

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 5

май

2023



СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные статьи

Сосудистые эффекты перинатальной гипоксии в раннем постнатальном периоде у крыс

*А. А. Швецова, Д. Д. Хухарева, С. Д. Симоненко, М. А. Хлыстова,
А. А. Борzych, Д. К. Гайнуллина* 561

Экспрессия молекул Tim-3 и CD9 на натуральных киллерах (NK) и Т-лимфоцитах с функциями NK (NKT) периферической крови в разные сроки физиологической беременности

Е. Г. Орлова, О. А. Логинова, О. Л. Горбунова, Н. В. Каримова, С. В. Ширшев 572

Влияние травмы спинного мозга на P2-сигнализацию в холинергическом синапсе

*А. Е. Хайруллин, Д. В. Ефимова, А. А. Еремеев, Д. Э. Сабирова,
С. Н. Гришин, А. У. Зиганшин* 588

Изменение сверхмедленных колебаний потенциалов мозга под влиянием БОС-тренинга по сверхмедленным частотам ЭЭГ

В. А. Гринь-Яценко, В. А. Пономарев, Ю. Д. Кропотов 600

Двигательные синергии в системе управления сложными спортивными равновесиями

С. А. Моисеев, Е. А. Михайлова 612

Восстановление функциональной активности K_{ATP} -каналов пиальных артерий после ишемии/реперфузии с помощью клеточной терапии

И. Б. Соколова, О. П. Горшкова 629

Влияние блокаторов кальциевых каналов Т- и L-типа на микрогемодинамику легких при экспериментальной тромбоэмболии легочной артерии у кроликов

В. И. Евлахов, И. З. Поясов, Т. П. Березина 643

Влияние вида вскармливания на таксономический состав кишечного микробиома и уровни трефилловых факторов у детей и подростков

*А. В. Шестопалов, И. М. Колесникова, Д. В. Савчук, Е. Д. Теплякова,
В. А. Шин, Т. В. Григорьева, Ю. Л. Набока, А. М. Гапонов, С. А. Румянцев* 656

Коррекция иммунологических и поведенческих параметров крыс при экспериментальной черепномозговой травме препаратом моноклональных антител к компоненту C3 комплемента

*Н. Б. Серебряная, Е. Е. Фомичева, С. Н. Шанин, Т. А. Филатенкова,
А. В. Жахов, К. А. Некрасова, А. М. Ищенко* 673

Модулирующий эффект фрагмента лептина 116–122 на тестикулярный стероидогенез у самцов крыс

А. А. Бахтюков, И. А. Лебедев, В. С. Кузнецова, К. В. Деркач, А. О. Шпаков 689

CONTENTS

Experimental Articles

Vascular Effects of Perinatal Hypoxia in the Early Postnatal Period in Rats <i>A. A. Shvetsova, D. D. Khukhareva, S. D. Simonenko, M. A. Khlystova, A. A. Borzykh, and D. K. Gaynullina</i>	561
Tim-3, CD9 Molecule Expressions on Natural Killer (NK) and T-Lymphocytes with NK Functions (NKT) of the Peripheral Blood at Different Trimesters of Physiological Pregnancy <i>E. G. Orlova, O. A. Loginova, O. L. Gorbunova, N. V. Karimova, and S. V. Shirshv</i>	572
The Effect of Spinal Cord Injury on P2 Signaling in the Cholinergic Synapse <i>A. E. Khairullin, D. V. Efimova, A. A. Ereemeev, D. E. Sabirova, S. N. Grishin, and A. U. Ziganshin</i>	588
The Changes of the Infra-Slow EEG Fluctuations of the Brain Potentials under Influence of Infra-Low Frequency Neurofeedback <i>V. A. Grin-Yatsenko, V. A. Ponomarev, and J. D. Kropotov</i>	600
Motor Synergies in the Control System of Complex Sports Balance Postures <i>S. A. Moiseev and E. A. Mikhaylova</i>	612
Recovery of the Functional Activity of K _{ATP} -Channels of Pial Arteries after Ischemia/Reperfusion Using Cell Therapy <i>I. B. Sokolova and O. P. Gorshkova</i>	629
The Impact of T- and L-Type Calcium Channels Blockers on Pulmonary Microhemodynamics in Experimental Model of Pulmonary Thromboembolism <i>V. I. Evlakhov, I. Z. Poyassov, and T. P. Berezina</i>	643
Influence of the Infant Feeding on the Taxonomy of the Gut Microbiome and the Trefoil Factors Level in Children and Adolescents <i>A. V. Shestopalov, I. M. Kolesnikova, D. V. Savchuk, E. D. Teplyakova, V. A. Shin, T. V. Grigoryeva, Yu. L. Naboka, A. M. Gaponov, and S. A. Roumiantsev</i>	656
Correction of Immunological and Behavioral Parameters of Rats with Experimental Traumatic Brain Injury with a Preparation of Monoclonal Antibodies to the C3 Component of Complement <i>N. B. Serebryanaya, E. E. Fomicheva, S. N. Shanin, T. A. Filatenkova, A. V. Zhakhov, K. A. Nekrasova, and A. M. Ishchenko</i>	673
Modulating Effect of the Leptin Fragment 116–122 on Testicular Steroidogenesis in Male Rats <i>A. A. Bakhtyukov, I. A. Lebedev, V. S. Kuznetsova, K. V. Derkach, and A. O. Shpakov</i>	689

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СОСУДИСТЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ
В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У КРЫС**

© 2023 г. А. А. Швецова¹, Д. Д. Хухарева¹, С. Д. Симоненко¹,
М. А. Хлыстова¹, А. А. Борzych^{1,2}, Д. К. Гайнуллина^{1, *}

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

²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 14.03.2023 г.

Нормальное функционирование сосудистой системы в раннем онтогенезе может изменяться при неблагоприятных воздействиях, влияющих на организм плода/новорожденного во время беременности, во время или после родов. Однако на настоящий момент недостаточно данных об “остром” (сразу после воздействия) и об “отставленном” (спустя несколько дней) влиянии непродолжительной (в течение нескольких часов) перинатальной нормобарической гипоксии на функционирование периферической сосудистой системы большого круга кровообращения в раннем онтогенезе у млекопитающих. Целью данной работы стало исследование “острых” и “отставленных” влияний однократной нормобарической гипоксии на функционирование артерий большого круга кровообращения в раннем постнатальном онтогенезе. В работе исследовали сократительные ответы подкожной артерии крыс в возрасте 10–14 дней в изометрическом режиме. Острую нормобарическую гипоксию (8% O₂) моделировали в течение 2 ч у 10-дневных крысят. Выбранный режим гипоксии не привел к изменениям сократительных ответов артерий на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин ни сразу после воздействия, ни спустя несколько дней. Эндотелий-зависимое расслабление артерий на ацетилхолин также не различалось между группами. Гипоксия не привела к изменению выраженности антиконстрикторных путей, связанных с оксидом азота и Kv7-каналов, а также проконстрикторной роли Rho-киназы. Таким образом, согласно представленным в данной работе результатам, кратковременная нормобарическая гипоксия на 10-й день жизни крысят не приводит ни к “острым”, ни к “отставленным” изменениям в регуляции тонуса периферических сосудов большого круга кровообращения в раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: гипоксия, артерия, Rho-киназа, оксид азота NO, эндотелий, гладкая мышца

DOI: 10.31857/S0869813923050102, **EDN:** XRPHSM

ВВЕДЕНИЕ

Нормальное функционирование сосудистой системы в период раннего постнатального онтогенеза демонстрирует целый ряд особенностей по сравнению со взрослым организмом. Ранее в ряде работ было показано, что регуляция тонуса сосудов у новорожденных отличается от взрослых как на уровне гладкой мышцы, так и на уровне эндотелия. Например, для раннего постнатального периода характерен

высокий уровень тонической продукции эндотелием оксида азота NO, который оказывает выраженное антиконстрикторное влияние [1–5]. Кроме того, в раннем онтогенезе наблюдается повышенный по сравнению со взрослыми уровень экспрессии и функциональной активности ряда типов калиевых каналов гладкомышечных клеток, включая потенциал-зависимые калиевые каналы Kv7, что также оказывает антиконстрикторное влияние на тонус сосудов [6]. В то же самое время в регуляцию тонуса сосудов новорожденных существенный проконстрикторный вклад вносит Rho-киназа, чье влияние ко взрослому возрасту уменьшается [7, 8].

Однако нормальное функционирование сосудистой системы в раннем онтогенезе может изменяться при неблагоприятных воздействиях или развитии ряда заболеваний, влияющих на организм плода/новорожденного во время беременности, во время или после родов. Одной из патологий, влияющих на функционирование организма в раннем онтогенезе, является перинатальная гипоксия. Перинатальная гипоксия — это патологическое состояние, связанное с кислородной недостаточностью во время беременности и в ранний неонатальный период, которая обусловлена уменьшением или прекращением поступления в организм кислорода, что может негативно сказываться на состоянии организма как в раннем постнатальном периоде, так и во взрослом возрасте [9]. Достаточно непродолжительные периоды перинатальной гипоксии, происходящие, например, во время родового процесса, могут являться одной из причин необходимости реанимационных мероприятий у новорожденных, что затрагивает около 10 млн новорожденных ежегодно [10]. Огромное число случаев перинатальной гипоксии указывает на необходимость всестороннего исследования последствий данной проблемы, в том числе и на функционирование сосудистой системы.

Известно, что длительное гипоксическое воздействие во время беременности может приводить к существенным изменениям в функционировании периферической сосудистой системы потомства во взрослом возрасте. Так, например, показано, что продолжительная гипоксия во время беременности у крыс, длящаяся с 5-го по 21-й день беременности, вызывает значимое усиление сократительных ответов артерий брыжейки на агонист α_1 -адренорецепторов у взрослого потомства [11, 12], а также к уменьшению эндотелий-зависимого расслабления [11]. Это реализуется в том числе за счет снижения продукции NO, происходящего вследствие уменьшения содержания эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в артериях брыжейки у взрослого потомства [11].

Однако на настоящий момент недостаточно данных об “остром” (сразу после воздействия) и об “отставленном” (спустя несколько дней) влиянии непродолжительной (в течение нескольких часов) перинатальной нормобарической гипоксии на функционирование периферической сосудистой системы большого круга кровообращения в раннем онтогенезе у млекопитающих.

В связи с изложенным выше целью данной работы стало исследование “острых” и “отставленных” влияний однократной нормобарической гипоксии на функционирование артерий большого круга кровообращения в раннем постнатальном онтогенезе. Для этого в работе моделировали острую нормобарическую гипоксию (8% O₂) в течение 2 ч у 10-дневных крысят [9, 13–15]. Необходимо отметить, что 10-дневные крысята по ряду показателей могут быть соотнесены с организмом доношенного новорожденного ребенка [16].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали крыс Wistar, полученных из питомника НИИ Общей патологии и патофизиологии. Половозрелых самцов и самок крыс содержали в стандартных условиях вивария биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоно-

сова при свободном доступе к пище и воде. Для получения потомства самцы и самки крыс были ссажены на 4 сут. Всего в работе было использовано потомство от 13 самок. День родов принимали как 0 день жизни крысят. На следующий день после родов ограничивали размер помета до 8 крысят. На 10-й день жизни крысят мужского пола отлучали от самки и случайным образом делили на две группы. Крысят одной группы помещали в гипоксические условия (8% O₂ и 92% N₂) в термостатируемую камеру (37°C) на 2 ч (группа “Гипоксия”). Крысят другой группы на 2 ч помещали в аналогичные условия, но с нормальным содержанием O₂ (21%) (группа “Контроль”). Для оценки “острых” эффектов перинатальной гипоксии проводили эксперименты на изолированных сосудах сразу после окончания сеанса гипоксии. Остальных крысят возвращали к самке и для оценки “отставленных” эффектов перинатальной гипоксии эксперименты на изолированных сосудах проводили на 11–14-е дни жизни крысят.

В день проведения эксперимента на изолированных артериях крысят взвешивали, декапитировали, выделяли подкожную артерию (сосуд мышечного типа, ответвление от бедренной артерии, питающей кровью кожу плюсны и стопы). Выделение артерий проводили в растворе для препаровки (в мМ): NaCl – 145; KCl – 4.5; CaCl₂ – 0.1; MgSO₄ – 1.0; NaH₂PO₄ – 1.2; EDTA – 0.025; HEPES – 5.0; pH 7.4 [17].

Эксперименты на изолированных артериях

Из артерий вырезали кольцевые сегменты длиной 2 мм и закрепляли их в многоканальном миографе (модели 410A, 420M или 620M, DMT, Дания) для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме. В случае необходимости проводили удаление эндотелия с помощью крысиного уса. Показания тензометрических датчиков оцифровывали с частотой 10 Гц с использованием аналогоцифрового преобразователя (E14 140, L CARD, Россия) и регистрировали при помощи программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия). После нагрева камер с раствором до 37°C определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления сократительной активности, в ходе этой процедуры также вычисляли внутренний диаметр сосуда, соответствующий давлению 100 мм рт. ст. (d₁₀₀) [18]. После этого раствор в камере миографа сменяли на рабочий (в мМ): NaCl – 120; NaHCO₃ – 26; KCl – 4.5; CaCl₂ – 1.6; MgSO₄ – 1.0; NaH₂PO₄ – 1.2; D-глюкоза – 5.5; EDTA – 0.025; HEPES – 5 [17]. Раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂) для оксигенации и поддержания pH 7.4.

Затем препараты артерий активировали добавлением с последующей отмывкой (1) норэпинефрина (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин); (2) метоксamina (агонист α₁-адренорецепторов, 10 мкМ, длительность воздействия 5 мин), на фоне действия которого проводили оценку эндотелиальной функции путем либо однократной аппликации ацетилхолина (10 мкМ), либо проведения зависимости “концентрация–эффект” на ацетилхолин (диапазон концентраций 10 нМ–10 мкМ, длительность действия каждой концентрации 1 мин); (3) метоксamina (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин). Для всех воздействий длительность отмывки составляла 15 мин, во время отмывки раствор в камере миографа меняли минимум 5 раз. Поскольку тест на ацетилхолин является стандартным тестом для оценки эндотелий-зависимого расслабления артерий [19], то в случае использования препаратов с интактным эндотелием убеждались, что они расслабляются на ацетилхолин, тогда как отсутствие расслабления на ацетилхолин свидетельствовало об успешном удалении эндотелия.

Протокол эксперимента заключался в проведении двух последовательных зависимостей “концентрация–эффект” на метоксамин (в диапазоне концентраций от 10 нМ до 100 мкМ, длительность действия каждой концентрации составляла 3 мин).

Первую зависимость “концентрация—эффект” на метоксамин проводили спустя 20 мин после окончания процедуры активации препарата. Этот этап эксперимента необходим для того, чтобы удостовериться, что исходно все препараты одной группы животных обладали одинаковой реактивностью на метоксамин. После отмывки от метоксамина в камеры миографа добавляли ингибитор/блокатор или такой же объем растворителя на 20 мин, после чего проводили вторую зависимость “концентрация—эффект” на метоксамин, аналогичную первой. В работе использовали ингибитор NO-синтаз L-NNA (100 мкМ) [20], блокатор Kv7 каналов XE991 (3 мкМ) [21], ингибитор Rho-киназы Y27632 (3 мкМ) [22].

В ряде экспериментов после окончания второй зависимости “концентрация—эффект” на метоксамин проводили отмывку канала с растворителем, на 20 мин добавляли L-NNA (100 мкМ) и проводили зависимость “концентрация—эффект” на ацетилхолин (диапазон концентраций 10 нМ—10 мкМ, длительность действия каждой концентрации 1 мин) на фоне предсокращения артерии метоксамином (10 мкМ).

При обработке результатов из значения силы при каждой концентрации вазоактивного вещества вычитали значение “пассивной” силы, соответствующее полному расслаблению гладкой мышцы препарата (в растворе для препаровки после окончания процедуры определения оптимального растяжения препарата). Полученные значения активной силы выражали в % от максимальной силы сокращения препарата, определенной по первой зависимости “концентрация—эффект” (для метоксамина), или в % от уровня предсокращения препарата (для ацетилхолина).

В работе использовали норэпинефрин, метоксамин, ацетилхолин, XE991 фирмы Sigma-Aldrich, Y27632 фирмы Tocris и L-NNA фирмы Alexis Biochemicals.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 7.0. Нормальность распределения проверяли с использованием теста Шапиро—Уилка. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений или *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего, *n* — количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка “острых” эффектов перинатальной гипоксии

Сразу после окончания проведения гипоксического сеанса оценивали “острые” эффекты перинатальной гипоксии. Масса крысят составила 22 ± 1 г в группе “Контроль” ($n = 9$) и 21 ± 1 г в группе “Гипоксия” ($n = 9$, $p > 0.05$). Внутренний диаметр артерий, соответствующий давлению 100 мм рт. ст. (d_{100}), составил 233 ± 8 мкм в группе “Контроль” ($n = 9$) и 231 ± 8 мкм в группе “Гипоксия” ($n = 9$, $p > 0.05$). Максимальная сила сокращения кольцевых сегментов артерий составила 8.2 ± 0.6 мН в группе “Контроль” ($n = 9$) и 7.9 ± 0.7 мН в группе “Гипоксия” ($n = 9$, $p > 0.05$).

Сократительные ответы на метоксамин не различались между группами “Контроль” и “Гипоксия” (рис. 1). Эндотелий-зависимое расслабление артерий на однократную аппликацию ацетилхолина также не различалось между группами и составило $82 \pm 6\%$ (в группе “Контроль”, $n = 9$) и $85 \pm 6\%$ (в группе “Гипоксия”, $n = 9$, $p > 0.05$).

Следующим этапом работы стала оценка выраженности путей, участвующих в регуляции сократительных ответов артерий, характерных для раннего постнатального периода. Для этого мы оценивали антиконстрикторное влияние NO по эффектам ингибитора NO-синтаз L-NNA, антиконстрикторное влияние Kv7 каналов

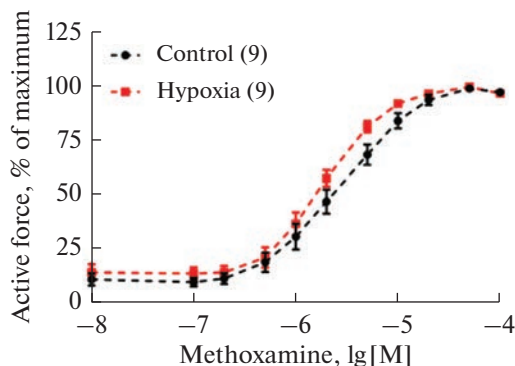


Рис. 1. “Острое” влияние перинатальной гипоксии у 10-дневных крысят на сократительные ответы артерий. Сократительные ответы подкожной артерии с интактным эндотелием на метоксамин. Числа в скобках обозначают количество животных в группе.

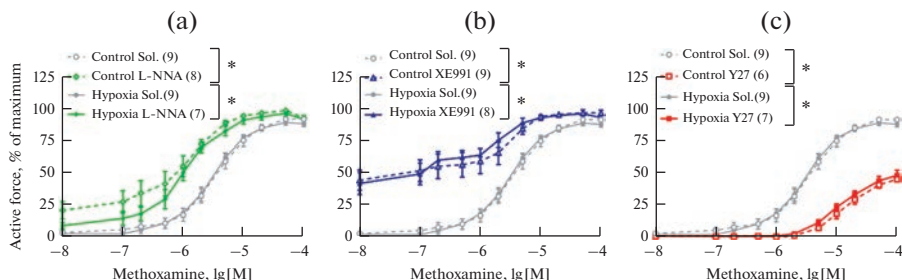


Рис. 2. “Острое” влияние перинатальной гипоксии у 10-дневных крысят на выраженность путей регуляции сократительных ответов артерий. Сократительные ответы подкожной артерии с интактным эндотелием на метоксамин в присутствии растворителя (Sol.) или ингибитора NO-синтазы L-NNA (a), блокатора Kv7 каналов XE991 (b), ингибитора Rho-киназы Y27632 (c). Числа в скобках обозначают количество животных в группе. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

с помощью их блокатора XE991, проконстрикторное влияние Rho-киназы с использованием ингибитора Rho-киназы Y27632. L-NNA и XE991 вызывали увеличение сократительных ответов на метоксамин в артериях обеих групп животных (рис. 2a, b), свидетельствуя о наличии выраженного антиконстрикторного влияния NO и Kv7 каналов соответственно. Y27632, напротив, приводил к уменьшению сократительных ответов артерий на метоксамин у животных обеих групп (рис. 2c), что говорит о выраженном проконстрикторном влиянии Rho-киназы в артериях крысят групп “Контроль” и “Гипоксия”. Однако как в присутствии L-NNA (рис. 2a), так и в присутствии XE991 (рис. 2b) или Y27632 (рис. 2c) межгрупповых различий обнаружено не было.

Оценка “отставленных” эффектов перинатальной гипоксии

Далее была проведена оценка “отставленных” эффектов перинатальной гипоксии. Усредненная масса 11–14-дневных крысят составила 28 ± 1 г в группе “Контроль” ($n = 9$) и 27 ± 1 г в группе “Гипоксия” ($n = 9$, $p > 0.05$). Внутренний диаметр

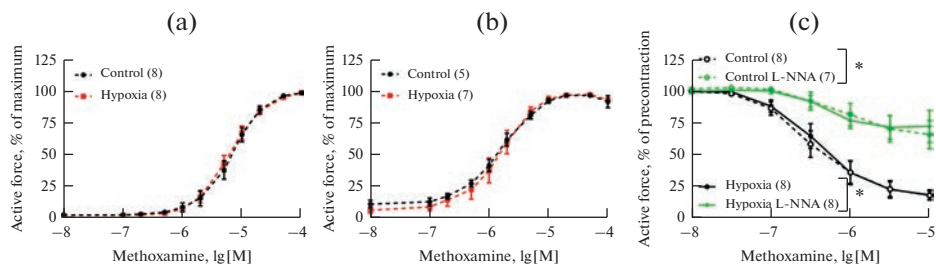


Рис. 3. “Отставленное” влияние перинатальной гипоксии у 11–14-дневных крысят на вазомоторные ответы. Сократительные ответы подкожной артерии с интактным (а) и удаленным (б) эндотелием на метоксамин. Реакции расслабления подкожной артерии с интактным эндотелием на ацетилхолин в отсутствие блокаторов и в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NNA (с). Числа в скобках обозначают количество животных в группе. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

артерий, соответствующий давлению 100 мм рт. ст. (d_{100}), составил 247 ± 6 мкм в группе “Контроль” ($n = 7$) и 246 ± 8 мкм в группе “Гипоксия” ($n = 8$, $p > 0.05$). Максимальная сила сокращения кольцевых сегментов артерий составила 12.7 ± 0.9 мН в группе “Контроль” ($n = 7$) и 11.8 ± 0.4 мН в группе “Гипоксия” ($n = 8$, $p > 0.05$).

На следующем этапе было проведено сравнение сократительных ответов артерий с интактным эндотелием у крысят контрольной и гипоксической групп на метоксамин. Артерии обеих групп крысят демонстрировали выраженные ответы на метоксамин, при этом межгрупповых различий обнаружено не было (рис. 3а). Кроме того, нами не было обнаружено различий в реактивности на метоксамин артерий с удаленным эндотелием (рис. 3б).

Для оценки эндотелиальной функции исследовали реакции расслабления артерий на ацетилхолин. Ответы на ацетилхолин в отсутствие ингибиторов не различались между группами (рис. 3с). Более того, межгрупповых различий в реакции на ацетилхолин не наблюдалось и после блокады NO-синтаз с помощью L-NNA (рис. 3с), что говорит об отсутствии различий во вкладе NO в эндотелий-зависимое расслабление артерий. Отметим, что ингибирование NO-синтаз приводило к существенному уменьшению реакций артерий на ацетилхолин в обеих группах животных. Максимальное расслабление на ацетилхолин при действии концентрации ацетилхолина 10 мкМ составило $82 \pm 3\%$ для контрольных крысят ($n = 8$) и $82 \pm 4\%$ для крысят из группы “Гипоксия” ($n = 8$) в контрольных условиях ($p > 0.05$). В присутствии L-NNA максимальное расслабление на 10 мкМ ацетилхолина составило $34 \pm 11\%$ для контрольных крысят ($n = 7$) и $28 \pm 13\%$ для крысят из группы “Гипоксия” ($n = 8$) ($p > 0.05$).

Далее в работе было проведено сравнение выраженности ряда путей, принимающих ключевое участие в регуляции сократительных ответов артерий, в ранний постнатальный период. L-NNA вызывал сопоставимое увеличение сократительных ответов на метоксамин в обеих группах (рис. 4а), то есть после блокады NO-синтаз различий между группами “Контроль” и “Гипоксия” не наблюдалось. XE991 вызывал увеличение сократительных ответов артерий обеих групп, при этом в присутствии XE991 реакции на метоксамин не различались (рис. 4б), что свидетельствует в пользу сопоставимого антиконстрикторного эффекта Kv7 каналов у крысят групп “Контроль” и “Гипоксия”. Y27632 вызывал значимое уменьшение сократительных ответов артерий на метоксамин в обеих группах, однако в присутствии Y27632 сократительные ответы артерий крысят из групп “Контроль” и “Гипоксия” не различались (рис. 4с).

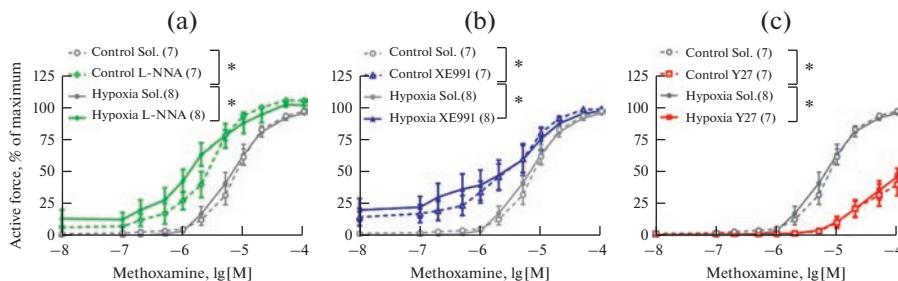


Рис. 4. “Отставленное” влияние перинатальной гипоксии у 11–14-дневных крысят на выраженность путей регуляции сократительных ответов артерий. Сократительные ответы подкожной артерии с интактным эндотелием на метоксамин в присутствии растворителя (Sol.) или ингибитора NO-синтазы L-NNA (a), блокатора Kv7 каналов XE991 (b), ингибитора Rho-киназы Y27632 (c). Числа в скобках обозначают количество животных в группе. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данной работы нами было проведено исследование “острого” и “отставленного” влияния гипоксии в 10-дневном возрасте на функционирование артерий крысят в раннем постнатальном периоде. Как оказалось, кратковременная нормобарическая гипоксия в возрасте 10 дней у крысят не приводит ни к “острому”, ни к “отставленному” изменению функционирования системных артерий как на уровне гладкомышечных, так и на уровне эндотелиальных клеток. Помимо изучения сократительных реакций артерий на агонист α_1 -адренорецепторов и дилаторных реакций при стимуляции эндотелий-зависимого расслабления на ацетилхолин, нами были рассмотрены ключевые анти- и проконстрикторные пути регуляции сосудистого тонуса в раннем онтогенезе. Выбор этих ключевых путей регуляции сосудистого тонуса не случаен, а объясняется как минимум двумя причинами. Во-первых, согласно нашим предыдущим данным, вклад антиконстрикторного влияния NO и Kv7 каналов максимален в период раннего постнатального онтогенеза [1, 6], так же как и проконстрикторное влияние Rho-киназы [7]. Во-вторых, данные литературы свидетельствуют о том, что именно эти пути регуляции сосудистого тонуса могут быть затронуты гипоксией.

Так, например, ранее в работах *in vitro* было продемонстрировано, что острая аноксия в течение 60 мин с последующей реоксигенацией вызывает уменьшение эндотелий-зависимого расслабления почечных артерий на ацетилхолин вследствие нарушения работы растворимой гуанилатциклазы, что уменьшает NO-зависимую компоненту вазодилатации [23]. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что в описанной работе, помимо *in vitro* условий, использовали экстремальные условия с 0%-ным содержанием O_2 , что существенно отличается от нашей работы, где, во-первых, гипоксию моделировали *in vivo*, а во-вторых, содержание O_2 было 8%. Наши данные об отсутствии “острого” влияния гипоксии на сосудистые реакции в раннем онтогенезе согласуются с данными, полученными на куриных эмбрионах. Показано, что у куриных эмбрионов практически сразу после кратковременного (в течение 30 мин) гипоксического воздействия с концентрацией O_2 10% сократительные ответы артерий большого круга кровообращения и их эндотелий-зависимое расслабление оказываются неизменными по отношению к контрольной группе [24].

Уменьшение антиконстрикторной роли Kv7 каналов в малом круге кровообращения было показано ранее при моделировании вызываемой гипоксией легочной

гипертензии у взрослых крыс [25]. В наших экспериментах не было обнаружено изменений в выраженности антиконстрикторного влияния Kv7 каналов в артериях большого круга кровообращения ни сразу после окончания сеанса гипоксии, ни спустя несколько дней.

Кроме того, увеличение проконстрикторной роли Rho-киназы в малом круге кровообращения было продемонстрировано в работах по исследованию влияния высокогорной гипобарической гипоксии в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе, вызывающей развитие легочной гипертензии [26]. Помимо этого, увеличение проконстрикторного влияния Rho-киназы было показано в условиях аноксии в экспериментах *in vitro* для коронарных артерий свиней [27]. Однако выбранный нами режим гипоксического воздействия не оказывал влияния на степень вовлеченности Rho-киназы в регуляцию сократительных ответов артерий новорожденных крыс ни сразу после окончания сеанса гипоксии, ни спустя несколько дней.

Таким образом, согласно представленным в данной работе результатам, кратковременная нормобарическая гипоксия на 10-й день жизни крысят не приводит ни к “острым”, ни к “отставленным” изменениям в регуляции тонуса периферических сосудов большого круга кровообращения в раннем постнатальном периоде. Рассмотренные в работе антиконстрикторные и проконстрикторные пути регуляции сокращения артерий также оказываются неизменными, несмотря на то, что в ряде предыдущих работ было продемонстрировано изменение этих путей вследствие гипоксического воздействия. Вероятно, что подобные расхождения в результатах нашей и предыдущих работ могут быть объяснены различиями в длительности и степени гипоксического воздействия, в типе исследуемого сосуда (принадлежит ли он к малому или большому кругу кровообращения), в возрасте и виде животных.

Необходимо подчеркнуть, что согласно современным представлениям, на этапах раннего онтогенеза в организме происходит закладка “правильности” развития различных систем и органов, включая сердечно-сосудистую систему. Иными словами, в раннем онтогенезе происходит программирование развития сердечно-сосудистой системы; при нарушениях формирования сердечно-сосудистой системы на ранних этапах онтогенеза могут закладываться различные заболевания, проявляющиеся значительно позднее, уже во взрослом возрасте [28, 29]. В связи с этим представляется важным исследование влияния различных воздействий и патологий, включая перинатальную гипоксию, на состояние сердечно-сосудистой системы не только в раннем онтогенезе, но и позднее, во взрослом возрасте, что будет являться предметом дальнейших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 97-ж-2 от 11.11.2021).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10036).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.Ш. и Д.К.Г.), сбор данных (А.А.Ш., Д.Д.Х., С.Д.С., М.А.Х., А.А.Б. и Д.К.Г.), обработка данных (А.А.Ш. и Д.К.Г.), написание и редактирование манускрипта (А.А.Ш. и Д.К.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaynullina D, Lubomirov LT, Sofronova SI, Kalenchuk VU, Gloe T, Pfitzer G, Tarasova OS, Schubert R (2013) Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats. *Cardiovasc Res* 99: 612–621.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt138>
2. Sofronova SI, Borzykh AA, Gaynullina DK, Kuzmin IV, Shvetsova AA, Lukoshkova EV, Tarasova OS (2016) Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats. *Nitric Oxide – Biol Chem* 55–56: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.005>
3. Boegehold MA (2010) Endothelium-dependent control of vascular tone during early postnatal and juvenile growth. *Microcirculation* 17: 394–406.
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2010.00035.x>
4. Nankervis CA, Nowicki PT (1995) Role of nitric oxide in regulation of vascular resistance in postnatal intestine. *Am J Physiol* 268: 949–958.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.6.G949>
5. Nankervis CA, Dunaway DJ, Nowicki PT (2001) Determinants of terminal mesenteric artery resistance during the first postnatal month. *Am J Physiol – Gastrointest Liver Physiol* 280: 678–686.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.4.g678>
6. Shvetsova AA, Gaynullina DK, Tarasova OS, Schubert R (2019) Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of Kv7 channels. *Acta Physiol* 225: e13176.
<https://doi.org/10.1111/apha.13176>
7. Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Kalenchuk VU, Borovik AS, Vorotnikov AV, Tarasova OS, Schubert R (2018) Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol* 223: 1–15.
<https://doi.org/10.1111/apha.13044>
8. Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ (1998) Regulation of Ca^{2+} sensitization by PKC and rho proteins in ovine cerebral arteries: Effects of artery size and age. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 275: 930–939.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.3.h930>
9. Sukhanova IA, Sebestova EA, Levitskaya NG (2016) The acute and delayed effects of perinatal hypoxic brain damage in children and in model experiments with rodents. *Neurochem J* 10: 258–272.
<https://doi.org/10.1134/S1819712416040127>
10. Rosa-Mangeret F, Benski AC, Golaz A, Zala PZ, Kyokan M, Wagner N, Muhe LM, Pfister RE (2022) 2.5 Million Annual Deaths—Are Neonates in Low-and Middle-Income Countries Too Small to Be Seen? A Bottom-Up Overview on Neonatal Morbi-Mortality. *Trop Med Infect Dis* 7: 1–21.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7050064>
11. Chen X, Qi L, Fan X, Tao H, Zhang M, Gao Q, Liu Y, Xu T, Zhang P, Su H, Tang J, Xu Z (2019) Prenatal hypoxia affected endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries of aged offspring via increased oxidative stress. *Hypertens Res* 42: 863–875.
<https://doi.org/10.1038/s41440-018-0181-7>
12. Liu B, Liu Y, Shi R, Feng X, Li X, Zhang W, Wu J, Li N, Zhou X, Sun M, Xu Z (2018) Chronic Prenatal Hypoxia Down-Regulated BK Channel B1 Subunits in Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells of the Offspring. *Cell Physiol Biochem* 45: 1603–1616.
<https://doi.org/10.1159/000487727>
13. Khukhareva DD, Sukhanova YA, Sebestova EA, Levitskaya NG (2021) Effects of Single-Session Normobaric Hypoxia in Rats Aged 10 Days on Sensorimotor Development and Behavior. *Neurosci Behav Physiol* 51: 1153–1161.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01175-2>
14. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141.
<https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
15. Bruder ED, Kamer KJ, Guenther MA, Raff H (2011) Adrenocorticotrophic hormone and corticosterone responses to acute hypoxia in the neonatal rat: effects of body temperature maintenance. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 300: R708–R715.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00708.2010>
16. Jantzie LL, Robinson S (2015) Preclinical Models of Encephalopathy of Prematurity. *Dev Neurosci* 37: 277–288.
<https://doi.org/10.1159/000371721>

17. Zavaritskaya O, Lubomirov LT, Altay S, Schubert R (2017) Src tyrosine kinases contribute to serotonin-mediated contraction by regulating calcium-dependent pathways in rat skeletal muscle arteries. *Pflug Arch Eur J Physiol* 469: 767–777.
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-1949-3>
18. Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
19. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373–376.
<https://doi.org/10.1038/288373a0>
20. Villari A, Giurdanella G, Bucolo C, Drago F, Salomone S (2017) Apixaban enhances vasodilation mediated by protease-activated receptor 2 in isolated rat arteries. *Front Pharmacol* 8: 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00480>
21. Zavaritskaya O, Dudem S, Ma D, Rabab KE, Albrecht S, Tsvetkov D, Kassmann M, Thornbury K, Mladenov M, Kammermeier C, Sergeant G, Mullins N, Wouappi O, Wurm H, Kannt A, Gollasch M, Hollywood MA, Schubert R (2020) Vasodilation of rat skeletal muscle arteries by the novel BK channel opener GoSlo is mediated by the simultaneous activation of BK and Kv7 channels. *Br J Pharmacol* 177: 1164–1186.
<https://doi.org/10.1111/bph.14910>
22. Lubomirov LT, Papadopoulos S, Filipova D, Baransi S, Todorović D, Lake P, Metzler D, Hilsdorf S, Schubert R, Schroeter MM, Pfitzer G (2018) The involvement of phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) and MYPT1 isoform expression in NO/cGMP mediated differential vasoregulation of cerebral arteries compared to systemic arteries. *Acta Physiol* 224: e13079.
<https://doi.org/10.1111/apha.13079>
23. Braun D, Zollbrecht C, Dietze S, Schubert R, Golz S, Summer H, Persson PB, Carlström M, Ludwig M, Patzak A (2018) Hypoxia/reoxygenation of rat renal arteries impairs vasorelaxation via modulation of endothelium-independent sGC/cGMP/PKG signaling. *Front Physiol* 9: 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00480>
24. Mohammed R, Salinas CE, Giussani DA, Blanco CE, Cogolludo AL, Villamor E (2017) Acute hypoxia-reoxygenation and vascular oxygen sensing in the chicken embryo. *Physiol Rep* 5: 1–11.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13501>
25. Sedivy V, Joshi S, Ghaly Y, Mizera R, Zaloudikova M, Brennan S, Novotna J, Herget J, Gurney AM (2015) Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 308: L48–L57.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00362.2013>
26. Lopez NC, Ebensperger G, Herrera EA, Reyes RV, Calaf G, Cabello G, Moraga FA, Beñaldo FA, Diaz M, Parer JT, Llanos AJ (2016) Role of the RhoA/ROCK pathway in high-altitude associated neonatal pulmonary hypertension in lambs. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 310: R1053–R1063.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00177.2015>
27. Liu H, Chen Z, Liu J, Liu L, Gao Y, Dou D (2014) Endothelium-independent hypoxic contraction of porcine coronary arteries may be mediated by activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Vascul Pharmacol* 61: 56–62.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.03.005>
28. Miranda JO, Areias JC, Miranda JO (2017) Fetal programming as a predictor of adult health or disease: the need to reevaluate fetal heart function. *Hear Fail Rev* 22: 861–877.
<https://doi.org/10.1007/s10741-017-9638-z>
29. Barker DJP (2002) Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 13: 364–368.
[https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00689-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00689-6)

Vascular Effects of Perinatal Hypoxia in the Early Postnatal Period in Rats

A. A. Shvetsova^a, D. D. Khukhareva^a, S. D. Simonenko^a,
M. A. Khlystova^a, A. A. Borzykh^{a, b}, and D. K. Gaynullina^{a, *}

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^bInstitute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com

The normal functioning of the vascular system in early ontogenesis can be altered by adverse effects affecting the organism of the fetus / newborn during pregnancy, during or after childbirth. However, at the moment there is not enough data on the “acute” (immediately after exposure) and “delayed” (after several days) effects of short-term (within several hours) perinatal normobaric hypoxia on the functioning of the peripheral vascu-

lar system of the systemic circulation in early ontogenesis in mammals. The aim of this work was to study the “acute” and “delayed” effects of a single normobaric hypoxia on the functioning of the arteries of the systemic circulation in early postnatal ontogenesis. The contractile responses of the saphenous artery of rats aged 10–14 days were studied in isometric myograph. Acute normobaric hypoxia (8% O₂) was simulated for 2 hours in 10-day-old rat pups. The selected hypoxia regimen did not lead to changes in arterial contractile responses to the α_1 -adrenergic agonist methoxamine either immediately after exposure or several days later. Endothelium-dependent relaxation of arteries to acetylcholine also did not differ between groups. Hypoxia did not change the contribution of anticontractile pathways associated with nitric oxide and Kv7 channels, as well as the pro contractile role of Rho-kinase. Thus, according to the presented results, short-term normobaric hypoxia on the 10th day of life in rat pups does not lead to either “acute” or “delayed” changes in the regulation of the tone of the peripheral arteries of the systemic circulation in the early postnatal period.

Keywords: hypoxia, artery, Rho-kinase, nitric oxide NO, endothelium, smooth muscle

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ TIM-3 И CD9 НА НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРАХ
(NK) И Т-ЛИМФОЦИТАХ С ФУНКЦИЯМИ NK (NKT) ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ В РАЗНЫЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

© 2023 г. Е. Г. Орлова^{1, *}, О. А. Логинова¹,
О. Л. Горбунова¹, Н. В. Каримова², С. В. Ширшев¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

²ООО Централизованная клинико-диагностическая лаборатория, Пермь, Россия

*E-mail: orlova_katy@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

При физиологически протекающей беременности натуральные киллеры (NK) и Т-лимфоциты с функциями NK (NKT) являются ведущими эффекторами иммунной толерантности организма матери к полуаллогенному плоду, а также выполняют фетотрофическую функцию. Молекулы Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) и CD9 играют критическую роль в реализации иммунорегуляторной и фетотрофической функций NK и NKT, однако их экспрессия на клетках периферической крови не изучена. Цель работы – исследовать экспрессию Tim-3, CD9 на субпопуляциях NK и NKT периферической крови в разные сроки физиологически протекающей беременности. Объектом исследования являлась периферическая кровь условно-здоровых женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Группу сравнения составили условно-здоровые небеременные женщины в I фазе менструального цикла. Экспрессию молекул Tim-3, CD9 анализировали методом проточной цитофлуориметрии на регуляторных NK (CD16[–]CD56^{bright}) и NKT (CD16[–]CD56⁺), цитотоксических NK (CD16⁺CD56^{dim/–}) и NKT (CD16⁺CD56⁺). Установлено, что в I триместре беременности количество и соотношение регуляторных и цитотоксических NK и NKT не менялось. Экспрессия Tim-3 увеличивалась на всех субпопуляциях NK и NKT за исключением цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Экспрессия CD9 возрастала на всех субпопуляциях NK, а на NKT не отличалась от небеременных. При этом на регуляторных NK и NKT в I триместре беременности выявлена прямая корреляция экспрессии CD9 и Tim-3. В III триместре количество регуляторных CD16[–]CD56^{bright}NK увеличивалось, а цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторных CD16[–]CD56⁺NKT снижалось по сравнению с небеременными. Количество CD16⁺CD56[–]NK не менялось по триместрам беременности. Экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NK и цитотоксических NKT, а CD9 повышалась только на регуляторных NK. Таким образом, экспрессия молекул Tim-3 и CD9 на разных субпопуляциях NK и NKT менялась по триместрам, что играет важную роль в регуляции их фенотипа и функций при беременности.

Ключевые слова: натуральные киллеры, Т-лимфоциты с функциями натуральных киллеров, Tim-3, CD9, беременность

DOI: 10.31857/S0869813923050072, EDN: XRCARE

ВВЕДЕНИЕ

Натуральные киллеры (NK) и Т-лимфоциты с функциями NK (NKT) при беременности играют критическую роль в формировании иммунной толерантности организма матери к полуаллогенному плоду, а также выполняют фетотрофическую функцию [1, 2]. NK-клетки относятся к эффекторам врожденного иммунитета [1, 2]. Более 90% NK периферической крови имеют фенотип $CD16^+CD56^{dim}$ и обладают высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых и вирус-инфицированных клеток [1, 3]. И лишь около 10% от общего числа NK-клеток имеют регуляторный фенотип $CD16^-CD56^{bright}$, основной функцией которых является продукция широкого спектра цитокинов [1, 3]. При беременности изменение гормонального фона индуцирует трансформацию фенотипа NK периферической крови с цитотоксического на регуляторный и миграцию $CD16^-CD56^{bright}$ NK в матку, где они становятся доминирующей лимфоидной популяцией, о чем свидетельствует сходный паттерн хемокиновых рецепторов периферических и децидуальных $CD16^-CD56^{bright}$ NK [1, 3]. Количество $CD16^+CD56^{dim}$ NK периферической крови, их цитотоксический потенциал, продукция интерферона-гамма (IFN- γ) при беременности снижаются, но увеличивается число интерлейкин (IL)-10-продуцирующих NK, что особенно выражено в I триместре беременности [4]. Повышенное содержание цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}$ NK в периферической крови у женщин ассоциировано с нарушением фертильности и спонтанными абортами [1, 3]. Исследования последних лет показали, что в периферической крови присутствует также субпопуляция цитотоксических истощенных $CD16^+CD56^-$ NK, которая характеризуется сниженной цитолитической и секреторной активностью [5–7]. Содержание $CD16^+CD56^-$ NK увеличивается при тяжелых вирусных инфекциях и связано со снижением противовирусной защиты, однако изменения их количества и функций при физиологической беременности не изучены [5–7].

В ранние сроки беременности количество децидуальных NK увеличивается до 70–90% от общего числа лимфоцитов в матке [8, 9]. Децидуальные NK продуцируют ангиогенные факторы (VEGF, PLGF), моделируют рост спиральных артерий, инвазию трофобласта, формирование иммунной толерантности в зоне фето-плацентарного контакта [1, 2, 10]. Секретируя иммуносупрессорные цитокины – IL-10, трансформирующий фактор роста (TGF- β), децидуальные NK индуцируют формирование адаптивных Т-регуляторных клеток (aTreg) из наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, которые за счет контактных взаимодействий и продукции IL-10, TGF- β бета подавляют цитотоксические реакции против трофобласта [1, 2, 10, 11].

Децидуальные $CD56^{bright}CD16^-$ NK отличаются от периферических регуляторных $CD56^{bright}CD16^-$ NK высокой экспрессией молекул Tim-3 и CD9, которые регулируют цитотоксическую и миграционную активность, продукцию ангиогенных факторов [8, 9, 12–19]. “Check-point” молекула Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) присутствует на большинстве лимфоидных клеток, однако NK обладают наибольшей экспрессией Tim-3, которая повышается при их трансформации в децидуальные [13, 14]. Экспрессия Tim-3 усиливается в ответ на активацию клеток и ограничивает продукцию провоспалительных цитокинов, дегрануля-

Список используемых сокращений: Gal-9 – галектин-9; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL – интерлейкин; INF – интерферон; NK – натуральные киллеры; NKT – Т-лимфоциты с функциями натуральных киллеров; PLGF – плацентарный фактор роста; PSG – гликопротеины, специфичные для беременности; TCR – Т-клеточный рецептор; TGF – трансформирующий фактор роста; Tim-3 – иммуноглобулиновый и муциновый домен Т-клеток; TNF – фактор некроза опухоли; Treg – регуляторные Т-клетки; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; БСА – бычий сывороточный альбумин; МПК – мононуклеарные клетки периферической крови; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

цию, цитотоксичность, повышает чувствительность к индуцированному апоптозу [15, 16]. Лигандом для Tim-3 является галектин-9 (Gal-9), уровень которого в периферической крови нарастает при беременности [14], поскольку Gal-9 активно продуцируется клетками трофобласта, Treg [17]. Молекула CD9 относится к семейству тетраспонинов и регулирует адгезию и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, а также экспрессию и активность других адгезионных молекул [19, 20]. Экспрессия CD9 изучена на децидуальных NK, но лишь в единичных исследованиях выявлена на NK и других популяциях лимфоцитов периферической крови при беременности [20, 21]. Лигандами для CD9, в том числе, являются продуцируемые клетками трофобласта ассоциированные с беременностью гликопротеины (“pregnancy specific glycoproteins”, PSG), концентрация которых нарастает в периферической крови пропорционально сроку беременности [22]. Взаимодействие CD9 с PSG регулирует продукцию цитокинов лейкоцитами в матке [22]. Все вышесказанное подтверждает значимость молекул Tim-3 и CD9 для контроля функций NK, однако их экспрессия разными популяциями NK периферической крови при беременности не исследована.

NKT представляют гетерогенную минорную популяцию Т-лимфоцитов периферической крови, выделение которой основано на экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) и молекул NK клеток – CD56, CD16 [23–25]. К NKT относятся как инвариантные (i) NKT, экспрессирующие инвариантный TCR и распознающие гликолипидные антигены, ассоциированные с молекулой CD1d, которая высоко экспрессируется клетками трофобласта, так и NKT-подобные клетки, включающие CD1d-независимые $\alpha\beta$ TCR Т-лимфоциты [26]. Критическая роль NKT в регуляции иммунореактивности определяется способностью к быстрой и массивной продукции цитокинов (INF-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10), направляющих развития иммунного ответа по клеточно-опосредованному или гуморальному типу [25–27]. Известно, что в ранние сроки физиологической беременности меняется субпопуляционный состав и количество NKT в периферической крови [25, 28]. Выявлено повышение экспрессии активационного маркера CD69, продукции IL-4 и, напротив, снижение цитотоксичности и секреции INF-gamma [28–30]. Избыточное количество NKT и продукция INF-gamma в периферической крови в ранние сроки беременности приводит к спонтанным абортam [25, 31, 32]. NKT не присутствуют в эндометрии вне беременности [33], но в I триместре количество CD56⁺CD16[–] NKT в матке значительно увеличивается [29], а к родам снижается [32]. В зоне фето-плацентарного контакта NKT выполняют фетотрофическую и регуляторную функцию, продуцируют INF-gamma и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), стимулируют рост спиральных артерий и развитие децидуальных макрофагов, пролиферацию децидуальных NK *in situ*, подавляют клеточноопосредованные реакции [29]. Возможность миграции CD56⁺CD16[–] NKT периферической крови в матку при беременности остается не изученной. Развитие NKT происходит в тимусе, продуктивная функция которого снижается при беременности вследствие стероид-индуцированной инволюции. В единичных работах показана экспрессия Tim-3 [17, 34], CD9 [35] на NKT периферической крови, однако их роль в изменении фенотипа и функций NKT при беременности не исследована.

При физиологической беременности иммунореактивность организма матери меняется по триместрам [36]. Первый триместр характеризуется наибольшей частотой спонтанных абортов, что связано с началом экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости клетками трофобласта и “лютео-плацентарной сменой” [37]. В третьем триместре изменения иммунореактивности организма матери связаны с подготовкой к родам. Все высказанное подтверждает значимость и актуальность изучения трансформации фенотипа эффекторов иммунной толеран-

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования

Исследуемые группы	<i>n</i>	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	10	26 (21–29)	—
Беременные, I триместр	12	26 (22–32)	12 (10–12)
Беременные, III триместр	12	30 (28–31)	30 (28–31)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me(Q1–Q3); *n* – количество проведенных исследований.

рантности по триместрам беременности. Цель работы – изучить экспрессию Tim-3 и CD9 на регуляторных и цитотоксических субпопуляциях NK, NKT периферической крови женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Исследовали периферическую кровь условно-здоровых небеременных (I фаза менструального цикла) и женщин с физиологически протекающей беременностью в I и III триместрах. Критериями включения являлось: наличие одной и более успешно завершившихся беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических соматических, эндокринных, аутоиммунных, генетических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных и гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов; наличие добровольного информированного согласия на использование биологического материала. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования представлена в табл. 1. Исследуемые группы не отличались по возрастному составу.

Анализ фенотипа клеток

Венозную кровь забирали из локтевой вены (утром, натощак) объемом 2 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см³) по стандартной методике [38]. Затем РВМС дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2 мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Фенотип клеток (1×10^6 клеток в пробе) анализировали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре “CytoFlex S” (BeckmanCoulter, США) с использованием программы “CytExpert 2.0” (BeckmanCoulter, США). Окрашивание моноклональными антителами проводили согласно инструкции производителя (табл. 2). Анализировали не менее 100 000 событий в каждой пробе. Для уменьшения неспецифического связывания и адгезии клеток окрашивание проводили в ФСБ, содержащем 2 мМ ЭДТА и 0.1% БСА, без использования консервантов. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие изотипические и негативные контроли. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1. В гейте РВМС оценивали: общее количество (total) NK-клеток как процент CD56⁺-клеток в гейте CD3/CD14/CD19-негативных мононуклеаров [39]. Субпопуляции NK определяли по коэкспрессии молекул CD56 и CD16 в гейте CD3/CD14/CD19 негативных мононуклеаров: регуляторные (regulatory) NK – CD16[–]CD56^{bright}, цитотоксические (cytotoxic) NK – CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁺CD56[–] [17]. Общее количество (total) NKT оценивали как процент CD56⁺-клеток в гейте

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител

Моноклональные антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Компания-производитель
Live/Dead	Zombie UV™			BioLegend
CD3	APC/Cy7	UCHT1	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD14	PE	M5E2	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend
CD19	PE	H1B19	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 605™	HCD56	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD16	FITC	3G8	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Tim-3 (CD366)	APC	F38-2E2	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
CD9	PerCP/Cyanine5.5	HI9a	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Изотипический контроль	APC	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend
Изотипический контроль	PerCP/Cyanine5.5	MOPC-21	Mouse/IgG1, κ	BioLegend

Примечание: страна-производитель всех моноклональных антител – США.

CD3⁺-лимфоцитов; регуляторные NKT – как процент CD16⁺CD56⁺, а цитотоксические NKT – как процент CD16⁺CD56⁺-клеток в гейте CD3⁺лимфоцитов (рис. 1) [40]. Экспрессию молекул Tim-3, CD9 изучали на разных субпопуляциях NK и NKT (рис. 1).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы Prism 8.0.1. Нормальность распределения оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Для анализа статистической значимости различий использовали *t*-тест для независимых выборок. Взаимосвязь признаков оценивали, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона (*r*). При множественных сравнениях использовали однофакторный или многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Бонферрони. Данные в рисунках представлены в виде среднего значения (*Mean*) и стандартной ошибки среднего (*SEM*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия Tim-3, CD9 на NK периферической крови в I и III триместрах беременности

Установлено, что общее число NK-клеток периферической крови в I триместре беременности не менялось, а в III триместре снижалось по сравнению с небеременными женщинами (рис. 2а). Анализ субпопуляционного состава NK периферической крови показывает, что уменьшение общего числа NK-клеток связано со снижением количества цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK в III триместре беременности. Следует отметить, что цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK преобладают среди NK периферической крови [9]. При этом количество цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK в III триместре снижалось и по сравнению с небеременными и с I триместром. Показано, что среди цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK присутствует субпопуляция CD16⁺CD56⁻NK (рис. 1а, 2а), которая характеризуется как цитотоксические истощенные NK со сниженной функциональной активностью [5–7]. Процент CD16⁺CD56⁻NK достоверно не изменялся по триместрам бере-

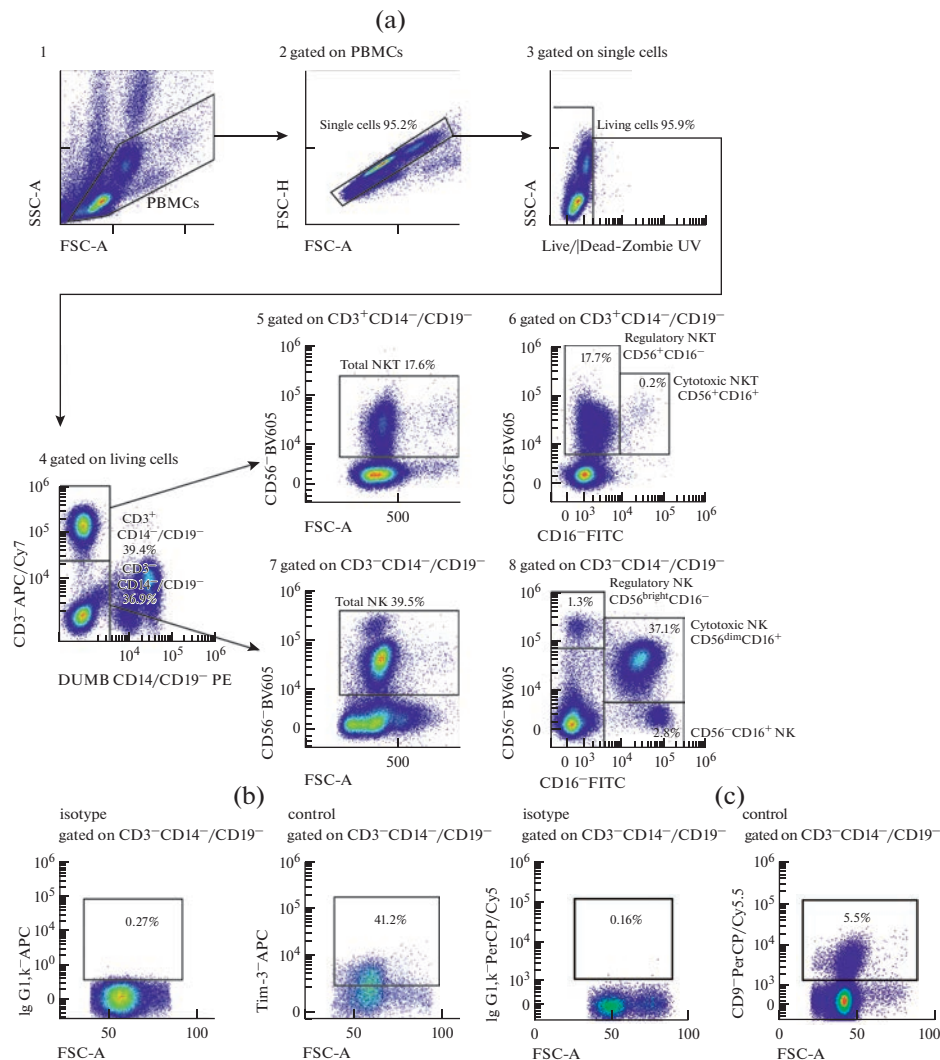


Рис. 1. Стратегия гейтирования NK и NKT периферической крови. (a) 1 — выделение гейта PBMC по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; 2 — дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/FSC-H); 3 — определение живых клеток LIVE/DEAD-ZOMBIE UV окрашиванием, 4 — выделение популяций CD3⁺ и CD3⁺-клеток в PBMC гейте, 5 — определение общего количества (total) NKT как процента CD56⁺-клеток в гейте CD3⁺-лимфоцитов; 6 — выделение регуляторной субпопуляции (regulatory) NKT как процента CD16⁻CD56⁺ и цитотоксической субпопуляции (cytotoxic) NKT как процента CD16⁺CD56⁺ клеток в гейте CD3⁺-лимфоцитов; 7 — определение общего количества (total) NK как процента CD56⁺-клеток в гейте CD3/CD14/CD19-негативных PBMC; 8 — определение регуляторной субпопуляции (regulatory) NK как процента CD16⁻CD56^{bright} и цитотоксических субпопуляций (cytotoxic) NK как процента CD16⁺CD56^{dim} и CD16⁺CD56⁻ в гейте CD3/CD14/CD19-негативных PBMC; (b, c) — оценка неспецифического связывания с использованием соответствующих изотипических MKA (isotype) для определения уровня экспрессии молекул Tim-3, CD9. На рис. 1 представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента.

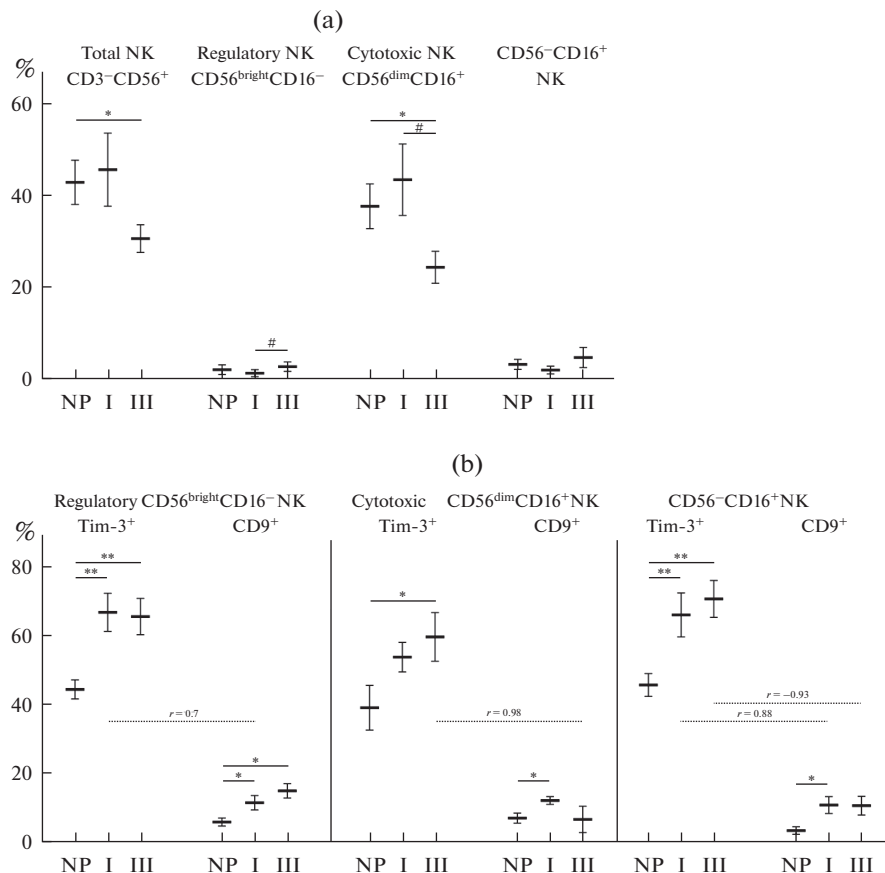


Рис. 2. Оценка (а) общего количества (total) NK (CD3⁺CD56⁺) и субпопуляций NK: цитотоксической (cytotoxic) (CD16⁺CD56^{dim}NK), регуляторной (regulatory) (CD16⁻CD56^{bright}NK) и CD16⁺CD56⁻NK. (б) — оценка экспрессии молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических (cytotoxic) (CD16⁺CD56^{dim}NK), регуляторных (regulatory) (CD16⁻CD56^{bright} NK) и CD16⁺CD56⁻NK в I и III триместрах беременности. *Примечание:* На рис. 2а и 2б данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартной ошибки среднего ($Mean \pm SEM$); I — I триместр беременности, III — III триместр беременности; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по t -тесту для независимых выборок по отношению к группе небеременных (NP); # $p < 0.05$ по отношению к I триместру, r — коэффициент корреляции Пирсона.

менности (рис. 2а). Количество регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK в I триместре не отличалось от небеременных, но в III триместре их процент увеличивался по сравнению с I триместром (рис. 2а).

Экспрессия Tim-3 усиливалась в I триместре на регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK, цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, но на последних недостоверно (рис. 2б), тогда как в III триместре экспрессия Tim-3 была повышена на всех субпопуляциях NK по сравнению с небеременными.

Экспрессия CD9 также менялась по триместрам беременности. Процент регуляторных CD9-позитивных CD16⁻CD56^{bright}NK был выше и в I, и в III триместрах по

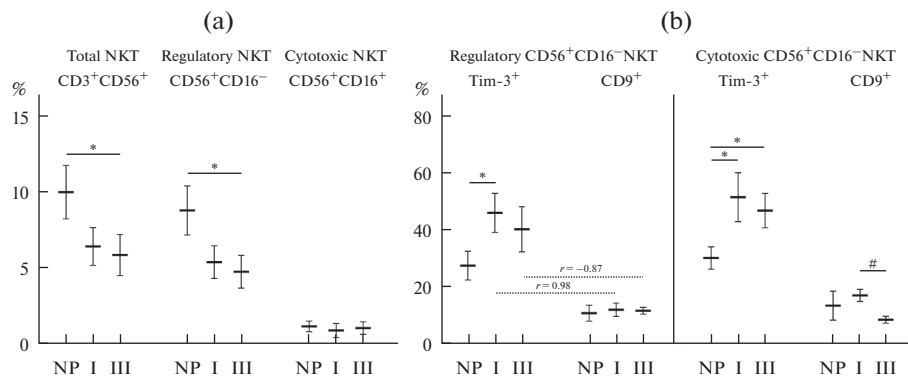


Рис. 3. Оценка (а) общего количества (total) NKT (CD3⁺CD56⁺) и субпопуляций NKT: цитотоксической (cytotoxic) (CD16⁺CD56⁺ NKT), регуляторной (regulatory) (CD16⁻CD56⁺ NKT). (б) – оценка экспрессия молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических (cytotoxic) (CD16⁺CD56⁺ NKT), регуляторных (regulatory) (CD16⁻CD56⁺ NKT) в I и III триместрах беременности. *Примечание:* На рис. 3а и 3б данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартной ошибки среднего (Mean $\pm$ SEM); I – I триместр беременности, III – III триместр беременности; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по t -тесту для независимых выборок по отношению к группе небеременных (NP); # $p < 0.05$ по отношению к I триместру, r – коэффициент корреляции Пирсона.

сравнению с небеременными (рис. 2б). На цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16⁺CD56⁻NK экспрессия CD9 была повышена в I триместре по сравнению с небеременными (рис. 3а, б). В III триместре экспрессия CD9 на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK снижалась по сравнению с I триместром, а на CD16⁺CD56⁻NK сохранялась повышенной, хотя и не отличалась достоверно от небеременных.

По данным корреляционного анализа экспрессия CD9 прямо коррелировала с присутствием Tim-3 на регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK ($r = 0.7$; $p < 0.05$) и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK ($r = 0.88$; $p < 0.05$) у беременных в I триместре. Выявленная корреляция свидетельствует о возможной взаимосвязи экспрессии этих молекул для субпопуляций NK с низкой цитотоксической активностью. А в III триместре экспрессия CD9 имела обратную зависимость с присутствием Tim-3 на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.98$; $p < 0.05$) и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK ($r = -0.93$; $p < 0.05$), что, по-видимому, связано с ограничением миграционной активности Tim-3⁺ цитотоксических NK.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в ранние сроки беременности увеличивается экспрессия молекул Tim-3, CD9 на цитотоксических и регуляторных NK периферической крови, тогда как их общее количество и соотношение не изменяется. В поздние сроки беременности общее количество NK снижается за счет уменьшения числа цитотоксических клеток, а процент регуляторных NK увеличивается, как и экспрессия CD9 на них. Экспрессия Tim-3 остается повышенной и на цитотоксических, и на регуляторных NK.

Экспрессия Tim-3, CD9 на NKT периферической крови в I и III триместрах беременности

Общее количество CD56⁺NKT в I триместре не отличалось от небеременных, а в III триместре процент CD56⁺NKT достоверно снижался (рис. 3а). Число регуля-

торных CD16⁻CD56⁺NKT изменялось аналогично общему количеству NKT (рис. 3а). Следует отметить, что в отличие от НК, в популяции NKT периферической крови преобладают регуляторные CD16⁻CD56⁺NKT. Количество цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT было сравнимо с небеременными и в I, и в III триместрах беременности (рис. 3а).

Экспрессия Tim-3 увеличивалась в I триместре на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT и на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT, а в III триместре беременности только на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT (рис. 3б). Экспрессия CD9 как на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT, так и на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT не отличалась от небеременных, но в III триместре она снижалась на цитотоксических CD16⁺CD56⁺NKT по сравнению с I триместром (рис. 3б). При этом в I триместре беременности экспрессия CD9 прямо коррелировала с количеством Tim-3 на регуляторных CD16⁻CD56⁺NKT ($r = 0.98$; $p < 0.05$), однако в III триместре, напротив, была выявлена обратная зависимость ($r = -0.87$; $p < 0.05$).

Таким образом, в I триместре беременности количество и соотношение разных субпопуляций NKT не изменялись, а экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NKT. В III триместре беременности общее количество NKT уменьшалось за счет снижения процента регуляторных NKT, а процент цитотоксических NKT не изменялся, но экспрессия Tim-3 на них увеличивалась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При физиологически протекающей беременности количество и функциональная активность НК и NKT периферической крови существенно меняются, что обусловлено изменением гормонально-цитокинового фона и необходимо для изменения иммунореактивности организма матери с целью сохранения и развития полуживотного плода [1, 25, 28]. В матке нарастает количество регуляторных НК и NKT, которые являются ведущими эффекторами иммунной толерантности в зоне фето-плацентарного контакта и выполняют фетотрофическую функцию, модулируют рост спиральных артерий [1, 25, 28]. Децидуальные НК и NKT характеризуются высокой экспрессией молекул Tim-3, CD9, которые играют критическую роль в регуляции их функций [12–19]. Tim-3-сигналинг на НК угнетает их дегрануляцию, цитотоксичность, моделирует продукцию цитокинов [14, 41]. Экспрессия CD9 необходима для взаимодействия с клетками эндотелия и трансэндотелиальной миграции, но также ограничивает дегрануляцию и влияет на продукцию цитокинов [19]. В поздние сроки физиологически протекающей беременности количество децидуальных НК и NKT снижается, а изменения иммунореактивности организма матери связаны с подготовкой к родам [42]. Учитывая критическую роль Tim-3 и CD9 в регуляции функций НК и NKT, а также возможность пополнения децидуальной популяции лимфоцитов клетками периферической крови, важно изучить экспрессию Tim-3, CD9 на цитотоксических и регуляторных периферических НК и NKT в разные сроки беременности.

В проведенном исследовании установлено, что в I триместре физиологически протекающей беременности общее количество и соотношение регуляторных и цитотоксических НК и NKT в периферической крови не менялось. Но экспрессия Tim-3 увеличивалась на регуляторных и цитотоксических NKT, регуляторных CD16⁻CD56^{bright}NK и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁻NK, кроме цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Однако процент Tim-3⁺CD16⁺CD56^{dim}NK также увеличивался в I триместре, хотя и недостоверно. Повышение экспрессии Tim-3 на всех изученных субпопуляциях НК и NKT в I триместре согласуется с угнетением их цитотоксической активности и изменением спектра продуцируемых цитокинов

(снижение выработки IFN-gamma, увеличение секреции IL-4), что характерно для ранних сроков беременности [28–30]. Сходные закономерности экспрессии Tim-3 на периферических CD56⁺NK описаны в ранние сроки беременности и другими авторами [14, 41]. Следует отметить, что именно регуляторная субпопуляция NKT периферической крови способна к быстрой и массивной продукции поляризующих цитокинов, направляющих развитие иммунного ответа по клеточноопосредованному или гуморальному типу [28–30]. Можно полагать, что увеличение экспрессии Tim-3 на них является одним из потенциальных механизмов, регулирующих продукцию IFN-gamma в ранние сроки беременности, хотя данные механизмы для NKT не исследованы [28–30].

В нашей работе показано, что экспрессия CD9 в ранние сроки беременности повышалась на всех типах NK и не менялась на NKT. Увеличение экспрессии CD9 на регуляторных NK находилось в прямой зависимости от присутствия Tim-3, что, по-видимому, раскрывает один из потенциальных механизмов, способствующих миграции периферических CD16[–]CD56^{bright}NK с низкой цитотоксической активностью в матку на ранних сроках беременности. Децидуальные NK характеризуются коэкспрессией Tim-3 и CD9 [20]. Увеличение экспрессии CD9 в сочетании с Tim-3 на цитотоксических NK, по-видимому, в большей мере ассоциировано с угнетением их цитотоксической активности и, возможно, миграцией во вторичные лимфоидные органы [43]. Отсутствие изменений в экспрессии CD9 на NKT в ранние сроки беременности связано, по-видимому, с их ограниченной способностью к миграции. Однако выявленная прямая корреляция между присутствием CD9 и Tim-3 на регуляторных NKT свидетельствует о взаимосвязи экспрессии этих молекул на клетках с ограниченной цитотоксичностью.

Таким образом, можно полагать, что увеличение экспрессии CD9 и Tim-3 на NK-клетках и Tim-3 на NKT периферической крови в I триместре физиологически протекающей беременности играет важную в регуляции их функциональной активности, а именно является одним из механизмов снижения их цитотоксичности, модулирует продукцию цитокинов, определяет миграцию регуляторных CD56^{bright}CD16[–]NK в матку [14, 41].

В III триместре физиологически протекающей беременности общее количество NK и NKT снижалось, причем для популяции NK за счет уменьшения числа цитотоксических CD56^{dim}CD16⁺NK, а среди NKT снижался процент регуляторных CD56⁺CD16⁺NKT. Количество же регуляторных CD56^{bright}CD16[–]NK, напротив, увеличивалось. Экспрессия Tim-3 усиливалась на всех субпопуляциях NK и цитотоксических NKT, а CD9 повышалась только на регуляторных NK.

Снижение количества цитотоксических CD56^{dim}CD16⁺NK при увеличении экспрессии Tim-3 на них, а также на цитотоксических NKT в поздние сроки беременности, по-видимому, является одним из механизмов системного угнетения цитотоксической активности клеток крови при беременности [8, 44, 45] и может быть обусловлено действием гормонов, продуцируемых плацентой. Так, прогестерон, концентрация которого нарастает к концу беременности, усиливает апоптоз NK-клеток [46]. Необходимо отметить, что цитотоксические NK обладают наибольшей экспрессией рецепторов к прогестерону в отличие от регуляторных [41, 46]. Можно полагать, что экспрессия Tim-3 на NK и NKT периферической крови усиливается под влиянием прогестерона, концентрация которого нарастает к концу беременности, поскольку в ряде экспериментальных работ выявлена зависимость экспрессии Tim-3 на CD56⁺NK и CD56⁺NKT периферической крови от эффектов прогестерона [34]. Экспрессия Tim-3 повышает чувствительность к апоптозу, что также может объяснять снижение количества NK и NKT периферической крови в III триместре беременности [16]. Однако и другие гормоны, продуцируе-

мые плацентой, а также цитокины влияют на функциональную активность НК и НКТ периферической крови. Показана прямая зависимость присутствия Tim-3 на CD56⁺NK от увеличения концентрации TGF-1beta [14, 41]. Другими авторами установлено, что белки беременности, продуцируемые трофобластом, модулируют экспрессию Tim-3 и CD9 на периферических НК [20]. В наших предыдущих исследованиях показано, что инкубация НК периферической крови человека *in vitro* с гормонами, продуцируемыми плацентой (эстрадиол, эстриол, прогестерон, хорионический гонадотропин, лептин, грелин, кисспептин), в концентрациях, характерных для разных триместров беременности, оказывала значимые модулирующие эффекты на экспрессию CD16, молекул клеточной адгезии, продукцию перфорина и гранзима, цитокинов, а также регуляторных микроРНК [46–48]. Экспрессия CD9 на цитотоксических НК в поздние сроки не отличалась от небеременных и имела обратную зависимость с присутствием Tim-3, что, по-видимому, связано с ограничением миграционной активности Tim-3⁺ цитотоксических НК.

Увеличение количества регуляторных НК также может быть обусловлено трансформирующим действием гормонов беременности и иммуносупрессорных цитокинов (TGF-1beta, IL-10), способствующих приобретению децидуально-подобного фенотипа НК-клетками [47–49]. Повышенная экспрессия Tim-3 и CD9 сохранялась на регуляторных НК периферической крови в поздние сроки беременности, что, по-видимому, в большей степени ассоциировано с ограничением дегрануляции и регуляцией продукцией цитокинов, чем с миграцией в матку [50]. Так, в единичных работах показано, что секреция IL-2 была снижена у Tim-3⁺CD56^{dim}NK по сравнению с Tim-3⁺CD56^{dim}NK, тогда как Tim-3⁺CD56^{bright}NK продуцировали больше INF-gamma, чем Tim-3⁺CD56^{bright}NK [41]. В III триместре экспрессия CD9 на всех исследуемых субпопуляциях НК (кроме регуляторных) и НКТ не отличалась от небеременных, что, по-видимому, характеризует уменьшение их миграционной активности и согласуется с данными литературы о том, что максимальное количество децидуальных НК и НКТ регистрируется в I триместре беременности, а далее их количество снижается [50].

Цитотоксические истощенные CD16⁺CD56⁻NK присутствуют в периферической крови небеременных, и их процент достоверно не менялся ни в I, ни в III триместрах физиологически протекающей беременности. Экспрессия Tim-3 на них была повышена как в I, так и в III триместрах беременности, а CD9 только в ранние сроки. Функции CD16⁺CD56⁻NK при физиологической беременности требуют дальнейшего изучения.

Снижение общего количества периферических НКТ в III триместре беременности происходит за счет уменьшения числа регуляторных НКТ, которые преобладают над цитотоксическими, процент которых не меняется. Уменьшение числа регуляторных НКТ может объясняться стероид-зависимым угнетением продуктивной функции тимуса, где проходит дифференцировка НКТ, следствием чего является характерная для беременности лимфопения [51]. Динамика субпопуляций регуляторных CD56⁺CD16⁻НКТ и цитотоксических CD56⁺CD16⁺НКТ по триместрам физиологической беременности не изучена. В единичных работах описано изменение количества активированных CD8⁺CD56⁺НКТ в периферической крови в III триместре беременности [39] и снижение общего количества CD56⁺НКТ [44]. Повышенная экспрессия Tim-3 сохранялась на цитотоксических CD56⁺CD16⁺НКТ, процент которых не изменялся, что, по-видимому, связано с ограничением их цитотоксической активности.

Таким образом, экспрессия молекул Tim-3 и CD9 на разных субпопуляциях НК и НКТ менялась по триместрам, что играет важную роль в регуляции их фенотипа и функций при беременности. Следует отметить, что экспрессия CD9 и Tim-3 ха-

рактеризует приобретение децидуально-подобного проангиогенного фенотипа NK клетками, свойственного и для NK в опухолевом микроокружении, где ведущую роль в трансформации фенотипа играют иммуносупрессорные цитокины TGF- β и IL-10 [43, 52, 53].

В целом, можно заключить, что экспрессия изученных молекул на регуляторных и цитотоксических популяциях NK и NKT периферической крови меняется по триместрам беременности, что дополняет наше понимание механизмов регуляции фенотипа и функций NK и NKT периферической крови. Модуляция экспрессии исследованных молекул на NK и NKT периферической крови представляет один из потенциальных терапевтических подходов в регуляции функций NK и NKT для повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий, а при онкологических заболеваниях необходима для восстановления цитотоксической функции клеток.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (протокол № 16 от 5.06.2022 г.) и проведено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00694).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Г.О. и С.В.Ш.), сбор данных (О.А.Л.; Н.В.К.; О.Л.Г.), обработка данных (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г.), написание и редактирование манускрипта (Е.Г.О.; О.А.Л.; Н.В.К.; О.Л.Г.; С.В.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A* (2008) The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 77(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.04.007>
2. *Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Pashangzadeh S, Motalebnezhad M* (2022) Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol Res Pract* 238: 154062. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154062>
3. *Di Santo JP* (2008) Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 38(11): 2948–2951. <https://doi.org/10.1002/eji.200838830>
4. *Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Santema J, Faas MM* (2002) Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 77(5): 1032–1037. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)02976-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)02976-x)
5. *Wijaya RS, Read SA, Schibeci S, Han S, Azardaryany MK, van der Poorten D, Lin R, Yuen L, Lam V, Douglas MW, George J, Ahlenstiel G.* (2021). Expansion of dysfunctional CD56⁺CD16⁺ NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver Int: Offic J Int Associat Study Liver*, 41(5): 969–981. <https://doi.org/10.1111/liv.14784>
6. *Orrantia A, Terrén I, Izquierdo-Lafuente A, Alonso-Cabrera JA, Sandá V, Vitallé J, Moreno S, Tassias M, Uranga A, González C, Mateos JJ, García-Ruiz JC, Zenarruzabeitia O, Borrego F* (2020) A NKp80-Based Identification Strategy Reveals that CD56neg NK Cells Are Not Completely

- Dysfunctional in Health and Disease. *Science* 23(7): 101298.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101298>
7. Cocker ATH, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P (2022) CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. *Front Immunol* 13: 992723.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.992723>
 8. Whettlock EM, Woon EV, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V (2022) Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy. *Front Immunol* 13: 880438.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880438>
 9. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL (2003) Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 198(8): 1201–1212.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030305>
 10. Михайлова ВА, Белякова КЛ, Сельков СА, Соколов ДИ (2017) Особенности дифференцировки NK-клеток: CD56dim и CD56bright NK-клетки во время и вне беременности. *Мед иммунол* 19(1): 19–26. [Mikhailova VA, Belyakova KL, Selkov SA, Sokolov DI (2017) Features of NK cell differentiation: CD56dim and CD56bright NK cells during and outside pregnancy. *Med Immunol* 19(1): 19–26. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>
 11. Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, Bukina E (2014) Interaction of decidual CD56⁺ NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scand J Immunol* 80(3): 198–208.
<https://doi.org/10.1111/sji.12196>
 12. Du X, Zhu H, Jiao D, Nian Z, Zhang J, Zhou Y, Zheng X, Tong X, Wei H, Fu B (2022) Human-induced CD49a⁺ NK Cells promote fetal growth. *Front Immunol* 13: 821542.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.821542>
 13. Khademi M, Illés Z, Gielen AW, Marta M, Takazawa N, Baecher-Allan C, Brundin L, Hannerz J, Martin C, Harris RA, Hafler DA, Kuchroo VK, Olsson T, Piehl F, Wallström ET (2004) Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172(11): 7169–7176.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.7169>
 14. Sun J, Yang M, Ban Y, Gao W, Song B, Wang Y, Zhang Y, Shao Q, Kong B, Qu X (2016) Tim-3 Is upregulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PLoS One* 11(1): e0147186.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147186>
 15. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6(12): 1245–1252.
<https://doi.org/10.1038/ni1271>
 16. Hou H, Liu W, Wu S, Lu Y, Peng J, Zhu Y, Lu Y, Wang F, Sun Z (2014) Tim-3 negatively mediates natural killer cell function in LPS-induced endotoxic shock. *PLoS One* 9(10): e110585.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110585>
 17. Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, Totsimon A, Illes Z, Szereday L, Miko E (2015). Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta* 36(10): 1153–1160.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.07.124>
 18. Cerdeira AS, Rajakumar A, Royle CM, Lo A, Husain Z, Thadhani RI, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Kopcow HD (2013). Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J Immunol* (Baltimore, Md: 1950), 190(8): 3939–3948.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202582>
 19. Reyes R, Cardenas B, Machado-Pineda Y, Cabañas C (2018) Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 9: 863.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00863>
 20. Lee CL, Vijayan M, Wang X, Lam KKW, Koistinen H, Seppala M, Li RHW, Ng EHY, Yeung WSB, Chiu PCN (2019) Glycodelin-A stimulates the conversion of human peripheral blood CD16-CD56bright NK cell to a decidual NK cell-like phenotype. *Hum Reprod* 34(4): 689–701.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dey378>
 21. Орлова ЕГ, Логинова ОА, Горбунова ОЛ, Каримова НВ, Ширишев СВ (2022) Особенности экспрессии молекул Tim-3, CD9, CD49a лимфоцитами периферической крови при физиологической беременности. [Электронный ресурс] *Вестн уральской мед акад науки* 19(5): 461–473. [Orlova EG, Loginova OA, Gorbunova OL, Karimova NV, Shirshov SV (2022) Features of TIM-3, CD9, CD49a molecule expressions by peripheral blood lymphocytes during physiological pregnancy. [Online] *Vestn Ural Med Akad Nauki* 19(5): 461–473. (In Russ)].
<https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-5-461-473>

22. Moore T, Dveksler GS (2014) Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int J Dev Biol* 58(2–4): 273–280.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.130329gd>
23. Kronenberg M, Gapin L (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2: 557–568.
<https://doi.org/dx.doi.org/10.1038/nri854>
24. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺CD16⁺CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺CD25 high regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 62(3): 297–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x>
25. Yuan J, Li J, Huang SY, Sun X (2015) Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 110: 81–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.05.001>
26. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L (2004) NKT cells: what's in a name? *Nature Rev Immunol* 4(3): 231–237.
<https://doi.org/10.1038/nri1309>
27. Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CWG, Sargent IL (2005) Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and preeclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur J Immunol* 35: 3054–3063.
<https://doi.org/10.1002/eji.200425929>
28. Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, Schatz F, Masch R, Wilson SB, Strominger JL (2002) CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9(21): 13741–13746.
<https://doi.org/10.1073/pnas.162491699>
29. Shi Y, Ling B, Zhou Y, Gao T, Feng D, Xiao M, Feng L (2007) Interferon-gamma expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cell Mol Immunol* 4(5): 389–394.
30. Southcombe J, Redman C, Sargent I (2010) Peripheral blood invariant natural killer T cells throughout pregnancy and in preeclamptic women. *J Reprod Immunol* 87(1–2): 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.07.003>
31. Van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK, Clark DA (2007) Decline in number of elevated blood CD3⁺CD56⁺ NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 58(5): 447–459.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00529.x>
32. Hosseini S, Shokri F, Pour SA, Khoshnoodi J, Jeddi-Tehrani M, Zarnani AH (2019) Diminished frequency of menstrual and peripheral blood NKT-like cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and infertile women. *Reprod Sci* 26(1): 97–108.
<https://doi.org/10.1177/1933719118766261>
33. Ito K, Karasawa M, Kawano T, Akasaka T, Koseki H, Akutsu Y, Kondo E, Sekiya S, Sekikawa K, Harada M, Yamashita M, Nakayama T, Taniguchi M (2000) Involvement of decidual Vα14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 740–744.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.740>
34. Lajko A, Meggyes M, Polgar B, Szereday L (2018) The immunological effect of Galectin-9/TIM-3 pathway after low dose Mifepristone treatment in mice at 14.5 day of pregnancy. *PLoS One* 13(3): e0194870.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194870>
35. Trittel S, Vashist N, Ebensen T, Chambers BJ, Guzmán CA, Riese P (2019) Invariant NKT cell-mediated modulation of ILC1s as a tool for mucosal immune intervention. *Front Immunol* 10: 1849.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01849>
36. Шупруев СВ (2009) Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург. УрО РАН. [Shirshov SV (2009) Immunology of maternal-fetal interactions. Ekaterinburg. (In Russ)].
37. Szekeres-Bartho J (2009) Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* (5): 873–882. PMID: <https://doi.org/10.2217/imt.09.5420636029>
38. Gutierrez C (1979) Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Methods* 29(1): 57–63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(79\)90125-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(79)90125-x)
39. De Andrés C, Fernández-Paredes L, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Ramos-Medina R, Sánchez-Ramón S (2017) Activation of Blood CD3⁺CD56⁺CD8⁺ T cells during pregnancy and multiple sclerosis. *Front Immunol* 8: 196.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00196>
40. Zhou J, Zhao X, Wang Z, Wang J, Sun H, Hu Y (2013) High circulating CD3⁺CD56⁺CD16⁺ natural killer-like T cell levels predict a better IVF treatment outcome. *J Reprod Immunol* 97(2): 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.12.006>

41. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z, Szereday L (2014) Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One* 9(3): e92371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371>
42. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN (2009) Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 82(1): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.001>
43. Gemelli M, Noonan DM, Carlini V, Pelosi G, Barberis M, Ricotta R, Albini A (2022) Overcoming resistance to checkpoint Inhibitors: natural killer cells in non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 12: 886440. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.886440>
44. Meggyes M, Nagy DU, Saad Al Deen I, Parkanyi B, Szereday L (2023) CD8⁺ and CD8[−] NKT cells exhibit phenotypic changes during pregnancy. *Immunol Invest* 52(1): 35–57. <https://doi.org/10.1080/08820139.2022.2119863>
45. Mikhailova VA, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, Milyutina YP, Demidova ES, Panina AN, Bazhenov DO, Belikova ME, Selkov SA, Sokolov DI (2020) Trophoblast cell influence on peripheral blood natural killer cell proliferation and phenotype in non-pregnant women and women in early pregnancy. *Immunobiology* 225(3): 151910. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151910>
46. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L (2008) NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J Immunol* 180(8): 5746–5753. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>
47. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG (2017) Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Dokl Biol Sci* 472(1): 28–30. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>
48. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG, Maslennikova IL (2017) MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function. *Dokl Biochem Biophys* 474(1): 168–172. <https://doi.org/10.1134/S160767291703005X>
49. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, Davydova A, Salloum Z, Tyshchuk E, Zagainova V, Markova K, Kogan I, Selkov S, Sokolov D (2022) Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Context of NK Cell-Trophoblast Interactions. *Int J Mol Sci* 23(4): 2387. <https://doi.org/10.3390/ijms23042387>
50. Van den Heuvel MJ, Chantakru S, Xuemei X, Evans SS, Tekpetey F, Mote PA, Clarke CL, Croy BA (2005) Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 34(3): 273–293. <https://doi.org/10.1081/imm-200064488>
51. Shinomiya N, Tsuru S, Tsugita M, Katsura Y, Takemura T, Roku-tanda M, Nomoto K (1991) Thymic depletion in pregnancy: kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts. *J Clin Lab Immunol* 34: 11–22.
52. Montaldo E, Vacca P, Chiossone L, Croxatto D, Loiacono F, Martini S, Ferrero S, Walzer T, Moretta L, Mingari MC (2016) Unique comes(+) NK cell subsets are present in uterus and decidua during early pregnancy. *Front Immunol* 6: 646. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00646>
53. Albini A, Gallazzi M, Palano MT, Carlini V, Ricotta R, Bruno A, Stetler-Stevenson WG, Noonan DM (2021) TIMP1 and TIMP2 downregulate TGFβ induced decidual-like phenotype in natural killer cells. *Cancers (Basel)* 13(19): 4955. <https://doi.org/10.3390/cancers13194955>

Tim-3, CD9 Molecule Expressions on Natural Killer (NK) and T-Lymphocytes with NK Functions (NKT) of the Peripheral Blood at Different Trimesters of Physiological Pregnancy

E. G. Orlova^{a, *}, O. A. Loginova^a, O. L. Gorbunova^a, N. V. Karimova^b, and S. V. Shirshov^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms RAS – Branch of Perm Federal Research Center UB RAS, Perm, Russia*

^b*LLC Centralized Clinical and Diagnostic Laboratory, Perm, Russia*

*e-mail: orlova_katy@mail.ru

Natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions (NKT) are the leading effectors of the mother's immune tolerance to a semi-allogeneic fetus and have a fetal trophic effect during physiological pregnancy. Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) and CD9 molecules play a critical role in the immunoregulatory and

fetal trophic functions of NK and NKT, but their expression in peripheral blood cells has not been studied. The aim of this work was to study the expression of Tim-3 and CD9 in peripheral blood NK and NKT during physiological pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of healthy women in I and III trimesters of a physiological pregnancy. The control group consisted of healthy non-pregnant women in the first phase of the menstrual cycle. Expression of Tim-3, CD9 molecules was analyzed by flow cytometry on regulatory NK ($CD16^{-}CD56^{bright}$) and NKT ($CD16^{-}CD56^{+}$), cytotoxic NK ($CD16^{+}CD56^{dim/-}$) and NKT ($CD16^{+}CD56^{+}$). It was found that in the first trimester of pregnancy, the total number and subpopulation composition of NK and NKT cells did not change. Tim-3 expression increased in all NK and NKT subpopulations, except for cytotoxic $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK. CD9 expression increased in all NK subpopulations, but in NKT did not differ from non-pregnant. At the same time, a direct correlation between CD9 and Tim-3 expressions was revealed in regulatory NK and NKT in the first trimester of pregnancy. In the third trimester, the regulatory $CD16^{-}CD56^{bright}$ NK number increased, while cytotoxic $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK and regulatory $CD16^{-}CD56^{+}$ NKT decreased compared to non-pregnant women. The number of $CD16^{+}CD56^{-}$ NK did not change in I and III trimesters of a physiological pregnancy. Tim-3 expression was upregulated in all NK and cytotoxic NKT subpopulations, while CD9 was upregulated only in regulatory NKs. Thus, Tim-3 and CD9 molecule expressions of s on different NK and NKT subpopulations changed during I and III trimesters of a physiological pregnancy, which plays an important role in the regulation of their phenotype and functions.

Keywords: natural killers, T-lymphocytes with natural killer functions, Tim-3, CD9, pregnancy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА НА P2-СИГНАЛИЗАЦИЮ
В ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ**

© 2023 г. А. Е. Хайруллин^{1, 2, *}, Д. В. Ефимова¹, А. А. Еремеев²,
Д. Э. Сабирова², С. Н. Гришин¹, А. У. Зиганшин¹

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: khajrulli@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Известно, что в спинальных мотонейронах после поражения верхнего уровня спинного мозга происходит деградация нейронов, сопровождающаяся дегенерацией аксонов. В настоящем исследовании функциональная целостность нервно-мышечной передачи оценивалась методом стимуляционной механомиографии. Мы продемонстрировали снижение модулирующей активности АТФ в холинергическом синапсе вследствие травмы спинного мозга (модель контузионной травмы спинного мозга) в сравнении с гиподинамией (модель антиортостатического вывешивания задних конечностей). Продемонстрированная аномальная модуляция пуринами нервно-мышечного перехода предоставляет доказательства дегенерации аксонов и предполагает, что транссинаптическая дегенерация двигательных нейронов может происходить ниже уровня поражения спинного мозга у пациентов с подобными травмами.

Ключевые слова: денервация, АТФ, P2-рецепторы, скелетные мышцы, гипогравитационный двигательный синдром, травматический двигательный синдром, синапс, сурамин

DOI: 10.31857/S0869813923050059, **EDN:** XQROOK

ВВЕДЕНИЕ

Обзор исследований, рассматривающих изменения в двигательных единицах вследствие действия различных повреждающих факторов, позволяет утверждать, что преобразования в количестве и балансе возбуждающих и тормозных сигналов после травмы спинного мозга реорганизуют управление мотонейронами. Похоже, что изменения в ретроградной сигнализации наряду с событиями в проксимальном участке аксона информируют тело мотонейрона о дистально расположенном повреждении, чтобы активировать сложный клеточный ответ, который в конечном итоге направлен либо на регенерацию, либо, в некоторых случаях, на гибель клеток [1, 2].

Повреждения спинного мозга человека, происходящие обычно на шейном и грудном уровнях, приводят к прерыванию нисходящих путей к нижним двигательным нейронам [3] и к значительным функциональным и морфологическим нарушениям двигательных единиц, расположенных каудальнее места повреждения [4, 5]. В ряде исследований была показана посттравматическая выживаемость мотонейронов [6, 7], но структурные изменения их синаптических контактов с мышцами,

вызванные глубокой потерей активности, до сих пор остаются малоизученными. Восстановление после травм спинного мозга требует не только восстановления связи между головным и спинным мозгом, но и стабилизации связей между двигательными нейронами и мышцами [4].

В ряде исследований было показано, что периферическая нервная система не остается интактной после травматического повреждения спинного мозга. С 60-х гг. прошлого столетия методом клинической электромиографии зарегистрировано наличие спонтанных потенциалов (фибрилляции и положительные острые волны) после травмы спинного мозга у человека [8], что в дальнейшем более подробно было описано на животных моделях [9].

При моделировании экспериментальной травмы спинного мозга также наблюдались изменения морфофункционального состояния скелетных мышц, подобные постденервационным [10], к примеру, снижение мембранных потенциалов в покое, снижение мембранной резистентности, распространение ацетилхолиновых рецепторов (AChR) от области концевой пластинки, холинэргическая гиперчувствительность и гиперкалиемия при введении сукцинилхолина [5].

Существует несколько гипотез о том, чем можно объяснить такие результаты, одной из возможных причин может быть нарушение функции нервно-мышечного синапса. Существуют данные об изменении аксонального транспорта нескольких видов веществ, участвующих в синаптической передаче у крыс с травмой спинного мозга на грудном уровне [11], снижение транспорта ацетилхолина и холин-ацетилтрансферазы, при увеличении переноса ацетилхолинэстеразы. Дальнейшие дополнительные исследования позволили утверждать, что существует прямая связь между ожидаемым снижением синаптической передачи при травме спинного мозга и уменьшением плотности AChR за счет уменьшения их рециркуляции и синтеза [12, 13].

К тому же, зарегистрированное уменьшение амплитуды сокращений мышц указывает на потерю аксонов, которая может происходить из-за гибели тел нервных клеток в спинном мозге и в ганглиях задних корешков или из-за того, что эти нейроны, лишенные синаптических входов и импульсной активности после травмы спинного мозга, не могут поддерживать жизнеспособный аксон [14].

В дополнение к опосредованию (модуляторному действию) нейротрансмиссии, АТФ была идентифицирована как мощный передатчик астроцитарной кальциевой сигнализации [15, 16]. Астроциты высвобождают АТФ регулируемым путем, что приводит к распространению межклеточных волн проникновения кальция в цитозоль [17]. Астроцитарная кальциевая сигнализация, по-видимому, является общим механизмом, с помощью которого астроциты реагируют на различные стимулы, включая синаптическую активность, воздействие медиатора и травматическое повреждение [18]. В свою очередь, сигналы астроцитарного кальция передаются соседним нейронам, тем самым модулируя их синаптическую силу [19]. Этот АТФ-зависимый процесс распространения кальциевых волн происходит не только в головном мозге, где он лучше всего изучен *in situ*, но также и в паренхиме спинного мозга [20, 21], где он может играть роль в распространении местного повреждения.

Известно, что вследствие повреждения тканей высвобождается большое количество молекул АТФ, непосредственно участвующих в механизмах развития острого и хронического болевого синдрома, а также местного и генерализованного воспалительного процесса [22, 23]. При повреждении спинного мозга выброс АТФ увеличивается в перитравматических областях в течение более чем 6 ч [24].

Среди АТФ-чувствительных пуриnergических рецепторов рецептор P2X7 (P2X7R) необычен тем, что может образовывать большие макромолекулярные поры при повторяющемся или длительном воздействии высоких концентраций АТФ [25]. Роль этого рецептора особенно важна при спинальной травме, поскольку он обильно экспрессируется нейронами спинного мозга [24], которые, в свою очередь, реаги-

руют на АТФ чрезмерным возбуждением, за которым следует необратимое увеличение Ca^{2+} и, в конечном счете, гибель клеток.

Также известны провоспалительные эффекты активации P2X7R: высвобождение интерлейкинов (включая IL-113) [26], супероксида и активация каспазы [27], циклооксигеназы-2 и ФНО- α [28, 29].

На основании вышеизложенного, целью настоящего исследования было выбрано определение вовлеченности P2-сигнализации в нервно-мышечном синапсе на модели травмы спинного мозга и гиподинамии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали структуры опорно-двигательного аппарата тазовых конечностей, имеющие принципиальное значение в организации двигательной активности (морфофункционально различные: камбаловидная мышца, длинный разгибатель большого пальца ноги и диафрагма—соответствующие нервно-мышечные синапсы—соответствующие спинальные двигательные центры).

Не менее чем за неделю до начала и во время экспериментов каждую крысу размещали в отдельной специализированной клетке при комнатной температуре 23°C, с циклом свет/темнота: 12 ч/12 ч, с доступом к воде и пище *ad libitum*. Все экспериментальные воздействия осуществляли в одинаковое время суток.

В зависимости от решаемых исследовательских задач животные были разделены на следующие экспериментальные группы: группу с контузионной травмой спинного мозга (как модель ограничения центростремительной и центробежной сигнализации, сопровождающаяся ограничением функционального использования двигательного аппарата); группу с воздействием моделируемой гипогравитации (как модель ограничения действия осевой нагрузки и силы реакции опоры при сохранении нервных влияний и возможности сократительной активности мышцы). Идентичность каждой крысы в каждой экспериментальной группе оставалась закодированной до конца эксперимента и анализа данных.

Контузионную травму спинного мозга осуществляли по модифицированной методике Allen [30]. Под комбинированной внутримышечной анестезией с использованием золетила (Zoletil 50, “Virbac”, Франция), 0.5 мг/кг и ксилавета инъекционного (XylaVET, “Pharmamagist Ltd”, Венгрия) 0.5 мл/кг в асептических условиях осуществляли препарирование 7–8 грудных позвонков. Проводили ламинэктомию, после чего позвоночный канал оголялся, становился доступным для осмотра и манипуляций в нем, а твердая оболочка спинного мозга оставалась интактной. Затем устанавливали трубку высотой 20 см на корни дужек ламинэктомированного позвонка и опускали внутри нее груз массой 2.5 г с высоты 5 см. Падающий груз и трубку после нанесения удара сразу же удаляли. После операции всем животным вводили антибактериальный препарат энрофлон (0.1 мл, п/к), животных помещали в индивидуальные клетки, однократно подкожно вводили 5 мл 0.9%-ного раствора хлорида натрия. В течение первых суток осуществляли дополнительный обогрев. В послеоперационном периоде у животных с нарушением мочеиспускания механически опорожняли мочевой пузырь дважды в день до восстановления его функции.

Для дополнительного контроля экспериментов на модели контузионной травмы спинного мозга и исключения данных, которые могут быть получены при ограничении движений нижних конечностей, было принято решение провести дополнительные исследования в условиях моделируемой гипогравитации.

Для имитации гипогравитации была использована модель антиортостатического вывешивания задних конечностей крыс [31–33]. В такой экспериментальной модели сведены к минимуму влияния таких нежелательных побочных факторов, как фиксация и ограничение возможности перемещения в пространстве. Сохране-

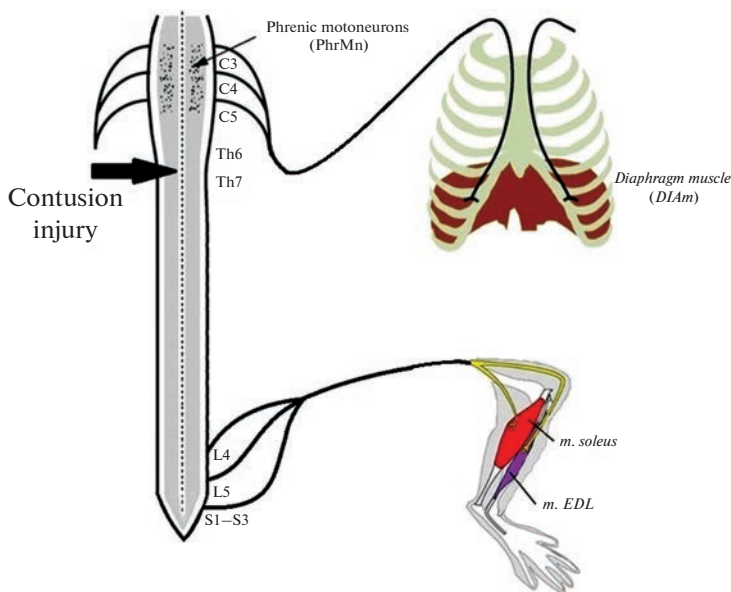


Рис. 1. Схема нанесения контузионной травмы.

ние подвижности благоприятно сказывается на общем состоянии животного, снижает беспокойство и агрессивность.

После проведения операции животных содержали в течение семи суток в одиночных клетках с водой и кормом *ad libitum*. После семисуточного восстановления животных предварительно наркотизировали, вводя внутривенно раствор этиминала натрия в дозе 40 мг/кг, обескровливали и выделяли *m. soleus*, *m. extensor digitorum longus*, *m. diaphragm* с культами нервов.

Выделенные мышцы, зафиксированные за оба сухожильных конца, погружали в небольшие резервуары объемом 10 мл, наполненные раствором Кребса (состав в мМ): NaCl – 118.0, KCl – 4.75, CaCl₂ – 2.5, NaHCO₃ – 24.8, KH₂PO₄ – 1.18, MgSO₄·7H₂O – 1.18, глюкоза – 11, pH 7.4. Заданное значение температуры (20 ± 0.5°C) поддерживали с помощью термостата. На мышцы изначально подавали нагрузку в 1 г, затем оставляли в покое на полчаса для адаптации к среде.

Электростимуляцию проводили с помощью “всасывающего” электрода (suction electrode). Культю нерва выделенной мышцы помещали в “всасывающий” электрод оригинальной конструкции. Для раздражения использовали электростимулятор Digitimer MultiStimul D330 (Великобритания). Мышцы стимулировали в течение 2 мин прямоугольными импульсами амплитудой 3 В и продолжительностью 0.5 мс при частоте 0.1 Гц. Силу сокращений мышц регистрировали с помощью датчика двигательной активности Linton FCG-01 (Великобритания), аналоговый сигнал преобразовывали системой сбора данных Biopack MP100MSW (США). Все полученные в течение двух минут ответы (12 сократительных ответов) усредняли и обрабатывали как один результат. Рассчитывали их в процентах относительно исходных результатов, полученных в начале эксперимента. Через полчаса после фиксации нервно-мышечной ткани проводили контрольную стимуляцию мышц дважды с интервалом в пять минут, удостоверившись в стабильности сократительных ответов, начинали экспериментальные процедуры.

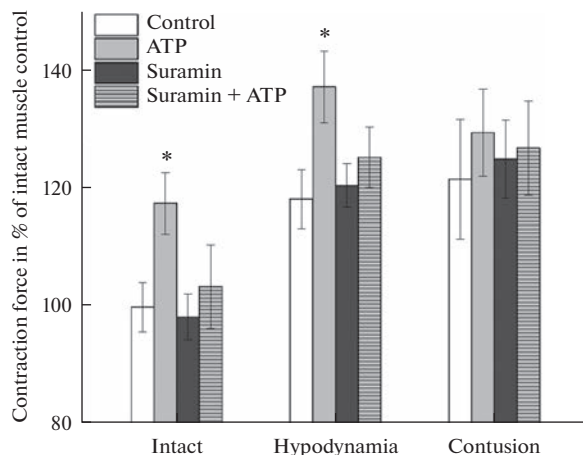


Рис. 2. Зависимость силы сокращений *m. soleus* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетания. $n = 8-10$. * $p < 0.05$ от контрольных значений.

Для оценки эффектов пуринергических агонистов и антагонистов в ванночку добавляли 100 мкМ АТФ и через 10 мин оценивали механические ответы мышцы. Затем мышцу промывали раствором Кребса и инкубировали с раствором сурамина в концентрации 100 мкМ в течение 20 мин с последующим добавлением 100 мкМ АТФ и вновь регистрировали механические ответы мышц. Для подтверждения синнаптической природы эффектов АТФ в экспериментах нервно-мышечную ткань инкубировали с сурамином в концентрации 100 мкМ, через 20 мин регистрировали сократительные ответы мышц, возникающие в ответ на непрямую стимуляцию электрическим током.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Проверку соответствия полученных данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова. Рассчитывали средние арифметические анализируемых параметров и стандартную ошибку. Статистическую значимость наблюдаемых изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента для независимых и попарно сопряженных выборок. Различия рассматривали как значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При условиях, соответствующих нативным, усредненная по 10 экспериментам сила сокращения камбаловидной мышцы крысы составила 2.48 ± 0.31 г, 7-дневная ортостатическая разгрузка и контузионная травма спинного мозга оказывали облегчающее влияние на сократимость исследуемой мышцы, так, сила сокращения составила $118.3 \pm 5.0\%$ ($n = 8$, $p < 0.05$) и $121.7 \pm 3.9\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$) соответственно от исходных значений интактной мышцы (рис. 2).

АТФ в концентрации 100 мкМ обратимо потенцировала амплитуду вызванных стимуляцией электрическим полем сокращений интактной камбаловидной мышцы — до $117.6 \pm 5.2\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$, рис. 2). Ее эффект сохранялся и на объектах, подвергшихся ортостатической разгрузке. Однако мы не получили достоверных данных на контуженных животных, такое снижение модулирующей способности АТФ согласуется с данными, полученными нами ранее на модели денервации [34].

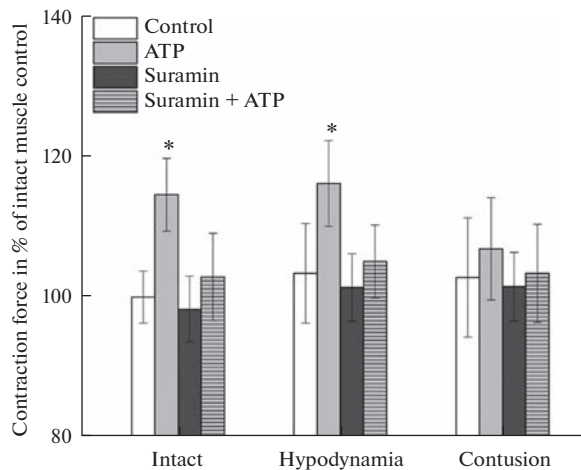


Рис. 3. Зависимость силы сокращений *m. diaphragma* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетания. $n = 7-12$. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Неселективный антагонист P2-рецепторов сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

Усредненная по 12 экспериментам сила сокращения *m. diaphragma* intactных крыс составила 1.51 ± 0.075 г ($n = 12$), что было принято за 100%. Ортостатическая разгрузка и контузионная травма спинного мозга существенно не влияли на сократимость дыхательной мышцы.

Аппликация 100 мкМ АТФ на *m. diaphragma* обратимо усиливала контрактильную способность intactной мышцы до $114.6 \pm 5.2\%$ ($n = 12$, $p < 0.05$, рис. 3) и до $116.2 \pm 6.1\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$, рис. 3) на диафрагме крыс, подвергшихся антиортостатическому вывешиванию. На фоне контузии наблюдалось стойкое снижение модулирующей способности АТФ до статистически незначимых $106.9 \pm 7.3\%$ ($n = 8$, $p > 0.05$, рис. 3).

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

Сила сокращения *m. EDL* intactных крыс составила 0.75 ± 0.039 г ($n = 10$), что было принято за 100%. Гипогравитационная разгрузка усиливала сократимость исследуемой мышцы, так, сила сокращения составила $121.1 \pm 7.1\%$ ($n = 9$, $p < 0.05$) от исходных значений на intactной мышце (рис. 4). В противоположность этому контузионная травма спинного мозга вызывала снижение силы сокращения до $86.6 \pm 7.2\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$, рис. 4) от контроля на intactной мышце.

Аппликация 100 мкМ АТФ на *m. EDL* обратимо угнетала контрактильную способность intactной мышцы до $86.2 \pm 3.9\%$ ($n = 10$, $p < 0.05$, рис. 4) и до $108.6 \pm 2.9\%$ ($n = 9$, $p < 0.05$, рис. 4) на *m. EDL* крыс, подвергшихся антиортостатическому вывешиванию. На фоне контузии не наблюдалось значимой АТФ-индуцированной модуляции.

Сурамин в концентрации 100 мкМ никаких достоверных эффектов не проявил. При этом на его фоне почти полностью угнеталось действие экзогенной АТФ (100 мкМ).

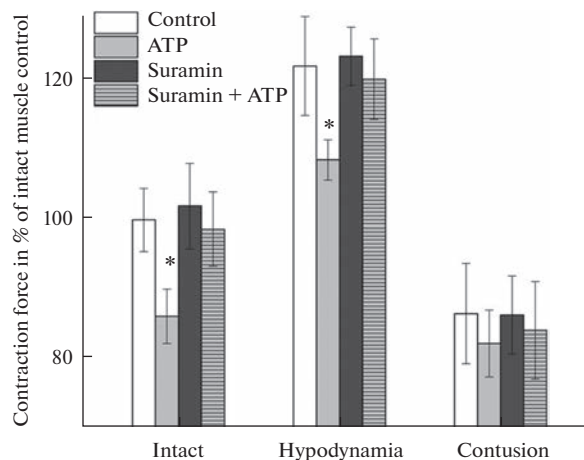


Рис. 4. Зависимость силы сокращений *m. EDL* крыс, вызванных электрической стимуляцией, от экспериментальных условий в контроле и добавлении в среду АТФ (100 мкМ), сурамина (100 мкМ) или их сочетания. $n = 9-10$. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Травма спинного мозга является основной причиной инвалидности, и в настоящее время общепринятого лечения данного патологического состояния не существует [1, 2, 4]. Снижение функциональной активности мышечной системы после травм спинного мозга связано как с прямым механическим повреждением, так и со вторичными патофизиологическими механизмами, вызванными первоначальной травмой. Эти механизмы изначально включают обширное кровоизлияние в месте повреждения и некроз клеточных компонентов центральной нервной системы. На более поздних стадиях повреждения в спинном мозге наблюдается реактивный глиоз [35]. Действия астроцитов, а также многих других клеток в этом ответе создают среду, которая крайне неблагоприятна для повторного роста аксонов, к тому же происходит активация иммунной системы. Например, раннее привлечение нейтрофилов, а на более поздних стадиях макрофагов, к месту повреждения вызывает обострение травмы. Однако на хронических стадиях макрофаги и рекрутированные Т-хелперы потенциально могут обеспечивать трофическую поддержку нейронных и ненейронных компонентов поврежденной центральной нервной системы. В условиях активации такого количества повреждающих механизмов олигодендроциты оказываются очень уязвимыми. На хронических стадиях травмы спинного мозга большое количество олигодендроцитов подвергается апоптозу в местах, удаленных от места первичного повреждения [36]. Это приводит к оголению аксонов и ухудшению их проводящих способностей, что значительно усугубляет функциональные нарушения. За счет изучения молекулярных механизмов, вызывающих апоптоз олигодендроцитов, и выявления потенциальных мишеней для терапевтического вмешательства предотвращения этой волны апоптоза будет иметь огромное значение для людей, живущих с травмой спинного мозга [35].

Травма спинного мозга связана с многократным увеличением высвобождения АТФ, которое может продолжаться в течение 6 ч и более, с чем связано вторичное повреждение и гибель мотонейронов вследствие увеличения концентрации цитозольного Ca^{2+} [37].

P2X-рецепторы – это АТФ-зависимые катионные каналы, которые опосредуют быструю передачу возбуждения в различных областях головного и спинного мозга. При этом некоторые подтипы рецепторов P2X обладают необычным свойством изменять свою ионную селективность при длительном воздействии АТФ. Кратковременное воздействие АТФ индуцирует открытие каналов, проницаемых как для одно-, так и для двухвалентных катионов, тогда как более продолжительное воздействие приводит к прогрессирующему расширению пор канала с развитием проницаемости для молекул размером до 700 Да [24].

Grafe и соавт. исследовали кинетику выхода АТФ и изменения амплитуды ПД при механическом воздействии (сдавливании) А-волокон нерва. Это приводило к увеличению экстраклеточного АТФ и одновременно к уменьшению амплитуды ПД [38] и, по мнению авторов, АТФ активирует аксональные P2X рецепторы.

Поскольку распространение кальциевых волн опосредовано высвобождением АТФ, возникает вопрос, может ли, в частности, травма спинного мозга быть связана с чрезмерным высвобождением АТФ, и является ли АТФ вредным для нейронов спинного мозга. Вероятнее всего, чрезмерное высвобождение АТФ может привести к гибели спинальных нейронов за счет активации нейрональных P2XR. Эта идея основана на наблюдениях, что высвобождение АТФ и передача сигналов Ca^{2+} астроцитами запускаются травматическим повреждением [39–41]; травматическое повреждение связано со снижением внеклеточного Ca^{2+} , что усиливает как высвобождение астроцитарного АТФ, так и передачу сигналов Ca^{2+} [42–44] и увеличивает сродство P2X7R [45], активация P2X7R напрямую опосредует гибель клеток [46], и нейроны спинного мозга, включая двигательные нейроны, экспрессируют P2X7R [47].

Биолюминесцентная визуализация высвобождения АТФ у крыс, подвергшихся экспериментальному ушибу спинного мозга, показала, что области, окружающие травматическое повреждение, имеют аномально высокий и устойчивый характер высвобождения АТФ, это указывает на то, что P2X7-опосредованная нейродегенерация способствует вторичному повреждению после травмы спинного мозга [24].

Даже при полной травме спинного мозга на уровне грудных сегментов (Th7–Th9) электростимуляция ниже уровня травмы активирует двустороннюю ритмическую двигательную активность задних конечностей у животных [48, 49].

Как известно, P1- и P2-рецепторы присутствуют и в глиальных клетках: швановская клетка, олигодендроцит, астроцит и микроглия. Тип рецепторов зависит не только от клетки, но и от ее физиологического состояния и клеточного цикла. В астроцитах мозга обнаружено, что помимо P2Y1- и P2X7-рецепторов, активация P2X2, P2X4, P2X5, P2Y2, P2Y4 и P2Y14 приводит к повышению концентрации внутриклеточного кальция. У швановских клеток выявлена активация кальциевых токов при стимуляции P2Y-рецепторов, а для активации P2X-рецепторов используемая концентрация АТФ должна быть на три порядка выше [50]. Наши результаты показывают, что после травмы спинного мозга происходит значительное ухудшение функции периферической нервной системы. Такое избыточное увеличение внутриклеточных ионов кальция может вызывать эксайтотоксичность, когда поступление ионов кальция в клетку активирует ряд ферментов (фосфолипаз, эндонуклеаз, протеаз (кальпаины)), разрушающих цитозольные структуры и приводит к запуску апоптоза клетки [51].

Механизмы, лежащие в основе угнетения функции периферической нервной системы, важны для предотвращения ухудшения состояния и поддержания высокого потенциала восстановления движений, особенно с помощью клеточной терапии, направленной на восстановление поврежденного спинного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют, что нервно-мышечная передача и функциональные свойства двигательных единиц могут быть сохранены после травмы спинного мозга, это создает основу для функционального восстановления или специальных фармакотерапевтических подходов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики. 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.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 2/22-5, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России на проведение научных исследований в рамках Программы развития Университета, а также в рамках программы “Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета” (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в разработку идеи работы и планирование эксперимента, сбор и обработку данных, написание и редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pollin MM, McHanwell S, Slater CR (1991) The effect of age on motor neurone death following axotomy in the mouse. *Development* 112(1): 83–89.
<https://doi.org/10.1242/dev.112.1.83>
2. Rishal I, Fainzilber M (2014) Axon-soma communication in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 15(1): 32–42.
<https://doi.org/10.1038/nrn3609>
3. Jackson AB, Dijkers M, Devivo MJ, Początek RB (2004) A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil* 85(11): 1740–1748.
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2004.04.035>
4. Burns AS, Jawaid S, Zhong H, Yoshihara H, Bhagat S, Murray M, Roy RR, Tessler A, Son YJ (2007) Paralysis elicited by spinal cord injury evokes selective disassembly of neuromuscular synapses with and without terminal sprouting in ankle flexors of the adult rat. *J Comp Neurol* 500(1): 116–133.
<https://doi.org/10.1002/cne.21143>
5. Burns AS, Lemay MA, Tessler A (2005) Abnormal spontaneous potentials in distal muscles in animal models of spinal cord injury. *Muscle Nerve* 31(1): 46–51.
<https://doi.org/10.1002/mus.20229>
6. Kaelan C, Jacobsen PF, Kakulas BA (1988) An investigation of possible transsynaptic neuronal degeneration in human spinal cord injury. *J Neurol Sci* 86(2–3): 231–237.
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(88\)90101-3](https://doi.org/10.1016/0022-510x(88)90101-3)
7. Bjugn R, Nyengaard JR, Rosland JH (1997) Spinal cord transection – no loss of distal ventral horn neurons. Modern stereological techniques reveal no transneuronal changes in the ventral horns of the mouse lumbar spinal cord after thoracic cord transection. *Exp Neurol* 148(1): 179–186.
8. Kirshblum S, Lim S, Garstang S, Millis S (2001) Electrodiagnostic changes of the lower limbs in subjects with chronic complete cervical spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 82(5): 604–607.
<https://doi.org/10.1053/apmr.2001.22348>

9. Burns AS, Boyce VS, Tessler A, Lemay MA (2007) Fibrillation potentials following spinal cord injury: Improvement with neurotrophins and exercise. *Muscle Nerve* 35(5): 607–613. <https://doi.org/10.1002/mus.20738>
10. Carter JG, Sokoll MD, Gergis SD (1981) Effect of spinal cord transection on neuromuscular function in the rat. *Anesthesiology* 55(5): 542–546. <https://doi.org/10.1097/00000542-198111000-00011>
11. Dahlstrom A, Heiwall PO, Booj S, Dahllof AG (1978) The influence of supraspinal impulse activity on the intra-axonal transport of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in rat motor neurons. *Acta Physiol Scand* 103(3): 308–319. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1978.tb06218.x>
12. Akaaboune M, Culican SM, Turney SG, Lichtman JW (1999) Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction *in vivo*. *Science* 286(5439): 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.503>
13. Bruneau E, Sutter D, Hume RI, Akaaboune M (2005) Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction *in vivo*. *J Neurosci* 25(43): 9949–9959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3169-05.2005>
14. Xiong GX, Zhang JW, Hong Y, Guan Y, Guan H (2008) Motor unit number estimation of the tibialis anterior muscle in spinal cord injury. *Spinal Cord* 46(10): 696–702. <https://doi.org/10.1038/sc.2008.7>
15. Cotrina, ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1988) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15735–15740. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15735>
16. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19(2): 520–528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00520.1999>
17. Arcuino G, Lin JHC, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 9840–9845. <https://doi.org/10.1073/pnas.152588599>
18. Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298(5593): 556–562. <https://doi.org/10.1126/science.298.5593.556>
19. Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2(3): 185–193. <https://doi.org/10.1038/35058528>
20. Nedergaard M, Ransom B, Goldman S (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26(10): 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
21. Fam SR, Gallagher CJ, Salter MW (2000) P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurosci* 20(8): 2800–2808. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-08-02800.2000>
22. Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442(7102): 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature04886>
23. Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN (2007) Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol* 585(Pt 1): 305–316. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143933>
24. Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P, Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman SA, Nedergaard M (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature Med* 10(8): 821–827. <https://doi.org/10.1038/nm1082>
25. North A (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82(4): 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
26. Solle M, Labasi J, Perregraux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *J Biol Chem* 276(1): 125–132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>
27. Kahlenberg J, Dubyak GW (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K^{+} release. *Am J Physiol* 286(5): 1100–1108. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00494.2003>
28. Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ (2001) Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain

- hypersensitivity. *Nature* 410(6827): 471–475.
<https://doi.org/10.1038/35068566>
29. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y (2004) Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24(1): 1–7.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-12-05153.1993>
 30. Allen AR (1911) Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA* 57: 878–880.
 31. Ильин ЕА, Новиков ВЕ (1980) Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами. *Косм биол авиакосм мед* 14(3): 79–80. [Ilyin EA, Novikov VE (1980) Stand for modeling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Cosm biol aerocosm med* 14(3): 79–80. (In Russ)].
 32. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92(4): 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00969.2001>
 33. Morey-Holton ER, Globus RK (1988) Hindlimb unloading of growing rats: a model for predicting skeletal changes during space flight. *Bone* 22(5 Suppl): 83–88.
[https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(98\)00019-2](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(98)00019-2)
 34. Khairullin AE, Efimova DV, Markosyan VA, Grishin SN, Teplov AY, Ziganshin AU (2021) The effect of acute unilateral denervation injury on purinergic signaling in the cholinergic synapse. *Biophysics* 66(3): 483–486.
<https://doi.org/10.1134/S0006350921030064>
 35. Profyris C, Cheema SS, Zang DW, Azari MF, Boyle K, Petratos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Disease* 15(3): 415–436.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.015>
 36. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17(10): 915–925.
<https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.915>
 37. Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(30): 12489–12493.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902531106>
 38. Grafe P, Schaffer V, Rucker F (2006) Kinetics of ATP release following compression injury of a peripheral nerve trunk. *Purinerg Signal* 2: 527–536.
 39. Cook SP, McCleskey EW (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95(1–2): 41–47.
 40. Neary JT, Kang Y, Willoughby KA, Ellis EF (2003) Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci* 23(6): 2348–2356.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02348.2003>
 41. Du S, Rubin A, Klepper S, Barrett C, Kim YC, Rhim HW, Lee EB, Park CW, Markelonis GJ, Oh TH (1999) Calcium influx and activation of calpain I mediate acute reactive gliosis in injured spinal cord. *Exp Neurol* 157(1): 96–105.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7041>
 42. Stokes BT, Fox P, Hollinden G (1983) Extracellular calcium activity in the injured spinal cord. *Exp Neurol* 80(3): 561–572.
 43. Nilsson P, Hillered L, Olsson Y, Sheardown MJ, Hansen AJ (1993) Regional changes in interstitial K⁺ and Ca²⁺ levels following cortical compression contusion trauma in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13(2): 183–192.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.22>
 44. Stout C, Charles A (2003) Modulation of intercellular calcium signaling in astrocytes by extracellular calcium and magnesium. *Glia* 43(3): 265–273.
<https://doi.org/10.1002/glia.10257>
 45. Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, Park HS, Yu H, Metzger R, Kowaluk E, Jarvis MF, Biesen T (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376(1–2): 127–138.
<https://doi.org/10.1002/glia.10257>
 46. Di Virgilio, Chiozzi FP, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5(3): 191–199.
 47. Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 21(18): 7143–7152.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07143.2001>
 48. Gerasimenko YP, Avelev VD, Nikitin OA, Lavrov IA (2003) Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 33(3): 247–254.
<https://doi.org/10.1023/a:1022199214515>

49. *Lavrov I, Dy CJ, Fong AJ, Gerasimenko Y, Courtine G, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR* (2008) Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats. *J Neurosci* 28(23): 6022–6029.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0080-08.2008>
50. *Irnich D, Burgstahler R, Bostock H, Grafe P* (2001) ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibers. *Pain* 92: 343–350.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00277-9)
51. *Lucas DR, Newhouse JP* (1957) The Toxic Effect of Sodium L-Glutamate on the Inner Layers of the Retina. *AMA Archiv Ophthalmol* 58(2): 193–201.
<https://doi.org/10.1001/archophth.1957.00940010205006>

The Effect of Spinal Cord Injury on P2 Signaling in the Cholinergic Synapse

A. E. Khairullin^{a, b, *}, D. V. Efimova^a, A. A. Ereemeev^b,
D. E. Sabirova^b, S. N. Grishin^a, and A. U. Ziganshin^a

^aKazan State Medical University, Kazan, Russia

^bKazan Federal University, 420008, Kazan, Russia

*e-mail: khajrulli@yandex.ru

It is known that in spinal motor neurons, after damage to the upper level of the spinal cord, neuronal degradation occurs, accompanied by axon degeneration. In the present study, the functional integrity of neuromuscular transmission was assessed by the method of stimulation mechanomyography. We demonstrated a decrease in the modulating activity of ATP in the cholinergic synapse due to spinal cord injury (a model of spinal cord contusion injury) in comparison with hypodynamia (a model of anti-orthostatic hanging of the hind limbs). The demonstrated abnormal modulation of the neuromuscular junction by purines provides evidence of axon degeneration and suggests that trans-synaptic degeneration of motor neurons may occur below the level of spinal cord injury in patients with similar injuries.

Keywords: denervation, ATP, P2 receptors, skeletal muscles, hypogravity motor syndrome, traumatic motor syndrome, synapse, suramin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЕ СВЕРХМЕДЛЕННЫХ КОЛЕБАНИЙ ПОТЕНЦИАЛОВ
МОЗГА ПОД ВЛИЯНИЕМ БОС-ТРЕНИНГА
ПО СВЕРХМЕДЛЕННЫМ ЧАСТОТАМ ЭЭГ**

© 2023 г. В. А. Гринь-Яценко¹, *, В. А. Пономарев¹, Ю. Д. Кропотов¹

¹*Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской
академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: veragrin.ihb@gmail.com*

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

В настоящем исследовании представлено сравнение влияния на электрическую активность ЭЭГ в диапазоне сверхмедленных частот двух видов воздействия: ЭЭГ биоуправления по сверхмедленным колебаниям и тренировки вариабельности сердечного ритма. В исследовании приняли участие 17 здоровых испытуемых в возрасте от 21-го до 50-ти лет с незначительно выраженными симптомами физиологического и/или психологического характера, не имевших в анамнезе неврологических и психических заболеваний. Для оценки результатов тренинга проводился анализ спектральной мощности медленных колебаний ЭЭГ во время выполнения теста на внимание (Visual Go/NoGo), зарегистрированных до и после двадцати сеансов биоуправления. Как субъективная оценка физиологического и психологического состояния, так и результаты выполнения зрительного теста показали более выраженные положительные сдвиги под влиянием ЭЭГ биоуправления по сравнению со случаями тренировки вариабельности сердечного ритма. Значительное повышение амплитуд в сверхмедленном диапазоне наблюдалось только после ЭЭГ биоуправления.

Ключевые слова: ЭЭГ, биоуправление, электроэнцефалография, сверхмедленные колебания потенциалов мозга, вариабельность сердечного ритма

DOI: 10.31857/S0869813923050047, **EDN:** XQOVEG

ВВЕДЕНИЕ

Сверхмедленные колебания потенциалов (СМКП) мозга представляют собой совокупность сложноорганизованной периодической динамики электрической активности нейронов частотой менее 0.5 Гц [1]. Первые результаты исследования флуктуаций электрического потенциала мозга в диапазоне инфранизких частот у животных и человека были описаны в работах Аладжаловой [2–4].

Несмотря на растущий в последнее время интерес к изучению СМКП мозга, функциональная роль и механизмы, лежащие в основе этой низкочастотной квазипериодической активности, остаются неясными. Существует несколько гипотез о происхождении этого вида колебаний электрического потенциала мозга. Эти волны предположительно связаны с регуляцией глобальной возбудимости зон мозга, координацией между его отдельными структурами, взаимодействием между различными функциональными сетями на протяжении выполнения когнитивных задач [5] и работой механизмов адаптации и регуляции функций организма [3, 4, 6, 7].

В ряде работ была обнаружена связь разных видов СМКП с механизмами нейрогуморальной регуляции нормальных и патологических состояний головного мозга [3, 4, 8, 9], а также корреляция СМКП частотой 0.1 Гц с локальными гемодинамическими осцилляциями в мозге [10] и колебаниями BOLD сигнала в фМРТ [11, 12]. Предположение об ассоциации этих сигналов с церебральными вазомоторными колебаниями подтвердилось, когда исследователи смогли обнаружить причинно-следственную связь между низкочастотными колебаниями ЭЭГ и хорошо известными волнами Майера — флуктуациями кровяного давления, вариабельности сердечного ритма и уровня насыщения крови кислородом, в диапазоне частот 0.05–0.15 Гц с пиком 0.1 Гц [13–15]. Также было выявлено модулирующее влияние СМКП на ритмическую активность ЭЭГ [7, 16].

Отклонения от ожидаемых распределений СМКП были выявлены при синдроме дефицита внимания и гиперактивности, шизофрении, аутизме, депрессии, тревоге и других расстройствах головного мозга [17–20]. Эти данные подтверждают гипотезу о нарушенной способности сохранять оптимальный уровень активации коры головного мозга при психических расстройствах [21, 22] и согласуются с предположением о снижении гибкости и способности задействовать функциональные сети во время подготовки и выполнения действий [23].

Возникает предположение о том, что, изменяя параметры СМКП, можно влиять на уровень функциональной активности мозга, механизмы регуляции его функций, в частности нейрогуморальной регуляции как у здоровых людей, так и при коррекции патологических состояний.

Активность мозга может модулироваться в режиме реального времени с помощью биологической обратной связи по ЭЭГ (ЭЭГ-БОС) — относительно пассивного подхода к интерфейсу мозг—компьютер, который позволяет обучаемому изменять функции мозга посредством обратной связи с потенциалами мозга, получаемыми от поверхностных электродов и представленными в виде потоков визуальных, слуховых или тактильных сигналов.

Одна из методик управления сверхмедленными потенциалами мозга была разработана американскими исследователями Othmer и соавт. в 2006 г. [24]. Для этой цели было создано программное обеспечение Cygnet на базе усилителей сигналов NeuroAmp. Управляемый параметр — скорость изменения разности потенциалов между двумя электродами. Предполагалось, что в процессе биоуправления осуществляется регуляция уровня общей возбудимости нейронов коры, а также меняется функциональная взаимосвязь между зонами мозга, участвующими в процессе.

В ряде публикаций сообщается о положительном воздействии ЭЭГ-БОС по сверхмедленным потенциалам мозга как у здоровых лиц, так и у пациентов с разнообразными патологическими состояниями. Эти выводы базировались на данных тестов и опросников, то есть на клинических данных [24–30]. Более того, на основании результатов исследований функциональной МРТ показано, что при ЭЭГ-БОС по сверхмедленным потенциалам мозга изменяется паттерн взаимосвязи различных зон мозга [31].

Однако при отсутствии исследований, включающих контрольную группу, остается открытым вопрос о возможной связи клинического улучшения с плацебо эффектом данной процедуры. В нашей предыдущей работе [30] в качестве контроля была взята группа испытуемых, выполняющих тренировку физиологического состояния организма, не направленную на изменение параметров сверхмедленных процессов — биологическая обратная связь по вариабельности сердечного ритма (ВСР). В этом исследовании было показано, что суммарная мощность СМКП в диапазоне 0.01–0.5 Гц увеличивается после выполнения курса ЭЭГ-БОС по сверхмедленным потенциалам мозга, но не изменялся в контрольной группе. В то же время детальный анализ спектральных характеристик СМКП в этой работе не проводился.

Настоящее исследование является логическим ее продолжением, в котором основное внимание было сосредоточено на изучении особенностей пространственно-частотных изменений СМКП, связанных с данными видами биоуправления.

Цель настоящего исследования заключалась в том, чтобы детально изучить влияние ЭЭГ-БОС по сверхмедленным потенциалам мозга и БОС по ВСР на спектральные составляющие СМКП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники

В исследовании приняли участие семнадцать здоровых испытуемых, которые были распределены на две группы в случайном порядке. Девять из них вошли в Основную группу ЭЭГ-БОС по СМКП (6 мужчин и 3 женщины, возраст 21–50 лет, средний 33.1 года), а семь (3 мужчины и 5 женщин, возраст 23–49 лет, средний возраст 35.9 лет) прошли курс управления ВСР и были отнесены к группе Контроля. Испытуемые были набраны среди студентов Санкт-Петербургского государственного университета и Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, научных сотрудников Института мозга человека РАН, а также из числа добровольцев, пришедших по объявлению.

Все участники заполняли анкету-опросник, включающую субъективную оценку физического и психического здоровья, а также сведения о ранее перенесенных заболеваниях. В исследования не включались лица, имевшие серьезные острые или хронические заболевания на момент начала эксперимента, а также в анамнезе: осложненный перинатальный период; аномалии психического и/или физического развития; черепно-мозговые травмы с церебральными симптомами; судорожный синдром; неврологические или психиатрические заболевания; прием медикаментов. Ни у одного из участников не было официально диагностированных невропсихических расстройств.

Все испытуемые дали письменное согласие на участие в исследовании после ознакомления с сущностью процедуры.

За 1–7 дней до начала курса биоуправления у каждого испытуемого регистрировали ЭЭГ в процессе выполнения зрительного GO/NOGO теста на внимание. Повторная регистрация ЭЭГ в ходе GO/NOGO теста выполнялась после прохождения 20 сеансов биоуправления, через 1–7 дней после последнего сеанса. Результаты второго теста были сопоставлены с исходными показателями.

ЭЭГ-БОС по СМКП

Для ЭЭГ-БОС по СМКП использовалась система Cygnet (BEE Medic), состоящая из усилителя NeuroAmp II и программного обеспечения Cygnet, интегрированного с видео-обратной связью Somatic Vision, установленной на стандартном персональном компьютере с монитором высокого разрешения.

Каждому из девяти участников Основной группы в начале каждого сеанса ЭЭГ-БОС подбирались индивидуальные параметры для ЭЭГ-биоуправления (оптимальная частота подкрепления) на основе отчета о субъективных ощущениях таким образом, чтобы просмотр видеоигры на мониторе сопровождался ощущением эмоционального и физиологического комфорта и не приводил к сонливости.

В течение сеанса последовательно использовались биполярные отведения P_4-T_4 , T_4-Fp_2 , T_3-T_4 и T_3-Fp_1 . Этот порядок размещения электродов является стандартным и был разработан на основе многолетнего опыта разработчиков методики Othmer и соавт. ЭЭГ-БОС по СМКП [32]. Общая продолжительность тренинга составляла

40–60 мин, длительность сеанса в каждом отведении — 10–15 мин. Курс состоял из 20 сеансов, занятия проводились 2–3 раза в неделю на протяжении 6–8 нед.

Биологическая обратная связь по variability сердечного ритма (BCP)

Сеансы биоуправления параметрами BCP у 7 участников Контрольной группы проводились с использованием системы снятия стресса emWave PC, разработанной Институтом HeartMath. Плетизмограф крепился на мочке уха участника и предоставлял программному обеспечению информацию о сердечном ритме, обеспечивая обратную связь по этому показателю в режиме реального времени. Испытуемые следовали инструкции поддерживать глубокое брюшное или диафрагмальное дыхание 5–7 полных дыхательных циклов в минуту, следуя методике обучения программы emWave. Графики, отображаемые на мониторе компьютера, представляли собой спектр мощности BCP, отражающий вагусные влияния на ритм сердца. Участники практиковались в достижении более высокого уровня выраженности дыхательной аритмии частоты сердечных сокращений по отношению к базовому уровню, и эта цель обычно достигалась без труда. Сеансы длились 30 мин и проводились 2–3 раза в неделю. Курс включал 20 сеансов управления BCP общей продолжительностью 7–8 нед.

ЭЭГ-исследование

Регистрация ЭЭГ проводилась с помощью 21-канального электроэнцефалографа Mitsar (Mitsar, Ltd, Россия) с использованием хлорсеребряных электродов, расположенных согласно международной системе 10–20 в точках Fp_1 , Fp_2 , F_7 , F_3 , F_z , F_4 , F_8 , T_3 , C_3 , C_z , C_4 , T_4 , T_5 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 , O_1 , O_2 , закрепленных с помощью электродной пасты “Ten20”. Входные сигналы регистрировались относительно объединенного ушного референта, с частотой квантования 250 Гц в полосе пропускания 0–50 Гц, с сетевым фильтром 50 Гц. Заземляющий электрод располагался в точке Fpz . Сопротивление электродов не превышало 5 кОм. Запись ЭЭГ проводилась во время выполнения зрительного GO/NOGO теста [33]. Зрительные стимулы в виде изображений животных (Ж), растений (Р) и людей (Ч) предъявлялись в центре экрана монитора парами с помощью программы Psytask. Угловые размеры изображений — порядка 3.8° . Длительность предъявления стимулов, межстимульные интервалы в паре и интервалы между началами пар стимулов были фиксированными и составляли 100, 1000 и 3100 мс соответственно. Использовались четыре сочетания изображений: “Ж–Ж”, “Ж–Р”, “Р–Р” и “Р–Ч”. Изображения в парах стимулов “Ж–Ж” или “Р–Р” были идентичными. С целью поддержания внимания в ходе выполнения теста в пробах “Р–Ч” одновременно со вторым зрительным стимулом предъявлялись звуковые сигналы — последовательности быстро сменяющихся тонов длительностью 20 мс и частотами 500, 1000, 1500, 2000 и 2500 Гц и звуковым давлением порядка 70 дБ. Тест состоял из 400 проб длительностью 3000 мс, по 100 проб для каждого из сочетаний изображений. Общая продолжительность теста — 21 мин. Пары стимулов предъявлялись с равной вероятностью в псевдослучайном порядке. Испытуемому давалось задание нажимать на кнопку как можно точнее и быстрее только после предъявления пары изображений “Ж–Ж”. Пробы, в которых испытуемый неправильно выполнял задание, исключались из анализа. Анализ поведенческих показателей и вызванных потенциалов в GO/NOGO тесте выполнялся традиционным способом, подробно описанным ранее [33].

При анализе СМКП полученные записи ЭЭГ преобразовывались следующим образом. Артефакты моргания глаз были скорректированы путем зануления независимых компонент ЭЭГ, соответствующих морганиям. Независимые компонен-

ты оценивались для ЭЭГ в полосе пропускания 0.5–50 Гц. Метод согласуется с описанным Vigario [34] и Jung и соавт. [35]. Для дальнейшего анализа ЭЭГ преобразовывалась в полосу пропускания 0.01–0.5 Гц с помощью цифровой фильтрации.

Количественные показатели ЭЭГ обрабатывались с помощью программного обеспечения WinEEG (Россия).

Для определения средней спектральной плотности в полосе частот 0.01–0.5 Гц для каждого электрода, каждого испытуемого и каждого условия в отдельности использовался метод мультизаострения Томсона (Thomson's multitaper method). При этом 20-минутная запись ЭЭГ разделилась на 256-секундные неперекрывающиеся эпохи, для каждой из них отдельно вычислялись периодограммы и усреднялись по эпохам. Также аналогичный анализ выполнялся для ЭЭГ, преобразованной в плотность источников тока, которая с помощью поверхностных сферических сплайнов, используя метод, предложенный Perrin и соавт. [36, 37], с параметрами: радиус головы – 10 см; 50 итераций; $\lambda = 10^{-5}$; $m = 4$ [38, 39].

Статистический анализ изменений спектральной плотности и связанных с событиями вызванных потенциалов выполнялся с помощью основанного на кластерах анализа [40, 41], являющегося аналогом так называемого Statistical Parametrical Mapping (SPM), адаптированного для многоканальной ЭЭГ. Преимущества этого метода анализа, по сравнению с традиционно используемыми методами, следующие. Прежде всего, этот метод позволяет эффективно решать проблему множественных сравнений путем автоматического выделения пространственно-частотных областей интереса (кластеров) на основе временной и пространственной близости эффектов. При этом для формирования кластера использовалась непараметрическая статистика Манна–Уитни, малочувствительная к выбросам. Порог статистической значимости эффектов для формирования кластера – $p < 0.05$. Статистическая значимость выделенных кластеров также оценивалась непараметрическим методом, использующим случайное перемешивание исходных данных. В нашем случае перемешивание выполнялось 10000 раз. В дальнейшем рассматривались только кластеры со статистической значимостью $p < 0.01$. Подробное описание основанного на кластерах анализа представлено в работе Maris и Oostenveld [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты выполнения зрительного GO/NOGO теста показали снижение количества пропусков значимых стимулов и ошибок ложных нажатий на кнопку при предъявлении незначимых стимулов у 5 из 9 участников Основной группы. В 3 случаях количество пропусков или ложных нажатий увеличилось, а в 2 случаях ошибок не было допущено ни до, ни после курса. В Контрольной группе 4 из 8 участников допустили меньше пропусков, а 2 из них – меньше ложных нажатий. У 3 испытуемых наблюдалось увеличение количества пропусков или ложных нажатий, и у 2 из них результаты не изменились. В то время как некоторый разброс индивидуальных данных затрудняет общую оценку динамики результатов, совокупные данные указывают на более выраженную тенденцию к положительным изменениям в группе ЭЭГ-БОС по СМКП. Общее количество ошибок ложных нажатий снизилось с 14 до 1 в Основной группе по сравнению со снижением с 5 до 4 в группе биоуправления параметрами ВСП. Количество ошибок пропуска значимых стимулов сократилось с 60 до 20 в группе ЭЭГ-БОС по сравнению с увеличением с 15 до 24 в группе биоуправления ВСП.

Среднее время реакции снизилось незначимо – на 2% в обеих группах, в то время как вариабельность среднего времени реакции уменьшилась на 7% в Основной группе и на 13% в Контрольной группе. Разница была незначительной. В целом, в

данных зрительного GO/NOGO теста не удалось выявить существенных групповых различий.

У 13 из 16 участников (76.5%) исходная ЭЭГ содержала ритмичные сверхмедленные колебания в диапазоне частот 0.06–0.12 Гц на фоне преобладающих более медленных колебаний потенциала. Локализации этих колебаний варьировались: у некоторых испытуемых эпизоды ритмической активности 0.06–0.12 Гц были широко распространены, без какого-либо определенного локального доминирования; в некоторых случаях эти колебания наблюдались в лобно-центральной области, в то время как в других они были обнаружены в задних областях мозга.

Результаты статистического сравнения связанных с событиями потенциалов, полученных до и после курса биоуправления, с помощью основанного на кластерах анализа не выявили никаких статистически значимых различий. Иными словами, это означает, что даже если биоуправление влияет на связанные с событиями потенциалы, то величина этого эффекта относительно небольшая.

Пост-тренинговые паттерны ЭЭГ у всех 9 испытуемых Основной группы выявили значимое увеличение средней спектральной плотности в полосе частот 0.01–0.5 Гц по сравнению с исходной ЭЭГ. В частности, с помощью основанного на кластерах анализа было выявлено два статистически значимых кластера, описывающих увеличение мощности СМКП в диапазонах 0.004–0.179 и 0.114–0.423 Гц ($p < 0.002$ и $p < 0.005$ соответственно). Напротив, в контрольной группе никаких статистически значимых изменений мощности СМКП не было выявлено. Эти изменения мощности СМКП показаны на рис. 1a, b.

При аналогичном анализе спектров мощности для плотности источников тока СМКП, основанный на кластерах анализ выявил один статистически значимый кластер, описывающий увеличение мощности в Основной группе в диапазоне 0.01–0.5 Гц ($p < 0.0004$). Для Контрольной группы также был обнаружен один статистически значимый кластер, соответствующий относительно локальному уменьшению мощности плотности источников тока СМКП в диапазоне 0.195–0.5 Гц ($p < 0.002$). Рис. 2 иллюстрирует эти изменения мощности плотности источников тока СМКП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СМКП головного мозга человека были обнаружены 60 лет назад, когда были разработаны специальные и дорогостоящие усилители для их регистрации. Многие лаборатории могли себе позволить такие исследования. В начале 21-го века интерес к СМКП возобновился в связи с появлением коммерчески доступных усилителей, а также в связи с обнаружением сверхмедленных процессов в BOLD-сигнале функциональной магнитно-резонансной томографии. Было показано, что независимые компоненты СМКП коррелируют с BOLD-сигналами, которые, в свою очередь, обусловлены изменениями уровня возбуждения, измеряемого кожно-гальванической реакцией, размером зрачка и другими показателями периферической нервной системы [1]. Нет единого мнения относительно временной организации СМКП: в некоторых исследованиях подчеркивается отсутствие пиков на спектрах ЭЭГ-ИСФ, в других работах сообщается о заметных колебаниях с частотой около 0.1 или 0.02 Гц, а в некоторых подчеркиваются множественные дискретные сверхмедленные колебания [1].

Параметры СМКП в качестве нейромаркеров различия психически больных от здоровых людей использовались в небольшом числе исследований. В частности, в работе [42] было показано, что пространственно-временной паттерн СМКП является достаточно стабильным и воспроизводимым для специфических корковых локализаций, тогда как мощность СМКП в этих локализациях была меньше у людей с выраженными симптомами невнимательности.

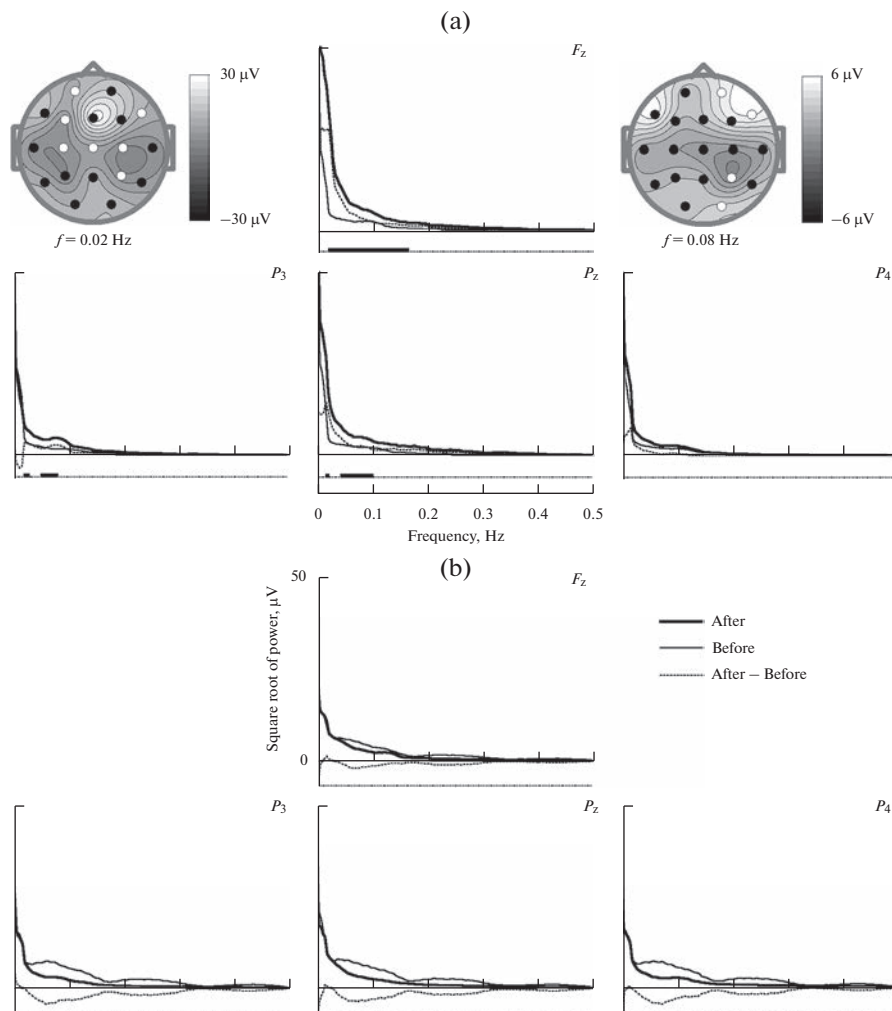


Рис. 1. Спектры мощности СМКП. (а) – группа ЭЭГ-БОС по СМКП, (б) – группа биоправления ВСП. На графиках толстые линии – спектры мощности после тренинга, тонкие линии – до тренинга, пунктирные линии – разностные кривые. Сплошные прямоугольники под графиками выделяют диапазоны частот, в которых наблюдались статистически значимые различия мощности. На топограммах, расположенных в верхних углах, показано распределение разницы мощности (после тренинга минус до тренинга) по поверхности головы. Маленькие круги внутри большого круга топографически соответствуют электродам, закрашенные круги обозначают электрода, для которых на частоте, указанной под топограммой, наблюдаются статистически значимые различия мощности.

Как сообщалось ранее [29, 30], после завершения 20 сеансов курса все девять участников Основной группы отметили улучшение состояния своего здоровья. Большинство из них сообщили о снижении реактивности на стрессовые факторы, снижении внутреннего напряжения и повышении стабильности настроения. Также они заметили увеличение уровня энергии и улучшение когнитивных функций. Шесть из семи участников группы биоправления параметрами ВСП также сообщили о положительных изменениях своего состояния по окончании курса. Наблю-

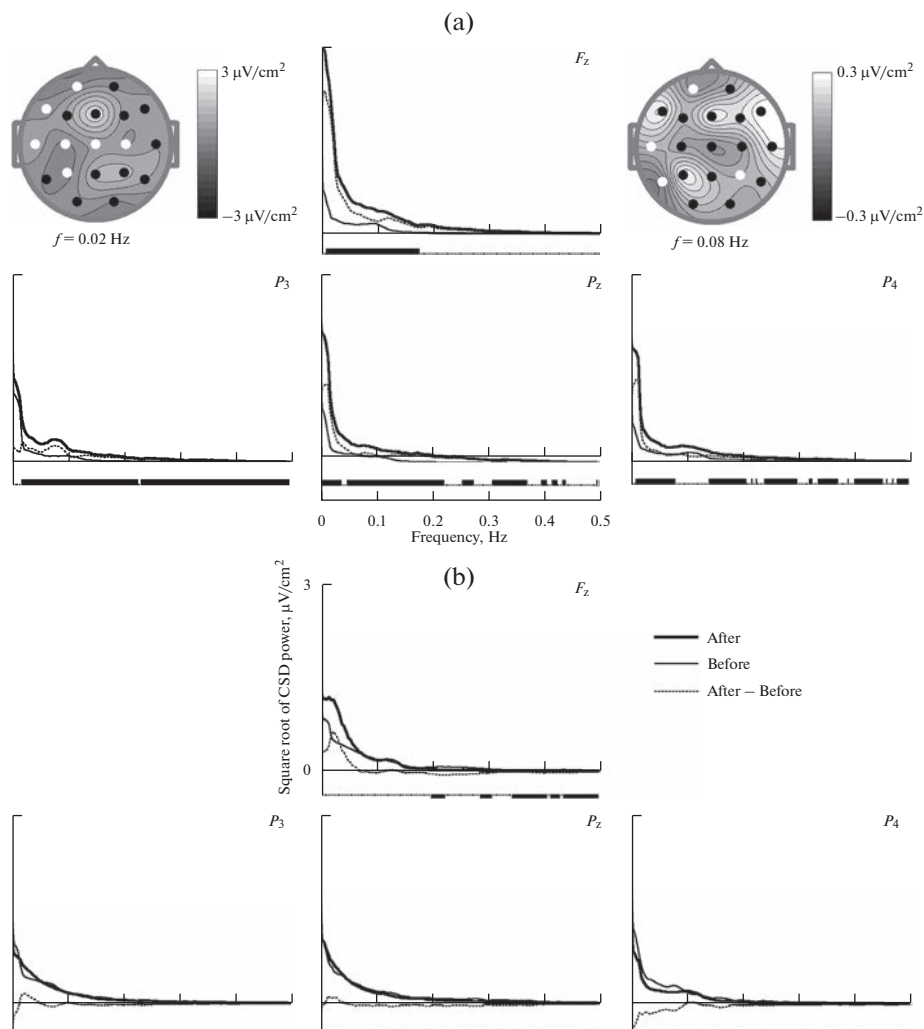


Рис. 2. Спектры мощности плотности источников тока СМКП. Обозначения те же, что на рис. 1.

даемое улучшение заключалось в повышении стрессоустойчивости и обретении навыка лучше расслабляться. Один из участников контрольной группы не был уверен в том, что курс произвел какие-либо заметные изменения в его состоянии.

В представленных выше результатах исследований было показано, что в после курса тренинга ЭЭГ-БОС по сверхмедленным потенциалам мозга наблюдаемое увеличение спектральной мощности СМКП неоднородно. В частности, низкочастотные составляющие СМКП порядка 0.02 Гц преимущественно возрастают в лобных и теменно-затылочных областях, тогда как пространственное распределение увеличения мощности высокочастотных (~0.1 Гц) осцилляций более широко и захватывает центральные области. Более того, пространственные паттерны этих изменений мощности СМКП различны. Эти особенности сохраняются при преобразовании СМКП к плотности источников тока, что указывает на относительную локальность источников этих процессов. В то же время в изменении спектральной

мощности плотности источников СМКП выявляются дополнительные эффекты. В частности, в центральных областях мощность увеличивается в широком диапазоне (до 0.5 Гц). Эти данные позволяют предположить, что в СМКП в диапазоне 0.01–0.5 Гц отражается протекание по крайней мере двух физиологических процессов: более медленного и более быстрого. Частотные характеристики второго процесса и BOLD-сигнала функциональной магнитно-резонансной томографии похожи, что, в свою очередь, указывает на их возможную взаимосвязь. Напротив, представляется сложным связать первый более медленный процесс с динамикой BOLD-сигнала. Скорее всего, для выявления механизма этого процесса необходимы дальнейшие исследования.

Использование преобразования СМКП в плотность источников тока позволило выявить еще одну особенность. В частности, было показано, что в лобных областях наблюдается уменьшение мощности СМКП в диапазоне 0.2–0.5 Гц после БОС по ВСР, что также дополнительно указывает на различие гипотетических более медленного и более быстрого процессов.

Подводя итог, отметим, что в данной работе нами были пересмотрены и уточнены результаты нашего предыдущего исследования [30], показавшего, что ЭЭГ-БОС с использованием СМКП в качестве параметра биоуправления увеличивает мощность СМКП и улучшает состояние здоровья по многим показателям, включая показатели внимания.

Проведенные исследования позволяют также утверждать, что описанные изменения мощности СМКП являются специфическими, поскольку не наблюдаются в контрольной группе, т.е. в группе испытуемых, выполнявших аналогические тренировки БОС, в которых в качестве параметра биоуправления использовались не показания СМКП, а ВСР.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены Комитетом по этике Института мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН (Санкт-Петербург, Россия). Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041300021-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента (В.А.Г-Я., В.А.П., Ю.Д.К.), сбор данных (В.А.Г-Я.), обработка данных (В.А.Г-Я., В.А.П.), написание и редактирование манускрипта (В.А.Г-Я., В.А.П., Ю.Д.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят за поддержку Bernhard Wandernoth, инженера компании BEE Medic, разработавшего систему ЭЭГ-БОС Cygnet, использованную в данной работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kropotov JD* (2022) The enigma of infra-slow fluctuations in the human EEG. *Front Hum Neurosci* 16: 928410.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.928410>
2. *Аладжалова НА* (1956) Сверхмедленные ритмические изменения электрического потенциала головного мозга. *Биофизика* 1956 (2): 127–136. [*Aladjalova NA* (1956) Infra-slow rhythmic changes of the brain electrical potential. *Biophysica* 1: 127–136. (In Russ)].
3. *Аладжалова НА* (1962) Медленные электрические процессы в головном мозге. М. Изд-во АН СССР. [*Aladjalova NA* (1962) Slow electrical processes in the brain. М. Publ House Acad SciUSSR. (In Russ)].
4. *Аладжалова НА* (1979) Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. М. Наука. [*Aladjalova NA* (1979) Psychophysiological Aspects of Brain Infra-Slow Rhythmical Activity. М. Nauka. (In Russ)].
5. *De Luca M, Beckmann CF, De Stefano N, Matthews PM, Smith SM* (2006) fMRI resting-state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain. *Neuroimage* 29: 1359–1367.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.08.035>
6. *Vanhatalo S, Palva JM, Holmes MD, Miller JW, Voipio J, Kaila K* (2004) Infralow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5053–5057.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0305375101>
7. *Van Putten MJAM, Tjepkema-Cloostermans MC, Hofmeijer J* (2015) Infralow EEG activity modulates cortical excitability in postanoxic encephalopathy. *J Neurophysiol* 113: 3256–3267.
<https://doi.org/10.1152/jn.00714.2014>
8. *Илюхина ВА* (1977) Медленные биоэлектрические процессы головного мозга человека. Ленинград. Наука. [*Ilyukhina VA* (1977) Slow Bioelectrical Processes of the Brain. Leningrad. Science. (In Russ)].
9. *Илюхина ВА* (1986) Нейрофизиология функциональных состояний человека. Ленинград. Наука. [*Ilyukhina VA* (1986) Neurophysiology of human functional states. Leningrad. Science. (In Russ)].
10. *Nikulin VV, Fedele T, Mehnert J, Lipp A, Noack C, Steinbrink J, Curio G* (2014) Monochromatic ultra-slow (~0.1 Hz) oscillations in the human electroencephalogram and their relation to hemodynamics. *Neuroimage* 97: 71–80.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.04.008>
11. *Rayshubskiy A, Wojtasiewicz TJ, Mikell CB, Bouchard MB, Timerman D, Youngerman BE, McGovern RA, Otten ML, Canoll P, McKhann GM, Hillman EMC* (2014). Direct, intraoperative observation of ~0.1Hz hemodynamic oscillations in awake human cortex: Implications for fMRI. *Neuroimage* 87: 323–331.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.10.044>
12. *Egorova N, Veldsman M, Cumming T, Brodtmann A* (2017) Fractional amplitude of low-frequency fluctuations (fALFF) in post-stroke depression. *Neuroimage Clin* 16: 116–124.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.07.014>
13. *Palva JM, Palva S* (2012) Infra-slow fluctuations in electrophysiological recordings, blood-oxygenation-level-dependent signals, and psychophysical time series. *Neuroimage* 62: 2201–2211.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.02.060>
14. *Pfurtscheller G, Schwerdtfeger A, Seither-Preisler A, Brunner C, Aigner CS, Brito J, Carmo MP, Andrade A* (2017) Brain–heart communication: Evidence for “central pacemaker” oscillations with a dominant frequency at 0.1 Hz in the cingulum. *Clin Neurophysiol* 128: 183–193.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.10.097>
15. *Noordmans HJ, van Bloonis D, Siero JCW, Zwanenburg JJM, Klaessens JHGM, Ramsey NF* (2018) Detailed view on slow sinusoidal, hemodynamic oscillations on the human brain cortex by Fourier transforming oxy/deoxy hyperspectral images. *Hum Brain Mapp* 39: 3558–3573.
<https://doi.org/10.1002/hbm.24194>
16. *Lorincz ML, Kekesi KA, Juhasz G, Crunelli V, Hughes SW* (2009) Temporal framing of thalamic relay-mode firing by phasic inhibition during the alpha rhythm. *Neuron* 63: 683–696.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.012>
17. *Low MD, Swift SJ* (1971) The contingent negative variation and the “resting” D.C. potential of the human brain: effects of situational anxiety. *Neuropsychologia* 9: 203–208.
[https://doi.org/10.1016/0028-3932\(71\)90044-3](https://doi.org/10.1016/0028-3932(71)90044-3)
18. *Broyd SJ, Helps SK, Sonuga-Barke EJ* (2011) Attention-induced deactivations in very low-frequency EEG oscillations: differential localization according to ADHD symptom status. *PLoS One* 6: e17325.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017325>
19. *Meda SA, Wang Z, Ivleva EI, Poudyal G, Keshavan MS, Tamminga CA, Sweeney JA, Clementz BA, Schretlen DJ, Calhoun VD, Lui S, Damaraju E, Pearlson GD* (2015) Frequency-Specific Neural

- Signatures of Spontaneous Low-Frequency Resting-State Fluctuations in Psychosis: Evidence From Bipolar-Schizophrenia Network on Intermediate Phenotypes (B-SNIP) Consortium. *Schizophr Bull* 41: 1336–1348.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbv064>
20. Guo X, Chen H, Long Z, Duan X, Zhang Y, Chen H (2017) Atypical developmental trajectory of local spontaneous brain activity in autism spectrum disorder. *Sci Rep* 7: 39822.
<https://doi.org/10.1038/srep39822>
 21. Reid PD, Daniels B, Rybak M, Turnier-Shea Y, Pridmore S (2002) Cortical excitability of psychiatric disorders: reduced post-exercise facilitation in depression compared to schizophrenia and controls. *Aust N Z J Psychiatry* 36: 669–673.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1614.2002.01082.x>
 22. Badawy RA, Loetscher T, Macdonell RA, Brodtmann A (2012) Cortical excitability and neurology: insights into the pathophysiology. *Funct Neurol* 27: 131–145.
 23. Tommasin S, Mascali D, Gili T, Eid Assan I, Moraschi M, Fratini M, Wise RG, Macaluso E, Mangia S, Giove F (2017) Task-Related Modulations of BOLD Low-Frequency Fluctuations within the Default Mode Network. *Front Phys* 5: 31.
<https://doi.org/10.3389/fphy.2017.00031>
 24. Othmer S, Othmer SF, Legarda S (2011) Clinical neurofeedback: Training brain behavior. *Treatment strategies. Pediatr Neurol Psych* 2: 67–73.
 25. Othmer S, Othmer SF (2009). Post-traumatic stress disorder – the neurofeedback remedy. *Biofeedback* 37(1): 24–31.
<https://doi.org/10.5298/1081-5937-37.1.24>
 26. Othmer S, Othmer SF (2016) Infra-low frequency neurofeedback for optimum performance. *Biofeedback* 44(2): 81–89.
<https://doi.org/10.5298/1081-5937-44.2.07>
 27. Legarda SB, McMahon D, Othmer S, Othmer S (2011) Clinical neurofeedback: Case studies, proposed mechanism, and implications for pediatric neurology practice. *J Child Neurol* 26(8): 1045–1051.
<https://doi.org/10.1177/0883073811405052>
 28. Grin-Yatsenko VA, Othmer S, Ponomarev VA, Evdokimov SA, Konoplev YY, Kropotov JD (2018) Infra-low frequency neurofeedback in depression: Three case studies. *Neuroregulation* 5: 30–42.
<https://doi.org/10.15540/nr.5.1.30>
 29. Grin-Yatsenko VA, Kropotov JD (2020) Effect of Infra-Low Frequency (ILF) Neurofeedback on the Functional State of the Brain in Healthy and Depressed Individuals. In: HW Kirk (ed) *Restoring the Brain Neurofeedback as an Integrative Approach to Health*.
<https://doi.org/10.4324/9780429275760>
 30. Grin-Yatsenko VA, Kara O, Evdokimov SA, Gregory M, Othmer S, Kropotov JD (2020) Infra-Low Frequency Neuro Feedback Modulates Infra-Slow Oscillations of Brain Potentials: A Controlled Study. *J Biomed Eng* 4: 1–11.
<https://doi.org/10.17303/jber.2020.4.104>
 31. Dobrushina OR, Vlasova RM, Rumshiskaya AD, Litvinova LD, Merzhina EA, Sinitsyn VE, Pechenkova EV (2020) Modulation of Intrinsic Brain Connectivity by Implicit Electroencephalographic Neurofeedback. *Front Hum Neurosci* 14(192): 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00192>
 32. Othmer SF (2017) *The Protocol guide for neurofeedback clinicians*. 6th ed. Los Angeles, CA. EEG Info.
 33. Kropotov J (2009) *Quantitative EEG, event-related potentials, and Neurotherapy*. San Diego, CA. Acad Press/Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374512-5.X0001-1>
 34. Vigario RN (1997) Extraction of ocular artifacts from EEG using independent component analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 103: 395–404.
[https://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)00042-8)
 35. Jung TP, Makeig S, Westerfeld M, Townsend J, Courchesne E, Sejnowski TJ (2000) Removal of eye activity artifacts from visual event-related potentials in normal and clinical subjects. *Clin Neurophysiol* 111: 1745–1758.
[https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00386-2](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00386-2)
 36. Perrin F, Pernier J, Bertrand O, Echallier JF (1989) Spherical splines for scalp potential and current density mapping. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 72: 184–187.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(89\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0013-4694(89)90180-6)
 37. Perrin F, Pernier J, Bertrand O, Echallier JF (1990) Spherical splines for scalp potential and current density mapping. *Corrigenda EEG* 02274. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 76: 565.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(89\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0013-4694(89)90180-6)
 38. Kayser J, Tenke CE (2006) Principal components analysis of Laplacian waveforms as a generic method for identifying ERP generator patterns: I. Evaluation with auditory oddball tasks. *Clin Neurophysiol* 117: 348–368.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.08.034>

39. *Kayser J, Tenke CE* (2006) Principal components analysis of Laplacian waveforms as a generic method for identifying ERP generator patterns: II. Adequacy of low-density estimates. *Clin Neurophysiol* 117: 369–380.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.08.033>
40. *Maris E, Oostenveld R* (2007) Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neurosci Methods* 164(1): 177–190.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
41. *Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen JM* (2011) FieldTrip: Open-source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput Intell Neurosci* 156869.
<https://doi.org/10.1155/2011/156869>
42. *Helps S, James C, Debener S, Karl A, Sonuga-Barke EJ* (2008) Very low frequency EEG oscillations and the resting brain in young adults: a preliminary study of localisation, stability and association with symptoms of inattention. *J Neural Transm (Vienna)* 115(2): 279–285.
<https://doi.org/10.1007/s00702-007-0825-2>

The Changes of the Infra-Slow EEG Fluctuations of the Brain Potentials under Influence of Infra-Low Frequency Neurofeedback

V. A. Grin-Yatsenko^{a, *}, V. A. Ponomarev^a, and J. D. Kropotov^a

^a*Bechtereva Institute of the Human Brain of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: veragrin.ihb@gmail.com*

This study presents a comparison of the effect on EEG electrical activity in the range of infraslow frequencies of two methods: infra-low frequency EEG biofeedback and heart rate variability training. The study involved 17 healthy subjects aged 21 to 50 years with minor symptoms of a physiological or psychological nature, who did not have a history of neurological or psychiatric diseases. To evaluate the results of the training, we analyzed the spectral power of slow EEG oscillations during the performance of the attention test (Visual Go/NoGo), recorded before and after twenty sessions of biofeedback. Both the subjective assessment of the physiological and psychological state and the results of the visual test showed more pronounced positive changes under the influence of EEG biofeedback compared to the cases of heart rate variability training. A significant increase in the amplitudes of oscillations in the infraslow EEG range was observed only after EEG biofeedback.

Keywords: neurofeedback, electroencephalogram, infra-slow EEG oscillations, heart rate variability

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ДВИГАТЕЛЬНЫЕ СИНЕРГИИ В СИСТЕМЕ УПРАВЛЕНИЯ
СЛОЖНЫМИ СПОРТИВНЫМИ РАВНОВЕСИЯМИ**

© 2023 г. С. А. Моисеев¹, *, Е. А. Михайлова¹

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

*E-mail: sergey_moiseev@vlgafo.ru

Поступила в редакцию 09.02.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

В работе представлена структура двигательных синергий на мышечном и кинематическом уровнях их исследования при выполнении различных спортивных равновесий. Рассматриваются особенности формирования и модификации синергетических модулей в зависимости от реализуемой двигательной задачи. Предпринята попытка объединения некоторых вычислительных аспектов, применяемых в рамках различных концепций синергетического контроля. Инструментарий для выявления и анализа параметров синергий включал регрессионный анализ и методы факторизации данных. Установлено, что разные по биомеханической структуре равновесия могут быть реализованы с применением общих паттернов пространственной организации кинематических синергий, однако на мышечном уровне существование общих пространственных профилей активации не очевидно. Выявлено наличие нескольких разных временных паттернов активации синергий в структуре каждого рассматриваемого равновесия, что может быть связано с применением в ЦНС различных стратегий двигательного контроля. На структуру кинематических синергий может оказывать влияние искусственное ограничение степеней свободы, не связанное с центральными процессами управления. Показано, что включение понятия “пространство переменных” в положения о модульной организации способствует сближению существующих концепций двигательного контроля, основанных на синергии.

Ключевые слова: двигательные синергии, статическое равновесие, факторизация данных, двигательный контроль, художественная гимнастика

DOI: 10.31857/S0869813923050060, EDN: XQWYYK

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие элементов двигательной системы человека при управлении сложными спортивными равновесиями может быть организовано по принципу синергии. Одна из концепций, базирующаяся на понятии синергии, рассматривает ее как способ снижения вычислительной нагрузки на структуры ЦНС посредством уменьшения количества управляемых элементов, в частности объединения в модули с меньшей размерностью и управление такими образованиями посредством центральных управляющих сигналов — концепция модульной организации. В ее рамках проведено немало экспериментов на различных двигательных моделях, представляющих фундаментальные направления исследований движений человека и животных. Предложен ряд методических подходов к изучению, обладающий

разработанным инструментарием для объективной оценки синергетических эффектов, преимущественно, базирующийся на методах факторизации матриц [1]. Иная концепция синергизма основана на оценке вариабельности между испытаниями как меры стабильности движения и его устойчивости к возмущениям — неконтролируемое многообразие (uncontrolled manifold — UCM). Центральной идеей теории является представление о том, что управляющая система контролирует многочисленные степени свободы (углы, усилия и мышечные активации) так, чтобы стабилизировать важные для успешной реализации двигательной задачи переменные. Под синергией здесь понимается такая совместная ковариация элементов системы управления, которая обеспечивает динамическую стабильность [2, 3].

Наряду с приведенными выше концепциями нередко синергию рассматривают как устойчивое функциональное образование, которое управляемая система действует в случае необходимости с целью реализации конкретной двигательной задачи, в том числе и для поддержания вертикальной позы. Классическим примером такого образования является “дыхательная” синергия, заключающаяся в изменении величин углов некоторых суставов, компенсирующих смещение положения центра масс в связи с дыхательным циклом [4]. В рамках концепции “естественных синергий” приводятся синергии, выявленные на основе наблюдений за динамикой тазобедренного и коленного суставов, а также электроактивности мышц, обеспечивающих движения в этих суставах — Н- и А-синергия [5]. Вполне вероятно существование множества различных синергий, связанных с задачей сохранения позы, вовлекающих в активность обширные мышечные группы и сегменты тела. Их изучение представляет интерес не только для понимания механизмов контроля фундаментальной двигательной функции — позы, но и в прикладном аспекте повышения результативности спортивной деятельности. Спортивные равновесия являются оцениваемым элементом, поэтому точность их выполнения во многом определяет результативность выступления. Равновесия в художественной гимнастике отличаются вовлечением большего числа сегментов тела и скелетных мышц, в отличие от поддержания ортоградной позы, и особенности их синергетического взаимодействия во многом остаются малоизученными.

В связи с вышесказанным целью работы явилось изучение пространственно-временной структуры синергий на мышечном и кинематическом уровнях при выполнении сложных спортивных равновесий. В работе предполагалось рассмотреть следующие положения и вопросы: 1) является ли синергия устойчивым функциональным образованием с относительно стандартным набором управляемых элементов, либо она формируется и реализуется в соответствии с условиями двигательной задачи; 2) использование методов факторизации данных для выявления низкоразмерных управляемых модулей и поиск стабилизируемых параметров движения в пространствах переменных разных уровней изучения синергий позволит получить новые данные об особенностях пространственно-временного структурирования межмышечного взаимодействия при реализации сложных спортивных равновесий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях приняли участие 4 гимнастки высокой спортивной квалификации. Они выполняли четыре вида равновесий: 1 — переднее с разноименной рукой (далее по тексту “равновесие 1”), 2 — боковое с помощью руки (“равновесие 2”), 3 — “стол” с помощью руки (“равновесие 3”), 4 — аттитюд с наклоном вперед и поворотом туловища (“равновесие 4”). Каждое равновесие выполнялось в течение четырех секунд по двенадцать реализаций с интервалом в одну минуту между ними. Анализировали период от момента достижения конечной антропометрической точки наивысшего положения по вертикальной оси (Z) и далее в течение четырех секунд.

Применяли систему 3D-видеозахвата Qualisys (Швеция), включающую 8 высокоскоростных камер Oqus с частотой дискретизации 500 Гц. Светоотражающие маркеры прикрепляли к основным антропометрическим точкам сегментов тела, соответствующим осям вращения в суставах. Из программного обеспечения (ПО) Qualisys Track Manager (QTM) экспортировали вариационные ряды величин билатеральных суставных углов: голеностопного, коленного, локтевого, плечевого (антропометрические точки: локтевая—плечевая—вертельная), плечевого (локтевая—плечевая правая—плечевая левая), тазобедренного (плечевая—вертельная—верхнеберцовая), тазобедренного (плечевая—вертельная правая—вертельная левая). Перед экспортом к данным применяли процедуру аппроксимизации кривой 2-ой степени, используя ПО QTM.

Синхронно с видеозахватом осуществляли запись шестнадцати электромиограмм (ЭМГ) поверхностных билатеральных мышц туловища, верхних и нижних конечностей: икроножной медиальной (MG), передней большеберцовой (ТА), прямой бедра (RF), двуглавой бедра (BF), наружной косой мышцы живота (OE), выпрямляющей позвоночник на уровне Т9 (ES), средней части прямой живота (RA), большой ягодичной (GM). Применяли биомонитор ME6000 (Финляндия). Частота дискретизации составляла 2000 Гц. Для отведения ЭМГ применяли накожные одноразовые самоклеющиеся электроды с токопроводящим гелем и активной площадью контакта 2.5 см^2 , $36 \times 45 \text{ мм}$ (Swaromed, Австрия). Электроды накладывались биполярно, при этом активный располагался в области проекции двигательной точки исследуемой мышцы, а референтный прикреплялся по ходу ее волокон с межэлектродным расстоянием 2 см, предусматривался дополнительный электрод заземления на каждой мышце [6]. Процедура обработки интерференционных ЭМГ включала предварительную фильтрацию полосовым фильтром 30–450 Гц, усреднение в интервалах 0.002 с и повторную фильтрацию фильтром низких частот 15 Гц, применяли ПО “Megawin”. Обработанные таким образом вариационные ряды ЭМГ экспортировали для дальнейшего анализа. Сопряжение работы биомонитора с системой Qualisys осуществлялось через штатный канал синхронизации.

Для регистрации кинезиограмм применяли стабилоанализатор Стабилан-01 (Россия) с частотой дискретизации 50 Гц. Его синхронизация с используемой аппаратурой осуществлялась посредством автоматической подачи метки, предусмотренной в программе “StabMed”. Вариационные ряды траекторий перемещений общего центра массы по сагиттальной и фронтальной осям экспортировали для дальнейшего анализа. Временные ряды, содержащие данные о перемещениях центра массы по двум осям, были экстраполированы до частоты дискретизации 500 Гц в системе Statistica при помощи модуля “Time/Series-Forecasting” путем добавления константы C ($x = x + c$) с нулевым значением.

Синхронизированные вариационные ряды относительно единой точки отсчета формировали в системе Statistica (StatSoft, Inc., version 10) матрицу исходных данных (X), размерностью $(I \times J)$, где I – число отчетов (измерений), а J – число независимых переменных (вариационных рядов ЭМГ, суставных углов, кинезиограмм – всего 32). Создавались дополнительные переменные, содержащие сведения, позволяющие идентифицировать принадлежность данных (измерений) к различным испытуемым, попыткам, равновесиям и пр. К данным в матрице применяли процедуру стандартизации к единице стандартного отклонения. Общая схема обработки данных представлена на рис. 1.

На первом этапе обработки данных из матриц извлекали компоненты (синергии) с помощью факторного анализа (ФА) и метода главных компонент (РСА), оба метода применялись как для снижения размерности, так и для классификации данных. Исходная матрица X разлагалась на произведение двух матриц: $X = T \times P + E$, где T – матрица счетов, P – матрица нагрузок, E – матрица остатков. Матрица нагрузок несет информацию о взаимосвязи или независимости переменных относительно

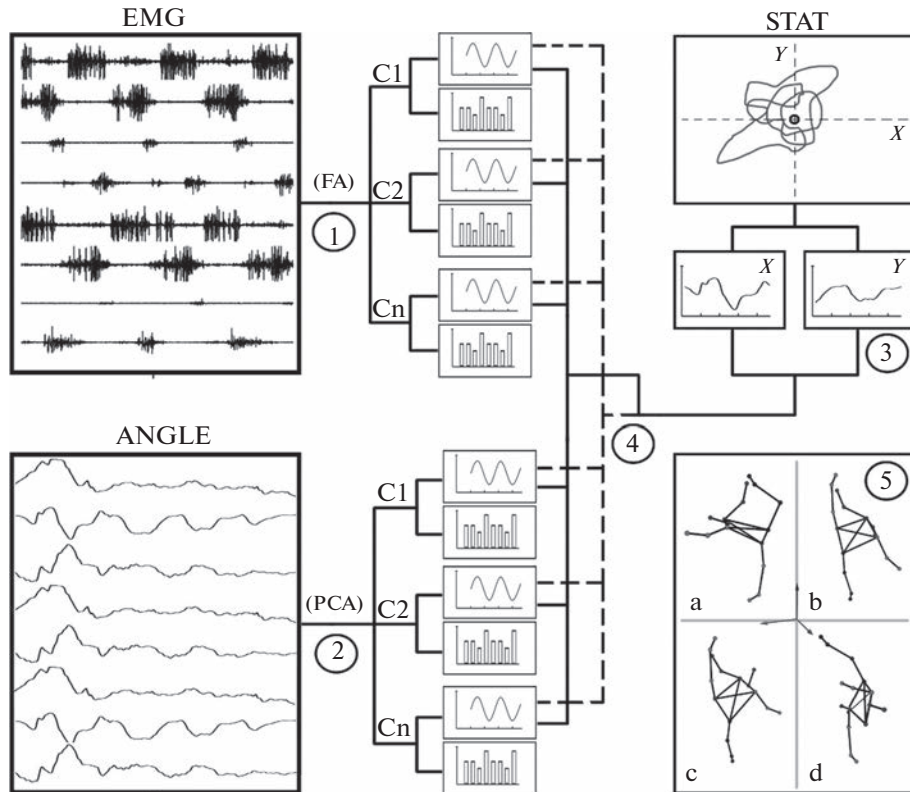


Рис. 1. Схема обработки экспериментальных данных. 1 – извлечение коэффициентов активации и весовых коэффициентов из ЭМГ-данных, 2 – извлечение коэффициентов активации и весовых коэффициентов из вариационных рядов величин основных суставных углов, 3 – извлечение данных из кинезиограмм и экстраполяция, 4 – регрессионный анализ (линейный и нелинейный), 5 – виды рассматриваемых спортивных равновесий: переднее с разноименной рукой (а), боковое с помощью руки (b), “стол” с помощью руки (c), аттитюд с наклоном вперед и поворотом туловища (d).

но новых, формальных переменных, полученных в процессе разложения матриц – “весовые коэффициенты”, чем выше коэффициент, тем больше связь с новой компонентой. Матрица счетов определяет временную организацию выявленных синергий и представляет собой проекции исходных данных на подпространство главных компонент – “коэффициенты активации”, т.е. процесс, показывающий изменение активности синергий во времени [7]. Разложение матриц осуществляли в среде Statistica, используя стандартные модули “Advanced/Multivariate – PCA” и “Mult/Exploratory – Factor”. Рассматривали компоненты, имеющие собственные значения (eigenvalues) больше единицы и учитывающие не менее 10% общей дисперсии. Анализировали следующие параметры: количество извлекаемых компонент (синергий), процент общей дисперсии, учитываемый каждым фактором в общем наборе данных (VAF), весовые коэффициенты и коэффициенты активации.

На следующем этапе формировали новую матрицу, включающую коэффициенты активации мышечных (МС), кинематических синергий (КинС) и стабилотрафические данные. Далее выполнялся регрессионный анализ с помощью стандартных модулей Statistica “Multiple Linear Regression” и “Nonlinear Estimation – Piece-

wise linear regression”. Предварительно осуществлялся анализ диаграмм рассеяния с целью выявления наличия зависимости и ее формы. В обоих случаях осуществляли анализ корреляционных матриц на предмет: мультиколлениарности; достоверности получаемых β -коэффициентов; нормальности распределения остатков, соответствия предсказанных и наблюдаемых значений [8]. В случае положительной проверки по этим параметрам модель считали приемлемой. В качестве зависимых и независимых переменных последовательно выступали вариационные ряды коэффициентов активации извлеченных на предыдущем этапе МС, КинС и статокенизограмм. При кусочно-линейном оценивании (регрессии) методом оценки являлся “Quasi-Newton”. При использовании обоих видов оценивания анализировали коэффициенты детерминации (R^2).

Математико-статистическая обработка данных выполнена в Statistica 10.0 и включала расчет среднего арифметического (M), медианы (Me), ошибки среднего арифметического (SE), стандартного отклонения (SD), коэффициентов вариативности (CV). При сравнении вариационных рядов в некоторых условиях (оценка схожести векторов коэффициентов регрессии, рядов предсказанных и наблюдаемых значений при регрессионном анализе) применяли анализ максимальных значений кросскорреляционных функций с учетом смещения относительно нуля, где 1 — полное соответствие, 0 — отсутствие взаимосвязи.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ извлеченных компонентов из набора ЭМГ-данных показал наличие от четырех до шести мышечных модулей — синергий. Меньшее количество было получено при рассмотрении равновесия 3, а большее — при равновесии 4. Вариативность количества извлекаемых компонентов оценивалась как низкая и не превышала 24.7% в среднем по группе. Качество реконструкции исходных данных оценивалось как среднее, а при равновесиях 2 и 3 — как высокое (более 70%), при этом отмечена очень низкая вариативность показателя. Были уставлены три кинематических синергий при выполнении всех рассматриваемых равновесий, при этом процент объясняемой дисперсии достигал высоких значений. В среднем он находился в диапазоне от 82 до 92%. Вариативность данного показателя также была очень низкой — CV составляли не более 8.9%.

Пространственно-временная структура мышечных синергий. На рис. 2а приведены образцы записей ЭМГ основных скелетных мышц при выполнении одного из равновесий. Следует отметить, что электроактивность большинства мышц имела волнообразный характер, с отчетливо выраженными всплесками активности в разных периодах упражнения. Некоторые мышцы, например, передняя большеберцовая правая, прямая живота правая и ряд других проявляли низкую электроактивность, не превышающую 15 мкВ.

Структура первой извлеченной МС включала активацию ряда скелетных мышц, имеющих весовые коэффициенты в одном диапазоне. Например, в первом равновесии таковыми являлись икроножные, передние большеберцовые мышцы обеих нижних конечностей, а также мышцы бедра правой (рис. 2ba). Во втором равновесии этой же синергии можно выделить активность тех же мышц, а также косой мышцы живота и выпрямляющей позвоночник левой стороны, кроме того, прямой живота и большой ягодичной левой стороны тела (рис. 2bb). Следует отметить, что вариативность весовых коэффициентов мышц, включенных в структуру первой МС, преимущественно оказывалась средней, однако регистрировались и низкие CV , например, у двуглавой мышцы бедра левой нижней конечности (равновесие 1), но не более 12.9%. Отмечались и мышцы, проявляющие высокую вариативность включения в структуру мышечных модулей, например, косая мышца живота

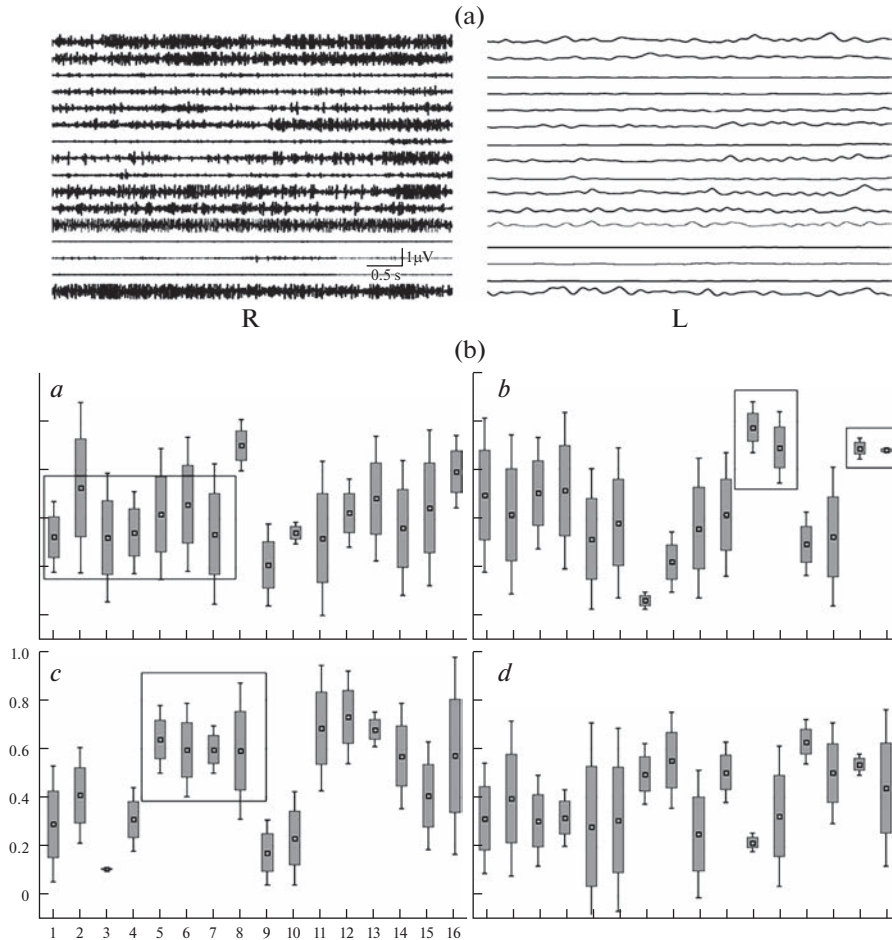


Рис. 2. Образец ЭМГ (a) (интерференционная слева, отфильтрованная справа) и весовые коэффициенты первой мышечной синергии (b) при выполнении различных равновесий. *a, b, c, d* – равновесия 1, 2, 3, 4 соответственно. Данные представлены в виде $M \pm SE \pm SD$. 1 – MGR, 2 – TAR, 3 – MGL, 4 – TAL, 5 – RFR, 6 – BFR, 7 – OER, 8 – ESR, 9 – RFL, 10 – BFL, 11 – OEL, 12 – ESL, 13 – RAR, 14 – GMR, 15 – RAL, 16 – GML. На рис. b по оси ординат – весовые коэффициенты. R – правая сторона, L – левая сторона.

левой стороны тела – 98.1%. В структуре второй выявленной МС можно выделить совместную активацию прямой живота и большой ягодичной мышц правой стороны (равновесие 1). Второе равновесие характеризовалось преимущественной активацией мышц бедра правой нижней конечности. Совместную активацию мышц бедра левой ноги и икроножной правой можно выделить в структуре этой же МС при выполнении третьего равновесия. Четвертое равновесие характеризовалось активацией мышц голени правой нижней конечности. Таким образом, пространственная структура мышечных синергий, определяемая весовыми коэффициентами, позволяет выделить в структуре каждой из них не менее двух мышц, имеющих коэффициенты в одном диапазоне. Это наблюдается при рассмотрении всех равновесий. Большинство мышц в структуре выделенных синергий обладали средней вариативностью их включения в структуру модулей, однако присутствовали и более стабильные,

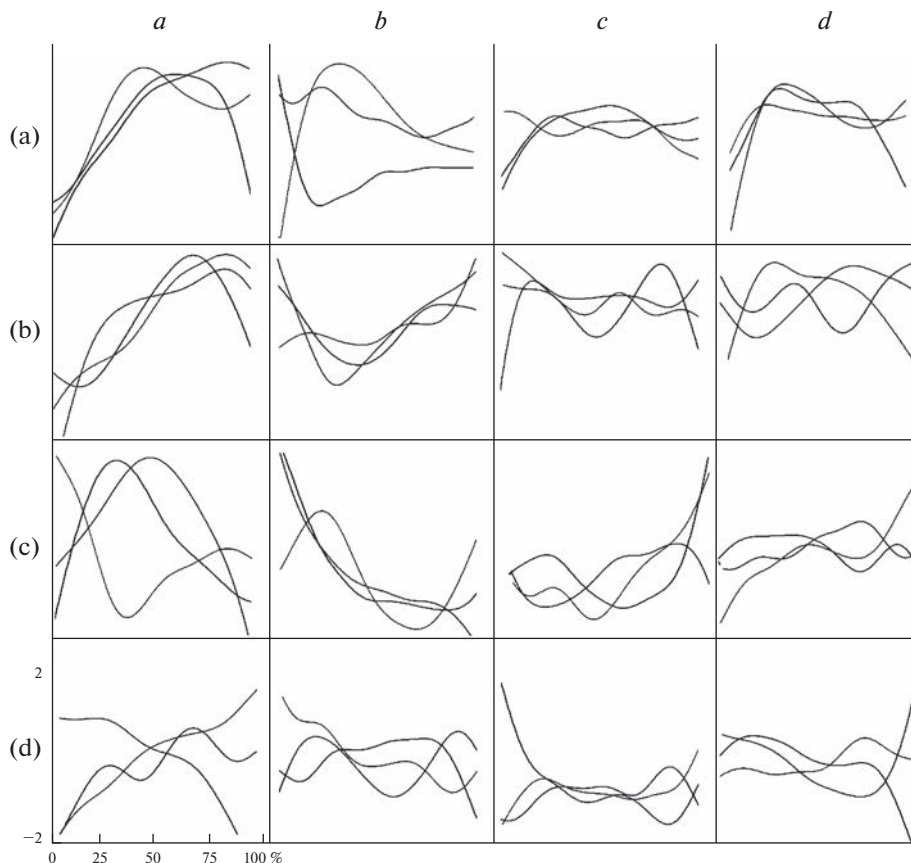


Рис. 3. Временные профили активации мышечных синергий при выполнении различных спортивных равновесий. Равновесия: переднее с разноименной рукой (а), боковое с помощью руки (б), “стол” с помощью руки (с), аттитюд с наклоном вперед и поворотом туловища (д). а, б, с, д – номер фактора (МС). По оси абсцисс – прогресс движения. По оси ординат – у.е.

характеризующиеся низкими *СV*. Весовые коэффициенты других выделенных факторов в большинстве случаев не достигали высоких значений, однако в их структуре тоже можно было выделить мышцы, имеющие значения в одном диапазоне.

Сравнение векторов весовых коэффициентов мышечных синергий показало среднее и высокое сходство некоторых выделенных факторов при выполнении разных равновесий. Например, высокие коэффициенты были установлены между фактором 4 и 3 в первом равновесии, фактором 4 и факторами 3 и 2 третьего и четвертого равновесия соответственно. Наибольшее количество значимых средних взаимосвязей было выявлено между разными факторами равновесий 1 и 4, а также между третьим и четвертым равновесиями. Таким образом, в разных по биомеханической структуре упражнениях присутствуют схожие пространственные синергетические паттерны межмышечного взаимодействия.

Основные временные профили мышечных синергий представлены на рис. 3. При анализе первого фактора равновесия 1 и 2 установлено преимущественное возрастание активности в первой половине упражнения, а затем спад активности в

последней четверти (рис. 3а). При реализации равновесия 3 выявлено два разных паттерна активации, первый характеризовался явно выраженным пиком активности в середине упражнения, второй имел наивысший пик активности в начале и резко снижался к середине упражнения (рис. 3са).

Четвертое равновесие также имело два разных временных синергетических профиля активации. Один из них имел явную тенденцию к возрастанию от начала к окончанию упражнения, причем еще один профиль имел ту же тенденцию, но характеризовался не плавным нарастанием, а волнообразным (рис. 3да). Другие выявленные профили активации мышечных синергий имели те же закономерности, что и в первой выявленной синергии. Чаще всего регистрировались два разных профиля активации, различающиеся направлением основного пика активации, в редких случаях таких пиков регистрировалось два, но не более. Анализ воспроизводимости временных профилей активации мышечных синергий показал наличие средней взаимосвязи между попытками. Так, например, при выполнении первого равновесия коэффициенты кросскорреляционных функций составляли в среднем 0.56 ± 0.04 , а максимальные значения достигали 0.63, что оценивается как средний уровень. При сопоставлении реализаций равновесия 2 также выявлен средний уровень соответствия — 0.54 ± 0.02 . В первом и во втором упражнениях вариативность была низкой — 12.5 и 6.6% соответственно. При сравнении коэффициентов активации МС упражнений 1 и 2 выявлено среднее соответствие их профилей активации — 0.64 ± 0.04 , а вариативность оценивалась как низкая — CV не превышали 18.4%.

Пространственно-временная структура кинематических синергий. В структуре первого равновесия было выявлено синергетическое взаимодействие ряда суставных углов, характеризующееся высокими весовыми коэффициентами и низкой вариативностью. Так, в первый компонент (синергию) оказались включены плечевой, тазобедренный суставы правой стороны, а также коленный, локтевой, плечевой и тазобедренный суставы левой стороны тела (рис. 4ад). Коэффициенты вариативности их включения в структуру КинС не превышали 12.2%, а весовые коэффициенты достигали 0.87. Другие суставы демонстрировали высокую вариативность и низкие весовые коэффициенты. Второй и третий компоненты чаще включали не более двух суставных углов с высокими весовыми коэффициентами. Второе равновесие характеризовалось включением в кинематическую синергию плечевого и тазобедренного суставов правой стороны и тазобедренных левой. Весовые коэффициенты последних составляли в среднем по группе 0.94 ± 0.01 и 0.92 ± 0.03 соответственно, а вариативность оценивалась как очень низкая ($CV = 3.1$ и 6.8%). КинС третьего равновесия определялась вовлечением голеностопного правого, локтевого и плечевого суставов левой стороны (рис. 4сд). Для четвертого равновесия были характерны высокие весовые коэффициенты коленного, локтевого и тазобедренного суставов правой, а также плечевого и локтевого левой стороны тела. Таким образом, в структуре первой кинематической синергии, как правило, оказывались задействованы суставы с высокими весовыми коэффициентами и высокой воспроизводимостью включения в синергию при многократных повторениях движения даже при межиндивидуальном их рассмотрении.

При рассмотрении временной структуры кинематических синергий можно отметить несколько особенностей. Во-первых, в большинстве случаев регистрируются множественные пики активации, причем, они приходятся на разные периоды выполнения упражнения (рис. 4). Например, в первой синергии первого равновесия такие пики отмечены в первой и последней четвертях, а в третьем равновесии они приходились на вторую и третью четверть (рис. 4са). Коэффициенты активации четвертого равновесия демонстрировали множественные пики во всех периодах движения (рис. 4да). Вторая особенность заключалась в наличии во временной структуре двух или трех разных профилей активации. Например, третье равновесие

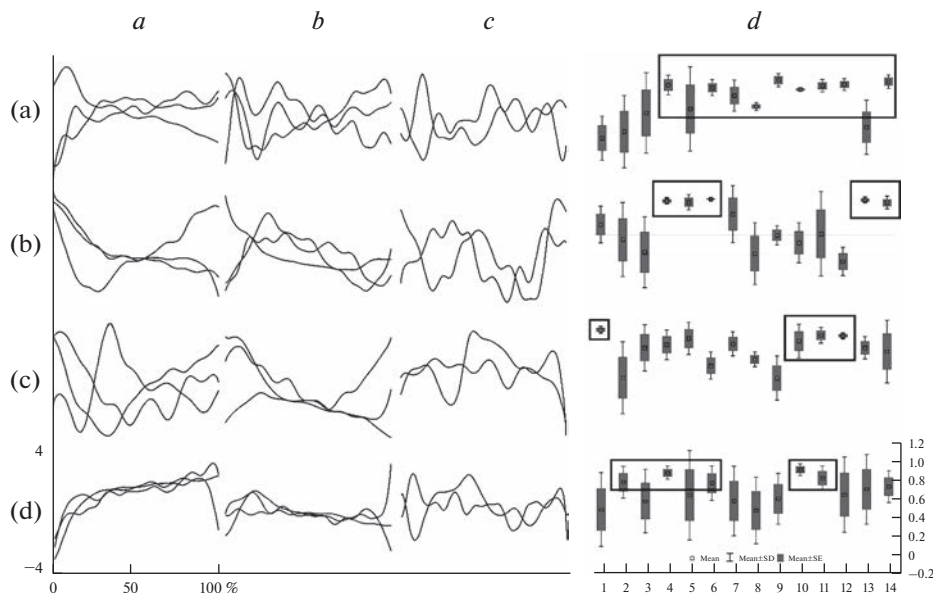


Рис. 4. Пространственно-временная структура кинематических синергий. Равновесия: переднее с разноименной рукой (а), боковое с помощью руки (b), “стол” с помощью руки (с), аттитюд с наклоном вперед и поворотом туловища (d). *a, b, c* — компоненты 1, 2, 3 соответственно. *d* — весовые коэффициенты первой КинС. На рис. *a, b, c* по оси абсцисс — прогресс упражнения, по оси ординат — у.е. На рис. *d* по оси абсцисс — суставные углы: 1 — голеностопный пр., 2 — коленный пр., 3 — локтевой пр., 4 — плечевой (лпб) пр., 5 — плечевой (лпп) пр., 6 — тазобедренный (пбк) пр., 7 — тазобедренный (пбб) пр., 8 — голеностопный лев., 9 — коленный лев., 10 — локтевой лев., 11 — плечевой (лпб) лев., 12 — плечевой (лпп) лев., 13 — тазобедренный (пбк) лев., 14 — тазобедренный (пбб) лев. По оси ординат — весовые коэффициенты.

демонстрировало три разных профиля, а коэффициенты их кросскорреляционных функций свидетельствовали о низком (0.10 ± 0.02) и среднем сходстве (0.63 ± 0.01). Третья особенность заключалась в том, что некоторые временные профили активации имели среднее или высокое сходство, но реализовывались в различные временные периоды движения, на что указывают значения коэффициентов кросскорреляционных функций с учетом смещения максимума относительно нуля. Причем, чаще всего, высокое сходство наблюдалось при сопоставлении не всего временного отрезка движения, а его отдельных периодов (условных). Например, фрагменты временных профилей активации КинС второго равновесия (компонент 3), соответствующие второй половине упражнения, демонстрировали высокое или среднее сходство, где коэффициенты кросскорреляции составляли 0.79 ± 0.03 . Первый компонент третьего равновесия показывал сходство двух профилей в первой половине упражнения — 0.63 ± 0.02 (рис. 4bc).

Анализ зависимостей мышечных, кинематических синергий и показателей устойчивости. Исходя из задач работы, был проведен регрессионный анализ и проанализированы коэффициенты детерминации регрессионных моделей с целью установления характера зависимостей между мышечными, кинематическими синергиями и показателями статокинезиограмм. Наряду с этим проведен анализ сходства векторов линейной и нелинейной регрессии. Установлено, что при выполнении всех равновесий наибольшие коэффициенты детерминации при линейном оценивании были получены при оценке влияния кинематических модулей (коэффициенты ак-

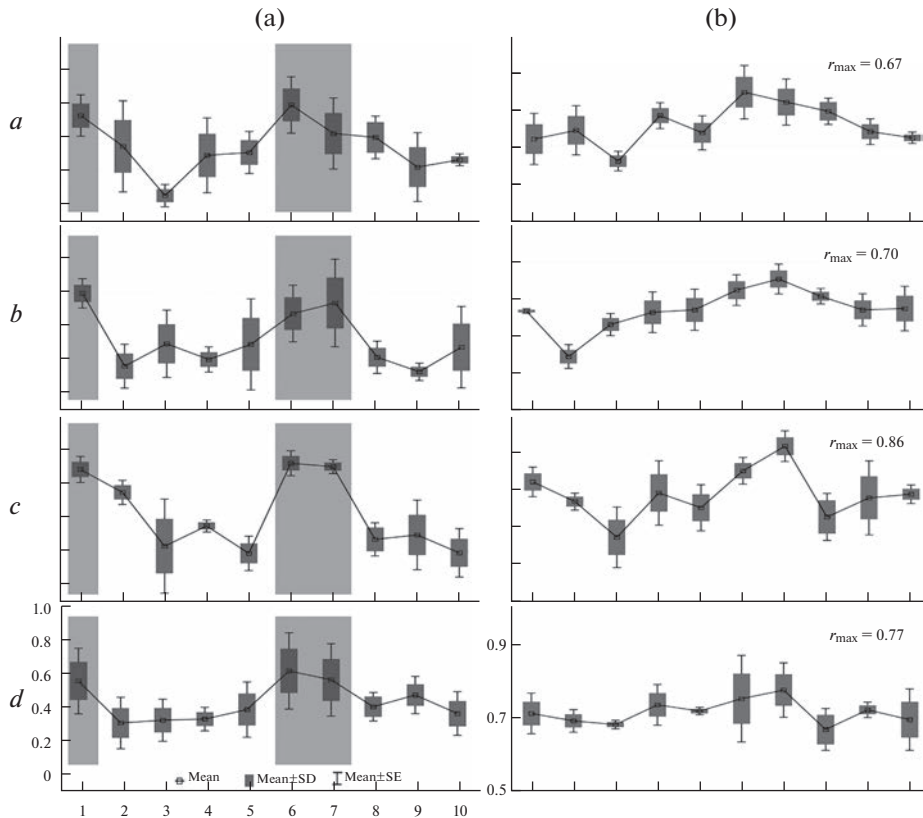


Рис. 5. Коэффициенты детерминации при анализе зависимостей между мышечными, кинематическими синергиями и показателями статокинезиограмм. (а) – линейная регрессия, (б) – нелинейное оценивание. *a, b, c, d* – равновесия 1, 2, 3, 4 соответственно. По оси абсцисс (зависимая переменная – независимые переменные): 1) МС1 – КинС, 2) МС1 – КинС, 3) МС3 – КинС, 4) СТАБ Х – КинС, 5) СТАБ Y – КинС, 6) КинС1 – МС, 7) КинС2 – МС, 8) КинС3 – МС, 9) СТАБ Х – МС, 10) СТАБ Y – МС. Сплошная линия – векторы регрессии. $r_{\max}$ – коэффициент кросскорреляционной функции при сравнении векторов линейной и нелинейной регрессии.

тивации КинС) на первую мышечную синергию. Например, во втором равновесии R^2 составляли 0.60 ± 0.05 , в третьем – 0.68 ± 0.04 (рис. 5а). Коэффициенты вариативности здесь составляли в первом случае 14.5%, во втором – 11.3%. Также установлено влияние мышечных модулей (мышечных синергий) на кинематические синергии 1 и 2. Самые высокие R^2 были получены при рассмотрении третьего равновесия – 0.72 ± 0.04 ($CV = 10.2$) и 0.70 ± 0.02 ($CV = 5.9$) соответственно (рис. 5ас). Отмечена средняя взаимосвязь мышечных и кинематических модулей с характеристиками стабилотграфии, в среднем коэффициенты детерминации не превышали 0.5, а коэффициенты вариативности в некоторых случаях, например, в процессе второго равновесия достигали 86.6%, что оценивается как высокая вариативность.

При использовании нелинейного оценивания зависимостей были получены схожие результаты с полученными методом линейной оценки, однако коэффициенты детерминации оказывались более высокими. Сходство результатов оценки было продемонстрировано при анализе кросскорреляционных функций, которые

оценивались в большинстве равновесий как высокие, например, при третьем равновесии величина $r_{\max}$ составляла 0.86 (рис. 5а, бс). При нелинейном оценивании также наибольшие коэффициенты детерминации были получены при оценке зависимостей между мышечными модулями с первой и второй кинематическими синергиями. Например, во втором равновесии в среднем по группе R^2 составляли 0.82 ± 0.02 при очень низкой вариативности, не превышающей 5%. При реализации третьего равновесия коэффициенты детерминации были 0.82 ± 0.02 , а CV составлял 4.2%, что оценивается как очень низкий показатель. В большинстве равновесий показано высокое влияние кинематических и мышечных модулей (синергий) на показатели статокинезиограмм. Практически во всех оцениваемых движениях коэффициенты детерминации были высокими и чаще низковариативными. Например, в первом равновесии R^2 при оценке влияния мышечных модулей на изменения перемещений общего центра массы по сагиттальной и фронтальной осям составляли 0.74 ± 0.02 и 0.72 ± 0.01 соответственно, а CV не превышали 5%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе планировалось продвинуться в понимании того, является ли синергия функциональным образованием с относительно стандартным набором элементов, или она генерируется при каждой реализации стереотипного двигательного действия. Одно из положений, раскрывающее данный вопрос, постулирует наличие основных (фундаментальных) синергий на мышечном уровне, являющихся “строительными блоками” ряда движений. Проведена обширная работа с целью выявления таких блоков при реализации различных двигательных задач, например, простых и сложных манипуляций верхними конечностями [9, 10]. Было показано, что сочетание различных наборов основных мышечных модулей, выявленных методом неотрицательной матричной факторизации ЭМГ-данных, позволяет осуществлять широкий спектр произвольных движений руками в разных плоскостях. Рассмотрение кинематических синергий, извлеченных методом главных компонент из обширных вариаций движений кисти, позволило выделить не менее двенадцати модулей, среди которых было отмечено три основных, задействованных практически во всех изучаемых захватах [11]. Постулируется, что ограниченное количество двигательных (кинематических) модулей, инициируемых единым активационным сигналом, могут являться основой для выполнения разнообразных захватов кистью [12]. При анализе пространственной организации паттернов мышечной активности были выявлены общие синергии, задействованные в задачах сохранения вертикальной позы и при ходьбе [13]. Результаты наших исследований показывают наличие ряда суставов, имеющих низкую вариативность включения в кинематические синергии и высокие весовые коэффициенты в структуре извлекаемых компонент. Включение многих суставных углов в КинС оказывается схожим при выполнении разных равновесий. Это свидетельствует о том, что разные по биомеханической структуре движения могут быть реализованы с применением единых (общих) паттернов пространственной организации кинематических синергий. При рассмотрении взаимодействия элементов на мышечном уровне также можно отметить включение одних и тех же мышц в общие мышечные модули (синергии), однако не столь явное, как на кинематическом. Ввиду того, что в большинстве случаев регистрируются невысокие весовые коэффициенты в структуре выделяемых факторов, наряду со средней их вариативностью при межиндивидуальном рассмотрении, существование общих мышечных модулей для реализации различных равновесий весьма сомнительно.

В постоянно изменяющихся условиях одна и та же задача может решаться совершенно разными способами, оперируя огромным количеством возможных ком-

бинаций мышечных усилий. Управление множеством параметров системы в процессе управления движением и выбор наиболее оптимальных из них для достижения конкретной двигательной задачи определяет тактику (стратегию) двигательного контроля [14]. Вполне вероятно, что управление по такому принципу может осуществляться и на уровне синергий. В этом случае управляемыми элементами будут являться низкоразмерные мышечные и кинематические модули, а стратегия контроля будет заключаться в выборе наиболее целесообразных для успешной реализации двигательной задачи. Стратегии контроля равновесий могут быть определены при рассмотрении количества извлекаемых компонент и динамики активности синергии во времени (коэффициенты активации). Одна из стратегий контроля определяет привлечение к основным синергиям дополнительных, ранее не задействованных. Это было продемонстрировано при сопоставлении количества модулей в задачах сохранения равновесия в обычной стойке и на неустойчивой опоре, либо на одной ноге [15–18]. Стратегия привлечения дополнительных синергий, вероятно, способствует усилению надежности реализации двигательной задачи. Мы наблюдали подобную картину, когда наряду с основными синергиями (четыре мышечные и три кинематические, регистрируемые при всех равновесиях у всех испытуемых), регистрировались дополнительные, например, одна мышечная при выполнении равновесий 1 и 2, а при реализации четвертого равновесия были выявлены две такие синергии. Анализ коэффициентов активации выделенных нами модулей на мышечном и кинематическом уровнях показал наличие двух и более различных временных паттернов активации в структуре каждого равновесия, причем некоторые профили были схожими у разных (высокие значения кросскорреляционных функций) испытуемых, например, в первой мышечной синергии. Подобная картина наблюдалась в ряде исследований при рассмотрении временных паттернов мышечных синергий в структуре локомоторного цикла. Наличие разных стратегий межмышечного взаимодействия, приводящих к образованию двух и более различных синергетических паттернов, связывают с использованием различных механизмов обеспечения локомоторной активности — путем модуляции продолжительности и величины мышечной синергетической активности, либо путем выборочной активации других мышечных синергий, ранее не задействованных в двигательном акте [19]. Возможно, в процессе удержания сложного статического равновесия могут быть задействованы те же механизмы и стратегии контроля, используемые управляющей системой при контроле локомоций.

При обсуждении природы наблюдаемых синергетических эффектов часто поднимается вопрос о соотношении биомеханических ограничений на кинематическом уровне и управления структурой разнообразных движений на нейрональном уровне, иначе говоря, насколько регистрируемые параметры моторного выхода отражают реальные процессы управления в структурах ЦНС. Представляется заманчивым привлечь к объяснению полученных нами закономерностей в структуре кинематических синергий естественное (не связанное с процессами управления в ЦНС) ограничение степеней свободы, например, в коленном и голеностопном суставах при выполнении некоторых рассматриваемых равновесий. При их выполнении создаются условия, когда суставы приведены в положение максимального разгибания, при этом рука фиксирует положение названных суставов, препятствуя их сгибанию. В известной монографии Бернштейна подобные условия обозначаются как “заморозка” некоторых степеней свободы [20]. Несмотря на то, что “заморозка” означала включение в активность скелетных мышц, стабилизирующих положение сустава (коактивация мышц антагонистов), естественная “заморозка” степеней свободы может определять пространственно-временную структуру некоторых выделяемых компонент — синергий. Например, тазобедренные и плечевые суставы правой стороны имели высокие весовые коэффициенты и низкую вариаци-

тивность в структуре первой КинС, т.е. определяли компонентный ее состав. Эти суставы находились в течение удержания равновесия в максимально зафиксированном положении вследствие искусственного уменьшения степеней свободы, проще говоря, удержание ноги рукой препятствовало ее разгибанию. Таким образом, на структуру КинС может оказывать влияние искусственное ограничение степеней свободы, не связанное с центральными процессами управления. Напротив, суставы опорной ноги (коленный и голеностопный) имели высокие весовые коэффициенты в структуре второй синергии, характеризующейся более вариативной временной структурой. В этом случае множественные пики коэффициентов активации и высокая вариативность профилей активации синергий как на мышечном, так и на кинематическом уровнях могут указывать на центральный способ управления координационной структурой движения.

Прежде чем перейти к обсуждению возможности объединения некоторых вычислительных аспектов, применяемых в рамках разных концепций синергетического контроля, необходимо уточнить определение понятия синергия. В одном случае под синергией понимают совместную работу элементов системы, например, одновременное возрастание или снижение амплитуды электроактивности мышц или изменение суставных углов, т.е. любых регистрируемых параметров движения. Одновременно активируемые элементы (мышцы, сегменты тела и пр.) образуют модули (синергии), активируемые общим управляющим сигналом. Согласно этой концепции, снижается вычислительная нагрузка на структуры ЦНС и тем самым обеспечивается более эффективное управление системой с избыточным числом элементов. Обращает на себя внимание характерная черта модульного принципа организации, заключающаяся в том, что управляющая система рассматривается как вычислительная. Методический подход в рамках модульной концепции использует инструменты определения модулей, их структуры и имеет количественные единицы измерения. Преимущественно для таких целей применяют методы факторизации данных, однако используют и менее распространенные методы, например, анализ межмышечной когерентности [21].

Иной подход к определению синергии рассматривает управляющую систему не как вычислительную, а как оптимизирующую, использующую множество степеней свободы для реализации конкретной двигательной задачи. Система применяет такую конфигурацию элементов управляемой системы, которая способствует стабилизации важной переменной двигательного контроля. Например, эффективное межмышечное взаимодействие и соотношение величин суставных углов обеспечивает стабилизацию конечного эффектора (системы прицеливания) в системе стрелок—оружие [22]. Такой подход основан на регистрации дисперсии при многократных реализациях стереотипного двигательного действия и вычислении коэффициентов в пространствах переменных, различающихся по уровню значимости для управляющей системы (концепция UCM). Измерение синергии в этом случае осуществляется в относительных величинах и позволяет определить характер взаимодействия элементов синергии (сильная, слабая синергия), ее наличие, а также вклад каждого элемента системы в стабилизацию важной для реализации двигательной задачи переменной контроля [23].

Очевидно, что применение вычислительных подходов концепции UCM для определения синергий на мышечном уровне целесообразно только в том случае, если рассматривать ее как ковариацию мышечной активности, направленную на стабилизацию совместного результирующего усилия, т.е. в пространстве других переменных (динамических). Рассмотрение межмышечного взаимодействия в рамках подхода модульной организации не предусматривает выделение разных пространств переменных и соответственно результаты не могут быть сопоставимы с таковыми в рамках другой концепции. Аналогичная ситуация возникает и при отдельном рассмот-

рении синергетических эффектов на кинематическом уровне. Одним из возможных решений, в какой-то мере сближающем основные положения двух рассмотренных концепций двигательного контроля, может быть использование методов снижения размерности данных (факторизации) для выявления низкоразмерных управляемых модулей (определения их структуры) и поиск стабилизируемых переменных контроля в пространствах переменных двух уровней изучения синергий — мышечном и кинематическом.

Концепция UCM предполагает выявление пространства важных для реализации двигательной задачи параметров и менее важных [24]. Вероятно, к первым могут быть отнесены те, на стабилизацию которых направлена стратегия контроля. Полученные нами данные с помощью линейной регрессии показывают высокое влияние мышечных синергий на кинематические модули, однако ни мышечные, ни кинематические модули не были связаны с показателями статокинезиограмм. Из этого следует, что стратегия поддержания равновесий направлена на стабилизацию некоторых кинематических профилей активации (кинематических синергий) посредством включения всех низкоразмерных мышечных модулей. В описанных ранее подходах, рассматривающих синергию как устойчивое структурное формирование, направленное на стабилизацию важной переменной, в качестве которой выделяют некоторые характеристики движения (величина суставного угла, перемещение антропометрической точки, динамика мышечного напряжения и др.), однако сами низкоразмерные управляемые модули не рассматриваются в качестве объекта контроля. Это четко прослеживается в работах, направленных на изучение механизмов поддержания позной устойчивости. Так, обнаруживается стратегия, связанная со стабилизацией голеностопного, коленного и тазобедренного суставов [15, 25]. Такие выводы основаны на результатах наблюдений за мышечной активностью и ее связью с изменениями величин суставных углов при стоянии на движущейся опоре. Подобные наблюдения изложены в рамках концепции “естественных синергий”, в которой выявлена специфика мышечной активности, компенсирующая колебания в тазобедренном и коленном суставах — Н- и А-синергия [5]. Известна синергия, выявленная с применением подхода UCM, включающая координацию множества суставов нижних конечностей в связи с изменениями ориентации головы [26]. Проведенный нами анализ зависимостей мышечных и кинематических модулей показал, что, управление равновесиями связано с преимущественной стабилизацией кинематических модулей посредством активации основных мышечных синергий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организация элементов управляемой системы в форме синергии при реализации сложных спортивных равновесий может включать общие паттерны межмышечного взаимодействия, таким образом, в управлении разными по биомеханической структуре упражнениями могут быть задействованы единые мышечные модули. Однако условия реализации двигательной задачи диктуют выбор наиболее эффективной стратегии двигательного контроля, заключающейся в модуляции продолжительности и величины мышечной синергетической активности или выборочной активации других мышечных синергий, ранее не задействованных в движении, что выражается в формировании разных временных профилей их активации.

Активность мышечных синергий направлена на преимущественную стабилизацию кинематических модулей, определяющих сочетанное изменение ряда суставных углов. Однако на структуру кинематических синергий может оказывать влияние искусственное ограничение степеней свободы, не связанное с центральными процессами управления. Наряду с этим отмечается низкое влияние мышечных синергий на показатели вертикальной устойчивости. Такие закономерности, вероят-

но, отражают наиболее эффективную стратегию ЦНС по поддержанию равновесия при реализации сложных спортивных упражнений в художественной гимнастике.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Протокол заседания локального этического комитета при Великолукской государственной академии физической культуры и спорта № 4 от 22.01.2023.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено в рамках плановой работы Великолукской государственной академии физической культуры и спорта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.А.М. — планирование, организация и участие в проведении экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, обработка данных, подготовка текста рукописи; Е.А.М. — участие в проведении экспериментов, написание и редактирование манускрипта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта А.М. Пухову, В.В. Маркевич, С.М. Иванову за помощь в организации и проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tresch M, Cheung V, d'Avella A* (2006) Matrix factorization algorithms for the identification of muscle synergies: evaluation on simulated and experimental data sets. *J Neurophysiol* 95(4): 2199–2212.
<https://doi.org/10.1152/jn.00222.2005>
2. *Scholz J, Schöner G* (1999) The uncontrolled manifold concept: identifying control variables for a functional task. *Exp Brain Res* 126(3): 289–306.
<https://doi.org/10.1007/s002210050738>
3. *Latash M* (2010) Motor synergies and the equilibrium-point hypothesis. *Motor Control* 14(3): 294–322.
<https://doi.org/10.1123/mcj.14.3.294>
4. *Гурфинкель ВС, Коц ЯМ, Шик МЛ* (1965) Регуляция позы человека. М. Наука. [*Gurfinkel' VS, Kocz Ya M, Shik ML* (1965) Regulation of human posture. M. Nauka. (In Russ)].
5. *Александров А, Фролов А* (2017) Биомеханический анализ координации позы и движения у стоящего человека при наклонах корпуса в сагиттальной плоскости. *Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова* 67(1): 33–48. [*Aleksandrov A, Frolov A* (2017) Biomechanical analysis of the coordination of posture and movement in a standing person when the body is tilted in the sagittal plane. *J Higher Nerve Activ named after IP Pavlov* 67(1): 33–48. (In Russ)].
6. *Altenburger K, Bumke O, Foerster O* (1937) Allgemeine neurologie. *Handbuch der Neurologie*. Berlin.
7. *Моисеев С, Пухов А, Михайлова Е, Городничев Р* (2021) Методологические и вычислительные аспекты извлечения обширных мышечных синергий при локомоциях умеренной интенсивности. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(1): 24–35. [*Moiseev A, Pukhov A*,

- Mikhailova E, Gorodnichev R* (2021) Methodological and Computational Aspects of Extracting Extensive Muscle Synergies in Moderate-Intensity Locomotions. *Russ J Physiol* 108(1): 24–35. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813922010101>
8. *Радченко СГ* (2011) Методология регрессионного анализа: монография. К. Корнийчук [Radchenko SG (2011) Methodology of regression analysis: monograph. K. Kornijchuk. (In Russ)].
9. *Saito H, Yokoyama H, Sasaki A, Kato T, Nakazawa K* (2022) Evidence for basic units of upper limb muscle synergies underlying a variety of complex human manipulations. *J Neurophysiol* 127(4): 958–968.
<https://doi.org/10.1152/jn.00499.2021>
10. *Zhao K, Zhang Z, Wen H, Wang Z, Wu J* (2019) Modular Organization of Muscle Synergies to Achieve Movement Behaviors. *J Healthc Eng* 2019: 8130297.
<https://doi.org/10.1155/2019/8130297>
11. *Jarque-Bou N, Scano A, Atzori M, Müller H* (2019) Kinematic synergies of hand grasps: a comprehensive study on a large publicly available dataset. *J Neuroeng Rehabil* 16(1): 63.
<https://doi.org/10.1186/s12984-019-0536-6>
12. *Scano A, Chiavenna A, Molinari Tosatti L, Müller H, Atzori M* (2018) Muscle Synergy Analysis of a Hand-Grasp Dataset: A Limited Subset of Motor Modules May Underlie a Large Variety of Grasps. *Front Neurobot* 12: 57.
<https://doi.org/10.3389/fnbot.2018.00057>
13. *Chvatal S, Ting L* (2013) Common muscle synergies for balance and walking. *Front Comput Neurosci* 7: 48.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00048>
14. *Гельфанд И, Цетлин М* (1962) О некоторых способах управления сложными системами. *УМН* 17(1): 3–25. [Gel'fand I, Cetlin M (1962) On some methods of managing complex systems. *UMN* 17(1): 3–25. (In Russ)].
15. *Torres-Oviedo G, Ting L* (2007) Muscle synergies characterizing human postural responses. *J Neurophysiol* 98(4): 2144–2156.
<https://doi.org/10.1152/jn.01360.2006>
16. *Torres-Oviedo G, Ting L* (2010) Subject-specific muscle synergies in human balance control are consistent across different biomechanical contexts. *J Neurophysiol* 103(6): 3084–3098.
<https://doi.org/10.1152/jn.00960.2009>
17. *Munoz-Martel V, Santuz A, Ekizos A, Arampatzis A* (2019) Neuromuscular organisation and robustness of postural control in the presence of perturbations. *Sci Rep* 9(1): 12273.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47613-7>
18. *Hagio S, Ishihara A, Terada M, Tanabe H, Kibushi B, Higashibata A, Yamada S, Furukawa S, Mukai C, Ishioka N, Kouzaki M* (2022) Muscle synergies of multidirectional postural control in astronauts on Earth after a long-term stay in space. *J Neurophysiol* 127(5): 1230–1239.
<https://doi.org/10.1152/jn.00232.2021>
19. *Nishida K, Hagio S, Kibushi B, Moritani T, Kouzaki M* (2017) Comparison of muscle synergies for running between different foot strike patterns. *PLoS One* 12(2): e0171535.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171535>
20. *Бернштейн НА* (1990) Физиология движений и активность. М. Наука [Bernshtejn NA (1990) Physiology of Movement and Activity. M. Nauka. (In Russ)].
21. *Glass S, Wildman L, Brummitt C, Ratchford K, Westbrook G, Aron A* (2022) Effects of global postural alignment on posture-stabilizing synergy and intermuscular coherence in bipedal standing. *Exp Brain Res* 240(3): 841–851.
<https://doi.org/10.1007/s00221-021-06291-6>
22. *Latash M, Zatsiorsky V* (2016) Biomechanics and Motor Control. Elsevier Science.
23. *Robert T, Zatsiorsky V, Latash M* (2008) Multi-muscle synergies in an unusual postural task: quick shear force production. *Exp Brain Res* 187(2): 237–253.
<https://doi.org/10.1007/s00221-008-1299-7>
24. *Nardon M, Pascucci F, Cesari P, Bertucco M, Latash M* (2022) Synergies Stabilizing Vertical Posture in Spaces of Control Variables. *Neuroscience* 500: 79–94.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.08.006>
25. *Labanca L, Ghislieri M, Knaflitz M, Barone G, Bragonzoni L, Agostini V, Benedetti M* (2021) Muscle synergies for the control of single-limb stance with and without visual information in young individuals. *BMC Sports Sci Med Rehabil* 13(1): 163.
<https://doi.org/10.1186/s13102-021-00392-z>
26. *Park E, Schöner G, Scholz J* (2012) Functional synergies underlying control of upright posture during changes in head orientation. *PLoS One* 7(8): e41583.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041583>

Motor Synergies in the Control System of Complex Sports Balance Postures

S. A. Moiseev^{a, *} and E. A. Mikhaylova^a

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

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

The paper presents the motor synergies' structure at the muscular and kinematic levels of their study during performing various sports balance postures. The features of the formation and modification of synergetic modules depending on the motor task are considered. An attempt is made to combine some computational aspects applied according of various concepts of synergetic control. The tools for identifying and analyzing synergy parameters included regression analysis and data factorization methods. It has been established that differing in biomechanical structure balance exercises can be realized using common patterns of kinematic synergies spatial organization, however, at the muscular level, the existence of common spatial activation profiles is not obvious. The presence of several different time patterns of synergy activation in the structure of each balance exercise has been revealed, which may be associated with various motor control strategies in the central nervous system. The structure of kinematic synergies may be influenced by artificial degrees of freedom restriction, unrelated to central control processes. It is shown that the inclusion of the concept of "variables' area" in the motor control modular organization theory contributes to the convergence of existing motor control concepts based on synergy principle.

Keywords: motor synergies, static balance, data factorization, motor control, gymnastics

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ K_{ATF} -КАНАЛОВ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ
ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

© 2023 г. И. Б. Соколова¹, *, О. П. Горшкова¹

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

*E-mail: SokolovaIB@infran.ru

Поступила в редакцию 22.09.2022 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

Цель работы — выяснить эффективность внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенной на 7-е сут после ишемии/реперфузии (И/Р) головного мозга, для восстановления функциональной активности K_{ATF} -каналов церебральных артерий. С помощью установки для прижизненной визуализации пиальных сосудов исследовали реакцию артерий на воздействие блокатора K_{ATF} -каналов глйбенкламида (GB), активатора этих же каналов пинацидила (PI), ацетилхолина (ACh), и ACh на фоне действия GB (ACh/GB) через 14 и 21 сут после И/Р головного мозга (12-минутная окклюзия обеих сонных артерий с управляемой гипотензией) и внутривенной трансплантации МСКч, проведенной на 7-е сут после ишемического воздействия. Установлено, что на 14-е сут после И/Р число сузившихся артерий на GB уменьшилось в 1.5–1.8 раза по сравнению с ложнооперированными крысами. К 21-м сут после И/Р констрикторная реакция полностью восстановилась кроме артерий диаметром более 40 мкм. В группе клеточной терапии констрикторная реакция на GB была полностью восстановлена до уровня ложнооперированных крыс у артерий диаметром менее 40 мкм уже к 14-м сут после И/Р; у более крупных сосудов не восстановилась до 21-х сут. Число дилатаций на ACh/GB по сравнению с чистым ACh у ложнооперированных крыс понижено в 1.6–1.8 раза на 14-е сут и в 1.6–6.6 раза на 21-е сут. У И/Р животных на 14-е сут число дилатаций на ACh/GB по сравнению с чистым ACh статистически значимо повышено у артерий диаметром более 20 мкм в 1.5–1.7 раза, а через 21 сут у артерий диаметром более 40 мкм в 1.2 раза. После введения МСКч GB блокировал ACh-опосредованную дилатацию у артерий диаметром менее 40 мкм и на 14-е, и на 21-е сут после И/Р. У сосудов диаметром более 40 мкм функциональная активность K_{ATF} -каналов не восстановилась до 21 сут. Делается заключение, что И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад K_{ATF} -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий и практически полностью выключает данные каналы из формирования ACh-опосредованной дилатации на протяжении 21 сут постишемического периода. Внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, приводит к восстановлению участия K_{ATF} -каналов гладкомышечных клеток в поддержании базального тонуса и осуществлении ACh-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметром менее 40 мкм уже через 14 сут после перенесенной И/Р.

Ключевые слова: ишемия/реперфузия, головной мозг, пиальные артерии, внутривенная трансплантация, мезенхимные стволовые клетки, K_{ATF} -каналы

DOI: 10.31857/S0869813923050114, **EDN:** XRSONB

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия/реперфузия (И/Р) головного мозга приводит к развитию эндотелиальной дисфункции в церебральных артериях [1] и ухудшению эндотелий-зависимой вазодилатации [2]. Один из основных каскадов эндотелий-зависимой вазодилатации: NO (оксид азота) $\rightarrow$ cGMP (циклический гуанозин монофосфат) $\rightarrow$ протеинкиназа G (PKG). PKG активирует кальций-активируемые калиевые каналы и K_{ATP} -каналы, что приводит к гиперполяризации гладкомышечных клеток, их расслаблению и дилатации артерий [3]. Ухудшение способности церебральных артерий к расширению может быть вызвано повреждением K_{ATP} -каналов, экспрессируемых как в сосудистых эндотелиальных, так и гладкомышечных клетках [4, 5]. В последние годы K_{ATP} -каналы рассматриваются в качестве мишеней терапевтического воздействия, направленного на сохранение нейронов и кардиомиоцитов после И/Р [6, 7]. Восстановление функциональной активности K_{ATP} -каналов церебральных сосудов после ишемического повреждения с помощью клеточной терапии — мало разработанный, но очень перспективный метод. В многочисленных работах было доказано, что трансплантация мезенхимных стволовых клеток (МСК) подавляет тканевое воспаление [8, 9], окислительный стресс [10, 11] после И/Р головного мозга, активирует ангиогенез в ишемизированной ткани и оказывает протекторное воздействие на мозговые структуры [12, 13]. Применительно к практическому использованию клеточной терапии нужно разработать методики трансплантации, удаленные от события транзиторной ишемии или другого повреждения головного мозга, для того чтобы подготовить клеточный материал. Процедура разморозки МСК, помещенных заранее на хранение в криобанк, и наращивания определенной клеточной массы требует не менее 7 сут [14]. В литературе имеются данные о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера в течение первых 7 сут после И/Р [15], что в этот отрезок постишемического периода позволяет МСК после венозной трансплантации мигрировать в головной мозг [16].

Цель исследования — выяснить эффективность внутривенного введения мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенного на 7-е сут после И/Р, для восстановления функциональной активности K_{ATP} -каналов церебральных артерий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург).

Животные. Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar ($n = 68$). Животные содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Ишемия/реперфузия. Для воспроизведения глобальной ишемии мозга использовали технику окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известную в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotention model”, с авторскими модификациями [17]. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс производили пережатие обеих сонных артерий на 12 мин с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение среднего АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlusTM (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разра-

Таблица 1. Группы экспериментальных животных

Группа	Воздействие	14-е сутки после И/Р		21-е сутки после И/Р	
		масса (г)	АД (мм рт. ст.)	масса (г)	АД (мм рт. ст.)
1	Ложнооперированные крысы (n = 19)	303 ± 13	133 ± 5	330 ± 12	135 ± 2
2	Крысы после И/Р (n = 17)	256 ± 5	133 ± 5	318 ± 4	124 ± 4
3	Крысы после И/Р и трансплантации МСКч (n = 20)	340 ± 4	128 ± 4	337 ± 8	132 ± 3

ботанной в нашей лаборатории. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{\text{ср}} = P_{\text{д}} + 1/3 (P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где $P_{\text{ср}}$ — среднее артериальное давление (мм рт. ст.), $P_{\text{с}}$ — систолическое давление (мм рт. ст.), $P_{\text{д}}$ — диастолическое давление (мм рт. ст.).

По окончании периода ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых столах) животных возвращали в клетки обычного содержания.

МСК и их трансплантация. Для внутривенной трансплантации использовали МСК человека, полученные от одного донора. Выделение МСК из костного мозга, их культивирование и фенотипирование проводили в ООО “Транс-Технологии” по стандартным, общепринятым методикам с минимальными изменениями [18]. В частности, для культивирования МСКч использовали питательную среду α -MEM (Nuclope, Новая Зеландия), с добавлением 20% сыворотки крови эмбрионов коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Фенотипирование МСКч проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSscan (Beckton Dickinson, США). МСКч окрашивали с помощью антител против позитивных маркеров CD90, CD105, CD44, CD73 и антител против негативных маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, HLA-DR и 7AAD (Beckton Dickinson, США). Для трансплантации использовали МСКч на 2–3 пассажах. Внутривенная трансплантация была проведена на 7-е сут после И/Р головного мозга. Каждому животному было введено 5 млн МСКч в 30 мкл культуральной среды.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил (20 мг/кг, внутривенно), Virbac, Франция) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы зоветила.

Группы животных представлены в табл. 1. Группа 1: контрольная группа — ложнооперированные (ЛО) крысы Вистар, которые подвергались оперативному вмешательству, но без проведения И/Р. Исследования функциональной активности К_{АТФ}-каналов пиальных артерий у данной и всех последующих групп на отдельных подгруппах животных (острые опыты) были проведены через 14 и 21 сут после хирургического воздействия. Группа 2: крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга. Группа 3: крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга и на 7-е сут внутривенно введены МСКч.

Визуализация и мониторинг микрососудистой сети. Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий в теменной области черепа живот-

ного высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$). Твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (pH 7.4), температура которого составляла 37°C . На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 38°C . Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scoretek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) измеряли диаметры пиальных артериальных сосудов. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано от 40 до 120 пиальных артерий. Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы: более 40 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм. Исследования реактивности сосудов были проведены через 14 и 21 сут после И/Р головного мозга. Диаметр артерий фиксировали в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} М , 8 мин) (Sigma-Aldrich, США), блокатором K_{ATP} -каналов раствором глибенкламида (GB) (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мкМ, 10 мин), в растворе диметилсульфоксида (DMSO, Sigma-Aldrich, США) или активатором K_{ATP} -каналов раствором пинацидила (Pinacidil monohydrate, Sigma-Aldrich, 200 мкМ, в растворе DMSO, 5 мин). Концентрация DMSO в применяемом растворе глибенкламида (GB) и пинацидила (PI) не превышала 0.1%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывает влияния на тонус церебральных артерий [19]. Исследование реакции сосудов на воздействие ACh проводили в отсутствие и на фоне блокады K_{ATP} -каналов (предварительное орошение поверхности мозга раствором GB в течение 10 мин с последующим добавлением ACh в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие ACh в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие ACh внутри каждой из исследованных групп. Относительно этого уровня оценивали изменение диаметра пиальных артерий при воздействии ACh на фоне блокатора K_{ATP} -каналов GB.

О результатах воздействия судили по количеству расширившихся или сузившихся артерий. Изменение числа сосудов, расширившихся/сузившихся в ответ на воздействие, выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Реакцию ($\Delta\text{Д}$) оценивали как разность между значениями диаметра после (Д_2) и до (Д_1) воздействия ACh, отнесенную к диаметру сосуда Д_1 перед воздействием, %:

$$\Delta\text{Д} = (\text{Д}_2 - \text{Д}_1) / \text{Д}_1 \times 100.$$

Считали, что реакция на воздействие отсутствует, если изменения диаметра не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. Это значение, как мы предварительно установили, регистрируется в покое в отсутствие каких-либо воздействий. Данные по каждой группе сосудов, полученные на разных животных, усреднялись для отдельной экспериментальной группы крыс и использовались для статистических сравнений.

Статистическая оценка данных. Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Проверка эксперимен-

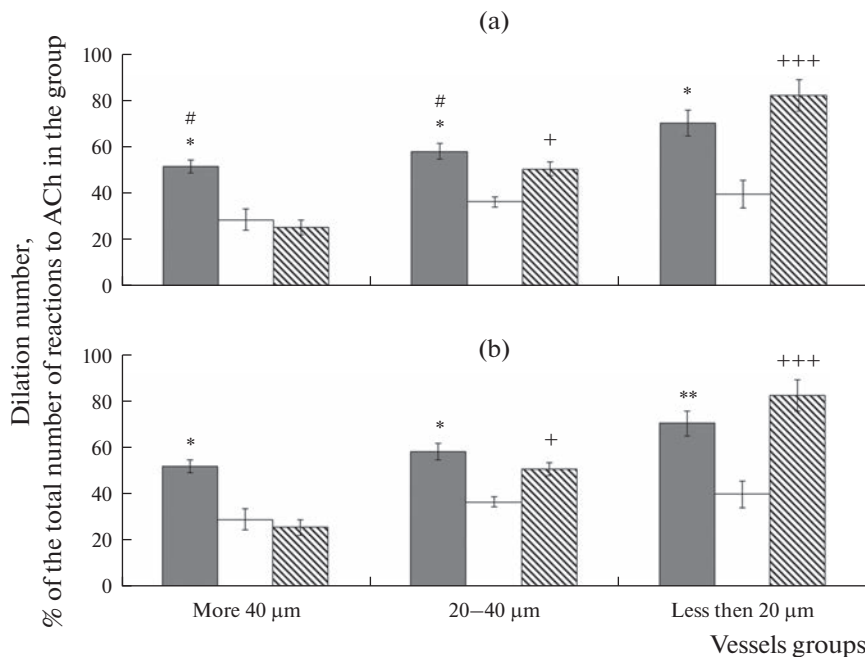


Рис. 1. Дилаторная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие ACh. (a) – 14-е сут после И/Р, (b) – 21-е сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие ACh, % от общего числа реакций на ACh в группе. * – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч; + – изменения значимы у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р без клеточной терапии (*, #, + $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$, критерий Тьюки).

тальных данных на нормальное распределение проведена с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариантов в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно U-критерию Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ культуры МСКч методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла на 99.7% из CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺-клеток (собственно МСК), на 0.3% CD45⁺, CD34⁺-клеток (клетки гемопоэтического ряда) и на 0.5% из CD14⁺, CD11b⁺, HLA-DR⁺. 7AAD⁺-клеток (нежизнеспособных) было не более 0.9–1%.

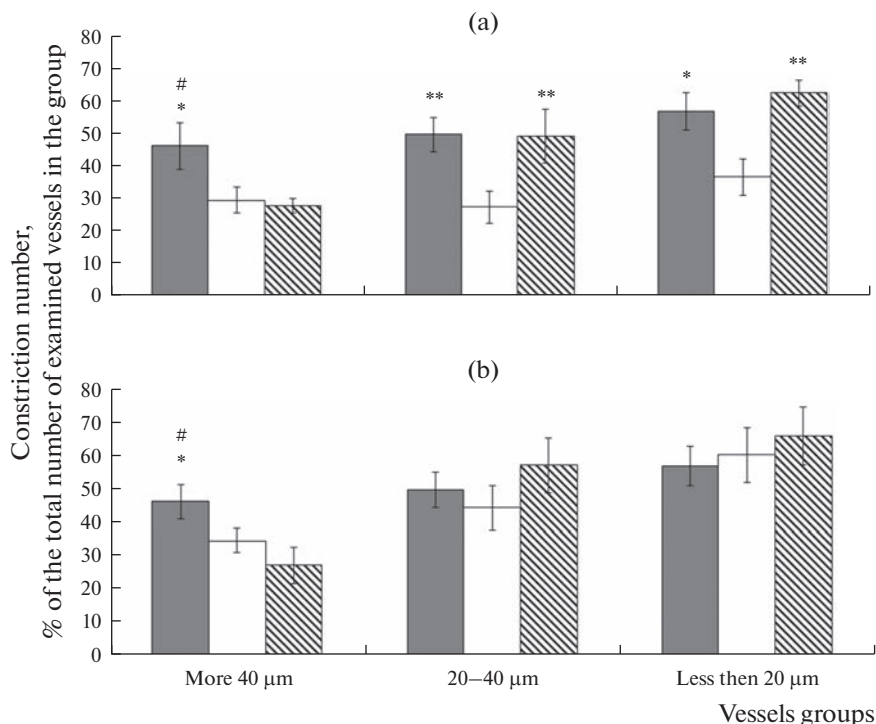


Рис. 2. Число пиальных артерий, ответивших констрикцией на воздействие глибенкламида. (а) — 14-е сут после И/Р, (б) — 21-е сут после И/Р. Темная заливка — ЛО крысы, светлая заливка — крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка — крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали — группы сосудов, по вертикали — число сосудов, сузившихся в ответ на воздействие GB, % от общего числа реакций на GB в группе. * — изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # — изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч (*, # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, критерий Тьюки).

На рис. 1 представлена дилататорная реакция пиальных артерий в ответ на воздействие ACh. Через 14 сут после И/Р (группа № 2) число расширившихся на ACh артерий всех исследованных диаметров было в среднем в 1.8 раза меньше, чем у ЛО (рис. 1а). В группе № 3 (введение МСКч на 7-е сут после И/Р) через 14 сут после И/Р число ACh-опосредованных дилатаций артерий диаметром более 20 мкм было в 1.2–1.5 раза меньше, чем в группе ЛО. У артерий диаметром менее 20 мкм число дилатаций достоверно не отличалось от такового у ЛО. По сравнению с группой № 2 у артерий диаметром 20–40 мкм число дилатаций было в 1.4 раза больше. Через 21 сут в группе № 2 число вызванных ACh дилатаций было меньше в 1.2–1.8 раза по сравнению с ЛО крысами (рис. 1б). В группе № 3 дилататорная реакция на ACh пиальных артерий всех исследованных диаметров не отличалась от реакций у ЛО животных (рис. 1б).

Констрикторная реакция пиальных артерий разного диаметра на воздействие глибенкламидом (GB) представлена на рис. 2. У ЛО животных на действие GB уменьшением диаметра ответило $57.3 \pm 6.4\%$ мелких артерий и около 46% пиальных артерий диаметром более 20 мкм. В этой группе не было выявлено статистически значимой

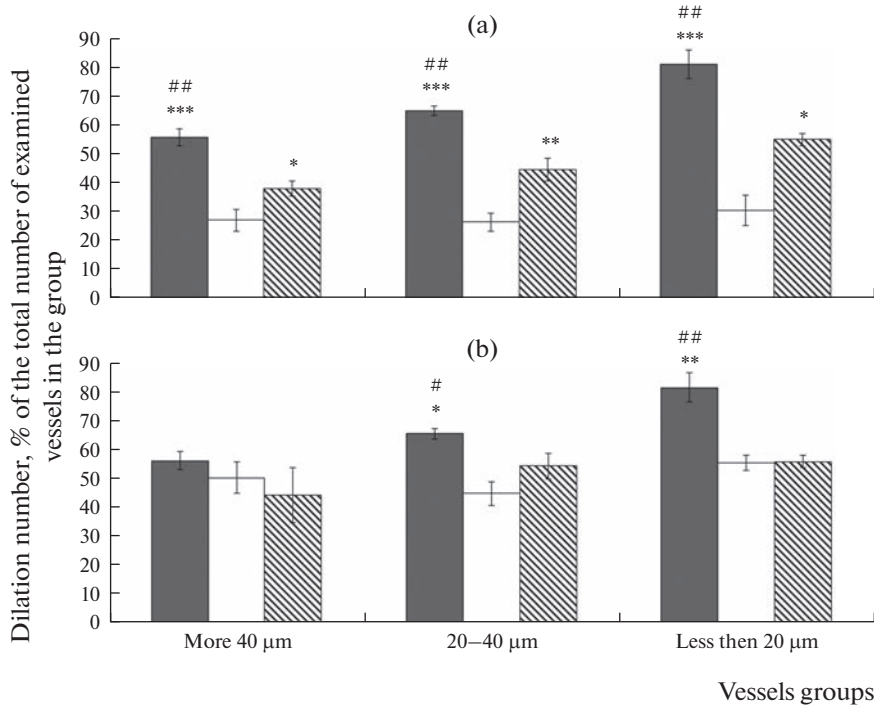


Рис. 3. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие пинацидила. (а) — 14 сут после И/Р, (б) — 21 сут после И/Р. Темная заливка — ЛО крысы, светлая заливка — крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка — крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутри-венная трансплантация МСКч. По горизонтали — группы сосудов, по вертикали — число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие PI, % от общего числа реакций на PI в группе. * — изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # — изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутри-венная трансплантация МСКч (*, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни).

разницы в реактивности пиальных артерий внутри одного калибра (более 40 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм) на разных сроках послеоперационного периода, поэтому для сравнения с другими экспериментальными группами представлены усредненные данные по всем результатам в течение эксперимента с 14-ти до 21-х сут.

Через 14 сут после И/Р у крыс из группы № 2 на воздействие GB сужением ответило в 1.5–1.8 раза меньше пиальных артерий по сравнению с ЛО группой (рис. 2а). В группе № 3 число сузившихся артерий диаметром более 40 мкм было в среднем в 1.7 раза меньше, чем в группе № 1 (т.е. столько же, сколько у крыс из группы № 2); артерии диаметром менее 40 мкм реагировали на GB так же, как сосуды у ЛО животных. Через 21 сут после И/Р у крыс из группы № 2 и 3 число сузившихся артерий диаметром более 40 мкм под влиянием GB было в 1.3–1.6 раза меньше, чем у ЛО крыс. У артерий меньшего диаметра не наблюдали статистически значимой разницы в констрикторной реакции на GB во всех экспериментальных группах (рис. 2б).

Дилататорная реакция пиальных артерий разного диаметра у ЛО крыс на воздействие пинацидила (PI) представлена на рис. 3 в виде усредненных данных по всем результатам в течение эксперимента с 14-ти до 21-х сут (объяснения см. вы-

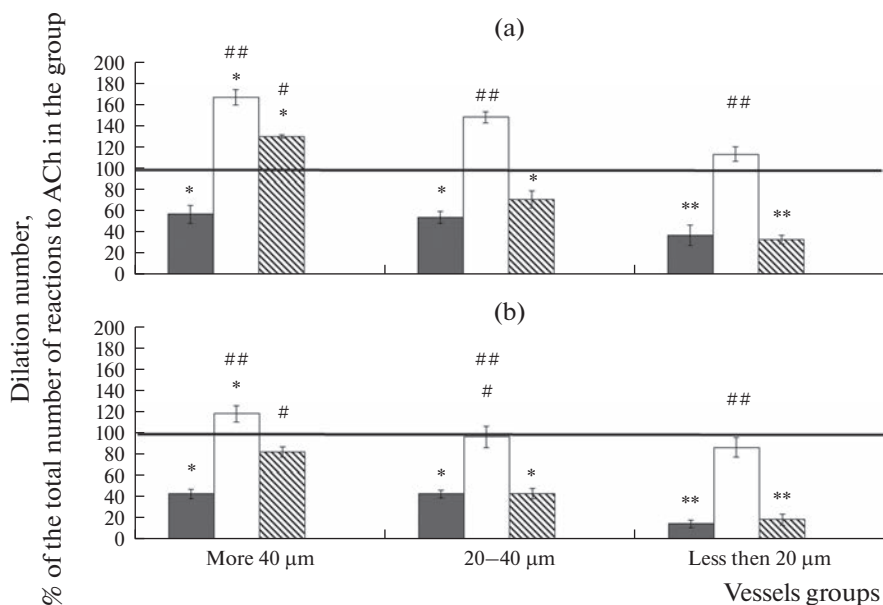


Рис. 4. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие ацетилхолина на фоне введения глибенкламида. (а) – 14 сут после И/Р, (б) – 21 сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. Линия – дилататорная реакция сосудов в группе на введение АСh без применения GB, принятая за 100%. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие АСh, % от общего числа реакций на АСh в группе. * – изменения значимы по сравнению с реакцией на АСh без применения GB; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у ЛО крыс (*, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.01$, критерий Тьюки).

ше). На воздействие PI расширением ответило $82 \pm 4.9\%$ пиальных артерий диаметром менее 20 мкм. Число расширившихся артерий более крупных диаметров составило около 60%.

Через 14 сут после И/Р головного мозга у крыс из группы № 2 число дилатаций на PI было в 2–2.6 раза меньше, чем в ЛО группе (рис. 3а). У крыс, которым на 7-е сут после И/Р были введены МСКч, расширением ответило в 1.4–1.5 раз меньше, чем в ЛО группе. При этом число дилатаций было выше, чем у крыс из группы № 2 в 1.4 раза (артерии диаметром более 40 мкм), в 1.7 раза (артерии диаметром 20–40 мкм), в 1.8 раза (артерии диаметром менее 20 мкм). Через 21 сут после И/Р у артерий диаметром более 40 мкм не было выявлено статистически значимой разницы по числу дилатаций на PI во всех экспериментальных группах (рис. 3б). Число расширившихся артерий диаметром 20–40 мкм у крыс из группы № 2 было меньше, чем в группах № 1 и 3 в 1.2–1.5 раза. Число дилатаций у артерий менее 20 мкм группах № 2 и 3 было ниже примерно в 1.5 раза по сравнению с ЛО.

Функциональную активность K_{ATP} -каналов пиальных артерий оценивали сравнением числа дилататорных реакций на воздействие АСh и АСh на фоне GB (АСh/GB) (рис. 4). У ЛО животных GB подавлял дилататорную реакцию на АСh: на действие АСh/GB расширением ответило в 1.6–1.8 раза меньше пиальных артерий, чем на чистый АСh.

Через 14 сут после И/Р головного мозга у крыс из группы № 2 число расширившихся пиальных артерий с исходным диаметром более 20 мкм на воздействие

ACh/GB было больше, чем на ACh в 1.5–1.7 раза, а у артерий с диаметром менее 20 мкм примерно одинаковым (рис. 4а). У крыс, которым на 7-е сут после И/Р были трансплантированы МСКч, число дилатаций на ACh/GB было больше, чем на чистый ACh у сосудов диаметром более 40 мкм. Число дилатаций на действие ACh/GB у артерий диаметром 20–40 мкм было меньше в 1.4 раза, чем на чистый ACh; у артерий диаметром менее 20 мкм — в 2.9 раза. Через 21 сут после И/Р у крыс из группы № 2 число расширившихся пиальных артерий диаметром более 40 мкм на воздействие ACh/GB было выше, чем на чистый ACh примерно в 1.2 раза; диаметром менее 40 мкм — одинаковым. В группе клеточной терапии артерии диаметром более 40 мкм реагировали одинаково на ACh и ACh/GB. У сосудов меньшего диаметра GB подавлял дилататорную реакцию на ACh в той же степени, что и у ЛО крыс (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

И/Р приводит к угнетению ACh-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении 21-го дня после восстановления кровотока (рис. 1). Развитие сосудистой дисфункции после ишемии и последующей реперфузии может быть связано с нарушением активности ионных каналов. Важным механизмом, обеспечивающим вазодилатацию мозговых сосудов, является активация АТФ-чувствительных калиевых каналов [4]. После И/Р головного мозга усиливается выработка активных форм кислорода и азота, включая супероксид и оксид азота (NO), которые могут быстро реагировать с образованием пероксинитрита (ONOO^-). С одной стороны, пероксинитрит и другие радикалы могут активировать $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы и кальций-чувствительные калиевые каналы большой проводимости, что, в свою очередь, приводит к гиперполяризации клеточной мембраны, расслаблению гладкомышечных клеток и увеличению диаметра артерий [20]. С другой стороны, они могут окислять и нитрозировать сульфгидрильные группы в составе молекул $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов и соответственно понижать их функциональную активность [21]. Восстановление функции $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов — одно из основных направлений коррекции церебральной циркуляции после И/Р, поскольку эти каналы играют значимую роль в регуляции базального тонуса и реактивности артерий [22]. Активация $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов приводит к снижению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , гиперполяризации клеточной мембраны, расслаблению гладкомышечных клеток и увеличению диаметра артерий. Напротив, ингибирование $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов сопровождается входом Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через кальциевые каналы, высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, деполяризации мембраны гладкомышечных клеток, уменьшению диаметра артерий и увеличению сосудистого сопротивления [23].

В представленной работе мы показали, что И/Р головного мозга существенно влияет на функциональную активность $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов. Через 14 сут после И/Р уменьшение диаметра в ответ на введение блокатора $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов наблюдается только у 30% пиальных артерий (рис. 2а), тогда как у контрольных животных этот показатель составляет в среднем 60%. Уменьшение числа сузившихся на воздействие GB артерий после И/Р может быть связано со снижением плотности $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов в гладкомышечных клетках. Косвенным доказательством этому может служить тот факт, что применение в наших экспериментах активатора $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналов пинацидила (PI) через 14 сут после И/Р привело к расширению в среднем тоже только 30% пиальных артерий. Эти данные позволяют предположить, что для поддержания базального артериального тонуса на 14-е сут после И/Р практически все $\text{K}_{\text{АТФ}}$ -каналы находятся в активном состоянии, т.е. отсутствует резерв для контроля реактивности артерий при эндогенном/экзогенном воздействии (рис. 3а). Уча-

стие $K_{ATФ}$ -каналов в формировании базального сосудистого тонуса пиальных артерий восстанавливается к 21-м суткам после И/Р (исключая самые крупные артерии диаметром более 40 мкм) (рис. 2b). Далее мы продемонстрировали, что внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, привела к восстановлению роли $K_{ATФ}$ -каналов в поддержании тонуса сосудистой стенки на 14-е сут после И/Р для пиальных артерий диаметром менее 40 мкм (рис. 2a). В более крупных артериях восстановления не произошло. Через 14 сут после ишемического воздействия в ответ на воздействие GB сужалось только около 30% сосудов, так же, как и у животных, перенесших И/Р без клеточной терапии. При этом на воздействие PI расширением ответило в среднем 40–60% пиальных артерий, что подтверждает структурную целостность $K_{ATФ}$ -каналов (рис. 3a). К 21-м суткам после И/Р в группе клеточной терапии у пиальных артерий диаметром более 40 мкм участие $K_{ATФ}$ -каналов в поддержании базального тонуса сосудистой стенки также не восстановилось (рис. 2b).

После И/Р головного мозга изменяется вклад $K_{ATФ}$ -каналов в осуществлении ACh-опосредованной дилатации. У животных из группы № 2 в наших экспериментах блокада $K_{ATФ}$ -каналов не уменьшала число дилатаций на ACh ни на 14-е, ни на 21-е сут после И/Р (рис. 4). Через 14 сут после И/Р введение GB увеличивало число ACh-опосредованных дилатаций пиальных артерий всех исследованных диаметров. Мы можем предположить, что после И/Р GB не уменьшает, а, напротив, усиливает калиевый ток, что, вероятно, и является причиной повышения числа дилатаций на ACh/Gb по сравнению с чистым ACh. Увеличение тока катионов K^+ проходит через SUR1-TRPM4-каналы, которых нет в сосудах головного мозга в обычном состоянии, но они активируются при различных патологических состояниях, в частности при гипоксии. В литературе есть данные, что GB препятствует открытию SUR1-TRPM4-каналов, но не влияет на уже открытые каналы [24]. Также причиной извращения дилататорной реакции на ACh на фоне введения GB может быть то, что эффективность блокаторов $K_{ATФ}$ -каналов зависит от внутриклеточного уровня Mg-АДФ, который значительно возрастает при ишемии и гипоксии [25]. Через 21 сут после И/Р число дилатаций на ACh на фоне блокады $K_{ATФ}$ -каналов достоверно не изменялось (рис. 3), это может свидетельствовать о том, что в этот отрезок постишемического периода $K_{ATФ}$ -каналы практически не участвуют в осуществлении ACh-опосредованной дилататорной реакции пиальных артерий. В группе клеточной терапии снижение роли $K_{ATФ}$ -каналов в ACh-опосредованной дилатации отмечалось только у артерий диаметром более 40 мкм. У артерий меньшего диаметра уже к 14-м суткам после И/Р блокирование $K_{ATФ}$ -каналов снижало ACh-опосредованную дилатацию в той же мере, что и у ЛО крыс. В последние годы показано, что МСК могут предотвращать гибель эндотелиальных клеток, поддерживая функциональную активность сигнальных путей, регулирующих клеточный цикл [26]. В литературе представлены данные о том, что в условиях ишемии в головном мозге может происходить передача неповрежденных митохондрий от трансплантированных МСК в эндотелиальные клетки сосудистой стенки, тем самым улучшая их функционирование [27]. Как известно, митохондриальные $K_{ATФ}$ -каналы также участвуют в формировании вазодилататорной реакции [28]. Следовательно, это еще один выявленный механизм влияния МСК на реактивность артериальных сосудов, который вполне может реализоваться в условиях И/Р головного мозга.

Также мы можем предположить, что после трансплантации МСКч, проведенной на 7-е сут после И/Р, в ткани ишемизированной области имела место активация ангиогенеза. Согласно литературным данным, МСК секретируют факторы, способствующие неоваскуляризации ткани: фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий ростовой фактор

(TGF β), интерлейкины IL-6, IL-8, ангиогенин, фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF BB) [12, 13]. Показано, что после внутривенной трансплантации МСК в ишемизированной тканевой зоне головного мозга наблюдали повышение уровня VEGF и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α) [29]. HIF-1 α стимулирует в ишемизированной ткани повышение экспрессии генов, обеспечивающих адаптацию клеток к гипоксии, регулирующих сосудистый тонус, клеточную пролиферацию и апоптоз [30]. В литературе представлены экспериментальные данные, показывающие увеличение плотности церебральной сосудистой сети в 1.5–2 раза через 7 сут после введения МСК [27, 31]. В нашей работе с помощью МСКч функция К_{АТФ}-каналов быстрее всего восстанавливалась у самых мелких артерий диаметром менее 20 мкм, которые могут быть не нативными, а вновь образованными сосудами. С другой стороны, нельзя исключать и протекторное воздействие МСКч на клетки сосудистой стенки. Как уже говорилось выше, МСК могут уменьшать негативное воздействие воспаления и окислительного стресса непосредственно в стенке сосудов, сохраняя тем самым жизнеспособность эндотелиальных и гладкомышечных клеток [32, 33]. За счет протекторного воздействия МСКч, скорее всего, восстанавливалась функция К_{АТФ}-каналов в сосудах диаметром 20–40 мкм.

Итак, внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, позволила полностью восстановить участие К_{АТФ}-каналов в поддержании базального тонуса и их функциональную активность у пиальных артерий диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том участке церебральной сосудистой сети, который принимает основное участие в кислородном транспорте между кровью и тканью [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад К_{АТФ}-каналов в поддержании базального тонуса пиальных артерий и практически полностью выключает данные каналы из формирования АСh-опосредованной дилатации на протяжении 21 сут постишемического периода. Внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, приводит к восстановлению вклада К_{АТФ}-каналов ГМК в поддержание базального тонуса и осуществление АСh-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметром менее 40 мкм уже через 14 сут после перенесенной И/Р.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/05 от 05.09.2022 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

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента – И.Б.С., сбор и обработка данных – И.Б.С., О.П.Г., написание и редактирование текста – И.Б.С., О.П.Г.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выносят глубокую благодарность ООО “Транс-Технологии” и лично генеральному директору Д.Г. Полынцеву за предоставление для проведения исследования клеточного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gong S, Ma H, Zheng F, Huang J, Zhang Y, Yu B, Li F, Kou J (2021) Inhibiting YAP in endothelial cells from entering the nucleus attenuates blood-brain barrier damage during ischemia-reperfusion injury. *Front Pharmacol* 26(12): 777680. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777680>
2. Chen Y-J, Chen C, Li M-Y, Li Q-Q, Zhang X-J, Huang R, Zhu X-W, Bai C-Y, Liu-Yi Zhang, Peng P-H, Yang W-M (2021) Scutellarin reduces cerebral ischemia reperfusion injury involving in vascular endothelium protection and PKG signal. *Nat Prod Bioprospect* 11(6): 659–670. <https://doi.org/10.1007/s13659-021-00322-z>
3. Ferdous A, Janta RA, Arpa RN, Afroze M, Khan M, Moniruzzaman M (2020) The leaves of *Bougainvillea spectabilis* suppressed inflammation and nociception in vivo through the modulation of glutamatergic, cGMP, and ATP-sensitive K⁺ channel pathways. *J Ethnopharmacol* 28(261): 113148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113148>
4. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF (2017) Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance. Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 7(2): 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
5. Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman GC (2019) Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 39(4): 670–679. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
6. Ning K, Jiang L, Hu T, Wang X, Liu A, Bao Y (2020) ATP-sensitive potassium channels mediate the cardioprotective effect of *Panax notoginseng* Saponins against myocardial ischaemia-reperfusion injury and inflammatory reaction. *Biomed Res Int* 2020: 3039184. <https://doi.org/10.1155/2020/3039184>
7. Maqoud F, Scala R, Hoxha M, Zappacosta B, Tricarico D (2022) ATP-sensitive potassium channel subunits in neuroinflammation: novel drug targets in neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 21(2): 130–149. <https://doi.org/10.2174/1871527320666210119095626>
8. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, Ying Wang Y (2018) Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 14(8): 493–507. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5>
9. Lin Q-M, Tang X-H, Lin S-R, Chen B-D, Feng Chen F (2020) Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates overexpression of inflammatory mediators in rat brain after cardiopulmonary resuscitation. *Neural Regen Res* 15(2): 324–331. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265563>
10. Liu Y, Zhao Y, Min Y, Guo K, Chen Y, Huang Z, Long C (2022) Effects and mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of ischemic stroke in hypertensive rats. *Int J Stem Cells* 15(2): 217–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc21136>
11. Xiao X, Xu M, Yu H, Wang L, Li X, Rak J, Wang S, Zhao RC (2021) Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 54. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00765-3>
12. Sheikh A, Yano S, Mitaki S, Haque MDA, Yamaguchi S, Nagai A (2019) A mesenchymal stem cells line (B10) increases angiogenesis in rat MCAO model. *Exp Neurol* 311: 182. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.10.001>
13. Dong H-J, Peng D, Luo Y, Liu R, Yin H-J, Lei Wang L, Hong Sha H, Meng H-P, Ping W, Shang C (2022) The hope for Pandora's Box: mesenchymal stem cells for promoting angiogenesis in stroke and traumatic brain injury. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 354. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00765-3>
14. Egger D, Lavrentieva A, Kugelmeier P, Cornelia Kasper C (2021) Physiologic isolation and expansion of human mesenchymal stem/stromal cells for manufacturing of cell-based therapy products. *Eng Life Sci* 22(3–4): 361–372. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100097>

15. Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Fernandes L, Alenina N, Bader M, Santos R, Massensini A, Campagnole-Santos J (2023) Transgenic rat with overproduction of ubiquitous angiotensin-(1–7) presents neuroprotection in a model of ischemia and reperfusion. *Brain Res Bull* 192: 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.017>
16. Lee SH, Choung JS, Kim JM, Kim H, Kim MY (2023) Distribution of embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells after intravenous infusion in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Life (Basel)* 13(1): 227. <https://doi.org/10.3390/life13010227>
17. Lensman M, Korzhhevskii DE, Mourovets VO, Kostkin VB, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin VA, Polenov SA, Balestrino M (2006). Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1114(1): 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.103>
18. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V (2018) Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells expand. *Cytometry A* 93(1): 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
19. Soltani N, Mohammadi E, Allahtavakoli M, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Haghparsat A (2016) Effects of dimethyl sulfoxid on neuronal response characteristics in deep layers of rat barrel cortex. *Basic Clin Neurosci* 7(3): 213–220. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070306>
20. Sancho M, Fletcher J, Welsh DG (2022) Inward rectifier potassium channels: membrane lipid-dependent mechanosensitive gates in brain vascular cells. *Front Cardiovasc Med* 9: 869481. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.869481>
21. Zeidner G, Sadja R, Reuveny E (2001) Redox-dependent gating of G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 276(38): 35564–35570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105189200>
22. Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman G (2019) Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 39(4): 670–679. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
23. Jackson WF (2021) Myogenic tone in peripheral resistance arteries and arterioles: The Pressure Is On! *Front Physiol* 12: 699517. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.699517>
24. Jha RM, Rani A, Desai SM, Raikwar S, Mihaljevic S, Munoz-Casabella A, Kochanek PM, Catapano J, Winkler E, Citerio G, Hemphill JC, Kimberly WT, Narayan R, Sahuquillo J, Sheth KN, Simard JM (2021) Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: an updated review. *Int J Mol Sci* 22(21): 11899. <https://doi.org/10.3390/ijms222111899>
25. Sancho M, Fletcher J, Welsh DG (2022) Inward rectifier potassium channels: membrane lipid-dependent mechanosensitive gates in brain vascular cells. *Front Cardiovasc Med* 9: 869481. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.869481>
26. Kang P, Ying C, Chen Y, Ford AL, An H, Lee J-M (2022) Oxygen metabolic stress and white matter injury in patients with cerebral small vessel disease. *Stroke* 53(5): 1570–1579. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.035674>
27. Liu K, Guo L, Zhou Z, Pan M, Yan C (2019) Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc Res* 123: 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.01.001>
28. Busija DW, Katakam PV (2014) Mitochondrial mechanisms in cerebral vascular control: shared signaling pathways with preconditioning. *J Vasc Res* 51(3): 175–189. <https://doi.org/10.1159/000360765>
29. Xu W, Xu R, Li Z, Wang Y, Hu R (2019) Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 α signaling. *J Cell Mol Med* 23(3): 1899–1907. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14091>
30. Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Yufang Shi Y (2022) The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1): 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
31. Guo Y, Peng Y, Zeng H, Gao Chen G (2021) Progress in mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke. *Stem Cells Int* 2021: 9923566. <https://doi.org/10.1155/2021/9923566>
32. Gao Y, Chen H, Cang X, Chen H, Di Y, Qi J, Cai H, Luo K, Jin S (2022) Transplanted hair follicle mesenchymal stem cells alleviated small intestinal ischemia-reperfusion injury via intrinsic and paracrine mechanisms in a rat model. *Front Cell Dev Biol* 10: 1016597. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1016597>
33. Korkmaz-İcöz S, Zhou P, Guo Y, Loganathan S, Brlecic P, Radovits T, Sayour AA, Ruppert M, Veres G, Karcik M, Szabó G (2021) Mesenchymal stem cell-derived conditioned medium pro-

- ffects vascular grafts of brain-dead rats against in vitro ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther* 12(1): 144.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02166-3>
34. Liu Y, Chen J, Liang H, Cai Y, Li X, Yan L, Zhou L, Shan L, Wang H (2022) Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther* 13(1): 258.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02927-8>

Recovery of the Functional Activity of K_{ATP} -Channels of Pial Arteries after Ischemia/Reperfusion Using Cell Therapy

I. B. Sokolova^{a, *} and O. P. Gorshkova^a

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

^{*}*e-mail: SokolovaIB@infran.ru*

This study aims to examine the efficiency of intravenous transplantation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) performed 7 days after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) for recovery of the functional activity of K_{ATP} -channels of cerebral arteries. Using a device for intravital visualization of pial vessels, the reaction of arteries to the K_{ATP} -channel blocker glibenclamide (GB), the activator of the same channels of pinacidil (PI), acetylcholine (ACh), and ACh against a background of GB action (ACh/GB) 14 and 21 days after I/R and intravenous hMSC transplantation performed 7 days after ischemic exposure. On exposure to GB 14 days after I/R, 1.5–1.8 times fewer arteries narrowed than in the sham-operated (SO) rats. By day 21 after I/R, the constriction reaction was completely restored, except for arteries with a diameter more 40 μ m. In the cell-therapy group, the constrictor response to GB was completely recovered to the level of SO animals in arteries with a diameter less than 40 μ m by 14 day after I/R exposure; in arteries with a diameter of more than 40 μ m, the constriction reaction did not recover until 21 days. The number of dilations per ACh/GB compared to a clear ACh in SO rats was reduced in 1.6–1.8 times on 14 day after I/R and in 1.6–6.6 after 21 days. In I/R animals on 14 day, the number of dilatations per ACh/GB compared to clear ACh was significantly increased in arteries with a diameter of more than 20 μ m by 1.5–1.7 times, and after 21 days in arteries with a diameter of more than 40 μ m by 1.2 times. After the introduction of hMSC, GB blocked ACh-mediated dilation in arteries less than 40 μ m in diameter both on days 14 and 21 after I/R. In arteries with a diameter of more than 40 μ m the functional activity of K_{ATP} -channels did not recover until 21 days. Conclusion. I/R of the rat cerebral cortex reduces the contribution of K_{ATP} -channels to maintaining the basal tone of the pial arteries and almost completely excludes these channels from the formation of ACh-mediated dilation during 21 days of the postischemic period. Practically did not participate in the dilatory response. Intravenous transplantation of hMSC, performed 7 days after I/R, results in restoration of participation of SMC K_{ATP} -channels in maintaining the basal tone and ACh-mediated dilatation of pial arteries with a diameter less than 40 μ m already 14 days after I/R.

Keywords: ischemia/reperfusion, brain, pial arteries, intravenous transplantation, mesenchymal stem cells, K_{ATP} -channels

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ Т- И L-ТИПА
НА МИКРОГЕМОДИНАМИКУ ЛЕГКИХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ТРОМБОЭМБОЛИИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ У КРОЛИКОВ**

© 2023 г. В. И. Евлахов¹, *, И. З. Поясов¹, Т. П. Березина¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: viespbu@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2022 г.

После доработки 16.03.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

В острых опытах при перфузии изолированных легких кроликов Chinchilla изучали изменения легочной микрогемодинамики в условиях эмболизации легочной артерии на фоне действия этосуксимида, мибефрадила, хлорохина и нифедипина. В ответ на применение блокаторов Ca^{2+} -каналов Т-типа этосуксимида и мибефрадила давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивления уменьшались примерно в равной степени, а посткапиллярное сопротивление не изменялось. В условиях применения хлорохина давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивления снижались больше, чем в ответ на применение этосуксимида и мибефрадила и антагониста Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипина; посткапиллярное сопротивление уменьшалось. В случае применения хлорохина на фоне инфузии блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида большинство показателей легочной микроциркуляции снижалось практически в такой же степени, как и в ответ на применение мибефрадила, а посткапиллярное сопротивление не изменялось. На фоне действия хлорохина в ответ на эмболизацию легочной артерии сопротивление сосудов легких, пре- и посткапиллярное сопротивления возрастали менее выражено, чем при тромбоэмболии в условиях применения этосуксимида, мибефрадила и нифедипина. При моделировании тромбоэмболии на фоне применения хлорохина в условиях блокады K_{ATP} -каналов глибенкламидом исследуемые гемодинамические показатели увеличивались в такой же степени, как и на фоне действия нифедипина. Таким образом, хлорохин проявляет свойства блокатора Ca^{2+} -каналов L- и Т-типа, а также активатора K_{ATP} -каналов, тогда как этосуксимид оказывает блокирующее влияние преимущественно на Ca^{2+} -каналы Т-типа гладкомышечных клеток легочных артериальных сосудов. Сдвиги коэффициента капиллярной фильтрации в указанных условиях в большей степени зависят от изменений прекапиллярного сопротивления, чем от проницаемости эндотелия сосудов легких.

Ключевые слова: тромбоэмболия легочной артерии, коэффициент капиллярной фильтрации, этосуксимид, мибефрадил, хлорохин, нифедипин

DOI: 10.31857/S0869813923050035, **EDN:** XQKAKU

ВВЕДЕНИЕ

В клинических рекомендациях Европейского общества кардиологов отмечено, что у пациентов с тромбоэмболией легочной артерии основной причиной смерти является острая правожелудочковая сердечная недостаточность на фоне повыше-

ния сопротивления сосудов легких [1]. Однако в предлагаемой тактике лечения не указаны способы снижения легочного сосудистого сопротивления, поскольку, по мнению авторов, вазодилататоры уменьшают давление в легочной артерии, но могут усугубить системную гипоперфузию вследствие отсутствия специфичности действия на сосуды легких. Поэтому, как подчеркнуто в обзорной работе [2], дальнейшие исследования механизмов легочной вазодилатации при указанной патологии являются обоснованными и значимыми как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях.

Из физиологической литературы известно, что концентрация внутриклеточного кальция является ключевой в регуляции процессов сокращения и расслабления гладкомышечных клеток легочных сосудов [3]. Вместе с тем применение существующих в настоящее время антагонистов кальция в условиях тромбоэмболии практически ограничено из-за, как отмечено выше, отсутствия их специфичности в отношении сосудов легких. Из литературы также известно, что в ответ на легочную тромбоэмболию имеет место развитие гипоксической вазоконстрикции [4]. В работе [5] показано, что при моделировании гипоксической легочной вазоконстрикции активируются кальциевые каналы L- и T-типа. В исследовании [6] рассматривается вопрос о преимущественной роли кальциевых каналов T-типа гладкомышечных клеток в развитии констрикторных реакций сосудов легких в указанных условиях. Кроме того, потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы T-типа эндотелия участвуют в расслаблении легочных артериальных сосудов [7]. Важно также отметить, что $\text{Cav}3.2$ -каналы T-типа регулируют функцию тромбоцитов и тромбообразование [8]. Нами поэтому было высказано предположение, что для снижения легочного сосудистого сопротивления в условиях тромбоэмболии легочной артерии можно использовать блокаторы Ca^{2+} -каналов T-типа. Одним из блокаторов указанных каналов в нейронах головного мозга является противоэпилептический препарат этосуксимид [9]. Вопрос же о влиянии этого препарата на гладкомышечные клетки легочных сосудов в литературе не освещен. Однако в работе [10] показано, что этосуксимид вызывал у крыс вазодилатацию мозговых артерий и уменьшал констрикторные реакции последних в ответ на применение норадреналина и серотонина. Следует также отметить, что противомаларийный препарат хлорохин уменьшает легочную гипоксическую вазоконстрикцию у крыс, что обусловлено блокадой потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, депо-управляемых Ca^{2+} -каналов, а также рецептор-зависимых Ca^{2+} -каналов гладкомышечных клеток артериальных сосудов легких [11]. Сведения же о влиянии хлорохина на Ca^{2+} -каналы T-типа в литературе практически отсутствуют. Так, в работе [12] показано, что хлорохин может активировать $\text{Cav}3.2$ кальциевые каналы T-типа кожных афферентных нервов. Гидроксихлорохин уменьшает стимулирующее действие тромбина на активацию тромбоцитов в присутствии эндотелиальных клеток [13]. Целью работы явилось проведение сравнительного анализа изменений легочной микрогемодинамики в условиях перфузии изолированных легких при экспериментальной тромбоэмболии легочной артерии на фоне применения этосуксимида, хлорохина, мибефрадила и нифедипина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 43 кроликах *Chinchilla* массой 3.5–4.5 кг (питомник “Рапполово”, Ленинградская область) под наркозом (уретан + хлоралоза (Sigma Chemical Co., США) 500 и 50 мг/кг соответственно, внутривенно). Вначале животных переводили на искусственную вентиляцию легких (частота дыхания 30–40 циклов/мин, дыхательный объем 15–20 см³/кг) с помощью аппарата “Фаза-9”

(Россия), затем вскрывали грудную клетку. Изолированные легкие перфузировали *in situ* двухканальным насосом постоянного расхода (136 мл/мин) (ФБГНУ “ИЭМ”). Капиллярное гидростатическое давление и коэффициент капиллярной фильтрации определяли с помощью методики волюмометрии экстракорпорально циркулирующей крови [14]. Величину перфузионного давления в легочной артерии, левом предсердии и экстракорпоральном резервуаре измеряли тензодатчиками MLT0699 (AD Instruments, Австралия). Контроль газового состава и кислотно-щелочного состояния крови осуществляли газоанализатором ABL-50 (Radiometer, Дания) [14].

Проведено 6 серий экспериментов. В первой серии (7 кроликов, группа сравнения) осуществляли эмболизацию легочной артерии путем введения в нее 10–15 эмболов цилиндрической формы диаметром 0.8 мм и длиной 1–1.5 мм. Для изготовления эмболов в начале эксперимента у животных забирали кровь из левой яремной вены в катетер длиной 15 см, внутренним диаметром 0.8 мм и шприц объемом 1 мл. Сформировавшийся кровяной сгусток удаляли из шприца и катетера, а затем изготавливали из него эмболы [14]. Во второй серии тромбоэмболию моделировали на фоне применения этосуксимида, в третьей и четвертой — соответственно мибефрадила и хлорохина. В пятой серии опытов вначале при помощи микродозатора (ФБГНУ “ИЭМ”) начинали инфузию блокатора K_{ATP} -каналов — глибенкламида (3 мг/кг/мин) [15] в течение 5 мин, затем на фоне инфузии применяли хлорохин и моделировали легочную эмболию. В шестой серии применяли антагонист кальциевых каналов L-типа нифедипин. Этосуксимид (40 мг/кг) [16] и хлорохин (50 мг/кг) [11] вводили в легочную артерию в 5 мл физиологического раствора (0.9%-ный раствор хлорида натрия) медленно в течение 1 мин, и после стабилизации гемодинамических параметров через 5 мин вводили эмболы. Мибефрадил и нифедипин вводили в легочную артерию путем инфузии при помощи микродозатора (ФБГНУ “ИЭМ”) соответственно (1 мкг/кг/мин) [17] и (5 мкг/кг/мин) [18], после начала инфузии через 5 мин моделировали тромбоэмболию. Различия способов введения указанных препаратов обусловлены особенностями их фармакокинетики [19, 20].

Этосуксимид (Mibe GmbH Arzneimittel, Германия), мибефрадил (Sigma Chemical Co., США), хлорохин (Alkaloida Chemical Company Zrt, Венгрия) растворяли в физиологическом растворе. Глибенкламид (ООО “Фармасинтез-Тюмень”) растворяли в 2 мл диметилсульфоксида (ОАО “Марбиофарм”), далее 2 мл раствора добавляли к 8 мл физиологического раствора. Диметилсульфоксид можно вводить внутривенно [21]. В предварительных опытах применение диметилсульфоксида без глибенкламида не вызывало достоверных сдвигов легочной микроциркуляции. Нифедипин (ООО “Озон Фарм”) растворяли в 95%-ном этиловом спирте (10 мг/мл), а затем добавляли к физиологическому раствору до необходимой концентрации [22]. Учитывая фоточувствительность нифедипина, приготовление его раствора проводилось при слабом освещении (мощность лампы 3 Вт, длина волны 590 нм), инфузия осуществлялась в условиях светоизоляции фольгой микродозатора и катетера. Концентрацию катехоламинов в плазме крови, оттекающей от легких, определяли методом Фолина—Чокалтеу. Для отделения плазмы 3 мл гепаринизированной крови центрифугировали (центрифуга ЛМС-3000, Латвия, 1000 об./мин) в течение 20 мин. Для осаждения белков 0.1 мл плазмы добавляли к 1 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и снова центрифугировали (2000 об./мин) в течение 10 мин. Затем к супернатанту добавляли 4 мл 10%-ного раствора карбоната натрия и 0.5 мл реактива Фолина—Чокалтеу. Через 5–10 мин определяли концентрацию катехоламинов на фотометре КФК-3-01 (Россия) при длине волны 650 нм после предварительной калибровки фотометра стандартным 0.1%-ным раствором адреналина (Россия) [23, 24]. Реактив Фолина—Чокалтеу, трихлоруксусная кислота и карбонат натрия были приобретены в “Ленреактив” (Россия). В конце опытов на электронных весах МАССА-К ВК-300 (Россия) измеряли массу легких кроликов.

Таблица 1. Исходные значения показателей микроциркуляции перфузируемых легких кроликов в проведенных опытах

Показатель, размерность	Исходные значения в сериях экспериментов					
	I <i>n</i> = 7	II <i>n</i> = 8	III <i>n</i> = 7	IV <i>n</i> = 8	V <i>n</i> = 6	VI <i>n</i> = 7
Перфузионное давление в легочной артерии, мм рт. ст.	30 ± 2	19 ± 2	21 ± 2	22 ± 1	26 ± 2	21 ± 3
Давление в левом предсердии, мм рт. ст.	5.6 ± 0.3	5.0 ± 0.1	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.1
Капиллярное гидростатическое давление, мм рт. ст.	8.9 ± 0.4	8.3 ± 0.2	7.8 ± 0.3	8.0 ± 0.3	7.9 ± 0.3	8.7 ± 0.1
Легочное сосудистое сопротивление, дин × с × см ⁻⁵	239 ± 8	137 ± 6	161 ± 8	171 ± 8	210 ± 11	157 ± 6
Прекапиллярное сопротивление (Ra), дин × с × см ⁻⁵	207 ± 7	105 ± 7	129 ± 9	137 ± 8	177 ± 11	120 ± 6
Посткапиллярное сопротивление (Rv), дин × с × см ⁻⁵	32 ± 4	32 ± 2	32 ± 3	34 ± 2	33 ± 2	37 ± 3
Отношение Ra/Rv	6.5 ± 0.5	3.3 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3	5.4 ± 0.3	3.2 ± 0.1
Коэффициент капиллярной фильтрации, л/мин/100 г/мм рт. ст.	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Масса легких, г	26 ± 4	17 ± 2	17 ± 3	16 ± 2	16 ± 3	18 ± 2
Концентрация катехоламинов, мкг/л	365 ± 26	370 ± 32	383 ± 22	374 ± 30	Не определ.	387 ± 20

Исходные значения показателей представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая значений показателей, m — стандартная ошибка среднего значения. n — количество животных.

Электрические сигналы измеряемых показателей легочной микрогемодинамики записывали на жесткий диск компьютера IBM PC после аналого-цифрового преобразования платой L-Card L-783 с последующим определением расчетных параметров и анализом по программе ACTest (версия 1.6.59, ООО “Лаборатория автоматизированных систем”, Россия). Изменения параметров микроциркуляции легких и концентрации катехоламинов сравнивали на 5-й мин после применения указанных выше препаратов и эмболов при достижении максимальных сдвигов давления в легочной артерии. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программы Axum 5.0 (Math Soft Inc., США). Гипотезу отличий сдвигов исследуемых показателей от нуля проверяли с использованием t -критерия Стьюдента. Определяли линейный коэффициент корреляции Пирсона между величинами прекапиллярного сопротивления и коэффициентом капиллярной фильтрации. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$. Проверку опытных данных на нормальное распределение проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 представлены исходные значения исследуемых показателей легочной микроциркуляции и концентрации катехоламинов в проведенных сериях экспериментов.

Из данных таблицы следует, что различия между исходными значениями исследуемых показателей микрогемодинамики легких кроликов в опытах были в основном статистически недостоверными.

Таблица 2. Направленность и величина изменений показателей микроциркуляции перфузируемых легких кроликов в ответ на применение блокаторов кальциевых каналов Т- и L-типа

Показатель	Изменение показателей относительно исходного уровня после применения:				
	этосуксимида	мибепфрадила	хлорохина	глибенкламид + хлорохин	нифедипина
	II серия <i>n</i> = 8	III серия <i>n</i> = 7	IV серия <i>n</i> = 8	V серия <i>n</i> = 6	VI серия <i>n</i> = 7
Перфузионное давление в легочной артерии	$-11 \pm 2^{**}$	$-10 \pm 2^{**}$	$-18 \pm 3^{**}$	$-11 \pm 3^*$	$-10 \pm 2^{**}$
Давление в левом предсердии	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2	0 ± 2
Капиллярное гидростатическое давление	-1 ± 2	-1 ± 2	$-8 \pm 2^{**}$	-1 ± 2	$-7 \pm 2^*$
Легочное сосудистое сопротивление	$-15 \pm 2^{**}$	$-12 \pm 2^{**}$	$-23 \pm 4^{**}$	$-14 \pm 5^*$	$-13 \pm 4^*$
Прекапиллярное сопротивление (Ra)	$-19 \pm 3^{**}$	$-15 \pm 3^{**}$	$-24 \pm 3^{**}$	$-16 \pm 6^*$	$-11 \pm 3^{**}$
Посткапиллярное сопротивление (Rv)	0 ± 2	0 ± 2	$-18 \pm 6^*$	0 ± 3	$-18 \pm 5^*$
Отношение Ra/Rv	$-18 \pm 3^{**}$	$-15 \pm 3^{**}$	$-8 \pm 3^*$	$-16 \pm 6^*$	$13 \pm 5^*$
Коэффициент капиллярной фильтрации	-1 ± 2	-1 ± 2	$-20 \pm 7^*$	-10 ± 5	-1 ± 2
Концентрация катехоламинов	-5 ± 3	$-10 \pm 3^*$	$-13 \pm 4^*$	Не определяли	-3 ± 2

Изменения показателей микроциркуляции в процентах к исходному уровню для животных в группе сравнения или к фону после применения препаратов представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая значений показателей, m – стандартная ошибка среднего значения. Цифры со знаком (–) – снижение показателя; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$. Отсутствие звездочки – недостоверные изменения показателя. n – количество животных.

Применение этосуксимида и блокатора Ca^{2+} -каналов Т-типа мибепфрадила приводило к практически одинаковым сдвигам исследуемых показателей микрогемодинамики легких, большинство из которых уменьшалось (табл. 2).

Так, депрессорные сдвиги давления в легочной артерии составили соответственно $-11 \pm 2\%$ ($p < 0.01$) и $-10 \pm 2\%$ ($p < 0.01$). Прекапиллярное сопротивление уменьшалось соответственно на $-19 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) и $-15 \pm 3\%$ ($p < 0.01$) от исходного уровня. Капиллярное гидростатическое давление и посткапиллярное сопротивление при этом не изменялись (табл. 2). Следовательно, этосуксимид, как и мибепфрадил, оказывал преимущественное влияние на Ca^{2+} -каналы Т-типа гладкомышечных клеток легочных артериальных сосудов.

В ответ на применение хлорохина давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивления снижались в большей степени, чем на фоне действия этосуксимида, мибепфрадила и нифедипина. Вместе с тем посткапиллярное сопротивление на фоне применения хлорохина и нифедипина уменьшалось практически одинаково, соответственно на $-18 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) и $-18 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) (табл. 2). Поскольку большее снижение давления в легочной артерии, легочного сосудистого сопротивления и прекапиллярного сопротивления в ответ на применение хлорохина по сравнению с депрессорными эффектами мибепфрадила и нифедипина не могло быть объяснено только его блокирующим действием на кальциевые каналы, нами было высказано предположение, что хлорохин мог активировать калиевые каналы.

Таблица 3. Характер и величина изменений показателей микроциркуляции перфузируемых легких кроликов при тромбоэмболии легочной артерии на фоне применения блокаторов кальциевых каналов Т- и L-типа

Показатель	Изменение показателей при тромбоэмболии легочной артерии					
	в группе сравнения $n = 7$	на фоне применения				
		этосуксимида $n = 8$	мибефрадила $n = 7$	хлорохина $n = 8$	глибенкламид + хлорохин $n = 6$	нифедипина $n = 7$
Перфузионное давление в легочной артерии	$90 \pm 10^{**}$	$47 \pm 3^{**}$	$37 \pm 5^{**}$	$17 \pm 3^{**}$	$26 \pm 3^{**}$	$26 \pm 3^*$
Давление в левом предсердии	-4 ± 2	0 ± 2	0 ± 2	-1 ± 2	1 ± 2	0 ± 2
Капиллярное гидростатическое давление	$17 \pm 4^{**}$	$16 \pm 2^{**}$	$16 \pm 3^*$	$8 \pm 3^*$	$16 \pm 2^{**}$	$15 \pm 2^{**}$
Легочное сосудистое сопротивление	$111 \pm 18^{**}$	$68 \pm 5^{**}$	$48 \pm 6^{**}$	$22 \pm 3^{**}$	$33 \pm 4^{**}$	$36 \pm 7^{**}$
Прекапиллярное сопротивление (R_a)	$120 \pm 22^{**}$	$77 \pm 6^{**}$	$51 \pm 8^{**}$	$22 \pm 4^{**}$	$31 \pm 3^{**}$	$34 \pm 5^{**}$
Посткапиллярное сопротивление (R_v)	$53 \pm 6^{**}$	$40 \pm 3^{**}$	$37 \pm 3^{**}$	$21 \pm 6^*$	$39 \pm 3^{**}$	$43 \pm 6^{**}$
Отношение R_a/R_v	$43 \pm 7^{**}$	$26 \pm 6^{**}$	$12 \pm 4^*$	1 ± 2	$-7 \pm 2^*$	$-8 \pm 3^*$
Коэффициент капиллярной фильтрации	$25 \pm 4^{**}$	$30 \pm 3^{**}$	$21 \pm 6^*$	10 ± 7	$14 \pm 4^{**}$	$14 \pm 6^*$
Концентрация катехоламинов (относительно исходного уровня)	$14 \pm 3^{**}$	$10 \pm 2^{**}$	-4 ± 3	-4 ± 2	Не определяли	$10 \pm 3^*$

Изменения показателей представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая значений показателей, m – стандартная ошибка среднего значения. Цифры со знаком (–) – снижение показателя; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$. Отсутствие звездочки – недостоверные изменения показателя. n – количество животных.

С целью проверки предположения о возможном активирующем влиянии хлорохина на K_{ATP} -каналы были проведены опыты с его применением на фоне инфузии глибенкламида – блокатора K_{ATP} -каналов. (В ответ на инфузию глибенкламида давление в легочной артерии повышалось на 7–10%, т.е. эффект был противоположен таковому в случае применения никорандила – активатора K_{ATP} -каналов [14]). Из данных табл. 2 следует, что в условиях применения хлорохина в сочетании с глибенкламидом показатели легочной микроциркуляции снижались практически в такой же степени, как и в ответ на применение мибefрадила. Можно поэтому полагать, что на фоне действия глибенкламида могло проявляться блокирующее влияние хлорохина на Ca^{2+} -каналы Т-типа. При этом не было отмечено уменьшения капиллярного гидростатического давления и посткапиллярного сопротивления (табл. 2). Следовательно, на фоне применения глибенкламида не проявлялись активирующие эффекты хлорохина на K_{ATP} -каналы, особенно гладкомышечных клеток легочных венозных сосудов. Сдвиги коэффициента капиллярной фильтрации в условиях применения указанных препаратов были взаимосвязаны с величиной прекапиллярного сопротивления: коэффициент корреляции составил 0.76 ± 0.02 ($p < 0.01$).

При моделировании тромбоэмболии легочной артерии на фоне применения антагонистов кальциевых каналов Т- и L-типа практически все исследуемые гемодинамические показатели возрастали меньше, чем в группе сравнения (табл. 3).

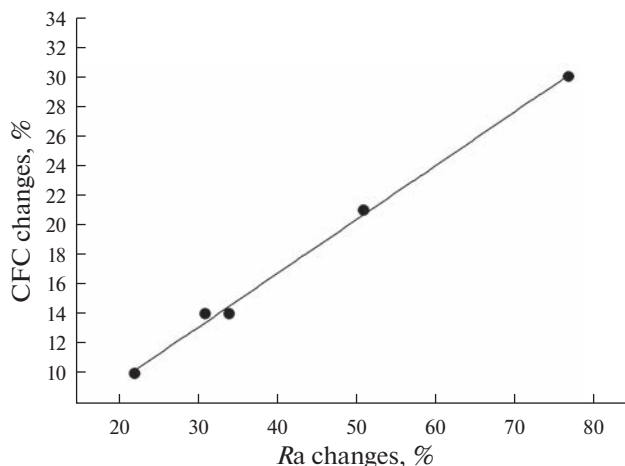


Рис. 1. Зависимость изменений коэффициента капиллярной фильтрации (CFC) от сдвигов прекапиллярного сопротивления (R_a) при тромбоэмболии легочной артерии на фоне применения блокаторов Ca^{2+} -каналов Т- и L-типа.

Однако наименее выраженные приросты давления в легочной артерии, легочного сосудистого сопротивления, капиллярного гидростатического давления, пре- и посткапиллярного сопротивлений в указанных условиях имели место на фоне применения хлорохина по сравнению с таковыми на фоне действия этосуксимида, мибефрадила и нифедипина (табл. 3). В опытах также отмечено, что при эмболизации легочной артерии после применения хлорохина в сочетании с блокатором K_{ATP} -каналов глибенкламидом исследуемые гемодинамические показатели увеличивались практически в такой же степени, как и при моделировании тромбоэмболии на фоне применения антагониста Ca^{2+} -каналов L-типа — нифедипина (табл. 3). Следовательно, в указанных условиях на фоне блокады K_{ATP} -каналов проявлялось блокирующее действие хлорохина на Ca^{2+} -каналы L-типа. В ответ на эмболизацию легочной артерии на фоне действия антагонистов кальция была особенно выражена взаимосвязь между изменениями коэффициента капиллярной фильтрации и сдвигами прекапиллярного сопротивления: коэффициент корреляции составил 0.99 ± 0.01 ($p < 0.01$) (рис. 1).

Можно поэтому полагать, что сдвиги коэффициента капиллярной фильтрации в указанных условиях в большей степени зависят от изменений прекапиллярного сопротивления, чем от проницаемости эндотелия при блокаде кальциевых каналов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как отмечено выше, применение существующих в настоящее время антагонистов кальция в условиях тромбоэмболии легочной артерии с целью снижения легочного сосудистого сопротивления практически ограничено из-за отсутствия их специфичности в отношении сосудов легких [1]. Вместе с тем в работе [2] рассматривается возможность применения гидралазина, который, с одной стороны, тормозит индуцируемое инозитол-трифосфатом высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула в гладкомышечных клетках, а с другой — усиливает открытие Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов, способствуя вазодилатации.

Нами было высказано предположение о возможности применения блокаторов Ca^{2+} -каналов Т-типа для уменьшения легочного сосудистого сопротивления при эмболизации легочной артерии. Это предположение базируется на том, что в указанных условиях имеет место развитие легочной гипоксической вазоконстрикции [4], в которой участвуют механизмы, опосредованные активацией Ca^{2+} -каналов Т-типа [5, 6]. В качестве потенциальных блокаторов Ca^{2+} -каналов Т-типа мы применили противоэpileптический препарат этосуксимид и противомалярийный препарат хлорохин. Эффекты указанных препаратов на микроциркуляцию легких при моделировании тромбоэмболии легочной артерии в литературе не освещены, поскольку эти лекарственные средства традиционно не рассматриваются как вазодилататоры. Следует также отметить, что большинство исследований веществ с потенциальным действием на гладкомышечные клетки выполняется, как правило, на изолированных колечках легочных сосудов, не уделяя существенного внимания вопросам микрогемодинамики.

Результаты проведенных экспериментов показали, что в ответ на применение этосуксимида, как и блокатора Ca^{2+} -каналов Т-типа мибефрадила, исследуемые показатели легочной микроциркуляции уменьшались примерно в равной степени, за исключением капиллярного гидростатического давления и посткапиллярного сопротивления, которые не изменялись (табл. 1). Можно поэтому полагать, что этосуксимид, как и мибефрадил, оказывал блокирующее влияние в основном на Ca^{2+} -каналы Т-типа гладкомышечных клеток легочных артериальных сосудов. Вместе с тем обратил на себя внимание тот факт, что концентрация катехоламинов в случае применения мибефрадила уменьшалась на $10 \pm 3\%$ ($p < 0.05$), тогда как на фоне действия этосуксимида она достоверно не изменялась. Это могло быть обусловлено блокирующими влияниями мибефрадила на Ca^{2+} -каналы N-типа симпатических терминалей легочных сосудов. В литературе имеются сведения о торможении мибефрадилом высвобождения катехоламинов из симпатических нервов сердца [25].

В случае применения хлорохина давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивление снижались в большей степени, чем в ответ на применение этосуксимида, мибефрадила и нифедипина. Концентрация катехоламинов уменьшалась на $13 \pm 4\%$ ($p < 0.05$), т.е. практически на такую же величину, как и в условиях инфузии мибефрадила ($-10 \pm 3\%$, $p < 0.05$) (табл. 1). Нельзя поэтому исключить, что хлорохин, как и мибефрадил, мог оказывать блокирующий эффект на Ca^{2+} -каналы N-типа симпатических терминалей легочных сосудов. Однако проверка указанного предположения нуждается в проведении специальных нейрофизиологических исследований.

Как отмечено выше, на фоне действия хлорохина давление в легочной артерии, легочное сосудистое сопротивление и прекапиллярное сопротивление уменьшались более выражено, чем в случае применения этосуксимида, мибефрадила и нифедипина, что не может быть объяснено только блокирующим действием хлорохина на кальциевые каналы. Нами было высказано предположение, что хлорохин мог также активировать калиевые каналы. В литературе имеются сведения о значимости $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов в развитии легочной гипоксической вазоконстрикции и легочной гипертензии [26, 27]. В ранее проведенных исследованиях нами было показано, что при моделировании легочной тромбоэмболии в условиях применения активатора $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов никорандила констрикторные реакции легочных артериальных сосудов были меньше, чем в контроле, а констрикторные реакции венозных сосудов устранялись [14]. Вместе с тем литературные данные о влиянии хлорохина на калиевые каналы противоречивы. Так, в работе [28] показано, что хлорохин блокировал BK_{Ca} -каналы гладкомышечных клеток трахеи, что, однако, не может способствовать

вазодилатации. В исследовании [29] отмечено, что применение указанного препарата, возможно, вызывает активацию K_{ATP} -каналов сенсорных нервных окончаний в коже.

Результаты опытов, в которых хлорохин применяли на фоне инфузии блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида показали, что в этом случае большинство показателей легочной микроциркуляции снижалось практически в такой же степени, как и в ответ на применение мибефрадила (табл. 2). Следовательно, на фоне действия глибенкламида могло проявляться блокирующее влияние хлорохина на Ca^{2+} -каналы Т-типа. Поскольку в указанных условиях капиллярное гидростатическое давление и посткапиллярное сопротивление не уменьшались, можно полагать, что на фоне применения глибенкламида не проявлялись активирующие эффекты хлорохина на K_{ATP} -каналы гладкомышечных клеток легочных венозных сосудов.

Наше предположение об активирующем влиянии хлорохина на K_{ATP} -каналы подтвердилось также в опытах с моделированием тромбоэмболии легочной артерии. В случае эмболизации последней на фоне действия хлорохина давление в легочной артерии, сопротивление сосудов легких, капиллярное гидростатическое давление, пре- и посткапиллярное сопротивления возрастали в меньшей степени по сравнению с приростами указанных показателей в условиях тромбоэмболии на фоне применения этосуксимида, мибефрадила и нифедипина (табл. 3). Однако при легочной тромбоэмболии на фоне применения хлорохина в сочетании с блокатором K_{ATP} -каналов глибенкламидом исследуемые показатели микроциркуляции повышались практически на такие же величины, как и при моделировании указанной патологии на фоне применения антагониста Ca^{2+} -каналов L-типа — нифедипина, но менее выражено, чем в условиях действия этосуксимида и мибефрадила (табл. 3). Следовательно, при эмболизации легочной артерии на фоне блокады K_{ATP} -каналов проявлялось блокирующее действие хлорохина на Ca^{2+} -каналы L-типа.

Обратил на себя внимание тот факт, что концентрация катехоламинов при эмболизации легочной артерии на фоне применения мибефрадила и хлорохина была на 4% меньше исходного уровня (статистически не достоверно), тогда как в группе сравнения этот показатель возрастал на $14 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Это можно объяснить, как отмечено выше, блокирующими влияниями указанных препаратов на Ca^{2+} -каналы N-типа симпатических терминалей сосудов легких. Вместе с тем при тромбоэмболии на фоне применения этосуксимида концентрация катехоламинов увеличивалась на $10 \pm 2\%$ ($p < 0.01$), т.е. практически на такую же величину, как и в группе сравнения, это свидетельствует о том, что Ca^{2+} -каналы Т-типа симпатических терминалей практически не регулируют высвобождение катехоламинов [30]. В ответ на эмболизацию легочной артерии на фоне применения нифедипина концентрация катехоламинов увеличивалась на $10 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Полученные данные также свидетельствуют об отсутствии значимости Ca^{2+} -каналов L-типа симпатических терминалей в высвобождении из последних катехоламинов, что отмечено и в работе [31]. Вместе с тем в литературе имеются сведения о наличии Cav1.2- и Cav1.3-каналов L-типа в нейронах верхнего шейного ганглия [32]. Можно предположить, что при применении антагонистов кальция L-типа в целостном организме их эффекты на легочную микроциркуляцию в условиях тромбоэмболии будут определяться не только влиянием на кальциевые каналы гладкомышечных клеток сосудов легких, но и на нейроны симпатических вегетативных ганглиев.

Сдвиги коэффициента капиллярной фильтрации в ответ на применение блокаторов кальциевых каналов Т- и L-типа были взаимосвязаны с изменениями прекапиллярного сопротивления: коэффициент корреляции составил 0.76 ± 0.02 ($p < 0.01$). Особенно выражено эта взаимосвязь проявилась при моделировании тромбоэмболии легочной артерии, когда коэффициент корреляции между величинами изме-

нений коэффициента капиллярной фильтрации и прекапиллярного сопротивления составил 0.99 ± 0.01 ($p < 0.01$) (рис. 1). Можно поэтому полагать, что сдвиги коэффициента капиллярной фильтрации в указанных условиях, в основном, зависят от изменений прекапиллярного сопротивления, чем от проницаемости эндотелия. Вместе с тем в работе [33] показано, что блокада Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипином способствует уменьшению проницаемости легочных сосудов при воздушной эмболизации легочной артерии. Кроме того, в литературе имеются сведения о значимости кальциевых каналов T-типа в регуляции проницаемости эндотелия легочных сосудов [34].

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что в ответ на применение этосуксимида, как и блокатора Ca^{2+} -каналов T-типа мибефрадила, давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивления уменьшались примерно в равной степени, а посткапиллярное сопротивление не изменялось. В случае применения хлорохина давление в легочной артерии, прекапиллярное и легочное сосудистое сопротивления снижались более выражено, чем в ответ на применение этосуксимида, мибефрадила и блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нифедипина; посткапиллярное сопротивление также уменьшалось. Если хлорохин применяли на фоне инфузии блокатора K_{ATP} -каналов глибенкламида, то большинство показателей легочной микроциркуляции снижалось практически в такой же степени, как и в ответ на применение мибефрадила, а посткапиллярное сопротивление не изменялось. При моделировании легочной тромбоэмболии на фоне действия хлорохина повышение давления в легочной артерии, сопротивления сосудов легких, пре- и посткапиллярного сопротивлений было менее выраженным, чем при тромбоэмболии в условиях применения этосуксимида, мибефрадила или нифедипина. В ответ на эмболизацию легочной артерии на фоне применения хлорохина в условиях блокады K_{ATP} -каналов глибенкламидом исследуемые показатели микроциркуляции легких возрастали в такой же степени, как и на фоне действия нифедипина. Следовательно, хлорохин проявляет свойства блокатора Ca^{2+} -каналов L- и T-типа, а также активатора K_{ATP} -каналов, тогда как этосуксимид оказывает блокирующее влияние в основном на Ca^{2+} -каналы T-типа гладкомышечных клеток легочных артериальных сосудов. Величина коэффициента капиллярной фильтрации в указанных условиях зависит в большей степени от изменений прекапиллярного сопротивления, чем от проницаемости эндотелия сосудов легких.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении биоэтического комитета Института экспериментальной медицины.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы FGWG-2022-0006 гос. задания Минобрнауки Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.И.Е.), проведение экспериментов (В.И.Е., И.З.П., Т.П.Б.), статистическая обработка данных (В.И.Е., И.З.П.), написание и редактирование рукописи (В.И.Е., И.З.П.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, Bueno H, Geersing GJ, Harjola VP, Huisman MV, Humbert M, Jennings CS, Jiménez D, Kucher N, Lang IM, Lankeit M, Lorusso R, Mazzolai L, Menendez N, Ní Áinle F, Prandoni P, Pruszczyk P, Righini M, Torbicki A, Van Belle E, Zamorano JL* (2020) 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Eur Heart J* 41: 543–603. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz405>
2. *Lyhne MD, Kline JA, Nielsen-Kudsk JE, Andersen A* (2020) Pulmonary vasodilation in acute pulmonary embolism – a systematic review. *Pulm Circ* 10: 2045894019899775. <https://doi.org/10.1177/2045894019899775>
3. *Li HH, Xie LJ, Xiao TT, Huang M, Shen J* (2016) Mibefradil suppresses the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *J Invest Med* 64: 45–49. <https://doi.org/10.1136/jim-d-15-00167>
4. *Fernandes CJ, Luppino Assad AP, Alves-Jr JL, Jardim C, de Souza R* (2019) Pulmonary Embolism and Gas Exchange. *Respiration* 98: 253–262. <https://doi.org/10.1159/000501342>
5. *Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MS, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JX* (2013) Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305: L154–L164. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2012>
6. *Chevalier M, Gilbert G, Roux E, Lory P, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF* (2014) T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 103: 597–606. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu166>
7. *Gilbert G, Courtois A, Dubois M, Cussac LA, Ducret T, Lory P, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF* (2017) T-type voltage gated calcium channels are involved in endothelium-dependent relaxation of mice pulmonary artery. *Biochem Pharmacol* 138: 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.021>
8. *Tamang HK, Yang RK, Song ZH, Hsu SC, Peng CC, Tung YC, Tzeng BH, Chen CC* (2022) Cav3.2 T-type calcium channel regulates mouse platelet activation and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 20: 1887–1899. <https://doi.org/10.1111/jth.15745>
9. *Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC* (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67: 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
10. *Velkova K, Krstev A, Kostadinova I* (1995) Effects of ethosuximide on the cerebral vasculature and hemodynamics of rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17: 677–684.
11. *Wu K, Zhang Q, Wu X, Lu W, Tang H, Liang Z, Gu Y, Song S, Ayon RJ, Wang Z, McDermott KM, Balistrieri A, Wang C, Black SM, Garcia JGN, Makino A, Yuan JX, Wang J* (2017) Chloroquine is a potent pulmonary vasodilator that attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol* 163: 4155–4172. <https://doi.org/10.1111/bph.13990>
12. *Gadotti VM, Kreitinger JM, Wageling NB, Budke D, Diaz P, Zamponi GW* (2020) Cav3.2 T-type calcium channels control acute itch in mice. *Mol Brain* 13(1): 119. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00663-9>
13. *Schreiber K, Sciascia S, Wehrmann F, Weiß C, Leipe J, Krämer BK, Stach KJ* (2021) The effect of hydroxychloroquine on platelet activation in model experiments. *J Thromb Thrombolysis* 52: 674–679. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02325-y>
14. *Evlakhov VI, Poyassov IZ, Berezhina TP* (2022) Changes of Pulmonary Microhemodynamics in Experimental Pulmonary Thromboembolism after Pretreatment with K-Channel Activators. *Bull Exp Biol Med* 173: 302–305. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05538-8>
15. *Chen X, Patel K, Connors SG, Mendonca M, Welch WJ, Wilcox CS* (2007) Acute antihypertensive action of Tempol in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3246–H3253. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00957.2007>
16. *Mifsud J, Collier PS, Millership JS* (2001) The pharmacokinetics of ethosuximide enantiomers in the rat. *Biopharm Drug Dispos* 22: 83–89. <https://doi.org/10.1002/bdd.266>
17. *Honda M, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Tokuyama H, Okubo K, Takamatsu I, Ozawa Y, Saruta TJ* (2001) Divergent renal vasodilator action of L- and T-type calcium antagonists *in vivo*. *Hypertension* 19: 2031–2037. <https://doi.org/10.1097/00004872-200111000-00014>

18. *Alanne L, Bhide A, Hoffren J, Lantto J, Huhta H, Kokki M, Haapsamo M, Acharya G, Räsänen J* (2020) Effects of nifedipine and sildenafil on placental hemodynamics and gas exchange during fetal hypoxemia in a chronic sheep model. *Placenta* 90: 103–108.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.12.014>
19. *Echizen H, Eichelbaum M* (1986) Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem. *Clin Pharmacokinet* 11: 425–449.
<https://doi.org/10.2165/00003088-198611060-00002>
20. *Skerjanec A, Tawfik S, Tam YK* (1996) Nonlinear pharmacokinetics of mibefradil in the dog. *J Pharm Sci* 85: 189–192.
<https://doi.org/10.1021/js9501775>
21. *Tsung YC, Chung CY, Wan HC, Chang YY, Shih PC, Hsu HS, Kao MC, Huang CJ* (2017) Dimethyl Sulfoxide Attenuates Acute Lung Injury Induced by Hemorrhagic Shock/Resuscitation in Rats. *Inflammation* 40: 555–565.
<https://doi.org/10.1007/s10753-016-0502-4>
22. *Gurtu S, Shukla S, Mukerjee D, Khattri S* (2000) Effect of calcium channel blockers on baroreceptor reflex in anesthetized cats. *Pharmacol Res* 42: 101–105.
<https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0659>
23. *Chen LY, Cheng CW, Liang JY* (2015) Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem* 170: 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
24. *Evlakhov VI, Berezina TP, Poyassov IZ, Ovsyannikov VI* (2021) Pulmonary Microcirculation during Experimental Pulmonary Thromboembolism under Conditions of Activation and Blockade of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Bull Exp Biol Med* 171: 198–201.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05194-4>
25. *Göthert M, Molderings GJ* (1997) Mibefradil- and omega-conotoxin GVIA-induced inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 860–863.
<https://doi.org/10.1007/pl00005130>
26. *Bardou M, Goirand F, Marchand S, Rouget C, Devillier P, Dumas JP, Morcillo EJ, Rochette L, Dumas MJ* (2001) Hypoxic vasoconstriction of rat main pulmonary artery: role of endogenous nitric oxide, potassium channels, and phosphodiesterase inhibition. *Cardiovasc Pharmacol* 38: 325–334.
<https://doi.org/10.1097/00005344-200108000-00018>
27. *Breen E, Yuan JX* (2022) Targeting ATP-Sensitive K⁺ Channels to Treat Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 66: 476–478.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0549ED>
28. *Wei MY, Xue L, Tan L, Sai WB, Liu XC, Jiang QJ, Shen J, Peng YB, Zhao P, Yu MF, Chen W, Ma LQ, Zhai K, Zou C, Guo D, Qin G, Zheng YM, Wang YX, Ji G, Liu QH* (2015) Involvement of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺-channels in chloroquine-induced force alterations in pre-contracted airway smooth muscle. *PLoS One* 10: e0121566.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121566>
29. *Ostadhadi S, Foroutan A, Haddadi NS, Norouzi-Javidan A, Momeny M, Zarrinrad G, Ghaffari SH, Dehpour AR* (2017) Pharmacological evidence for the involvement of adenosine triphosphate sensitive potassium channels in chloroquine-induced itch in mice. *Pharmacol Rep* 69: 1295–1299.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.05.021>
30. *Molderings GJ, Likungu J, Göthert M* (2000) N-Type calcium channels control sympathetic neurotransmission in human heart atrium. *Circulation* 101: 403–407.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.101.4.403>
31. *Uhrenholt TR, Nedergaard OA* (2003) Calcium channels involved in noradrenaline release from sympathetic neurones in rabbit carotid artery. *Pharmacol Toxicol* 92: 226–233.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.920505.x>
32. *Wu CY, Lee RH, Chen PY, Tsai AP, Chen MF, Kuo JS, Lee TJ* (2014) L-type calcium channels in sympathetic $\alpha 3\beta 2$ -nAChR-mediated cerebral nitrergic neurogenic vasodilation. *Acta Physiol (Oxf)* 211: 544–558.
<https://doi.org/10.1111/apha.12315>
33. *Huang KL, Lin YC* (1997) Pharmacologic modulation of pulmonary vascular permeability during air embolism. *Undersea Hyperb Med* 24: 315–321. PMID: 9444063
34. *Townsley MI, King JA, Alvarez DF* (2006) Ca²⁺-channels and pulmonary endothelial permeability: insights from study of intact lung and chronic pulmonary hypertension. *Microcirculation* 13: 725–739.
<https://doi.org/10.1080/10739680600930362>

The Impact of T- and L-Type Calcium Channels Blockers on Pulmonary Microhemodynamics in Experimental Model of Pulmonary Thromboembolism

V. I. Evlakhov^a, *, I. Z. Poyassov^a, and T. P. Berezina^a

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

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

In acute experiments on isolated perfused rabbit's Chinchilla lungs changes of pulmonary microhemodynamics were studied in case of pulmonary embolization in the comparison group and after pretreatment with ethosuximide, mibefradil, chloroquine and nifedipine. In response to administration of T-type Ca^{2+} -channel blockers ethosuximide and mibefradil, pulmonary artery pressure, precapillary and pulmonary vascular resistance decreased approximately to the same extent, postcapillary resistance did not change. After pretreatment with chloroquine pulmonary artery pressure, precapillary and pulmonary vascular resistance decreased more than in response to the administration of ethosuximide and mibefradil and the antagonist of L-type Ca^{2+} -channels nifedipine; postcapillary resistance decreased. In the case of chloroquine administration combined with infusion of the K_{ATP} -channel blocker glibenclamide, most parameters of pulmonary microcirculation decreased almost to the same extent as in response to mibefradil administration, and postcapillary resistance did not change. After pretreatment with chloroquine in response to pulmonary embolization, pulmonary vascular resistance, pre- and postcapillary resistance increased less pronounced than with thromboembolism after pretreatment with ethosuximide, mibefradil and nifedipine. When modeling thromboembolism after pretreatment with chloroquine combined with K_{ATP} -channels blocker glibenclamide, the studied hemodynamics parameters increased to the same extent as after nifedipine pretreatment. Thus, chloroquine exhibits the properties of L- and T-type Ca^{2+} -channels blocker, as well as an activator of K_{ATP} -channels, whereas ethosuximide has a blocking effect mainly on T-type Ca^{2+} -channels of smooth muscle cells of pulmonary arterial vessels. Shifts of capillary filtration coefficient under these conditions depend more on changes of precapillary resistance than from the changes of permeability of endothelium of pulmonary vessels.

Keywords: pulmonary thromboembolism, capillary filtration coefficient, ethosuximide, mibefradil, chloroquine, nifedipine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ВИДА ВСКАРМЛИВАНИЯ НА ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ
КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА И УРОВНИ ТРЕФОИЛОВЫХ
ФАКТОРОВ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

© 2023 г. А. В. Шестопалов^{1, 2, 3}, И. М. Колесникова^{1, *}, Д. В. Савчук^{4, 5},
Е. Д. Теплякова⁴, В. А. Шин⁴, Т. В. Григорьева⁶,
Ю. Л. Набока⁴, А. М. Гапонов^{2, 7}, С. А. Румянцев^{1, 2}

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

²ООО “Центр молекулярного здоровья”, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁴Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

⁵Детская городская больница № 1, Ростов-на-Дону, Россия

⁶Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁷НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, Россия

*E-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Изменения в кишечном микробиоме признаются важным компонентом развития ожирения как у взрослых, так и у детей. Одним из значимых факторов формирования кишечной микробиоты в период новорожденности является вид вскармливания, который может оказывать и пролонгированный эффект на микробное сообщество. Кроме того, грудное молоко способствует формированию толерантности к микробиоте кишечника мукозального барьера, одним из компонентов которого являются трефоиловые факторы (TFF2 и TFF3). Целью работы стало изучение состава кишечной микробиоты и содержания трефоиловых факторов в крови у детей и подростков с ожирением в зависимости от типа вскармливания на первом году жизни. Обследовано 93 ребенка без ожирения (Группа 1) и 92 с ожирением (Группа 2). Проводилось исследование уровня TFF2 и TFF3 в сыворотке крови, а также определение таксономического состава микробиома кала методом метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. В целом состав кишечной микробиоты у Группы 1 и 2 был схож. Однако для Группы 2 была характерна меньшая представленность [*Prevotella*], *Epulopiscium* и *Haemophilus* и большая — *Clostridium* и *Catenibacterium*. Ни ожирение, ни вид вскармливания на первом году жизни не оказали влияния на сывороточную концентрацию TFF2 и TFF3. При этом вид вскармливания оказывает пролонгированное влияние на кишечную микробиоту, причем у детей Группы 2 такое влияние было менее выражено. В Группе 1 естественный тип вскармливания на первом году жизни привел к формированию у детей полной толерантности мукозального барьера к микробиому, чего не происходило при смешанном и искусственном вскармливании. В Группе 2 большая часть ассоциаций “TFF–кишечный микробиом” носила положительный характер, что указывает на неблагоприятное взаимодействие кишечной стенки и микробиома. Таким образом, тип вскармливания представляется слабым, но значимым фактором формирования кишечного микробиома у

детей и подростков, который также оказывает влияние на становление толерантности мукозального барьера к кишечной флоре.

Ключевые слова: дети, ожирение, тип вскармливания, кишечный микробиом, треоиловые факторы TFF2 и TFF3

DOI: 10.31857/S0869813923050096, **EDN:** XRFVGC

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день ожирение в детском возрасте является одной из серьезных проблем здравоохранения, носит глобальный характер и затрагивает как развивающиеся, так и развитые страны [1]. Несмотря на то, что известно достаточно много причин и факторов, способствующих развитию ожирения, поиск новых взаимосвязей, в том числе влияние микробиоты кишечника, является перспективным направлением научных исследований [2]. При этом большинство исследований фокусируют свое внимание на изменениях таксономического состава микробиома на уровне филумов. Вместе с тем более подробное исследование микробиома на уровне семейств и родов позволит получить детальную информацию о закономерностях изменений микробного сообщества.

В последнее время человеческий организм рассматривают как метаболическую химеру (суперорганизм, холоорганизм), в котором кишечная микробиота является важнейшим “метаболическим органом” [3]. Поэтому очевидно, что изменение таксономического состава микробного сообщества кишечника приведет к изменению метаболической активности микробиоты и соответственно всего “суперорганизма” [4]. Важным компонентом в формировании системы “суперорганизма” является слизистая оболочка кишечника, барьерные и иммунные механизмы которой обеспечивают симбиотическое взаимодействие макроорганизма с микробиотой.

Одним из компонентов мукозального барьера являются треоиловые факторы (trefoil factors, TFFs), которые представляют собой группу пептидов, синтезирующихся и выделяющихся эпителием слизистых оболочек [5]. Была обнаружена взаимосвязь между уровнем экспрессии TFFs и заболеваниями желудочно-кишечного и урогенитального трактов [6, 7]. В частности, содержание TFFs взаимосвязано с уровнями лептина и грелина у детей с эрозивным гастродуоденитом [8].

На процесс формирования “суперорганизма” значительное влияние оказывает вскармливание грудным молоком в период новорожденности. Грудное молоко является не только источником микробиоты с высоким разнообразием, но и создает среду для формирования нормального микробного сообщества кишечника [9]. В формировании таксономического состава микробиома кишечника новорожденных значительную роль играют компоненты грудного молока, такие как олигосахариды, иммунные факторы, бактерии и бактериальные метаболиты, нутриенты [10]. Учитывая, что олигосахариды и секреторный иммуноглобулин А грудного молока обеспечивают формирование периферической толерантности к микробному сообществу [10, 11], то вероятно, тип вскармливания влияет и на выработку факторов мукозального барьера, в том числе треоиловых пептидов. При этом вскармливание оказывает очень длительный эффект, вплоть до подросткового возраста, что было показано на примере микробиоты ротовой полости [12].

Таким образом, детальное исследование микробного сообщества и треоиловых факторов у детей с ожирением представляет особый интерес.

Целью настоящей работы стала характеристика особенностей состава микробиоты толстого кишечника на уровне семейств и родов, а также содержания треоиловых факторов в крови детей и подростков с ожирением в зависимости от типа вскармливания на первом году жизни.

Таблица 1. Характеристика обследуемых групп

Показатель	Группа 1	Группа 2
Пол, ♂/♀	60.2%/39.8%	47.8%/52.2%
Возраст, лет	13.0 [11.0–15.0]	13.0 [11.0–15.0]
Индекс массы тела, кг/м ²	20.2 [19.4–21.1]	27.0 [25.8–28.7]*
Естественное вскармливание	19 (20.4%)	28 (30.4%)
Смешанное вскармливание	40 (43.0%)	51 (55.4%)
Искусственное вскармливание	34 (36.6%)	13 (14.1%)*

* – различия достоверны по сравнению с Группой 1 ($p < 0.05$).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено проспективное одномоментное исследование на базе Детской городской больницы № 1, г. Ростов-на-Дону; ООО “Центр Молекулярного Здоровья”, г. Москва; Казанского (Приволжского) федерального университета и Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова в период 2019–2020 гг. Были обследованы 185 детей от 10 до 18 лет, средний возраст которых составил 13.1 ± 4.1 лет. Критерии включения: подписанное родителями добровольное информированное согласие и отсутствие приема анти-, про- и пребиотических препаратов за 3 мес. до включения в исследование. Критерии исключения: тяжелые соматические заболевания (хроническая сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, хроническая почечная недостаточность), любые заболевания желудочно-кишечного тракта, а также все острые патологии. На основании клинических рекомендаций “Ожирение у детей” [13] у 92 детей было диагностировано ожирение I–III степени. Таким образом, были сформированы две клинические группы: Группа 1, состоящая из 93 детей без ожирения, и Группа 2, включавшая 92 ребенка с ожирением. В обеих группах обязательно учитывался тип вскармливания на первом году жизни. Характеристика исследуемых групп приведена в табл. 1.

У всех обследуемых было проведено изучение анамнеза, жалоб на момент обращения, общеклинический осмотр и отбор образцов кала и крови. В сыворотке крови проводилось определение содержания трефоиловых факторов 2-го и 3-го типов (TFF2 и TFF3 соответственно) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов Cloud-Clone Corp (США).

Метагеномный анализ сообщества кишечника осуществляли на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета. ДНК из образцов кала выделяли с использованием набора QIAamp DNA stool mini kit (QIAGEN GmbH, Германия). Секвенирование варибельного участка v3–v4 гена 16S рPHK проводили на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США). Полученные последовательности генов 16S рPHK были проанализированы с помощью программы QIIME v.1.9.1 (Knight and Caporaso labs., США) с использованием референсной базы данных Greengenes v.13.8 (Second Genome, Inc., США) с 97.0%-ным порогом сходства между последовательностями. Относительная представленность бактериальных таксонов в общем пуле ридов указана в долях (от 0 до 1), которые были рассчитаны на основе количества картированных ридов для каждого таксона. В последующий статистический анализ были включены идентифицированные семейства и роды, выделенные у 25.0% и более детей хотя бы одной из исследуемых групп.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Полученные массивы данных были провере-

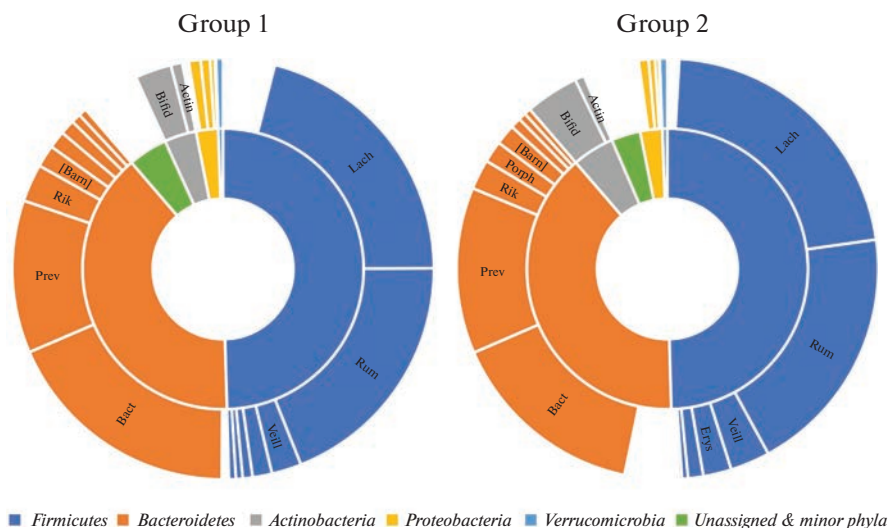


Рис. 1. Таксономический состав кишечного микробиома на уровне филумов и их основных семейств. Actin – Actinomycetaceae; Bifid – Bifidobacteriaceae; [Barn] – [Barnesiellaceae]; Porph – Porphyromonadaceae; Rik – Rikenellaceae; Prev – Prevotellaceae; Bact – Bacteroidaceae; Erys – Erysipelotrichaceae; Veill – Veillonellaceae; Rum – Ruminococcaceae; Lach – Lachnospiraceae.

ны на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Преимущественно полученные данные не подчинялись нормальному распределению, в связи с чем для их описания были использованы медианы [25; 75 перцентили]. Для сравнения содержания трефоиловых факторов и долей отдельных таксонов между исследуемыми группами использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение трех подгрупп (в зависимости от типа вскармливания) выполняли с использованием теста Крускала–Уоллиса, а в случае его положительного результата ($p < 0.05$) проводился апостериорный тест по Коноверу. Кроме того, сравнивали частоту выделения ДНК отдельных таксонов из образцов кала методом Хи-квадрат анализа. Выявление взаимосвязи между долями таксонов кишечного микробиома и содержания трефоиловых факторов в сыворотке проводилось с расчетом коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Коэффициенты корреляции принимались во внимания, если они по модулю были более 0.3 (умеренный уровень связи по шкале Чеддока) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В микробном сообществе кишечника детей и подростков была идентифицирована ДНК, принадлежащая к 83 семействам и 142 родам. При этом ДНК лишь 35 семейств и 50 родов выделялась более чем у 25.0% детей Группы 1 и/или Группы 2. Однако на долю исследуемых 35 семейств приходилось 0.919 [0.893; 0.934] у Группы 1 и 0.928 [0.897; 0.949] у Группы 2, что указывает на полноту описания микробного сообщества. Основными семействами кишечного микробиома у детей обеих групп были Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae и Prevotellaceae, суммарно на долю которых в Группе 1 приходилось 0.721 [0.643; 0.722] и 0.708 [0.634; 0.780] в Группе 2 (рис. 1).

В целом таксономический состав кишечного микробиома был схож у детей исследуемых групп. Однако сравнение долевого содержания семейств и родов у здо-

Таблица 2. Изменения в содержании отдельных таксонов кишечного микробиома у детей исследуемых групп

Филумы		Группа 1		Группа 2	
	Семейства	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)
Bacteroides	[Odoribacteraceae]	100	5.00 [3.00; 9.00]	98.9	4.00 [2.00; 7.00]*
Firmicutes	Clostridiaceae	98,9	5.00 [3.00; 10.00]	98.8	8.00 [5.00; 13.00]*
Proteobacteria	Pasteurellaceae	67.7	0.14 [0.00; 0.50]	48,9*	0.00 [0.00; 0.38]*
	Роды	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)
Bacteroides	[Prevotella]	31.2	0.00 [0.00; 0.07]	18.5*	0.00 [0.00; 0.00]*
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	96.8	1.80 [1.10; 2.90]	96.7	2.40 [1.60; 4.60]*
	<i>Epulopiscium</i>	29.0	0.00 [0.00; 0.07]	5.4*	0.00 [0.00; 0.00]*
	<i>Catenibacterium</i>	16.1	0.00 [0.00; 0.00]	30.4*	0.00 [0.00; 2.40]*
Proteobacteria	<i>Haemophilus</i>	66.7	0.14 [0.00; 0.44]	47.8*	0.00 [0.00; 0.36]*

Примечание. *Здесь и далее:* для удобства восприятия данные по долям отдельных таксонов в общем пуле бактериальной ДНК микробиома кишечника $\times 10^3$. % — частота выделения ДНК таксона из образцов; * — $p \leq 0.05$.

ровых детей и детей с ожирением были выявлены статистически значимые изменения в содержании ряда семейств и родов (табл. 2).

Большинство выявленных различий демонстрировали снижение доли отдельных таксонов в микробной популяции у детей с ожирением. Снижение родов [*Prevotella*] (семейство [Paraprevotellaceae]), *Epulopiscium* (семейство Lachnospiraceae) и *Haemophilus* (семейство Pasteurellaceae) было результатом более редкого выявления ДНК данных таксонов в образцах от детей Группы 2. Подобное может быть следствием меньшего разнообразия кишечного микробиома, характерного для детей с ожирением [14]. При этом у детей Группы 2 чаще выделялась ДНК *Catenibacterium* (семейство Erysipelotrichaceae) из образцов кала. У детей с ожирением также была повышена доля, приходящаяся на семейство Clostridiaceae и его род *Clostridium*. Было показано, что *Clostridium* позитивно взаимосвязано с высокими уровнями липидов сыворотки, мочевой кислоты, артериального давления, объемом талии и индексом массы тела у взрослых [15]. Следует отметить, что в исследование были включены только здоровые дети без признаков метаболических нарушений. Возмозно, выявленное у детей повышение *Clostridium* является одним из первых “маркеров” перерождения микробной флоры, характерное для метаболических нарушений [16].

Анализ содержания трефоиловых факторов у детей и подростков исследуемых групп показал, что ожирение у них не сопровождается изменением сывороточного TFF2, однако у таких пациентов присутствовала тенденция к снижению TFF3 в сыворотке крови ($p = 0.10$) (рис. 2).

Известно, что TFF2 синтезируется слизистой оболочкой желудка и 12-перстной кишки [17]. Он стабилизирует муциновый слой, вступая во взаимодействие с муцином Мис6 и повышая его вязкость, тем самым обеспечивая эффективную защиту от соляной кислоты желудочного сока [17, 18]. TFF3 синтезируется преимущественно бокаловидными клетками толстого кишечника, но также и слизистой бронхов и урогенитального тракта, слюнными, поджелудочной и щитовидной железами, макрофагами и лимфоидной тканью. Он взаимодействует с иммуноглобулин-G-связываю-

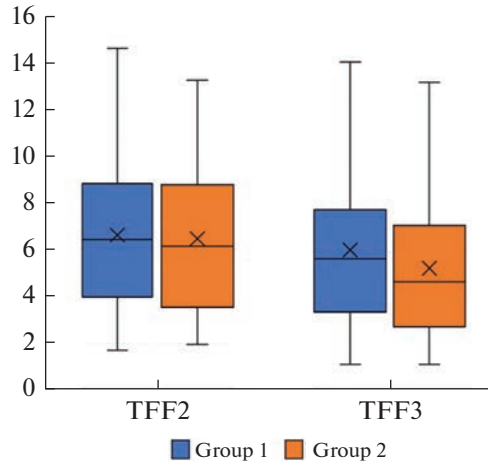


Рис. 2. Содержание треоиловых факторов в сыворотке у исследуемых групп, нг/мл.

щим белком (IgG-Fc-binding protein, FCGBP), и комплекс TFF3–FCGBP принимает участие в мукозальном иммунном барьере, обеспечивая связывание и клиренс различных микроорганизмов [19]. Оба пептида способны связываться с хеморецепторами CXCR4 и CXCR7, активируя хемотаксис, играют роль в регуляции пролиферации и апоптоза клеток, регенерации слизистых оболочек, в ангиогенезе и являются частью хронического воспалительного ответа [5].

Отмеченная нами тенденция к снижению уровня TFF3 в сыворотке крови на первый взгляд не согласуется с результатами исследований, демонстрирующими повышение TFF3 при метаболическом синдроме, сахарном диабете II типа и его осложнениях [20]. Кроме того, было показано, что инсулин и глюкоза усиливают экспрессию TFF3 [21]. Учитывая, что у обследуемых нами детей с ожирением отсутствовали гипергликемия, метаболический синдром, почечные и печеночные нарушения, становится понятным отсутствие повышения концентрации TFF3 в сыворотке.

De Giorgio и соавт. показали, что у мышей, нокаутированных по гену *tff2*, отмечается более низкий уровень лептина в сыворотке и повышенная транскрипция Агути-подобного белка в гипоталамусе [22]. Эти животные характеризовались повышенными аппетитом, расходом энергии и фекальной экскрецией триглицеридов, локомоторной активностью, были устойчивы к индуцированному диетой ожирению, что проявлялось меньшей прибавкой в массе тела и сниженным отложением жира [22]. Напротив, животные, нокаутированные по гену *tff3* характеризуются повышенной чувствительностью к развитию колита и определенным двигательным дефицитом. Если предположить, что сниженный уровень TFF3 в сыворотке крови у детей и подростков с ожирением является результатом низкой конститутивной экспрессии гена *tff3* у этих детей, то данный факт можно расценивать как элемент их наследственной предрасположенности к ожирению.

Несмотря на схожее содержание треоиловых факторов у детей в обеих группах, у детей с ожирением наблюдались изменения во взаимоотношениях “TFFs–таксоны кишечной микробиоты” (табл. 3). У здоровых детей отсутствовали значимые ассоциации “TFF2–кишечная микробиота”, тогда как при ожирении у детей была отмечена негативная корреляция с долей, приходящейся на семейство Cerasicoccaceae.

Интересно также, что выявленные у здоровых детей и подростков взаимосвязи таксонов кишечного микробиома с TFF3 носили негативный характер. При ожи-

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоиловых факторов в сы-
воротке и отдельными семействами и родами кишечной микробиоты

	Группа 1	Группа 2
TFF2	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$, $p \leq 0.05$)	Cerasicoccaceae ($r_s = -0.466$, $p = 0.038$, $n = 20$)
TFF3	Clostridiaceae ($r_s = -0.326$, $p = 0.002$, $n = 92$) Cerasicoccaceae ($r_s = -0.426$, $p = 0.034$, $n = 25$) Christensenella ($r_s = -0.459$, $p = 0.032$, $n = 22$)	Coprobacillus ($r_s = 0.521$, $p = 0.027$, $n = 18$) Slackia ($r_s = 0.442$, $p = 0.027$, $n = 25$)

рении, напротив, все выявленные корреляции между TFF3 и кишечным микробиомом носили позитивный характер. С чем связано изменение знака во взаимоотношении “TFF3—кишечный микробиом” у Группы 2 неясно, но, возможно, это отражает негативные изменения в мукозальном барьере у детей с ожирением [23]. Негативная ассоциация *Christensenella* с уровнем TFF3 согласуется с данными Hiiprала и соавт., показавшими, что содержание TFF3 в кале отрицательно коррелирует с представленностью Christensenellaceae [24].

Была проанализирована взаимосвязь типа вскармливания и таксономического состава кишечного микробиома у обследуемых групп. Примечательно, что характер вскармливания в грудном возрасте оказал пролонгированный эффект на микробиоту кишечника (на уровне родов и семейств) детей и подростков с нормальной массой тела и с ожирением. У здоровых детей из Группы 1 вид вскармливания в грудном возрасте, не затронув основные доминантные семейства и роды, оказал влияние на содержание минорных таксономических групп (табл. 4). Достаточно неожиданным фактом является значительное число различий между искусственным и смешанным вскармливанием, а естественный тип вскармливания занимал в большинстве случаев “промежуточное” положение между смешанным и искусственным.

Группа детей с естественным вскармливанием отличалась от остальных групп только значимо меньшим содержанием [*Eubacterium*], принадлежащего к семейству Erysipelotrichaceae. Было показано, что высокие уровни Erysipelotrichaceae характерны для лиц с ожирением и ассоциированы с дислипидемией [25]. Кроме того, [*Eubacterium*] *biforme* отрицательно коррелирует с уровнем физической активности у здоровых взрослых [26]. Таким образом, меньшее содержание [*Eubacterium*] можно рассматривать как потенциально благоприятный фактор, снижающий риск развития ожирения у детей после естественного вскармливания.

У детей и подростков без ожирения, находившихся на первом году жизни на смешанном типе вскармливания, наблюдалось критическое снижение *Veillonella* в кишечном микробиоме. Значение этого явления однозначно трактовать не представляется возможным, так как, с одной стороны, была показана высокая представленность этого рода у взрослых с ожирением [26], а с другой — его увеличение после длительной физической нагрузки и положительная ассоциация с выносливостью спортсмена [27].

Искусственный тип вскармливания приводил к меньшей “заселяемости” желудочно-кишечного тракта представителями *Butyricimonas* и практически полному отсутствию Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*). Содержание *Butyricimonas* также может оказывать влияние на метаболический профиль, поскольку Lee и соавт. показали, что пребиотическое применение *B. virosa* способствует снижению массы тела, уровня глюкозы и резистентности к инсулину [28]. При этом уменьше-

Таблица 4. Выявленные различия в содержании отдельных таксонов у детей Группы 1 в зависимости от типа вскармливания в первый год жизни

Таксоны	Естественное вскарм- ливание ($n = 19$)		Смешанное вскармли- вание ($n = 40$)		Искусственное вскармливание ($n = 34$)		H^1
Семейства	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	
Christensenellaceae	78.9	0.64 [0.09; 1.95]	82.5	0.94* [0.11; 4.20]	67.6	0.21* [0.00; 1.87]	6.03
Methanobacteriaceae	36.8	0.00 [0.00; 0.14]	47.5	0.00* [0.00; 1.34]	14.7	0.00* [0.00; 0.00]	7.40
Pasteurellaceae	63.2	0.07 [0.00; 1.33]	52.5	0.07* [0.00; 0.22]	57.9	0.35* [0.07; 0.74]	11.75
Verrucomicrobiaceae	57.9	0.42 [0.00; 2.04]	60.0	0.93* [0.00; 10.70]	38.2	0.00* [0.00; 0.29]	6.14
Роды	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	
<i>Butyricimonas</i>	94.7	2.43 [0.98; 4.77]	97.5	2.73 [1.50; 4.55]	79.4	1.48[†] [0.29; 2.42]	11.73
<i>Methanobrevibacter</i>	36.8	0.00 [0.00; 0.14]	45.0	0.00 [0.00; 1.28]	8.8	0.00[†] [0.00; 0.00]	8.24
<i>Veillonella</i>	73.7	0.07 [0.02; 0.34]	40.0	0.00[†] [0.00; 0.21]	73.5	0.14 [0.00; 0.63]	8.54
[<i>Eubacterium</i>]	68.4	0.14[†] [0.00; 0.37]	72.5	0.32 [0.00; 8.15]	82.4	0.63 [0.14; 4.90]	6.22
<i>Haemophilus</i>	63.5	0.07 [0.00; 1.30]	52.5	0.07* [0.00; 0.22]	85.3	0.34* [0.07; 0.66]	10.19
<i>Akkermansia</i>	57.9	0.42 [0.00; 2.04]	60.0	0.93* [0.00; 10.70]	38.2	0.00* [0.00; 0.29]	6.14

Примечание. % — частота выделения ДНК таксона из образцов; ¹ — H -критерий Краскела—Уоллиса; * — различия в доле данного таксона, обнаружены между отмеченными типами вскармливания ($p \leq 0.05$); [†] — доля таксона при отмеченном типе вскармливания отличается его долей при двух других типах вскармливания ($p \leq 0.05$).

ние представителей домена Archaea — Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*) после искусственного вскармливания может играть протективную роль в развитии ожирения, так как было показано, что метан-продуцирующие археи способствуют ожирению у мышей [29].

Также у детей после искусственного вскармливания наблюдалось большое содержание Pasteurellaceae (*Haemophilus*) по сравнению с детьми, имеющими смешанный тип вскармливания в анамнезе. Было показано, что обилие *Haemophilus* в кишечнике детей негативно коррелирует с уровнем инсулина и индексом инсулинорезистентности НОМА-IR у детей с тяжелым ожирением [30]. Таким образом, большее обилие *Haemophilus* и меньшее — Methanobacteriaceae (*Methanobrevibacter*) как результат искусственного вскармливания может рассматриваться в качестве факторов, потенциально снижающих риск развития ожирения у таких детей.

У здоровых детей и подростков, находившихся на первом году жизни на искусственном типе вскармливания, наблюдалось снижение Christensenellaceae, Verrucomicrobiaceae (*Akkermansia*) и *Butyricimonas* в сравнении с группой смешанного вскармливания, что потенциально можно рассматривать как факторы, повышающие риск развития ожирения. Было показано, что обилие Christensenellaceae в ки-

Таблица 5. Выявленные различия в долях отдельных таксонов у Группы 2 в зависимости от типа вскармливания в первый год жизни

Таксоны	Естественное вскарм- ливание ($n = 28$)		Смешанное вскарм- ливание ($n = 51$)		Искусственное вскармливание ($n = 13$)		H^1
	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	%	Доля ($\times 10^3$)	
Семейства							
Turicibacteraceae	53.6	0.07 [0.00; 0.27]	78.4	0.22 [†] [0.07; 1.02]	38.5	0.00 [0.00; 0.91]	6.72
Christensenellaceae	67.9	0.21 [†] [0.00; 1.64]	74.5	1.29 [0.02; 3.69]	92.3	1.34 [0.14; 4.25]	6.33
Alcaligenaceae	100	8.80 [†] [4.08; 14.20]	96.1	3.78 [2.19; 7.46]	100	2.89 [1.82; 8.74]	9.13
Роды							
<i>Turicibacter</i>	53.6	0.07 [0.00; 0.27]	78.4	0.22 [†] [0.07; 1.02]	38.5	0.00 [0.00; 0.91]	6.72
<i>Anaerotruncus</i>	25.0	0.00 [†] [0.00; 0.04]	47.1	0.00 [0.00; 0.14]	53.9	0.07 [0.00; 0.16]	4.80
<i>Sutterella</i>	100	8.43 [†] [3.97; 13.70]	94.1	3.51 [2.01; 7.24]	100	2.82 [1.82; 8.74]	9.29

Примечание. % – частота выделения ДНК таксона из образцов; ¹ – H -критерий Краскела–Уоллиса; [†] – доля таксона при отмеченном типе вскармливания отличается его долей при двух других типах вскармливания ($p \leq 0.05$).

шечнике положительно взаимосвязано с меньшим объемом висцеральной жировой ткани, благоприятным метаболическим профилем и обратно пропорционально индексу массы тела [31, 32]. Представитель рода *Akkermansia* – *A. muciniphila* на сегодняшний день признается одним из основных таксонов кишечной флоры, участвующим в регуляции углеводного и липидного обменов, иммунного ответа, чье содержание негативно ассоциировано с индексом массы тела [33]. Выявленные изменения могут обусловить большую подверженность детей после искусственного вскармливания к развитию ожирения и метаболических нарушений [34].

У детей и подростков с ожирением влияние типа вскармливания в грудном возрасте также оказывало влияние на таксономический состав микробиома (табл. 5). Однако количество таксонов, которые различались у детей Группы 2 в зависимости от типа вскармливания, было меньше, чем в Группе 1. Такое различие понятно, так как у таких детей присутствует более “свежий” и актуальный фактор, влияющий на кишечный микробиом, – ожирение.

В настоящее время активно обсуждается возможное влияние грудного вскармливания на развитие ожирения у детей, и есть основания полагать, что такой тип вскармливания (при условии отсутствия избытка белка в грудном молоке) представляет собой фактор, потенциально способный снижать риск развития ожирения у детей [35].

У детей с ожирением, которые находились в первый год жизни на естественном вскармливании, было отмечено снижение Christensenellaceae и *Anaerotruncus* и, напротив, увеличение Alcaligenaceae (*Sutterella*). Учитывая, что обилие кишечных Christensenellaceae взаимосвязано с меньшим объемом висцеральной жировой ткани и более низкими значениями индекса массы тела [31, 32], их недостаточное содержание в кишечнике после естественного вскармливания можно рассматривать как фактор риска развития ожирения у детей и подростков. Недавно было показано, что содержание *Anaerotruncus* в кишечнике обратно пропорционально индексу массы тела [36]. Полученные нами данные показывают, что недостаточная обсемененность кишечни-

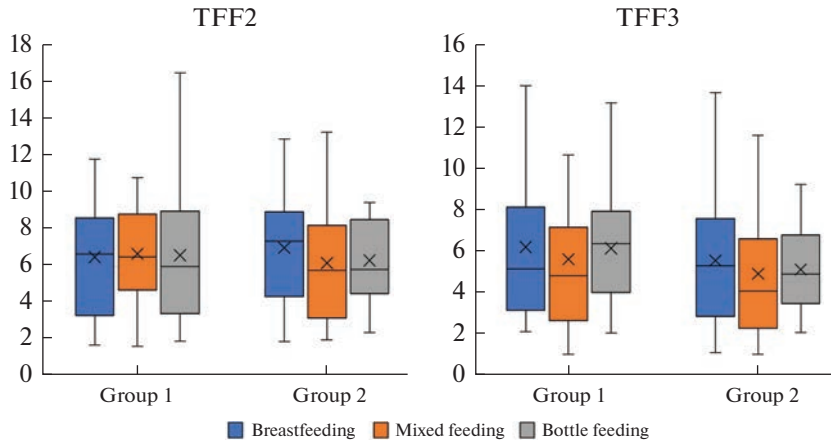


Рис. 3. Содержание треофиловых факторов в сыворотке у исследуемых групп при различных типах вскармливания в первый год жизни, нг/мл.

ка представителями данного таксона после грудного вскармливания может рассматриваться как фактор риска развития ожирения в детском и подростковом возрасте.

Интересным также выглядит в 2.5 раза большая представленность представителей рода *Sutterella* семейства *Alcaligenaceae* у детей с ожирением, которые в младенчестве находились на естественном вскармливании. Было показано, что *Sutterella* обладает легкой провоспалительной активностью в желудочно-кишечном тракте [37], с другой стороны, ряд работ демонстрируют положительное влияние этого таксона на метаболизм глюкозы [38].

Особенностью детей с ожирением после смешанного вскармливания в грудном возрасте было больше содержание семейства *Turicibacteraceae* и его рода *Turicibacter*. Обращает внимание, что его частота выявления из образцов кала детей после смешанного вскармливания была в 1.5 раза выше, чем после естественного вскармливания, и почти в 2 раза выше, чем после искусственного. Создается впечатление, что дополнительные питательные компоненты при смешанном вскармливании и последующее избыточное потребление калорий, приведшее к развитию ожирения, способствовали закреплению *Turicibacter* в кишечном микробиоме.

Тип вскармливания не оказал статистически значимого влияния на уровень треофиловых пептидов в сыворотке крови ни у здоровых детей и подростков, ни у детей с ожирением (рис. 3).

Однако изменился спектр корреляций уровня треофиловых пептидов с содержанием в микробиоме отдельных семейств и родов (табл. 6).

У детей без ожирения после естественного вскармливания отсутствовали взаимосвязи “кишечный микробиом—TFF”, что может указывать на сформировавшуюся толерантность мукозального барьера желудочно-кишечного тракта к микробной флоре. Вероятно, поступающие с грудным молоком многочисленные противовоспалительные пептиды [39] предотвращают иммунный ответ на микробную контаминацию и формируют толерантность кишечной стенки как в верхних, так и нижних отделах желудочно-кишечного тракта.

При этом у детей и подростков без ожирения со смешанным и искусственным вскармливанием в анамнезе появляются единичные ассоциации “TFF2—таксоны кишечного микробиома”, что может указывать на определенное снижение толерантности мукозального иммунитета к отдельным представителям микробного со-

Таблица 6. Выявленные корреляционные взаимосвязи между содержанием трефоилловых факторов в сыворотке и отдельными семействами и родами кишечной микробиоты у исследуемых групп при различных типах вскармливания

	Группа 1	Группа 2
Естественное вскармливание		
	<i>n</i> = 19	<i>n</i> = 28
TFF2	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)	Mogibacteriaceae ($r_s = -0.471, p = 0.027, n = 22$) Prevotellaceae ($r_s = -0.402, p = 0.047, n = 25$) Prevotella ($r_s = -0.402, p = 0.047, n = 25$) Bifidobacteriaceae ($r_s = 0.370, p = 0.053, n = 28$) Bifidobacterium ($r_s = 0.370, p = 0.053, n = 28$) Clostridium ($r_s = 0.578, p = 0.002, n = 27$)
TFF3	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)	Oxalobacter ($r_s = -0.857, p = 0.014, n = 7$)
Смешанное вскармливание		
	<i>n</i> = 40	<i>n</i> = 51
TFF2	S24-7 ($r_s = 0.406, p = 0.055, n = 23$) Odoribacter ($r_s = -0.361, p = 0.026, n = 38$)	Не выявлено значимых корреляций ($r_s \geq 0.3$ при $p \leq 0.05$)
TFF3	Barnesiellaceae ($r_s = -0.456, p = 0.004, n = 39$) Clostridiaceae ($r_s = -0.407, p = 0.009, n = 40$) SMB53 ($r_s = -0.394, p = 0.038, n = 28$) Odoribacteraceae ($r_s = -0.343, p = 0.031, n = 40$) Victivallaceae ($r_s = -0.457, p = 0.057, n = 18$) Pasteurellaceae ($r_s = 0.491, p = 0.024, n = 21$) S24-7 ($r_s = 0.401, p = 0.058, n = 23$) Haemophilus ($r_s = 0.491, p = 0.024, n = 21$)	Rikenellaceae ($r_s = 0.324, p = 0.020, n = 51$) Streptococcaceae ($r_s = 0.320, p = 0.025, n = 49$) Streptococcus ($r_s = 0.322, p = 0.0242, n = 49$) Slackia ($r_s = 0.662, p = 0.010, n = 14$) Coprobacillus ($r_s = 0.700, p = 0.017, n = 11$)
Искусственное вскармливание		
	<i>n</i> = 34	<i>n</i> = 13
TFF2	Coprobacillus ($r_s = 0.661, p = 0.038, n = 10$)	Anaerotruncus ($r_s = 0.750, p = 0.052, n = 7$)
TFF3	Clostridiaceae ($r_s = -0.353, p = 0.044, n = 33$) Turicibacteraceae ($r_s = -0.395, p = 0.051, n = 25$) Turicibacter ($r_s = -0.395, p = 0.051, n = 25$)	Lachnospira ($r_s = 0.629, p = 0.028, n = 12$)

общества. Интересно, что у детей Группы 1, в анамнезе которых был смешанный тип вскармливания, присутствовала негативная взаимосвязь TFF2 и *Odoribacter*. Учитывая, что синтез TFF2 стимулируется провоспалительными цитокинами, появление подобной взаимосвязи может быть следствием противовоспалительного действия *Odoribacter splanchnicus* на кишечную стенку [40–42]. Также у детей после смешанного вскармливания наблюдалась положительная корреляция с обилием S24-7 (Muribaculaceae). Представители данного семейства являются основными потребителями муцинов [43], что может объяснить появление позитивной ассоциации с TFF2 — стабилизатором муцинового слоя.

Также смешанный и искусственный типы вскармливания, по-видимому, не приводят к формированию полной толерантности в нижних отделах желудочно-кишечного тракта и связаны с появлением взаимосвязи “TFF3—кишечный микробиом”. Сле-

дует отметить, что в основном такие связи носили негативный характер, это указывает на протективное действие кишечной флоры на мукозальный барьер.

Обращает на себя внимание, что у детей и подростков с ожирением с естественным типом вскармливания в анамнезе, напротив, наблюдались многочисленные корреляции TFF2 с таксонами кишечной флоры, носящие как положительный, так и отрицательный характер.

С одной стороны, возможно предполагать, что у этих детей изначально после естественного вскармливания сформировались физиологические толерантные взаимоотношения между микрофлорой верхних отделов желудочно-кишечного тракта и мукозальной системой желудка и тонкой кишки. Однако в процессе развития ожирения избыток высококалорийной пищи вызвал синдром избыточного бактериального роста, развивающийся у 72.4% детей с ожирением [44], и тонкий кишечник контаминировала флора, к которой в процессе грудного вскармливания толерантность не была сформирована.

Возможен второй сценарий, при котором в силу различных причин естественное вскармливание не привело к формированию толерантности. К таким причинам могут относиться перенесенные кишечные инфекции, особенности пищевого поведения матери и химического состава грудного молока — дефицит в нем фукоолигосахаридов, секреторных иммуноглобулинов или избыток белка, который не только способствует развитию ожирения [35], но и оказывает заметное влияние на микробиом кишечника [45].

У детей с ожирением, имеющих в анамнезе смешанный и искусственный типы вскармливания, выявленные взаимосвязи “TFF3—кишечный микробиом” носили позитивный характер. Подобные взаимоотношения могут свидетельствовать о потенциально неблагоприятном взаимодействии кишечной микрофлоры с мукозальным барьером толстой кишки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, таксономический состав кишечной микробиоты детей и подростков с ожирением схож с детьми без ожирения. Однако для детей с ожирением характерна меньшая представленность таких минорных родов, как [*Prevotella*], *Epulopiscium* и *Haemophilus* и большая — *Clostridium* и *Catenibacterium*.

Нами не обнаружено изменений в содержании трефоиловых пептидов у детей и подростков с ожирением. Подобное наблюдение может указывать на то, что детское ожирение без метаболических нарушений не сопровождается нарушениями мукозальных барьеров желудочно-кишечного тракта.

Тип вскармливания не оказывал значимого влияния на содержание трефоиловых факторов у здоровых детей и подростков вне зависимости от наличия или отсутствия ожирения. Однако вид вскармливания оказывает пролонгированное влияние на кишечную микробиоту вплоть до подросткового возраста. У детей и подростков без ожирения с искусственным вскармливанием в анамнезе специфические изменения таксономического состава микрофлоры кишечника потенциально способны повышать риск развития ожирения. При этом у детей и подростков с ожирением тип вскармливания продемонстрировал меньшее влияние на кишечный микробиом, по-видимому, вследствие наличия у них более актуального влияющего фактора — ожирения.

Естественный тип вскармливания у детей с нормальной массой тела приводил к формированию полной толерантности мукозального барьера к микробной флоре, на что указывает отсутствие ассоциаций “кишечный микробиом—трефоиловые пептиды”. При этом для детей, имеющих смешанный или искусственный типы вскармливания в анамнезе, подобные взаимосвязи были характерны. У детей без

ожирения отсутствие связи “кишечный микробиом—трефоилы пептиды”, очевидно, указывает на протективное действие кишечной флоры в отношении мукозального барьера. На фоне ожирения у детей большая часть выявленных корреляционных связей “TFF—кишечный микробиом”, напротив, носила положительный характер, что свидетельствует о неблагоприятном взаимодействии кишечной стенки и бактериальной флоры.

Таким образом, тип вскармливания представляется слабым, но значимым фактором формирования кишечного микробиома у детей и подростков, который также оказывает влияние на становление толерантности мукозального барьера к кишечной флоре.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено Российским национальным исследовательским медицинским университетом им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019) и Ростовским государственным медицинским университетом Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников и их родителей было получено добровольное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.В.Ш., С.А.Р., А.М.Г., В.А.Ш.); планирование эксперимента (А.В.Ш., С.А.Р., А.М.Г., Т.В.Г., Е.Д.Т.), сбор данных (Д.В.С., И.М.К., Е.Д.Т., В.А.Ш.), обработка данных (И.М.К., Д.В.С.), написание манускрипта (А.В.Ш., И.М.К., Д.В.С., Ю.Л.Н.), редактирование манускрипта (С.А.Р., А.М.Г., Т.В.Г., Е.Д.Т., В.А.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lobstein T, Jackson-Leach R, Moodie ML, Hall KD, Gortmaker SL, Swinburn BA, James WPT, Wang Y, McPherson K (2015) Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *Lancet* (London, England) 385: 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)
2. Singer-Englar T, Barlow G, Mathur R (2019) Obesity, diabetes, and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 3–15. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1543023>
3. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG (2014) Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 28: 1221–1238. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
4. Шестопалов АВ, Шатова ОП, Комарова ЕФ, Румянцев СА (2020) Особенности метаболического сопряжения в системе “СУПЕРОРГАНИЗМА” (хозяин—микробиота). *Крымск журн экспер клин мед* 10: 95–103. [Shestopalov AV, Shatova OP, Komarova EF, Rumyantsev SA (2020) Features of metabolic coupling in the “SUPERORGANISM” system (host—microbiota) *Krymsk J Exper Klin Med* 10: 95–103. (In Russ)]. <https://doi.org/10.37279/2224-6444-2020-10-2-95-103>
5. Шестопалов АВ, Дворников АС, Борисенко ОВ, Тутельян АВ (2019) Трефоилы факторы — новые маркеры мукозального барьера желудочно-кишечного тракта. *Инфекция и иммунитет* 9: 39–46. [Shestopalov AV, Dvornikov AS, Borisenko OV, Tutelyan AV (2019) Trefoil factors — new markers of gastrointestinal mucosal barrier. *Infekciya i immunitet* 9: 39–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-39-46>

6. Шестопалов АВ, Трофименко ОВ, Шестопалова МА (2012) Уровень трефоиловых пептидов (TFF-1 и TFF-2) у детей с хроническими гастродуоденитами. *Фундамент исследований* 10: 363–366. [Shestopalov AV, Trofimenko OV, Shestopalova MA (2012) Level trefoil peptides (TFF-1 and TFF-2) in children with chronic gastroduodenitis. *Fundament Issledovan* 10: 363–366. (In Russ)].
7. Шестопалов АВ, Мирошниченко ЮА, Рымашевский АН (2013) Содержание муцинов (MUC 5 AC, MUC 6) и трефоилового пептида-3 (TFF-3) в эндометрии и цервико-вагинальном секрете у женщин с физиологической беременностью. *Фундамент исследований* 12: 104–106. [Shestopalov AV, Miroshnichenko YA, Rymashevskiy AN (2013) The concentration of mucin (MUC 5 ac, MUC 6) and trefoil peptide-3 (TFF-3) in the endometrium and cervico-vaginal secretions of women with physiological pregnancy. *Fundament Issledovan* 12: 104–106. (In Russ)].
8. Шестопалов АВ, Румянцев СА, Шестопалова МА, Сапрыкина ЕА, Шумилов ПВ (2014) Влияние *H. pylori* на уровень трефоиловых факторов и адипокинов у детей с гастродуоденитами. *Педиатрия. Журн им ГН Сперанского* 93: 6–10. [Shestopalov AV, Rumyantsev SA, Shestopalova MA, Saprykina EA, Shumilov PV (2014) Effect of *H. pylori* on the level of trefoil factors and adipokines in children with gastroduodenitis. *Pediatrics. Zhurn im GN Speranskogo* 93: 6–10. (In Russ)].
9. Ford SL, Lohmann P, Preidis GA, Gordon PS, O'Donnell A, Hagan J, Venkatachalam A, Balderas M, Luna RA, Hair AB (2019) Improved feeding tolerance and growth are linked to increased gut microbial community diversity in very-low-birth-weight infants fed mother's own milk compared with donor breast milk. *Am J Clin Nutr* 109: 1088–1097. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz006>
10. Le Doare K, Holder B, Bassett A, Pannaraj PS (2018) Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front Immunol* 9: 361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361>
11. Donald K, Petersen C, Turvey SE, Finlay BB, Azad MB (2022) Secretory IgA: Linking microbes, maternal health, and infant health through human milk. *Cell Host Microbe* 30: 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.005>
12. Eshriqui I, Viljakainen HT, Ferreira SRG, Raju SC, Weiderpass E, Figueiredo RAO (2020) Breastfeeding may have a long-term effect on oral microbiota: results from the Fin-HIT cohort. *Int Breastfeed J* 15: 42. <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00285-w>
13. Peterkova VA, Bezlepikina OB, Bolotova NV, Bogova EA, Vasyukova OV, Girsh YV, Kiyayev AV, Kostrova IB, Malievskiy OA, Mikhailova EG, Okorokov PL, Petryaykina EE, Taranushenko TE, Khranova EB (2021) Clinical guidelines “Obesity in children”. *Probl Endocrinol* 67: 67–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.14341/probl12802>
14. Chen X, Sun H, Jiang F, Shen Y, Li X, Hu X, Shen X, Wei P (2020) Alteration of the gut microbiota associated with childhood obesity by 16S rRNA gene sequencing. *Peer J* 8: e8317. <https://doi.org/10.7717/peerj.8317>
15. Zeng Q, Li D, He Y, Li Y, Yang Z, Zhao X, Liu Y, Wang Y, Sun J, Feng X, Wang F, Chen J, Zheng Y, Yang Y, Sun X, Xu X, Wang D, Kenney T, Jiang Y, Gu H, Li Y, Zhou K, Li S, Dai W (2019) Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Sci Rep* 9: 13424. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49462-w>
16. Гапонов АМ, Волкова НИ, Ганенко ЛА, Набока ЮЛ, Маркелова МИ, Синягина МН, Харченко АМ, Хуснутдинова ДР, Румянцев СА, Тутельян АВ, Макаров ВВ, Юдин СМ, Шестопалов АВ (2021) Особенности микробиома толстой кишки у пациентов с ожирением при его различных фенотипах (оригинальная статья). *Журн микробиол, эпидемиол и иммунобиол* 98: 44–155. [Gaponov AM, Volkova NI, Ganenko LA, Naboka YL, Markelova MI, Sinyagina MN, Kharchenko AM, Khusnutdinova DR, Rumyantsev SA, Tutelyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Shestopalov AV (2021) Features of the colon microbiome in obese patients with its various phenotypes (original article). *Zhurn microbiol, epidemiol and immunobiol* 98: 44–155. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-66>
17. Heuer F, Stürmer R, Heuer J, Kalinski T, Lemke A, Meyer F, Hoffmann W (2019) Different Forms of TFF2, A Lectin of the Human Gastric Mucus Barrier: *In Vitro* Binding Studies. *Int J Mol Sci* 20(23): 5871. <https://doi.org/10.3390/ijms20235871>
18. Hoffmann W (2015) TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol* 47: 806–816. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3090>
19. Hoffmann W (2020) Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci* 21(12): 4535. <https://doi.org/10.3390/ijms21124535>

20. Yang Y, Lin Z, Lin Q, Bei W, Guo J (2022) Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death Dis* 13: 62. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04504-6>
21. Roa JB, Tortolero GS, Gonzalez E (2013) Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *J Heal Sci* 3: 1–12. <https://doi.org/10.17532/jhsci.2013.26>
22. De Giorgio MR, Yoshioka M, Riedl I, Moreault O, Cherizol R-G, Shah AA, Blin N, Richard D, St-Amand J (2013) Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 21: 1389–1395. <https://doi.org/10.1002/oby.20165>
23. Paone P, Cani PD (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69: 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
24. Heitkemper MM, Cain KC, Shulman RJ, Burr RL, Ko C, Hollister EB, Callen N, Zia J, Han CJ, Jarrett ME (2018) Stool and urine trefoil factor 3 levels: associations with symptoms, intestinal permeability, and microbial diversity in irritable bowel syndrome. *Benef Microbes* 9: 345–355. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0059>
25. Kaakoush NO (2015) Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 84. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
26. Palmas V, Pisanu S, Madau V, Casula E, Deledda A, Cusano R, Uva P, Vascellari S, Loviselli A, Manzin A, Velluzzi F (2021) Gut microbiota markers associated with obesity and overweight in Italian adults. *Sci Rep* 11: 5532. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84928-w>
27. Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham L-D, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, Yang Z, Hattab MW, Avila-Pacheco J, Clish CB, Lessard S, Church GM, Kostic AD (2019) Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 25: 1104–1109. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
28. Lee H, An J, Kim J, Choi D, Song Y, Lee C-K, Kong H, Kim SB, Kim K (2022) A Novel Bacterium, *Butyricimonas virosa*, Preventing HFD-Induced Diabetes and Metabolic Disorders in Mice via GLP-1 Receptor. *Front Microbiol* 13: 858192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858192>
29. Conway de Macario E, Macario AJL (2009) Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 299: 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.011>
30. Yuan X, Zhang Y, Lin X, Yang X, Chen R (2023) Association of gut microbiota and glucose metabolism in children with disparate degrees of adiposity. *Pediatr Obes* 18(4): e13009. <https://doi.org/10.1111/ijpo.13009>
31. Waters JL, Ley RE (2019) The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol* 17: 83. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0699-4>
32. Tavella T, Rampelli S, Guidarelli G, Bazzocchi A, Gasperini C, Pujos-Guillot E, Comte B, Barone M, Biagi E, Candela M, Nicoletti C, Kadi F, Battista G, Salvioli S, O'Toole PW, Franceschi C, Brigidi P, Turroni S, Santoro A (2021) Elevated gut microbiome abundance of Christensenellaceae, Porphyromonadaceae and Rikenellaceae is associated with reduced visceral adipose tissue and healthier metabolic profile in Italian elderly. *Gut Microbes* 13: 1–19. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1880221>
33. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y (2020) Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front Microbiol* 11: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00219>
34. Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP (2014) The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 14: 1267. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>
35. Verduci E, Gianni ML, Vizzari G, Vizzuso S, Cerasani J, Mosca F, Zuccotti GV (2021) The Triad Mother-Breast Milk-Infant as Predictor of Future Health: A Narrative Review. *Nutrients* 13(2): 486. <https://doi.org/10.3390/nu13020486>
36. Lv Y, Qin X, Jia H, Chen S, Sun W, Wang X (2019) The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing. *Br J Nutr* 122: 986–995. <https://doi.org/10.1017/S0007114519001909>

37. Hiippala K, Kainulainen V, Kalliomäki M, Arkkila P, Satokari R (2016) Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp. *Front Microbiol* 7: 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01706>
38. Wang C, Zhang H, Liu H, Zhang H, Bao Y, Di J, Hu C (2020) The genus *Sutterella* is a potential contributor to glucose metabolism improvement after Roux-en-Y gastric bypass surgery in T2D. *Diabetes Res Clin Pract* 162: 108116. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108116>
39. Chatterton DEW, Nguyen DN, Bering SB, Sangild PT (2013) Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1730–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.028>
40. Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, Bowers JR, Lemmer D, Engelthaler DM, Eklund KK, Facciotti F, Satokari R (2020) Novel *Odoribacter splanchnicus* Strain and Its Outer Membrane Vesicles Exert Immunoregulatory Effects *in vitro*. *Front Microbiol* 11: 575455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575455>
41. Hoffmann W (2021) Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Links to Inflammation: A Re-evaluation and New Medical Perspectives. *Int J Mol Sci* 22(9): 4909. <https://doi.org/10.3390/ijms22094909>
42. Lima SF, Gogokhia L, Viladomiu M, Chou L, Putzel G, Jin W-B, Pires S, Guo C-J, Gerardin Y, Crawford CV, Jacob V, Scherl E, Brown S-E, Hambor J, Longman RS (2022) Transferable Immunoglobulin A-Coated *Odoribacter splanchnicus* in Responders to Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis Limits Colonic Inflammation. *Gastroenterology* 162: 166–178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.09.061>
43. Pereira FC, Wasmund K, Cobankovic I, Jehmlich N, Herbold CW, Lee KS, Sziranyi B, Vesely C, Decker T, Stocker R, Warth B, von Bergen M, Wagner M, Berry D (2020) Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nat Commun* 11: 5104. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18928-1>
44. Налетов АВ, Пушкарук ВВ (2022) Состояние кишечной микробиоты у детей с ожирением. *Child Med North-West* 10: 70–74. [Nalyotov AV, Pushkaruk VV (2022) The state of the intestinal microbiota in obese children. *Child Med North-West* 10: 70–74. (In Russ)].
45. Dong TS, Luu K, Lagishetty V, Sedighian F, Woo S-L, Dreskin BW, Katzka W, Chang C, Zhou Y, Arias-Jayo N, Yang J, Ahdoot A, Li Z, Pisegna JR, Jacobs JP (2020) A High Protein Calorie Restriction Diet Alters the Gut Microbiome in Obesity. *Nutrients* 12(10): 3221. <https://doi.org/10.3390/nu12103221>

Influence of the Infant Feeding on the Taxonomy of the Gut Microbiome and the Trefoil Factors Level in Children and Adolescents

A. V. Shestopalov^{a, b, c}, I. M. Kolesnikova^{a, *}, D. V. Savchuk^{d, e}, E. D. Teplyakova^d,
V. A. Shin^d, T. V. Grigoryeva^f, Yu. L. Naboka^d, A. M. Gaponov^{b, g}, and S. A. Roumiantsev^{a, b}

^aPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^bCenter for Molecular Health, Moscow, Russia

^cDmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Moscow, Russia

^dRostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

^eChildren's City Hospital № 1 in Rostov-on-Don, Rostov-on-Don, Russia

^fKazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

^gNegovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical
Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

*e-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Changes in the gut microbiome are recognized as an important component of obesity in both adults and children. One factor in the gut microbiome formation is the infant feeding type, which may also have a prolonged effect on the microbial community. Breast milk contributes to the formation of mucosal tolerance to the intestinal microbiota. In turn, trefoil factors (TFF2 and TFF3) are important components of the mucosal barrier. The aim was to study the composition of the gut microbiota and the trefoil factors level in the blood of children and adolescents with obesity, depending on the infant feeding

type. The study included 93 non-obese children (Group 1) and 92 obese children (Group 2). Serum TFF2 and TFF3 levels were determined by enzyme immunoassay in each study participant. The taxonomic composition of the fecal microbiome was determined by metagenomic sequencing of the 16S rRNA gene. In general, the taxonomic composition of the gut microbiota in Groups 1 and 2 was similar. However, Group 2 had less by [*Prevotella*], *Epulopiscium* and *Haemophilus* and more by *Clostridium* and *Catenibacterium*. Neither obesity nor the infant feeding type of influenced the serum concentration of TFF2 and TFF3. However, the infant feeding has a prolonged effect on the gut microbiota, and in Group 2 this effect was less pronounced. In Group 1, breastfeeding led to the formation of a complete mucosal tolerance to the microbiome, which did not occur with mixed and bottle feeding. In Group 2, most of the “TFFs—gut microbiome” associations were positive, indicating an unfavorable interaction between intestinal wall and microbiome in obese children and adolescents. Thus, infant feeding type seems to be a weak but significant factor in the gut microbiome formation in children and adolescents, which also affects the formation of mucosal tolerance to the intestinal microbiota.

Keywords: children, obesity, infant feeding, gut microbiome, trefoil factors TFF2 and TFF3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КОРРЕКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ПОВЕДЕНЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ
ТРАВМЕ ПРЕПАРАТОМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
К КОМПОНЕНТУ С3 КОМПЛЕМЕНТА**

© 2023 г. Н. Б. Серебряная^{1, *}, Е. Е. Фомичева¹, С. Н. Шанин¹, Т. А. Филатенкова¹,
А. В. Жахов², К. А. Некрасова³, А. М. Ищенко²

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: serebr@gmail.com

Поступила в редакцию 14.03.2023 г.

После доработки 15.04.2023 г.

Принята к публикации 18.04.2023 г.

После черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в ЦНС развивается воспаление, активным участником которого является система комплемента. Активированные фрагменты комплемента инициируют воспаление, а в дальнейшем существенно влияют на процессы репарации и регенерации. Цель работы – уменьшить нейροиммунные нарушения после экспериментальной ЧМТ путем блокирования избыточного воспаления на ранних этапах травматической болезни моноклональными антителами к С3-компоненту комплемента. Работа выполнена на 65 крысах-самцах породы Wistar с использованием модели “падающего груза”. Для коррекции нейровоспаления вводили препарат рекомбинантного моноклонального антитела 3A8, специфичного к неопределяемому С3-компоненту комплемента крысы, блокирующего активацию альтернативного пути комплемента (вводили в/в в дозе 100 мг/кг массы). Как препарат сравнения использован препарат рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-1 человека (rIL-1RA), который вводили п/к в дозе 50 мг/кг массы тела. Оба препарата вводили однократно через 30 мин после ЧМТ (режим 1) или 24 ч после ЧМТ (режим 2). Исследовали уровни кортикостерона в крови, цитотоксическую и пролиферативную активность лимфоцитов и поведенческие реакции в тесте “крестообразный лабиринт”. Полученные данные свидетельствуют о том, что на 7-е сут после ЧМТ у крыс, получавших антитела 3A8 в режиме 1, уменьшилась посттравматическая потеря массы тела, повысилась цитотоксическая активность спленоцитов и их пролиферативная активность, а также увеличилась двигательная и исследовательская активности при существенном снижении уровня тревожности. Введение rIL-1RA в указанных режимах, как и совместное использование обоих препаратов, не имело существенного влияния на изученные параметры.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, комплемент, rIL-1RA, поведение, кортикостерон, спленоциты

DOI: 10.31857/S0869813923050084, EDN: XRBINO

ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) характеризуется первичным повреждением мозга в результате прямого травматического воздействия, включающего повреждение нейронов, аксонов и глиальных клеток, а также разрывы кровеносных сосудов, вызывающие кровоизлияние и последующую гипоксию [1]. Повреждение вызывает нарушение гематоэнцефалического барьера, а изменения в кровоснабжении приводят к митохондриальному и последующему нарушению выработки энергии, высвобождению нейротрансмиттеров и свободных радикалов, активации и инфльтрации иммунных клеток, апоптозу и высвобождению цитокинов [2, 3]. В этот период инициируется вторичное повреждение головного мозга [4], опосредованное нейровоспалением, вызванным в значительной степени неадекватными/неэффективными защитными реакциями организма [5].

Последствия ЧМТ в существенной степени зависят от выраженности и длительности нейровоспаления. Они могут проявляться как изменение личности, когнитивные проблемы, нарушения двигательных функций, иммунной дисфункции, а в ряде случаев приводят к развитию эпилепсии и нейродегенерации [6–8].

Важной частью развивающейся воспалительной реакции в ЦНС является активация каскада комплемента в поврежденном мозге [9], которая повышает степень активации клеток микроглии и астроглии. В ЦНС глиальные клетки и нейроны конститутивно экспрессируют белки классического и альтернативного пути комплемента [10, 11], а также рецепторы для продуктов активации C3- и C5-компонентов (анафилатоксинов): C3aR и C5aR [12–14]. Воспаление идет главным образом через сигналинг по оси C5a–C5aR, в то время как ответ на взаимодействие C3a со своим специфическим рецептором является более сложным. Кроме того, при травматическом повреждении в условиях разрыва гемато-энцефалического и гематоликревного барьеров наблюдается дополнительный массивный приток сывороточных белков системы комплемента, формируя “петлю усиления” нейровоспаления [15, 16].

На животных моделях ЧМТ показано, что активация C3-компонента запускает устойчивый механизм активации микроглии и астроцитов, снижая плотность дендритов и синапсов, ингибируя репаративную миграцию нейробластов через несколько недель после ЧМТ [17]. На нейронах вблизи участка, поврежденного при ЧМТ, локализованы компоненты C3d и C9, это указывает на то, что эти нейроны являются мишенями для комплемента [18]. Экспериментальное блокирование всех путей активации комплемента или только альтернативного пути обеспечивает значительное улучшение по широкому ряду показателей посттравматического восстановления, что указывает на ключевую роль альтернативного пути в развитии хронической патологии после ЧМТ [16].

Необходимо отметить, что в ЦНС система комплемента участвует также в репарации, защите и регенерации резидентных клеток [19]. Сравнение мышей с заблокированным геном C3 и контрольных мышей, подвергшихся ишемическому инсульту, выявило значительное снижение нейрогенеза в субвентрикулярной зоне у мышей с нулевым уровнем C3 через 7 дней после повреждения [20]. Известно, что после повреждения ЦНС астроциты продуцируют NGF (Nerve growth factor) в ответ на анафилатоксины C3a и C5a, а также интерлейкин-1 β [21, 22]. В присутствии C3a продукция NGF увеличивается [23], что способствует выживанию нейронов, их прорастанию и регенерации [24]. Приведенные данные свидетельствуют, что активация комплемента в ЦНС может иметь как повреждающие, так и нейропротекторные эффекты. По-видимому, как и в случае других регуляторов, вовлечение активированных компонентов комплемента в регуляцию разнонаправленных процессов может зависеть от их концентрации и контекста (стадии воспалительной реакции и присутствия других регуляторов). Можно

предположить, что на ранних этапах посттравматического периода ЧМТ использование различных иммуномодулирующих подходов, связанных с угнетением активности комплемента, применением противовоспалительных цитокинов, например, рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA) может быть целесообразно для противодействия избыточному нейровоспалению.

Целью настоящего исследования было изучение возможности противодействия развитию нейроиммунных нарушений, появляющихся у животных после экспериментальной ЧМТ, путем блокирования избыточного воспаления на ранних этапах травматической болезни моноклональными антителами к С3-компоненту комплемента, препаратом рекомбинантного цитокина IL-1RA или при одновременном введении обоих препаратов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 65 крысах-самцах породы Wistar массой 280–330 г, возраст 18–22 недели. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Все процедуры с животными проводились в одно и то же время. В качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель “падающего груза”, также известную как “модель ударного ускорения” в собственной модификации, вызывающую в основном диффузное повреждение мозга: груз массой 115 г падал с высоты 120 см для нанесения травмы средней тяжести в центр теменной части головы животного. Падение груза направлялось при помощи цилиндрической трубы с внутренним диаметром 20 мм, которая была жестко закреплена на штативе двумя держателями и центрирована над головой крысы. Расстояние между концом трубы и головой животного составляло 7 см [25]. Падающий груз представляет собой металлический полый стержень диаметром 16 мм и плоской ударной поверхностью (площадь ударной поверхности около 2 см²). Наркотизированное животное помещалось на мягкой поролоновой прокладке толщиной 3 см, голова крысы была защищена металлической пластиной, которая за счет фиксирующих ее резинок прижимала голову животного к поролону в нужном для экспериментаторов положении. Таким образом, животное было защищено от переломов свода черепа, и удар падающим грузом вызывал ударное ускорение, достаточное для повреждения ткани головного мозга. О степени повреждения головного мозга судили по развитию клонических, тонических судорог в первые минуты посттравматического периода, увеличению времени выхода из наркоза по сравнению с интактными животными (236 ± 42 с у травмированных животных, против 108 ± 17 с у интактных), снижению двигательной и исследовательской активности в первые часы после травмы, снижению массы тела травмированных крыс в последующие дни наблюдения.

Перед нанесением травмы животные получали наркоз: ингаляцию эфира осуществляли путем загрузки лабораторных животных в стеклянную емкость (эксикатор) с притертой крышкой объемом 3.0 л – со стандартной дозой эфира (1 мл на 1.0 л воздуха) [26].

Системный (внутривенный) путь введения и временное окно инъекции выбирались на основании нарушения гематоэнцефалического барьера в течение первых 24 ч после травмы [27, 28]. Это создает “временное окно” для достижения интратекального компартмента периферически вводимым соединениям и проявления фармакологических эффектов в ЦНС [29–31].

В эксперименте использовано рекомбинантное антитело 3A8, специфичное к неопредетерминанте С3-компонента комплемента крысы, которое обладало способ-

ностью блокировать активацию альтернативного пути комплемента [32]. Препарат, содержащий 100 мг антитела 3A8, и вспомогательные компоненты (натрия хлорид 18.8 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат 6.64 мг, натрия гидрофосфатадодекагидрат 2.68 мг, полисорбат-80 0.2 мг, динатрияэдетат 0.36 мг, сахароза 20 мг) был лиофилизирован. Перед использованием препарат регидратировали добавлением 1 мл дистиллированной воды и вводили внутривенно однократно в дозе 100 мг/кг массы через 30 мин после ЧМТ (режим 1) или 24 ч после ЧМТ (режим 2).

Рекомбинантный рецепторный антагонист интерлейкина-1 человека — IL-1ra — (Регистрационное удостоверение, ЛСР-007452/10-300710) вводили подкожно в дозе 50 мг/кг массы тела животного в 0.5 мл изотонического раствора NaCl через 30 мин после ЧМТ (режим 1) или 24 ч после ЧМТ (режим 2).

Отдельной группе животных после ЧМТ вводили оба препарата одновременно в тех же дозах и тем же путем через 30 мин после ЧМТ (режим 1), или через 24 ч после ЧМТ (режим 2).

Контрольные животные получали изотонический раствор NaCl в те же сроки.

Отбор материала для исследования осуществлялся на 7-е сут после ЧМТ, так как ранее нами было показано, что именно к этому сроку у животных развиваются максимальные нарушения различных параметров [33].

В ходе проведения исследования были сформированы следующие экспериментальные группы:

1. Контрольные животные;
2. Животные, перенесшие ЧМТ (группа ЧМТ);
3. Животные, перенесшие ЧМТ, получавшие антитела к C3 компоненту комплемента (группа C3A8);
4. Животные, перенесшие ЧМТ, получавшие препарат рецепторного антагониста IL-1 (группа IL-1Ra);
5. Животные, перенесшие ЧМТ, получавшие оба препарата (группа C3A8 + IL-1Ra).

В каждой серии экспериментов в каждой обозначенной группе животных было по 7 крыс.

Определение гемолитической активности комплемента по альтернативному пути: для оценки гемолитической активности комплемента по альтернативному пути животных выводили из эксперимента путем мгновенной декапитации, собирали кровь в пробирки с воронкой. Пробы крови для анализов отбирали дозатором, далее осаждали и собирали сыворотку. В качестве мишени для комплемент-зависимого лизиса использовали эритроциты кролика в соответствии с методом, описанным [34]. Цельную кровь кролика смешивали с раствором Олсвера (30 mM цитратный буфер pH 6.1, содержащий 71 mM NaCl и 110 mM глюкозы) в соотношении 9 : 1 и хранили не более 5 дней при температуре 4°C. Перед использованием из цельной крови выделяли эритроциты, отмывали на центрифуге K-23D при 400 g в течение 10 мин в GVB/Mg-ЭГТА (4.5 mM натрий-барбиталовый буфер, содержащий 0.15 M NaCl, 10 mM Mg-ЭГТА, 0.05% желатин; pH 7.4) и использовали для анализа в конечной концентрации 10^8 эритроцитов/мл. Сыворотку разводили буфером GVB/Mg-ЭГТА в 100 раз. Эритроциты смешивали с сывороткой крови (конечная концентрация сыворотки при изучении альтернативного пути — 5%) анализируемых образцов и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением ледяного PBS в соотношении 7.5 : 1. В качестве положительного контроля (100%-ный лизис эритроцитов) использовали образцы, в которых на последнем этапе добавляли дистиллированную воду. Пробы центрифугировали при 500 g в течение 5 мин при комнатной температуре, и затем в супернатантах определяли гемоглобин: отбирали по 200 мкл супернатантов в планшеты.

Оптическую плотность гемоглобин-содержащих супернатантов измеряли на спектрофотометре при длине волны 414 нм. Гемолитическую активность компонента (ГАК) рассчитывали по формуле:

$$\text{ГАК} = \frac{\text{OD}_{414}(\text{образца})}{\text{OD}_{414}(\text{положит. контр})} \times 100\%.$$

Функциональную активность лимфоцитов оценивали по показателям естественной цитотоксичности и пролиферативной активности спленоцитов.

Определение концентрации кортикостерона в крови животных проводилось с помощью наборов для иммуноферментного анализа фирмы DRG Diagnostic (Германия) согласно протоколу, предложенному фирмой-производителем. Кровь после мгновенной декапитации собирали из поврежденных сосудов шеи в пробирки с помощью воронки и выделяли сыворотку путем центрифугирования при температуре 4–6°C.

Определение цитотоксической активности спленоцитов. Выделенные из селезенки и отмые спленоциты разводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки (“Биолот”, Санкт-Петербург). Клетки (1×10^5 /мл) использовали для определения пролиферативной и цитотоксической активности. В качестве мишеней (2×10^4 кл./лунку) для определения специфической цитотоксичности спленоцитов крыс использовали клетки эритромиелолейкоза человека К-562 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), которые поддерживали *in vitro* в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, 2 мМ глюкозы, 1.2 мМ HEPES (pH 7.3), 1.2% глюкозы и 0.08 мг/мл гентамицина (Sigma).

Определение пролиферативной активности спленоцитов в реакции бласттрансформации. Интенсивность пролиферации спленоцитов крыс оценивали по реакции бласттрансформации лимфоцитов селезенки при добавлении к пробам лектина Конканавалина А и рекомбинантного IL-1 β (препарат Беталейкин ГосНИИ Особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург), и антитела к С3-компоненту компонента (производства ГосНИИ Особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург).

Изучение поведенческих реакций животных. Регистрация поведенческих реакций животных после ЧМТ проводилась в тесте “крестообразный лабиринт” [35]. Регистрировали и анализировали с использованием программного обеспечения Video-Mot 2 (TSESystems, Германия) двигательную активность, учитывая общую длину пробега. Исследовательская активность животных изучалась по параметрам времени нахождения в центре и открытых рукавах лабиринта, количеству свисаний с рукавов и вертикальных стоек. Оценка эмоционального состояния животных (тревожность) проводилась по количеству актов фризинга (замирания) и груминга. Длительность регистрации поведения каждого животного в тесте составляла 5 мин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 20.0. Количественные показатели оценивались на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение; либо, в случае ассиметричного распределения, в виде Me [Min; Max], где Me – выборочная медиана, Min и Max – минимальное и максимальное значения. При сравнении показателей в экспериментальных группах с показателями контрольных животных, либо животных, не получавших лечения, использовали t -критерий Стьюдента для независимых выборок. В случае несоответствия нормальному распределению использовали U -критерий Манна–Уитни. Для учета множественных сравнений применяли поправку Холма–Бонферрони. Различия сравниваемых параметров считали значимыми при $p < 0.05$.

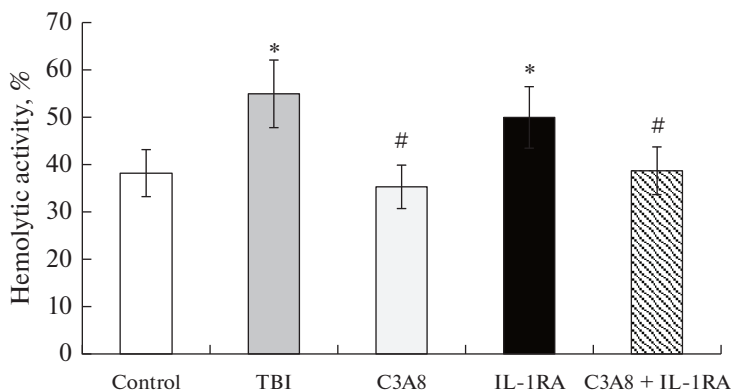


Рис. 1. Гемолитическая активность комплемента сыворотки крови крыс на 7-е сут после ЧМТ и введения препаратов антител к C3 компоненту комплемента (C3A8) и рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA) ($M \pm SD$). * — $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. # — $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

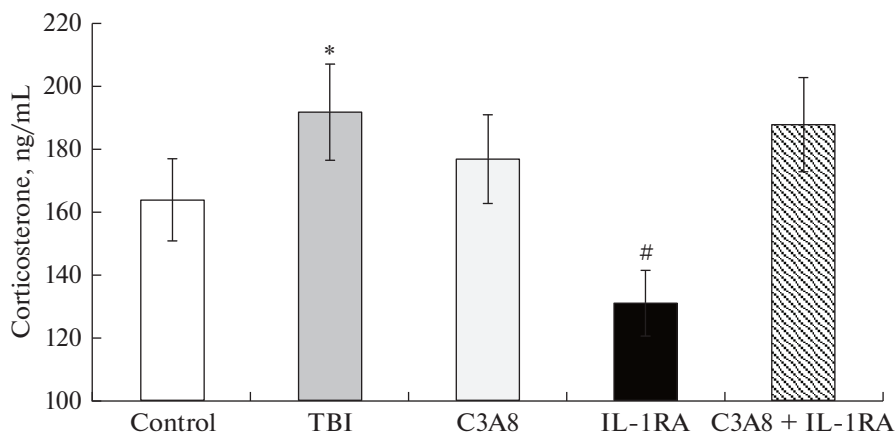


Рис. 2. Изменения концентрации кортикостерона в сыворотке крови крыс на 7-е сут после ЧМТ ($M \pm SD$). * — $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. # — $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты введения препаратов в режиме 1 (через 30 мин после ЧМТ) представлены на рис. 1–5 и табл. 1.

О влиянии ЧМТ и препаратов C3A8 и IL-1RA на активность системы комплемента судили по его гемолитической активности в тесте АН50. Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют, что активность комплемента по альтернативному пути была повышена на 7-е сут после ЧМТ у травмированных животных, а введение препарата C3A8 самостоятельно или совместно с IL-1RA снижало ее до уровня контрольных животных.

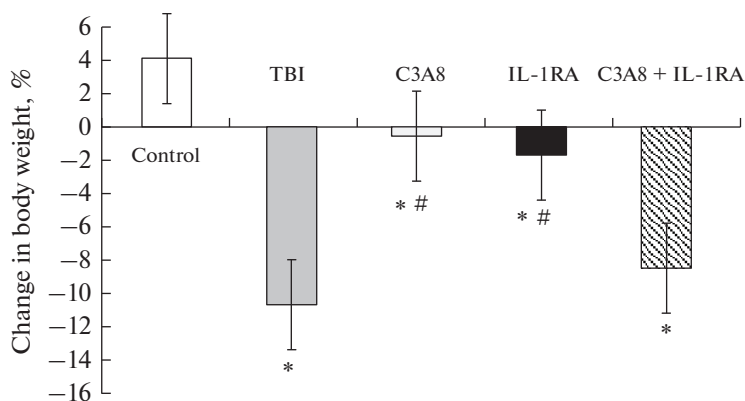


Рис. 3. Изменения массы тела крыс на 7-е сут после ЧМТ ($M \pm SD$). * – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. # – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

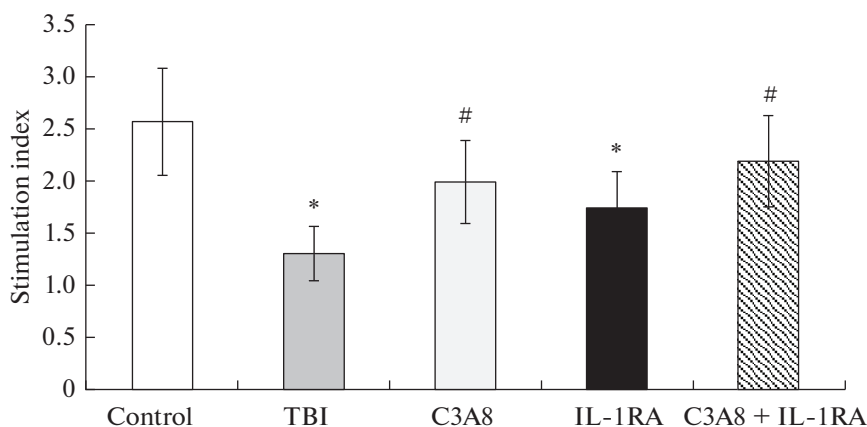


Рис. 4. Пролиферативная активность спленцитов крыс на 7-е сут после ЧМТ ($M \pm SD$). * – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. # – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

ЧМТ явилась существенным стрессогенным событием, о чем свидетельствуют повышение уровня кортикостерона в крови травмированных животных (рис. 2). Существенных изменений уровня кортикостерона в группах животных, получавших СЗА8, мы не обнаружили, при том что после введения рецепторного антагониста IL-1 уровень кортикостерона был ниже, чем у травмированных нелеченых крыс.

В изученных группах животных наибольшее снижение массы наблюдалось у травмированных крыс (рис. 3), в то время как минимальная потеря массы к 7-му дню после травмы отмечена у крыс, пролеченных СЗА8 и препаратом IL-1RA в течение 30 мин после ЧМТ. Совместное введение одновременно двух препаратов в ранний посттравматический период не повлияло существенно на снижение массы тела.

Пролиферативная активность спленцитов и цитотоксичность естественных киллеров существенно снижалась у травмированных нелеченых животных (рис. 4,

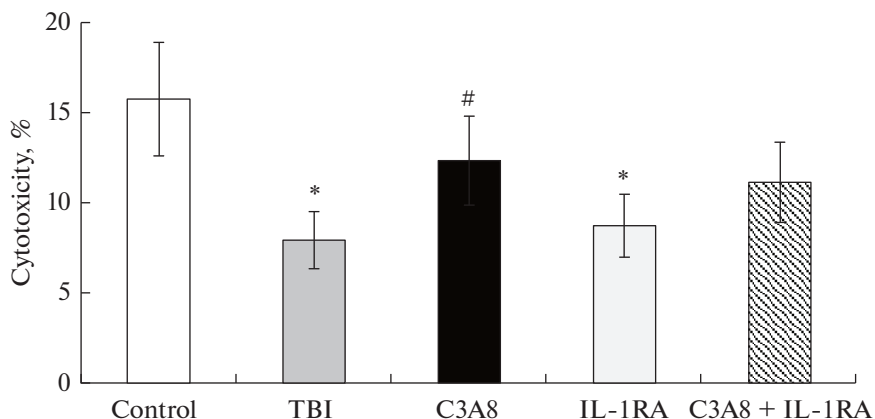


Рис. 5. Цитотоксическая активность ЕК-клеток крыс на 7-е сут после ЧМТ ($M \pm SD$). * – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. # – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

рис. 5), однако введение препарата С3А8 самостоятельно или совместно с IL-1RA усиливало пролиферативную активность, приближая ее к показателям контрольных животных (рис. 4). При этом цитотоксическая активность ЕК-клеток корректировалась при введении только препарата С3А8 в указанном режиме.

Изучение поведенческих реакций, проведенных в тесте “крестообразный лабиринт”, показало, что двигательная активность крыс на 7-е сут после ЧМТ существенно снизилась по сравнению с этим показателем у контрольных животных (табл. 1). В группе крыс, получавших только С3А8, двигательная активность восстанавливалась и не отличалась от этого показателя у контрольных животных. В группах сравнения, получавших препарат рецепторного антагониста IL-1 и комплекс С3А8 + IL-1RA, двигательная активность животных не улучшалась.

Исследовательская активность животных изучалась по параметрам времени нахождения в центре и открытых рукавах лабиринта, количеству свисаний с рукавов и вертикальных стоек. На 7-й день после травмы показатели исследовательской активности у травмированных нелеченых животных не отличались существенно от кон-

Таблица 1. Поведение крыс в крестообразном лабиринте на 7-й день после ЧМТ и введения препаратов антител С3А8 и rIL-1RA, Ме [Min; Max]

Экспериментальные группы ($n = 7$ в каждой группе)	Двигательная активность (длина пробега, м)	Паттерны активного, поискового поведения		Паттерн тревоги (фризинг + гриминг, шт.)
		свисания, стойки, шт.	открытый рукав, центр лабиринта, с	
Контроль	2.02 [1.77; 2.12]	18.5 [12; 29]	62.0 [51; 95]	2.0 [1; 4]
ЧМТ	1.81 [1.38; 1.95]*	19.5 [16; 29]	47.0 [26; 73]	6.0 [4; 11]*
С3А8	2.11 [2.04; 2.15] [#]	20.0 [10; 27]	104.5 [79; 121]* [#]	2.5 [1; 4] [#]
IL-1RA	1.51 [1.18; 1.89]*	10.0 [5; 12]* [#]	21.5 [13; 36]* [#]	8.0 [5; 10]*
С3А8 + IL-1RA	1.70 [1.46; 1.97]*	10.5 [9; 18]	38.0 [19; 117]	3.0 [1; 4] [#]

* – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных. [#] – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

трольных, однако после введения крысам СЗА8 исследовательская активность была выше по параметрам времени нахождения в центре и в открытых рукавах, чем у контрольных животных. Интересно, что введение препарата IL-1RA снижало показатели исследовательской активности, тогда как его совместное применение с СЗА8 не изменяло эти поведенческие параметры по сравнению с контрольными животными.

Оценка эмоционального состояния животных по количеству актов фризинга и груминга показала, что тревожность крыс существенно возросла на 7-й день после травмы. У крыс, пролеченных СЗА8, тревожность достоверно снижалась. Введение препарата IL-1RA не снижало показателя тревожности (он не отличался существенно от показателя травмированных животных), тогда как при совместном применении IL-1RA с СЗА8 показатель тревожности был существенно ниже, чем у травмированных крыс.

При введении препаратов в режиме 2 (через 24 ч после ЧМТ) большинство параметров, изученных в данном исследовании, не показали достоверных изменений по сравнению с параметрами травмированных нелеченых животных. Только гемолитическая активность комплемента к 7-му дню после травмы была существенно ниже у крыс, пролеченных СЗА8 в режиме 2, чем у нелеченых крыс после ЧМТ (38.3 ± 10.8 vs. 53.3 ± 4.7 соответственно, $p < 0.05$), и не отличалась от таковой при введении СЗА8 в режиме 1 (48.4 ± 8.3 vs. 53.3 ± 5.78 ; $p > 0.05$). При введении препарата IL-1RA и при совместном введении СЗА8 и IL-1RA достоверных изменений исследованных параметров по сравнению с нелечеными животными не выявлено.

Представленные данные позволяют заключить, что однократная инъекция антител СЗА8 в кратчайший срок после травмы (30 мин) позволила на 7-й день после травмы (период наиболее выраженных нарушений) существенно снизить гемолитическую активность комплемента при активации по альтернативному пути, уменьшить посттравматическую потерю массы тела крыс. При этом естественная цитотоксичность спленоцитов и их пролиферативная активность была существенно более высокой. Также поведенческие реакции у животных, пролеченных СЗА8, были более физиологичными: сохранялась высокая двигательная и исследовательская активности при более низком уровне тревожности. Однако при введении препарата СЗА8 в более поздний срок (через 24 ч после ЧМТ) подобного позитивного эффекта не наблюдалось.

Однократное введение препарата IL-1RA снизило уровень кортикостерона на 7-й день после травмы, позволило существенно снизить посттравматическую потерю массы тела животных, но не повлияло на функциональную активность лимфоцитов (по результатам тестов РБТЛ и определения NK-активности) и поведенческие характеристики. Интересно, что одновременное использование обоих препаратов не усиливало их действия ни в одном из изученных тестов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное ранее морфологическое исследование ткани мозга после ЧМТ в использованной нами экспериментальной модели показало, что доля метаболически неактивных тканей вплоть до 14-го дня после ЧМТ достигает 18–20% на срезах коры головного мозга, доля клеток с поврежденной ДНК достигает 31–38%, причем существенно поэтапно изменяется и степень активации микроглии. [36]. Развившееся в результате “ударного ускорения” диффузное повреждение ткани мозга индуцирует защитную воспалительную реакцию, как общую, так и нейровоспаление, что связано с повышенной продукцией про- и противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин IL-6, IL-1, IL-8, IL-10 и фактор некроза опухоли-альфа (TNF α) [37]. В частности, IL-1 β активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, индуцируя стресс-реакцию. [38]. Ранее показано, что ЧМТ является сильным стрессогенным фактором, а переносимый стресс связан с резкими

колебаниями кортикостерона [39] и потерей массы тела [40]. Полученные в настоящем исследовании данные об уровне кортикостерона на 7-й день после травмы свидетельствуют, что после ЧМТ его уровень был существенно повышен (рис. 2), но после введения препарата IL-1RA в режиме 1 этот показатель был снижен, что соответствует представлениям о решающей роли цитокинов семейства IL-1 в индукции стресс-реакции. Введение препарата СЗА8 в режимах 1 и 2 не повлияло на уровень кортикостерона на 7-й день после травмы, что связано с другими задействованными противовоспалительными реакциями. Так, известно, что снижение массы тела у травмированных животных обусловлено системной катаболической реакцией, которая истощает как жировую, так и мышечную массу и обусловлена существенным повышением уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-1 α , IL-6 [41]. Учитывая эту закономерность, можно утверждать, что существенно меньшее снижение массы тела у крыс, получавших СЗА8 и gIL-1RA, по сравнению с нелечеными травмированными животными свидетельствует о подавлении у них активности воспалительного процесса после ЧМТ. Однако иммунотропное действие изучаемых препаратов, оцененное по их влиянию на функциональное состояние периферических лимфоцитов/спленоцитов, было различным. Так, препарат СЗА8, вводимый в режиме 1, позволил сохранить высокую пролиферативную активность спленоцитов и цитотоксичность естественных киллеров, тогда как препарат gIL-1RA не имел такого действия.

Система комплемента, наряду с цитокинами, активируется при ЧМТ и является важным компонентом воспалительного/противовоспалительного ответа [15]. Современные протеомные и транскриптомные исследования показали, что ЧМТ повышает экспрессию генов белков, задействованных во всех путях активации комплемента [42]. Причем в развитии острой фазы ЧМТ особенно вовлечены ген и белок C3 [43]. Используя масс-спектрометрию, выявили, что среди 32 белков, резко и хронически активируемых в сыворотке пациентов с тяжелой ЧМТ, было 5 белков системы комплемента, включая центральный компонент C3 [44]. Протеомные данные показали, что у грызунов именно компонент C3 является узловым белком в кортикальных сетях межбелковых взаимодействий на стадии потери массы тела после ЧМТ [45]. Раскрывая механизмы влияния комплемента на развитие нейровоспаления, определили, что астроциты, индуцируемые активированной микроглией, секретируют комплемент C3 [46]. В свою очередь C3, активируясь, опсонизирует нейроны и синапсы, что вызывает вторичное повреждение и снижение когнитивных функций как в острой, так и в хронической фазах после ЧМТ [46].

В соответствии с этими патогенетическими механизмами несколько исследований на животных показали, что ингибирование комплемента после ЧМТ оказывает нейропротекторное действие и улучшает результаты в поведенческих тестах и гистологическую картину мозга [47–49]. В частности, при блокировании альтернативного пути активации комплемента у мышей, лишенных фактора В (fB^{-/-}), после ЧМТ снижается потеря нейронов с сопутствующим усилением экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и подавлением проапоптотического рецептора Fas по сравнению с контрольными животными [50].

Полученные нами данные подтверждают эффективность ингибирования альтернативного пути комплемента препаратом СЗА8 для уменьшения неврологических нарушений, выявляемых в поведенческих тестах (а именно повышение двигательной и исследовательской активности при существенном снижении уровня тревожности) в случае раннего (через 30 мин после ЧМТ) введения препарата.

Необходимо отметить, что отсутствие выраженного позитивного эффекта при введении препарата gIL-1RA не свидетельствует о его неэффективности. Ранее нами получены убедительные данные о нейропротективном действии данного препарата (по результатам измерения потери массы тела, поведенческих тестов, гистоло-

гических исследований ткани мозга, функциональной активности спленоцитов и уровню кортизола) при другой схеме введения (подкожное введение в дозе 50 мг/кг массы тела животного в 0.5 мл изотонического раствора NaCl через 1 ч после ЧМТ и еще дважды в течение последующих двух суток, всего три инъекции) [51]. Эти результаты позволяли рассчитывать, что совместное введение препаратов С3А8 и rIL-1RA может обеспечить синергичный эффект за счет активации различных противовоспалительных механизмов, индуцируемых обоими препаратами. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что в использованных нами режимах 1 и 2 такой эффект не достигается. В совокупности, полученные нами данные свидетельствуют, что ингибирование комплемента препаратом С3А8 может давать позитивные терапевтические эффекты при использовании в ранний период после ЧМТ.

Перспективными могут быть дальнейшие исследования для изучения возможных эффектов препарата при его повторных введениях в течение длительного периода, так как недавние исследования показали продолжающуюся активацию комплемента до 6 мес. после ЧМТ и продолжающееся снижение когнитивных функций, которое было обратимым при ингибировании комплемента даже при введении ингибитора через 2 мес. после травмы [46, 52]. Поскольку в патогенезе ЧМТ активно участвуют и классический, и лектиновый пути, ведутся изучения ингибитора компонента С4 [15] и С1-ингибитора, оба воздействия приводят к ингибированию как классического, так и лектинового пути [53].

Возможно, что более комплексный подход, позволяющий регулировать различные пути активации комплемента в разные сроки после ЧМТ, позволит достигать клинически значимых результатов, не допуская развития тяжелых посттравматических нарушений и заболеваний у лиц, перенесших серьезную ЧМТ.

ВЫВОДЫ

1. Однократное введение через 30 мин после ЧМТ (режим 1) препарата моноклонального антитела 3А8 (С3А8), блокирующего активацию комплемента по альтернативному пути, позволило на 7-й день после травмы снизить гемолитическую активность комплемента в тесте АН50, уменьшить посттравматическую потерю массы тела, повысить естественную цитотоксичность лимфоцитов и их пролиферативную активность, а также усилить двигательную и исследовательскую активности при существенном снижении уровня тревожности у животных.

2. Введение препарата С3А8 через сутки после ЧМТ (режим 2) снижало уровень активности комплемента в тесте АН50, но не приводило к позитивным изменениям функциональной активности лимфоцитов и коррекции в поведенческих тестах.

3. Однократное в режиме 1 и 2 введение препарата rIL-1RA или его совместное использование с препаратом С3А8 в обоих исследованных режимах не улучшало состояние травмированных крыс по результатам всех исследованных параметров.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики” и Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (протокол 6/20 от 21.10.2020 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в соответствии с плановыми исследованиями по теме FGWG-2022-0007 “Исследование молекулярно-клеточных механизмов нейроиммунных взаимодействий и по-

иск новых подходов для создания корректоров нарушений на основе пептидов системы врожденного иммунитета”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с опубликованием этой статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Б.С. — идея работы, общее руководство, обсуждение, написание и редактирование статьи. Е.Е.Ф. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание и редактирование статьи. С.Н.Ш. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание статьи. Т.А.Ф. — сбор и обработка данных, написание статьи. А.М.И. — идея, обоснование порядка экспериментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность к.б.н., с.н.с. отдела общей патологии патофизиологии Института экспериментальной медицины Жарковой Марии Сергеевне за помощь в обработке и оформлении материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maas AI, Stocchetti N, Bullock R* (2008) Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7(8): 28–41.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70164-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70164-9)
2. *Allan SM, Rothwell NJ* (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2(10): 734–744.
<https://doi.org/10.1038/35094583>
3. *Barkhoudarian G, Hovda DA, Giza CC* (2016) The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury — an Update. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 27(2): 373–393.
<https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.01.003>
4. *Patterson ZR, Holahan MR* (2012) Understanding the neuroinflammatory response following concussion to develop treatment strategies. *Front Cell Neurosci* 6: 58.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00058>
5. *Van Erp IAM, Michailidou I, van Essen TA, van der Jagt M, Moojen W, Peul WC, Baas F, Fluiter K Tackling* (2022) Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury: Complement Inhibition as a Therapy for Secondary Injury. *Neurotherapeutics* 12.
<https://doi.org/10.1007/s13311-022-01306-8>
6. *McAllister TW* (2011) Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci* 13(3): 287–300.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.2/tmcallister>
7. *Graham NS, Sharp DJ* (2019) Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90 (11): 1221–1233.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317557>
8. *Chen M, Edwards SR, Reutens DC* (2020) Complement in the Development of Post-Traumatic Epilepsy: Prospects for Drug Repurposing. *J Neurotrauma* 37(5): 692–705.
<https://doi.org/10.1089/neu.2019.6942>
9. *Azouvi P, Arnould A, Dromer E, Vallat-Azouvi C.* (2017) Neuropsychology of traumatic brain injury: An expert overview. *Rev Neurol (Paris)* 173(7–8): 461–472.
<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.07.006>
10. *Gasque P, Ischenko A, Legoeud J, Mauger C, Schouft MT, Fontaine M* (1993) Expression of the complement classical pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J Biol Chem* 268: 25068–25074.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74572-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74572-4)
11. *Barnum SR* (1995) Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 6: 132–146.
<https://doi.org/10.1177/10454411950060020301>
12. *Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan B* (1997) Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* 150: 31–41.
13. *Ischenko A, Sayah S, Patte C, Andreev S, Gasque P, Schouft MT, Vaudry H, Fontaine M* (1998) Expression of a functional anaphylatoxin C3a receptor by astrocytes. *J Neurochem* 71(6):

- 2487–2496.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062487.x>
14. *Farkas I, Baranyi L, Takahashi MA, Liposits Zs, Yamamoto T, Okada H* (1998) A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway J Physiol 507(Pt 3): 679–687.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.679bs.x>
 15. *Hammad A, Westacott L, Zaben M* (2018) The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. J Neuroinflammat 15(1): 24.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1066-z>
 16. *Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, Zanier ER, De Simoni M-G* (2015) The ischemic environment drives microglia and macrophage function. Front Neurol 6: 81.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00081>
 17. *Alawieh A, Langley EF, Weber S, Adkins D, Tomlinson S* (2018) Identifying the Role of Complement in Triggering Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury. J Neurosci 38(10): 2519–2532.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2197-17.2018>
 18. *Bellander BM, von Holst H, Fredman P, Svensson M* (1996) Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. J Neurosurg 85(3): 468–475.
<https://doi.org/10.3171/jns.1996.85.3.0468>
 19. *Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Fang S, Parsa AT* (2010) Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. Immunol Cell Biol 88: 781–786.
<https://doi.org/10.1038/icb.2010.48>
 20. *Rahpeymai Y, Hietala MA, Wilhelmsson U, Fotheringham A, Davies I, Nilsson A-K, Zwirner J, Wetsel RA, Gerard C, Pekny M, Pekna M* (2006) Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. EMBO J 25: 1364–1374.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601004>
 21. *Oderfeld-Nowak B, Bacia A, Grdkowska M, Fusco M, Vantini G, Leon A, Aloe L* (1992) In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules. Neurochem Int 21: 455–4561.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90197-y](https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90197-y)
 22. *Jauneau A, Ischenko A, Chatagner A, Benard M, Chan P, Schouft M, Patte C, Vaudry H, M* (2006) Interleukin-1 β and anaphylatoxins exert a synergistic effect on NGF expression by astrocytes. J Neuroinflammat 3: 8.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-8>
 23. *Heese K, Hock C, Otten U* (1998) Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. J Neurochem 70: 699–707.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70020699.x>
 24. *Ramirez JJ, Caldwell JL, Majure M, Wessner DR, Klein RL, Meyer EM, King MA* (2003) Adeno-associated virus vector expressing nerve growth factor enhances cholinergic axonal sprouting after cortical injury in rats. J Neurosci 23: 2797–2803.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02797.2003>
 25. *Шанин СН, Фомичева ЕЕ, Филатенкова ТА, Серебряная НБ* (2018) Коррекция нарушений нейроиммунных взаимодействий при экспериментальной черепно-мозговой травме препаратом рекомбинантного интерлейкина-2. Мед иммунол 20(2): 171–178. [*Shanin SN, Fomicheva EE, Filatenkova TA, Serebryanaya NB* (2018) Correction of disorders of neuroimmune interactions in experimental traumatic brain injury with a drug of recombinant interleukin-2. Med Immunol 20(2): 171–178. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-171-178>
 26. *Якубовский АП, Жмайлик РР* (2015) Метод проведения эфирного наркоза по закрытому контуру в эксперименте. Смоленск мед альманах № 1. [*Yakubovsky AP, Zhmaylik RR* (2015) Method of conducting ether anesthesia on a closed circuit in an experiment. Smolensk Med Almanac № 1. (In Russ)].
 27. *Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E* (1996) An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J Neurotrauma 13: 557–568.
<https://doi.org/10.1089/neu.1996.13.557>
 28. *Stahel PF, Shohami E, Younis FM, Kariya K, Otto VI, Lenzlinger PM, Grosjean MB, Eugster HP, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC* (2000) Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. J Cereb Blood Flow Metab 20: 369–380.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200002000-00019>
 29. *Leinhase I, Schmidt OI, Thurman JM, Hossini AM, Rozanski M, Taha ME, Scheffler A, John T, Smith WR, Holers VM, Stahel PF* (2006) Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and

- neurological outcome after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 199: 454–464.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.01.033>
30. *Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsender J, Shohami E* (2005) Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 19: 1701–1703.
<https://doi.org/10.1096/fj.05-3907fje>
 31. *Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, Stahel PF* (2002) Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 971–978.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200208000-00008>
 32. *Горбунов НП, Жахов АВ, Трофимов АВ, Некрасова КА, Родин СВ, Атанесян ЕА, Карабанова ЕА, Захаров МС, Симбирцев АС, Ищенко АМ* (2019) Комплемент при патологиях, возможность коррекции с помощью нового гуманизированного антитела, блокирующего альтернативный путь. *Рос иммунол журн* 22(2–2): 754–756. [*Gorbunov NP, Zhakhov AV, Trofimov AV, Nekrasova KA, Rodin SV, Atanesyan EA, Karabanova EA, Zakharov MS, Simbirtsev AS, Ishchenko AM* (2019) Complement in pathologies, the possibility of correction with a new humanized antibody that blocks an alternative pathway. *Russ Immunol J* 22(2–2): 754–756. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S102872210006712-8>
 33. *Фомичева ЕЕ, Шанин СН, Филатенкова ТА, Серебряная НБ* (2020) IL-2 как регулятор уровней стресс-гормонов и нейротропного фактора BDNF при экспериментальной черепно-мозговой травме. *Мед иммунол* 22(4): 647–656. [*Fomicheva EE, Shanin SN, Filatenkova TA, Serebryanaya NB* (2020) IL-2 as a regulator of stress hormones and neurotropic factor BDNF in experimental traumatic brain injury. *Med Immunol* 22(4): 647–656. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-IAR-1973>
 34. *Joiner KA, Hawiger A, Gelfand J* (1983) A study of optimal reaction conditions for an assay of the human alternative complement pathway. *Am J Clin Pathol* 79: 65–72.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/79.1.65>
 35. *Буреш Я, Бурешова О, Хьюстон ДП* (1991) Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Ред. АС Батуев. М. Высш. шк. [*Buresh Ya, Bureshova O, Houston DP* (1991) Methods and basic experiments to study the brain and behavior. Ed. AC Batuev. M. Higher School. (In Russ)].
 36. *Дмитриенко ЕВ, Акимото Н, Наое С, Нода М, Рыбакина ЕГ, Корнева ЕА* (2013) Иммунная система мозга и черепно-мозговая травма: попытки коррекции. *Мед акад журн* 13(4): 7–19. [*Dmitrienko EV, Akimoto N, Naoe S, Noda M, Rybakina EG, Korneva EA* (2013) Immune system of the brain and traumatic brain injury: attempts at correction. *Med Acad J* 13(4): 7–19. (In Russ)].
 37. *Rodney T, Osier N, Gill J* (2018) Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. *Cytokine* 110: 248–256.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.01.012>
 38. *Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell N* (2007) Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 35(5): 1122–1126.
<https://doi.org/10.1042/BST0351122>
 39. *Фомичева ЕЕ, Шанин СН, Филатенкова ТА, Серебряная НБ* (2019) Коррекция стресс-индуцированных гормональных изменений введением rIL-2 при экспериментальной черепно-мозговой травме. *Мед акад журн* 19(1S): 199–200. [*Fomicheva EE, Shanin SN, Filatenkova TA, Serebryanaya NB* (2019) Correction of stress-induced hormonal changes by the introduction of rIL-2 in experimental traumatic brain injury. *Med Acad J* 19(1S): 199–200. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-171-178>
 40. *Scherer JJ, Holmes PV, Harris RB* (2011) The importance of corticosterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. *Physiol Behav* 102(2): 225–233.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.014>
 41. *Муралева НА* (2019) Влияние хронического стресса на массу тела и иммунных органов экспериментальных животных раннего возраста. *Волгоградск науч-мед журн* 64(4): 3. [*Muraeva NA* (2019) Influence of chronic stress on body weight and immune organs of experimental animals of early age. *Volgograd J Med Scient Res* 64(4): 3. (In Russ)].
 42. *Toutonji A, Mandava M, Guglietta S, Tomlinson S* (2021) Chronic complement dysregulation drives neuroinflammation after traumatic brain injury: a transcriptomic study. *Acta Neuropathol Commun* 9(1): 126.
<https://doi.org/10.1186/s40478-021-01226-2>
 43. *Wang H, Chen J, Gao C, Chen W, Chen G, Zhang M, Luo C, Wang T, Chen X, Tao L* (2021) TMT-based proteomics analysis to screen potential biomarkers of acute-phase TBI in rats. *Life Sci* 264: 118631.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118631>
 44. *Bao W, He F, Yu L, Gao J, Meng F, Ding Y, Zou H, Luo B* (2018) Complement cascade on severe traumatic brain injury patients at the chronic unconscious stage: implication for pathogenesis.

- Expert Rev Mol Diagn 18: 761–766.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1471985>
45. Wang J, Hou Y, Zhang L, Liu M, Zhao J, Zhang Z, Ma Y, Hou W (2021) Estrogen Attenuates Traumatic Brain Injury by Inhibiting the Activation of Microglia and Astrocyte-Mediated Neuroinflammatory Responses. *Mol Neurobiol* 58(3): 1052–1061.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02171-2>
 46. Alawieh A, Chalhoub R, Mallah K, Langley EF, York M, Broome H, Couch C, Adkins D, Tomlinson S (2021) Complement drives synaptic degeneration and progressive cognitive decline in the chronic phase after traumatic brain injury. *J Neurosci* 41(8): 1830–1843.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1734-20.2020>
 47. Rich MC, Keene CN, Neher MD, Johnson K, Yu Z-X, Ganivet A, Holers VM, Stahel PF (2016) Site-targeted complement inhibition by a complement receptor 2-conjugated inhibitor (mTT30) ameliorates post-injury neuropathology in mouse brains. *Neurosci Lett* 617: 188–194.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.025>
 48. Mercurio D, Oggioni M, Fumagalli S, Lynch NJ, Roscher S, Minuta D, Perego C, Ippati S, Wallis R, Schwaebler WJ, De Simoni M-G (2020) Targeted deletions of complement lectin pathway genes improve outcome in traumatic brain injury, with MASP-2 playing a major role. *Acta Neuropathol Commun* 8: 174.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-01041-1>
 49. Fluiter K, Oppenhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V (2014) Inhibition of the membrane attack complex of the complement system reduces secondary neuroaxonal loss and promotes neurologic recovery after traumatic brain injury in mice. *J Immunol* 192: 2339–2348.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302793>
 50. Leinhardt I, Holers VM, Thurman JM, Harhausen D, Schmidt OI, Pietzcker M, Taha ME, Rittirsch D, Huber-Lang M, Smith WR, Ward PA, Stahel PF (2006) Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC Neurosci* 7: 55.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-55>
 51. Фомичева ЕЕ, Шанин СН, Филатенкова ТА, Новикова НС, Дятлова АС, Ищенко АМ, Серебряная НБ (2022) Коррекция нарушений поведенческих реакций и состояния микроглии рекомбинантным рецепторным антагонистом рецептора ИЛ-1 при экспериментальной ЧМТ. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(10): 1264–1278. [Fomicheva EE, Shanin SN, Filatenkova TA, Novikova NS, Dyatlova AS, Ishchenko AM, Serebryanaya NB (2022) Correction of behavioral disorders and microglial state with a recombinant IL-1 receptor antagonist in experimental TBI. *Russ J Physiol* 108(10): 1264–1278. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/50869813922100077>
 52. Mallah K, Couch C, Alshareef M, Borucki D, Yang X, Alawieh A, Tomlinson S (2021) Complement mediates neuroinflammation and cognitive decline at extended chronic time points after traumatic brain injury. *Acta Neuropathol Commun* 9: 72.
<https://doi.org/10.1186/s40478-021-01179-6>
 53. Longhi L, Perego C, Ortolano F, Zanier ER, Bianchi P, Stocchetti N, McIntosh TK, De Simoni MG (2009) C1-inhibitor attenuates neurobehavioral deficits and reduces contusion volume after controlled cortical impact brain injury in mice. *Crit Care Med* 37: 659–665.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318195998a>

Correction of Immunological and Behavioral Parameters of Rats with Experimental Traumatic Brain Injury with a Preparation of Monoclonal Antibodies to the C3 Component of Complement

N. B. Serebryanaya^{a,*}, E. E. Fomicheva^a, S. N. Shanin^a,
 T. A. Filatenkova^a, A. V. Zhakhov^b, K. A. Nekrasova^c, and A. M. Ishchenko^b

^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

^bSaint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

^cState Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

*e-mail: serebr@gmail.com

After traumatic brain injury (TBI), inflammation develops in the CNS, an active participant in which is the complement system. Activated complement fragments initiate inflammation, and subsequently significantly affect the processes of repair and regeneration. The aim of the work is to reduce neuroimmune disorders after experimental TBI by blocking excessive inflammation in the early stages of traumatic disease with monoclonal antibodies to the C3 component of complement. The work was carried out on 65 male Wistar

rats using the “falling weight” model. To correct neuroinflammation, a preparation of a recombinant monoclonal antibody 3A8, specific for the C3 neodeterminant of the rat complement component, blocking the activation of the alternative complement pathway was administered (i.v., 100 mg/kg). As a reference drug, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rIL-1RA) was used, which was administered s.c. (dose of 50 mg/kg). Both drugs were administered once after 30 min of TBI (mode 1) or 24 hours after TBI (mode 2). We studied the levels of corticosterone in the blood, the cytotoxic and proliferative activity of lymphocytes, and behavioral responses in the “plus maze” test. The obtained data indicate that on the 7th day after TBI in rats treated with 3A8 antibodies in mode 1, post-traumatic weight loss was decreased, the natural cytotoxicity of splenocytes and their proliferative activity were increased, and motor and exploratory activity were increased with a significant decrease in the level of anxiety. The introduction of rIL-1RA in these regimens, as well as the combined use of both drugs, did not have a significant effect on the studied parameters.

Keywords: traumatic brain injury, complement system, rIL-1RA, behavior, corticosterone, splenocytes

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ФРАГМЕНТА ЛЕПТИНА 116–122
НА ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ СТЕРОИДОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС**

© 2023 г. А. А. Бахтюков¹, *, И. А. Лебедев¹,
В. С. Кузнецова¹, К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹

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

*E-mail: bahtyukov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.03.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 20.04.2023 г.

Адипокин лептин играет важную роль в регуляции репродуктивной системы. Он стимулирует активность гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, опосредованно действуя на нейроны, секретирующие гонадолиберин (GnRH), и модулирует стероидогенную функцию семенников посредством связывания с лептиновыми рецепторами в клетках Лейдига. Фрагмент лептина 116–122 (ФЛ), включающий основные рецептор-связывающие детерминанты этого адипокина, нормализует метаболические показатели у животных с диета-индуцированным ожирением. Однако его способность влиять на стероидогенную функцию семенников, в том числе посредством взаимодействия с GnRH-нейронами гипоталамуса, не изучена. Целью работы было изучить эффекты однократного и трехдневного интраназального введения ФЛ (200 мкг/крысу) на уровень тестостерона в крови и экспрессию стероидогенных генов в семенниках у половозрелых самцов крыс Вистар, а также оценить стероидогенную активность ФЛ в условиях стимуляции синтеза тестостерона хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ, 15 МЕ/крысу, п/к) и при обработке животных ингибитором гонадной оси — антагонистом GnRH-рецептора цетрореликсом (75 мкг/кг, п/к). Показано, что ФЛ повышает уровень тестостерона в крови при однократном введении, а при трехдневном введении усиливает стероидогенный эффект ХГЧ. ФЛ и ХГЧ повышали экспрессию гена *Star*, кодирующего ключевой регуляторный белок стероидогенеза StAR. Введение цетрореликса снижало уровень тестостерона и экспрессию *Star*, а также компенсаторно усиливало экспрессию гена рецептора лютеинизирующего гормона. В условиях обработки GnRH-антагонистом потенцирующее влияние ФЛ на ХГЧ-индуцированную стимуляцию уровня тестостерона и экспрессии *Star* не было выявлено. Таким образом, ФЛ способен стимулировать стероидогенез в семенниках крыс и потенцировать стероидогенные эффекты ХГЧ. Поскольку его эффекты подавляются в присутствии GnRH-антагониста, то имеются основания считать, что действие ФЛ реализуется за счет стимуляции гипоталамических GnRH-нейронов.

Ключевые слова: фрагмент лептина, стероидогенез, тестостерон, антагонист GnRH-рецептора, рецептор лютеинизирующего гормона, хорионический гонадотропин

DOI: 10.31857/S0869813923050023, **EDN:** XQFQGU

Стероидогенный статус и сперматогенез у мужчин зависят от функционирования гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (ГГТ) оси. Декапептид гонадолибе-

рин (GnRH), релизинг-фактор лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, экспрессируемый GnRH-продуцирующими нейронами гипоталамуса, стимулирует секрецию ЛГ и ФСГ аденогипофизом. Повышение уровня ЛГ в крови приводит к повышению продукции тестостерона, основного мужского полового гормона, клетками Лейдига семенников. Среди регуляторов тестикулярного стероидогенеза особое место занимают адипокины, гормоноподобные вещества, продуцируемые жировой тканью. Имеются данные об участии в регуляции функций репродуктивной системы таких адипокинов, как лептин, адипонектин, висфатин, апелин, резистин [1, 2].

В настоящее время наиболее обстоятельно изучено влияние на ГГТ ось анорексигенного гормона лептина [2]. Показано, что лептин может напрямую или опосредованно воздействовать на гипоталамические, гипофизарные и периферические звенья ГГТ оси, оказывая на них в основном стимулирующее влияние [3]. В то же время установлено, что в условиях метаболических расстройств длительное повышение уровня лептина в крови, ведущее к развитию лептиновой резистентности, наряду с такими факторами, как высокий уровень провоспалительных цитокинов, инсулиновая резистентность и гипергликемия, может негативно влиять на секрецию GnRH, гонадотропинов и тестостерона, что является одной из причин андрогенной недостаточности и снижения мужской фертильности [4]. В свою очередь, пониженный уровень лептина в крови подростков может значительно замедлить наступление пубертатного периода, что обусловлено ослаблением лептиновой сигнализации в различных звеньях ГГТ оси [5].

Способность лептина влиять на активность различных звеньев ГГТ оси обусловлена присутствием в них функционально активных рецепторов лептина (ObRb) и других компонентов лептинового сигнального каскада [3]. До сих пор нет единого мнения о том, какое из звеньев ГГТ оси в наибольшей степени опосредует регуляторные эффекты лептина на репродуктивную систему. В соответствии с превалирующей в настоящее время концепцией, основной вклад в это вносит стимулирующее воздействие лептина на GnRH-продуцирующие нейроны, которое опосредуется через активацию кисцепептин(KND)- и про-опиомеланокортин(POMC/CART)-экспрессирующих нейронов и ингибирование нейрпептид Y/агути-подобный пептид(NPY/AgRP)-экспрессирующих нейронов в гипоталамусе [6]. Необходимо отметить, что эти эффекты реализуются при воздействии на гипоталамические нейроны нормальных физиологических концентраций лептина, которые вызывают стимуляцию секреции GnRH, и это приводит к повышению секреции ЛГ и ФСГ гонадотрофами гипофиза и активации тестикулярного стероидогенеза. В семенниках, где также присутствуют ObRb-рецепторы, лептин оказывает на тестикулярный стероидогенез разнонаправленные эффекты. В физиологических концентрациях он его усиливает, в то время как в условиях дефицита лептина или, напротив, в условиях длительной гиперлептинемии, ассоциированной с лептиновой резистентностью, лептиновые каскады в семенниках ослабляются [2]. Поскольку поиск регуляторов тестикулярного стероидогенеза на основе лептина и его аналогов представляет большой интерес для современной эндокринологии и андрологии, актуальной задачей представляется как изучение их влияния на стероидогенный статус, так и поиск основных мишеней их действия среди компонентов ГГТ оси. Имеются данные о том, что N-концевой фрагмент лептина 116–122 (ФЛ), соответствующий его участку, ответственному за связывание с рецептором и его активацию, может быть использован в качестве регулятора лептиновых сигнальных путей вместо полноразмерной молекулы адипокина [7, 8]. Показан анорексигенный эффект этого ФЛ на метаболические показатели у мышей с генетически-обусловленным и диета-индуцированным ожирением, что выражалось в снижении уровня глюкозы в крови, а также в уменьшении массы тела и потребления корма [9, 10]. Однако данные о вли-

янии ФЛ на активность компонентов ГТТ оси и стероидогенный статус, а также о возможных механизмах такого влияния в литературе отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучить влияние однократного и трехдневно-го интраназального введения ФЛ, миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амида, на уровень тестостерона в крови и экспрессию генов, ответственных за тестикулярный стероидогенез, у самцов крыс, в том числе в условиях подавления секреции гонадотропинов с помощью антагониста рецептора GnRH цетрореликса и стимуляции тестикулярного стероидогенеза с помощью хорионического гонадотропина человека (ХГЧ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Схема эксперимента. Для экспериментов использовали половозрелых самцов крыс линии Вистар в возрасте 5 мес., содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Животные были разделены на 8 групп (в каждой $n = 6$). Фрагмент лептина, миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амид (“Atagenix Laboratories”, КНР) растворяли в физиологическом растворе и вводили крысам из групп “ФЛ” и “ФЛ + ХГЧ”, “АНТ + ФЛ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ” интраназально в дозе 200 мкг/крысу в течение трех дней, ежедневно в 11:00. Антагонист рецептора GnRH, цетрореликса ацетат (Cetrorelix acetate) (Xingtai Yuanao Technology Co, КНР) растворяли в физиологическом растворе и вводили крысам из групп “АНТ”, “АНТ + ФЛ”, “АНТ + ХГЧ”, “АНТ + ФЛ + ХГЧ” подкожно в дозе 75 мг/кг в течение трех дней, ежедневно в 11:00. Крысам из групп “ФЛ + ХГЧ”, “ХГЧ”, “АНТ + ХГЧ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ” в последний день эксперимента подкожно вводили ХГЧ (“Московский эндокринный завод”, Россия) в дозе 15 МЕ/крысу в 12:30 (через 90 мин после введения ФЛ). Животные из группы “Контроль” получали физиологический раствор вместо препарата. У животных из всех групп оценивали базовый уровень тестостерона в крови, для чего у них забирали кровь из хвостовой вены в нулевой день эксперимента в 10:00, 12:00, 14:00 и 16:00 (под местным наркозом с использованием 2–4%-ного раствора лидокаина), чтобы рассчитать интегрированные значения концентрации гормона, учитывающие динамику его изменения в течение эксперимента. Эти данные использовали для равномерного распределения самцов по группам в соответствии с их андрогенным статусом. В первый день введения ФЛ у крыс из групп “ФЛ” и “ФЛ + ХГЧ” забирали кровь в 10:00 (за час до введения), в 12:00 (через 60 мин) и 14:00 (через 180 мин), чтобы оценить эффект однократного введения препарата на уровень тестостерона. На третий день введения ФЛ у крыс забирали кровь до введения ФЛ и/или цетрореликса (в 10:00), через 90 мин после введения ФЛ и/или цетрореликса, через 90 и 180 мин после введения ХГЧ. Кроме того, у всех самцов были оценены метаболические показатели до начала и в третий день эксперимента. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски “One-Touch Select Ultra” (“LifeScan”, США). Также были получены образцы плазмы крови для определения уровня общего холестерина с помощью набора “Холестерин-1-Ольвекс (013.001)” (“Ольвекс”, Россия) и уровня триглицеридов с помощью набора “Триглицериды-1-Ольвекс (017.001)” (“Ольвекс”, Россия). Вслед за последним забором крови животные подвергались общей анестезии с помощью хлоральгидрата (400 мг/кг), после чего их декапитировали, извлекали ткани семенников и хранили их при -80°C до проведения экспериментов по оценке экспрессии генов.

Определение уровня тестостерона с помощью иммуноферментного анализа. Уровень тестостерона в образцах плазмы крови самцов крыс определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы “ИФА-Тестостерон” (“Алкор-Био”, Россия).

Таблица 1. Последовательность использованных в работе прямого и обратного праймеров к генам крысы

Название гена	Прямая последовательность праймера	Обратная последовательность праймера
<i>Lhr</i>	CTGCGCTGTCCTGGCC	CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA
<i>Star</i>	AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC	CACCTGGCACCACCTTACTT
<i>Cyp11a1</i>	TATTCCGCTTTGCCTTTGAG	CACGATCTCCTCCAACATCC
<i>Actb</i>	CTGGCACCACACCTTCTACA	AGGTCTCAAACATGATCTGGGT

Таблица 2. Эффекты трехдневного интраназального введения фрагмента лептина 116–122, миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амида, на массу тела и уровни глюкозы, общего холестерина и триглицеридов в крови самцов крыс

	Масса тела, г	Глюкоза, мМ	Триглицериды, мМ	Общий холестерин, мМ
До введения ФЛ	380 ± 10	5.7 ± 0.2	0.89 ± 0.08	3.67 ± 0.17
После трехдневного введения ФЛ	379 ± 12	5.6 ± 0.3	0.74 ± 0.07	3.47 ± 0.25

Образцы крови для анализа уровней глюкозы, триглицеридов и общего холестерина взяты через 6 ч после приема пищи. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 12$.

Оценка генной экспрессии. Для анализа экспрессии генов из тканей семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента “ExtractRNA” (“Евроген”, Россия), затем получали кДНК с помощью реакции обратной транскрипции, используя набор “MLV RT Kit” (“Евроген”, Россия). ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью амплификатора “Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System” (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) в инкубационной смеси, содержащей кДНК, 0.4 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, реагент “qPCR-HS SYBR + Low ROX” (“Евроген”, Россия). Для исследований использовали последовательности комплементарных кДНК прямого и обратного праймеров для генов крысы *Star*, *Cyp11a1*, *Lhr*, кодирующих белки StAR, цитохром P450_{sc} и рецептор ЛГ, а также *Actb* (β-актин) в качестве референсного гена (табл. 1) [11].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных по определению уровня тестостерона в крови проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки для попарного сравнения. Для статистической обработки данных по оценке генной экспрессии использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки для попарного сравнения. Для статистической обработки данных по определению массы тела крыс, а также уровней глюкозы, общего холестерина и триглицеридов использовали парный тест Стьюдента. Все статистические анализы проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (версия 8.0.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика метаболических показателей у самцов крыс при их обработке интраназально вводимым ФЛ

Трехдневное введение ФЛ самцам крыс не вызывало значимых изменений массы тела животных, а также уровней глюкозы, триглицеридов и общего холестерина в крови (табл. 2).

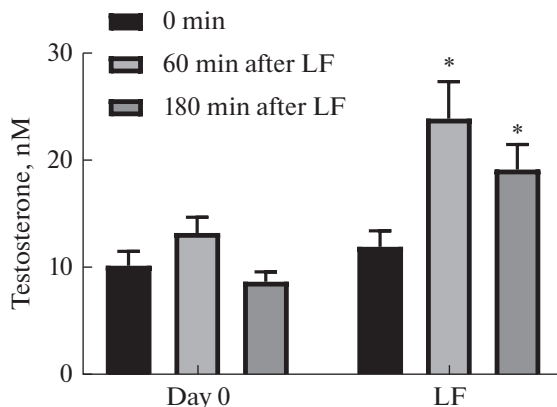


Рис. 1. Уровни тестостерона в крови крыс до и после однократного интраназального введения фрагмента лептина 116–122, миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амида. В нулевой день эксперимента образцы крови из хвостовой вены крыс забирали в 10:00, 12:00 и 14:00 час (day 0). В день эксперимента фрагмент лептина (ФЛ) вводили животным интраназально в 11:00, образцы крови забирали в 10:00 (до введения) и через 60 и 180 мин после введения ФЛ (LF). * – отличия от точки “0 min” статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 12$.

Влияние интраназального введения ФЛ на уровень тестостерона в крови в норме, а также при обработке животных антагонистом GnRH-рецептора и хорионическим гонадотропином человека

Однократное интраназальное введение ФЛ приводило к повышению уровня тестостерона в крови крыс на 99% через 60 мин после введения препарата (рис. 1). При этом уровень гормона оставался повышенным и через 180 мин, превосходя базовый уровень на 61%. Трехдневное введение ФЛ не вызывало значимых изменений уровня тестостерона в крови в течение всего исследованного периода (60–270 мин) (рис. 2а). Однократное подкожное введение ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу приводило к повышению уровня тестостерона на 243% через 180 мин после введения. Введение ХГЧ крысам, которые в течение трех дней интраназально получали ФЛ, приводило к более выраженному повышению уровня тестостерона, чем у интактных животных. Через 90 мин после введения ХГЧ (180 мин после введения ФЛ) уровень тестостерона был выше базовых значений на 340%, через 180 мин – на 773%. Тем самым, трехдневное введение ФЛ в значительной степени потенцировало стимулирующий эффект ХГЧ на продукцию тестостерона в сравнении с интактными животными, и эффект потенцирования составил 62 и 221% через 180 и 270 мин соответственно (рис. 2а).

Трехдневное введение антагониста рецептора GnRH цетрореликса приводило к значительному снижению уровня тестостерона. На третий день эксперимента через 180 и 270 мин после введения цетрореликса уровень гормона составил 36 и 25% от его базовых значений (рис. 2b). В условиях обработки животных интраназально вводимым ФЛ ингибирующие эффекты цетрореликса сохранялись, на что указывало снижение уровня тестостерона до 48 и 32% от его базовых значений через 180 и 270 мин после введения препаратов. На третий день эксперимента уровень тестостерона в группах “АНТ + ХГЧ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ” был снижен через 90 мин и нормализовался через 180 мин после введения ХГЧ (270 мин после введения цетрореликса и ФЛ соответственно) (рис. 2b). Введение ФЛ не приводило к ослаблению ингибирующего эффекта цетрореликса на стероидогенез и существенно не влияло на стероидогенный эффект ХГЧ (рис. 2b).

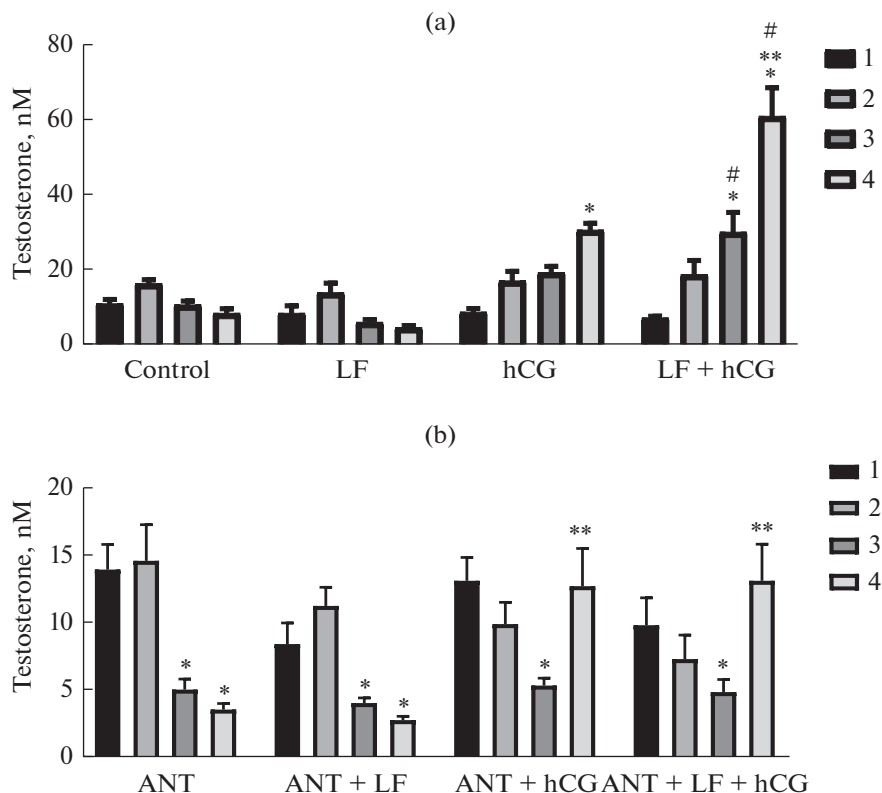


Рис. 2. Влияние трехдневного введения фрагмента лептина 116–122 и (или) антагониста рецептора GnRH, а также однократного введения ХГЧ на уровень тестостерона в крови самцов крыс. (а) – Изменение уровня тестостерона в крови у крыс, которые в течение трех дней получали интраназально вводимый ФЛ и затем были однократно обработаны ХГЧ. ФЛ вводили интраназально в суточной дозе 200 мкг/крысу (LF и LF+hCG – группы “ФЛ” и “ФЛ + ХГЧ”), ХГЧ вводили однократно, подкожно, в дозе 15 МЕ/крысу (hCG и LF + hCG – группы “ХГЧ” и “ФЛ + ХГЧ”). (б) – Изменение уровня тестостерона у крыс, которых в течение трех дней обрабатывали цетрореликсом и ФЛ и однократно ХГЧ. Цетрореликс вводили подкожно в суточной дозе 75 мкг/кг. ФЛ вводили группам ANT + LF и ANT + LF + hCG (группы “АНТ + ФЛ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ”), как описано выше. ХГЧ вводили как описано выше (ANT + hCG и ANT + LF + hCG – группы “АНТ + ХГЧ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ”). Образцы крови для изучения уровня тестостерона были взяты из хвостовой вены крыс на третий день обработки ФЛ и (или) цетрореликсом до введения обоих препаратов (1), через 90 мин после введения ФЛ и (или) цетрореликса (2), через 180 мин после введения ФЛ и (или) цетрореликса и через 90 мин после введения ХГЧ (3), через 270 мин после введения ФЛ и (или) цетрореликса и через 180 мин после введения ХГЧ (4). * – отличия от базового уровня тестостерона (точка 1) при внутригрупповом сравнении, ** – отличия от временной точки 180 мин после обработки ФЛ и (или) цетрореликсом или через 90 мин после введения ХГЧ (точка 3) при внутригрупповом сравнении, [#] – отличия от аналогичной временной точки в группе “Контроль” статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 6$.

*Влияние трехдневного введения фрагмента лептина на экспрессию генов
стероидогенеза в семенниках в норме и в условиях обработки
антагонистом рецептора GnRH и ХГЧ*

Исследовали экспрессию тестикулярных генов, кодирующих рецептор лютеинизирующего гормона (*Lhr*), белок *StaR* (*Star*) опосредующий скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза (транспорт холестерина в митохондрии), и фермент

цитохром P450_{sc} (*Cyp11a1*), катализирующий первую реакцию превращения холестерина в тестостерон. Изучение генной экспрессии в тканях семенников показало, что на третий день через 270 мин после введения ФЛ экспрессия генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* существенно не менялась. В группе “ХГЧ” через 180 мин после однократной инъекции гонадотропина повышение экспрессии генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* было значимым в сравнении с контрольной группой и составило 172, 168 и 74% соответственно. Для генов *Star* и *Cyp11a1* значимыми были различия и с группой “ФЛ”. Трехдневное введение ФЛ не приводило к усилению стимулирующего эффекта ХГЧ на экспрессию генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* (рис. 3а).

Трехдневное введение цетрореликса значимо снижало экспрессию гена *Star* в группах “АНТ” и “АНТ + ФЛ” до 62 и 65% от соответствующих значений в контрольной группе (рис. 3б). Введение ХГЧ восстанавливало экспрессию гена *Star* до контрольных значений в группах “АНТ + ХГЧ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ”. При этом трехдневная обработка ФЛ не оказывала значимого влияния на эффекты цетрореликса и ХГЧ на экспрессию гена *Star*. В группах “АНТ”, “АНТ + ФЛ” и “АНТ + ХГЧ” отмечали повышение экспрессии гена *Lhr* на 138, 83 и 183% соответственно. При этом в группе “АНТ + ФЛ + ХГЧ” экспрессия *Lhr* была на 64% снижена относительно группы “АНТ + ХГЧ”. В группах, обработанных цетрореликсом, не было обнаружено существенных изменений экспрессии гена *Cyp11a1*, но наблюдалась тенденция к ее усилению (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимосвязь энергетического метаболизма и функциональной активности репродуктивной системы в последние годы активно изучается. Одним из важных регуляторов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси является адипокин лептин, действующий на клетки-мишени через рецепторы ObRb. Будучи анорексигенным фактором, лептин снижает потребление пищи организмом, влияя на энергетический гомеостаз и опосредованно регулируя широкий спектр физиологических и биохимических процессов в организме [3].

Несмотря на доказанный терапевтический эффект полноразмерного лептина, в том числе при его дефиците в условиях липодистрофии, применение этого адипокина в клинике крайне ограничено, что обусловлено быстрой деградацией лептина в кровотоке и тканях, а также тем, что длительное его использование приводит к развитию лептиновой резистентности, что снижает фармакологическую эффективность лептиновой терапии. Альтернативой являются укороченные аналоги лептина, наиболее перспективным из которых является фрагмент 116–122 MA-[D-Leu4]-OB3. Продемонстрированы его анорексигенные эффекты у ob/ob- и db/db-мышей с нарушенным лептиновым сигналингом, а также у мышей с диета-индуцированным ожирением [9, 10]. По данным литературы, исследованный нами ФЛ способен ослаблять потребление пищи, нормализовать толерантность к глюкозе и снижать массу тела при ожирении [8]. В данном исследовании нами были использованы самцы крыс без метаболических нарушений (табл. 2). Трехдневное интраназальное введение ФЛ не влияло на основные метаболические показатели у крыс, такие как масса тела, уровни глюкозы, общего холестерина и триглицеридов в крови, что, по всей видимости, связано с нормальным метаболическим статусом животных, а также с краткосрочностью их обработки ФЛ. В описанных выше работах объектами исследования были мыши с признаками явных метаболических расстройств (ожирение, дислипидемия, нарушенная толерантность к глюкозе). Наряду с этим продолжительность лечения составила 14 дней при использовании суточной дозы 20–100 мг/кг (п/ор), в то время как в нашем эксперименте крысы получали ФЛ в суточной дозе 200 мкг/крысу в течение всего трех дней.

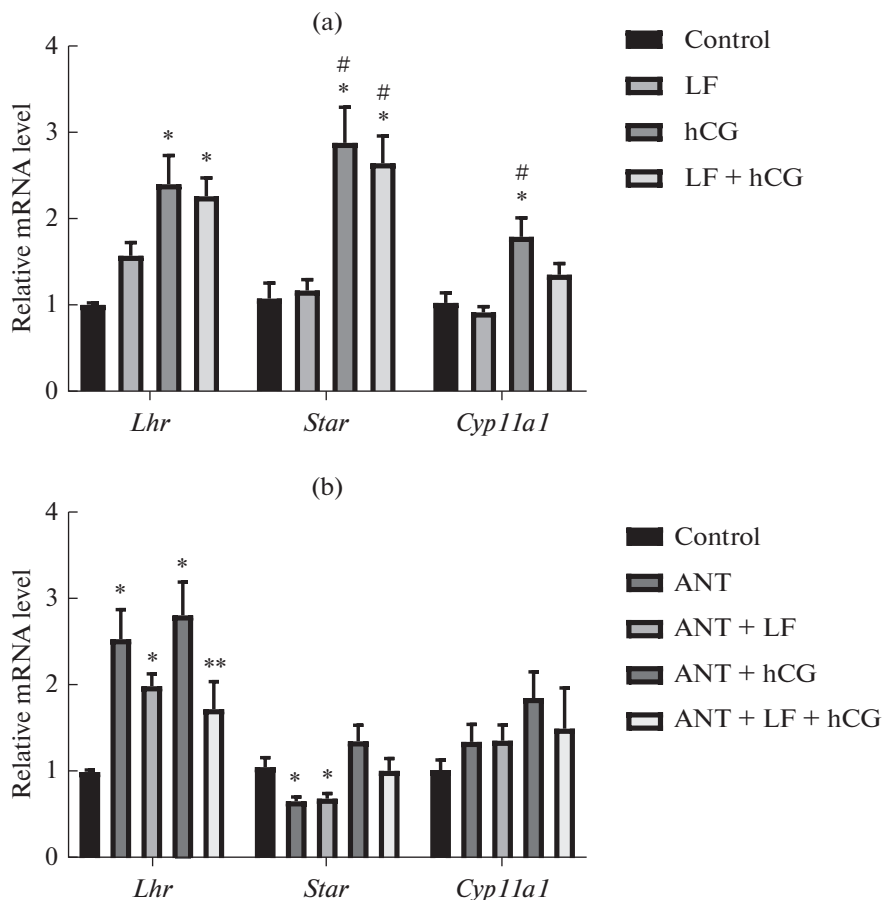


Рис. 3. Изменение экспрессии генов *Lhr*, *Star* и *Cyp11a1* в ткани семенников крыс после введения фрагмента лептина 116–122, антагониста рецептора GnRH или ХГЧ. Ткани семенников были взяты на третий день эксперимента через 270 мин после введения ФЛ и(или) цетрореликса и через 180 мин после введения ХГЧ. (а) – Изменение генной экспрессии в семенниках крыс в условиях трехдневного интраназального введения ФЛ, а также однократной стимуляции ХГЧ. ФЛ вводили интраназально в течение трех дней в суточной дозе 200 мкг/крысу (LF и LF + hCG – группы “ФЛ” и “ФЛ + ХГЧ”), ХГЧ вводили однократно, подкожно, в дозе 15 МЕ/крысу (hCG и LF + hCG – группы “ХГЧ” и “ФЛ + ХГЧ”). Сравнение проводили с группой “Контроль” (Control), получавшей только физиологический раствор. (б) – Изменение генной экспрессии в семенниках крыс, которых в течение трех дней обрабатывали антагонистом рецептора GnRH цетрореликсом и ФЛ, а также однократно вводили ХГЧ. Цетрореликс вводили подкожно в суточной дозе 75 мкг/кг, ФЛ (ANT + LF и ANT + LF + hCG – группы “АНТ + ФЛ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ”) и ХГЧ (ANT + hCG и ANT + LF + hCG – группы “АНТ + ХГЧ” и “АНТ + ФЛ + ХГЧ”) вводили, как описано выше. * – отличия от группы “Контроль” (Control), # – отличия от группы “ФЛ” (LF), ** – отличия от группы “АНТ + ХГЧ” (ANT + hCG) статистически значимы при $p < 0.05$, $M \pm SEM$, $n = 6$.

Для оценки влияния ФЛ на компоненты ГГТ оси нами был выбран интраназальный способ введения. При подобном способе введения ФЛ быстро проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в гипоталамическую область, что позволяет ему действовать непосредственно на гипоталамические компоненты лептиновой сигнальной системы [12]. По данным литературы ФЛ хорошо проникает через ГЭБ, при этом концентрация препарата в плазме крови имеет два пика: через 10

и 60 мин. Исследователи предполагают, что первый пик связан с быстрым всасыванием миристинилизированного пептида через слизистую оболочку носа, в то время как второй — с более медленным проникновением в кровь в ротоглотке [7]. Считается, что биодоступность препарата при интраназальном введении выше, чем при пероральном и разных способах парентерального введения [7]. Основываясь на этих данных и наших предварительных результатах, нами была разработана стратегия изучения эффективности влияния ФЛ на уровень тестостерона в крови и стероидогенез в семенниках самцов крыс.

Нами впервые показано, что при однократном интраназальном введении ФЛ стимулирует продукцию тестостерона, и максимальный эффект наблюдается уже через 60 мин после его введения (рис. 1). Этот максимум по времени хорошо совпадает со скоростью проникновения ФЛ через ГЭБ в гипоталамус [7]. При этом трехдневное введение препарата не приводило к изменениям уровня тестостерона в крови, что может быть связано с затуханием краткосрочных стероидогенных эффектов ФЛ на тестикулярный стероидогенез при многократном введении. Из данных литературы хорошо известно, что лептин может реализовать свои эффекты через опосредованную стимуляцию гипоталамических GnRH-продуцирующих нейронов и, тем самым, регулировать и модулировать стероидогенез в семенниках [3]. Использование ХГЧ, стимулятора тестикулярного стероидогенеза, позволяет изучить мишени и механизмы регуляторных эффектов ФЛ на активность ГГТ оси.

Ранее нами было показано, что метформин, широко известный антидиабетический препарат, способен усиливать эффекты однократно вводимого ХГЧ, взятого в относительно низкой дозе [11, 13, 14]. В рамках настоящего исследования мы изучили способность обработки крыс интраназально вводимым ФЛ потенцировать стероидогенные эффекты ХГЧ, также взятого в относительно низкой дозе — 15 МЕ/крысу. Мы показали, что трехдневная обработка крыс с помощью ФЛ вызывает значительное усиление эффекта ХГЧ через 90 и 180 мин после введения гонадотропина в сравнении с группой, получавшей только ХГЧ (рис. 2а). Регуляция синтеза тестостерона в клетках Лейдига семенников осуществляется через активацию эндогенными гонадотропинами рецептора ЛГ, что ведет к стимуляции активности белка StAR, транспортирующего холестерин из цитоплазмы в митохондрии к месту начала синтеза тестостерона, и цитохрома P450_{sc}, который катализирует превращение холестерина в прегненолон. Синтезированный в этой реакции прегненолон затем диффундирует в эндоплазматическую сеть и в серии последовательных реакций превращается в тестостерон [15]. Тем самым гены, кодирующие рецептор ЛГ (*Lhr*), белок StAR (*Star*) и цитохром P450_{sc} (*Cyp11a1*), являются ключевыми компонентами системы стероидогенеза. Нами показано, что обработка самцов крыс с помощью ХГЧ приводит к повышению экспрессии генов *Lhr* и *Cyp11a1* в семенниках (рис. 3а). В то же время необходимо отметить, что значимых различий в уровне мРНК для генов *Lhr* и *Cyp11a1* между группами “ХГЧ” и “ФЛ + ХГЧ” выявлено не было, что говорит об отсутствии заметных эффектов ФЛ на их экспрессию.

Способность лептина и его фрагмента влиять на тестикулярный стероидогенез и уровень тестостерона в крови обусловлена присутствием рецепторов лептина и низележащих компонентов лептинового сигналинга (трансдукторные IRS-белки, рецепторная тирозинкиназа JAK2, Akt-киназа, транскрипционные факторы STAT3/5) как в гипоталамических нейронах, так и в гонадотропах гипофиза и клетках Лейдига семенников [3]. Общепринято, что определяющую роль в регуляции ГГТ оси играют гипоталамические эффекты лептина [1, 3]. Однако данные о механизмах и мишенях влияния ФЛ на эту ось, в том числе информация о вовлечении в это влияние гипоталамических механизмов отсутствует. Для доказательства гипоталамических механизмов действия ФЛ нами было исследовано влияние антагониста GnRH-рецептора цетрореликса на стероидогенные эффекты ФЛ. При этом цетро-

реликс вводили в течение трех дней как отдельно, так и совместно с ФЛ и ХГЧ. Сам цетрореликс ожидаемо снижал уровень тестостерона в крови (рис. 2b) и экспрессию гена *Star*, играющего ключевую роль в регуляции тестикулярного стероидогенеза (рис. 3b). При этом мы наблюдали компенсаторное повышение экспрессии гена *Lhr* в семенниках, что может быть связано с необходимостью повысить плотность рецепторов ЛГ на плазматической мембране клеток Лейдига в условиях дефицита ЛГ, вызванного введением цетрореликса [16]. Далее самцам крыс, получавшим в течение трех дней цетрореликс, и животным, которые, помимо этого, интраназально получали ФЛ, на третий день однократно вводили ХГЧ в дозе 15 МЕ/крысу. В ответ на ХГЧ, через 180 мин после введения гормона было продемонстрировано восстановление до контрольных значений уровня тестостерона, сниженного при обработке цетрореликсом (рис. 2b), но потенцирования стероидогенного эффекта ХГЧ в группе с обработкой ФЛ (“АНТ + ФЛ + ХГЧ”) в этом случае выявлено не было. В группе “АНТ + ФЛ + ХГЧ” не было выявлено заметного эффекта ФЛ на стимуляцию гонадотропином экспрессии гена *Star* (рис. 3b). Таким образом, сделан вывод, что на фоне ингибирования ГГТ оси цетрореликсом ФЛ утрачивает способность усиливать стероидогенные эффекты ХГЧ, и это может указывать на то, что основной мишенью ФЛ, как и в случае полноразмерного лептина, являются компоненты лептиновой системы в гипоталамусе.

Таким образом, нами впервые показано, что ФЛ при однократном (но не трехдневном) интраназальном введении самцам крыс повышает у них уровень тестостерона в крови. При этом трехдневное введение ФЛ потенцирует эффекты ХГЧ, агониста рецептора ЛГ, на уровень тестостерона, хотя стимулирующие эффекты гонадотропина на экспрессию генов *Star* и *Lhr*, играющих ключевую роль в регуляции тестикулярного стероидогенеза, в присутствии ФЛ не меняются. Подавление стимулирующих эффектов GnRH на секреторную активность гонадотрофов гипофиза с помощью цетрореликса, антагониста GnRH-рецепторов, приводило к снижению уровня тестостерона в крови, а также к снижению экспрессии гена *Star* и компенсаторному повышению экспрессии гена *Lhr* в семенниках крыс. В условиях подавления ГГТ оси цетрореликсом, ФЛ не оказывал существенного влияния на стероидогенные эффекты ХГЧ, и это может свидетельствовать в пользу того, что мишенью действия ФЛ являются гипоталамические нейроны. В этой связи важно отметить высокую доступность гипоталамических структур при интраназальном способе введения ФЛ. Дальнейшие исследования фармакологической активности и механизмов действия ФЛ 116–122, миристоил-Ser-Cys-Ser-D-Leu-Pro-Gln-Thr-амида, как на мужскую, так и на женскую репродуктивную систему необходимы как для более глубокого понимания функций лептиновой сигнальной системы в контроле репродукции, так и для создания новых лекарственных средств для стимуляции репродуктивных функций и лечения бесплодия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры осуществляли в строгом соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 6-2/2022), “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” и European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-75-00130). Биохимические и молекулярно-биологические исследования проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и

молекулярно-биологических исследований Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kawwass JF, Summer R, Kallen CB (2015) Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review. *Mol Hum Reprod* 21(8): 617–632.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gav025>
2. Nieuwenhuis D, Pujol-Gualdo N, Arnoldussen IAC, Kiliaan AJ (2020) Adipokines: A gear shift in puberty. *Obes Rev* (6): e13005.
<https://doi.org/10.1111/obr.13005>
3. Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM (2021) The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology* 162(2): bqaa204.
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa204>
4. Leisegang K, Sengupta P, Agarwal A, Henkel R (2021) Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia* 53(1): e13617.
<https://doi.org/10.1111/and.13617>
5. Huang A, Roth CL (2021) The link between obesity and puberty: what is new? *Curr Opin Pediatr* 33(4): 449–457.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001035>
6. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, Gojoberi T, Isenovic ER (2021) Leptin and obesity: role and clinical implication. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 585887.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
7. Novakovic ZM, Leinung MC, Lee DW, Grasso P (2009) Intranasal administration of mouse [D-Leu-4]OB3, a synthetic peptide amide with leptin-like activity, enhances total uptake and bioavailability in Swiss Webster mice when compared to intraperitoneal, subcutaneous, and intramuscular delivery systems. *Regul Pept* 154(1–3): 107–111.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.01.002>
8. Novakovic ZM, Leinung MC, Grasso P (2013) [D-Leu-4]-OB3, an orally bioavailable leptin-related synthetic peptide insulin sensitizer: a study comparing the efficacies of [D-Leu-4]-OB3 and metformin on energy balance and glycemic regulation in insulin-deficient male Swiss Webster mice. *Peptides* 43: 167–173.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.02.023>
9. Leinung MC, Grasso P (2012) [D-Leu-4]-OB3, a synthetic peptide amide with leptin-like activity, augments the effects of orally delivered exenatide and pramlintide acetate on energy balance and glycemic control in insulin-resistant male C57BLK/6-m db/db mice. *Regul Pept* 179(1–3): 33–38.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.08.006>
10. Wang A, Anderson BM, Novakovic ZM, Grasso P (2018) [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, small molecule synthetic peptide leptin mimetics, improve glycemic control in diet-induced obese (DIO) mice. *Peptides* 101: 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.012>
11. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2022) The effects of separate and combined treatment of male rats with type 2 diabetes with metformin and orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor on steroidogenesis and spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23(1): 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
12. Anderson BM, Jacobson L, Novakovic ZM, Grasso P (2017) Oral delivery of [D-Leu-4]-OB3 and MA-[D-Leu-4]-OB3, synthetic peptide leptin mimetics: Immunofluorescent localization in the mouse hypothalamus. *Brain Res* 1664: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.03.020>
13. Derkach KV, Bakhtyukov AA, Morina IY, Romanova IV, Bayunova LV, Shpakov AO (2022) Comparative study of the restoring effect of metformin, gonadotropin, and allosteric agonist of lu-

- teinizing hormone receptor on spermatogenesis in male rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med* 172(4): 435–440.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05409-2>
14. *Derkach KV, Bakhtyukov AA, Bayunova LV, Zorina II, Shpakov AO* (2020) Normalization of testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus under the conditions of metformin therapy. *Dokl Biol Sci* 493(1): 110–113.
<https://doi.org/10.1134/S0012496620040031>
 15. *Zirkin BR, Papadopoulos V* (2018) Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod* 99(1): 101–111.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iy059>
 16. *Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, Riethmiiller H, Engel J* (2000) The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update* 6(4): 322–331.
<https://doi.org/10.1093/humupd/6.4.322>

Modulating Effect of the Leptin Fragment 116–122 on Testicular Steroidogenesis in Male Rats

A. A. Bakhtyukov^{a, *}, I. A. Lebedev^a, V. S. Kuznetsova^a,
K. V. Derkach^a, and A. O. Shpakov^a

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

^{*}*e-mail: bahtyukov@gmail.com*

Adipokine leptin plays an important role in the regulation of the reproductive system. It stimulates the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by indirectly acting on GnRH-secreting neurons and modulates testicular steroidogenic function by binding to leptin receptors in Leydig cells. A leptin fragment 116–122 (LF) including the main receptor-binding determinants of this adipokine, normalizes metabolic parameters in animals with diet-induced obesity. However, its ability to influence the steroidogenic function of the testes, including through interaction with GnRH neurons of the hypothalamus, has not been studied. The aim of this work was to study the effects of a single and three-day intranasal administration of LF (200 µg/rat) on the blood testosterone level and the expression of steroidogenic genes in the testes in mature male Wistar rats. To evaluate the effect of LF on testicular steroidogenesis upon stimulation with human chorionic gonadotropin (hCG, 15 IU/rat, s/c), a stimulator of testosterone synthesis and an antagonist of the GnRH receptor cetrorelix (75 µg/kg, s.c.) an inhibitor of testicular steroidogenesis. It has been shown that LF increases the level of testosterone in the blood after a single injection, and after a three-day administration it enhances the steroidogenic effect of hCG. LF and hCG increased the expression of the *Star* gene encoding the key regulatory protein of steroidogenesis StAR. Administration of cetrorelix reduced testosterone levels and *Star* expression, and compensatory increased expression of the luteinizing hormone receptor gene. The potentiating effect of LF on hCG-induced stimulation of testosterone levels and *Star* expression was not detected under conditions of GnRH antagonist treatment. Thus, LF is capable of stimulating steroidogenesis in rat testis by itself and potentiating the steroidogenic effects of hCG. Since its effects are suppressed in the presence of a GnRH antagonist, there is reason to assume that the effect of LF is realized through stimulation of hypothalamic GnRH neurons.

Keywords: leptin fragment, steroidogenesis, testosterone, GnRH receptor antagonist, luteinizing hormone receptor, human chorionic gonadotropin