impairs the auditory fear conditioning of rats via glutamate toxicity. *Neurosci Res* 91: 34–40.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.015>
21. *Sivachenko IB, Pavlova MB, Vaido AI, Shiryayeva NV, Panteleev SS, Dyuzhikova NA, Lyubashina OA* (2021) Spike activity and genome instability in neurons of the amygdaloid complex in rats of selected strains with contrasting nervous system arousability in normal conditions and stress. *Neurosci Behav Physiol* 51(5): 620–628.
22. *Альперина ЕЛ, Жукова ЕН* (2019) Содержание цитокинов в структурах мозга крыс с различным уровнем генетически обусловленной агрессии. *Мед академ журн* 19(S): 9–10. [*Alperina EL, Zhukova EN* (2019) Cytokine content within brain structures in rats with genetic predisposition to different levels of aggression. *Med Acad J* 19(1S): 9–10. (In Russ)].
23. *Noumbissi ME, Galasso B, Stins MF* (2018) Brain vascular heterogeneity: implications for disease pathogenesis and design of in vitro blood–brain barrier models. *Fluids Barr CNS* 15(1): 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12987-018-0097-2>

The Effect of Prolonged Emotional and Painful Stress on the Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in Rats with High and Low Excitability of the Nervous System

**I. G. Shalaginova^{a, *}, O. P. Tuchina^a, A. V. Turkin^a, A. E. Vylegzhanina^a,
A. N. Nagumanova^a, T. G. Zachepilo^b, M. B. Pavlova^b, and N. A. Dyuzhikova^b**

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

^b*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

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

Stress plays an important role in the pathogenesis of anxiety and depressive disorders. Neuroinflammation is considered as one of the mechanisms by which stress alters the molecular and cellular plasticity in the nervous tissue, which leads to a violation of the functions of the central nervous system. The contribution of genetically determined features of the nervous system to the development of post-stress neuroinflammation has not been sufficiently studied. In this study, the dynamics of poststress changes in the mRNA levels of the *il1 β* and *tnf* genes of proinflammatory cytokines interleukin-1-beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF) in the blood and in the brain in two rat strains with high and low excitability thresholds of the nervous system (HT and LT) was evaluated. Changes in IL-1 β and TNF mRNA levels were assessed by real-time PCR 24 h, 7, 24 and 60 days after prolonged emotional and painful stress in the blood and three brain structures involved in the development of post-stress pathology (prefrontal cortex, hip-

poecampus, amygdala). In highly excitable rats of the LT strain, the level of IL-1 β mRNA in the hippocampus and amygdala increased compared to the control 24 days after the end of stress, in low-excitable animals of the HT strain, an increase in the level of IL-1 β mRNA was detected only in the hippocampus at the same time. The TNF mRNA level did not change in any of the strains at any of the time points after stress. Genetically determined excitability of the nervous system is a promising marker of individual vulnerability to stress, manifested in post-stress disorders associated with the characteristics of the formation and dynamics of neuroinflammation.

Keywords: neuroinflammation, proinflammatory cytokines, IL-1 β , *tnf*, stress, excitability of the nervous system, post-stress disorders, rats