

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 8

август

2023



СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

- Механосенсорные структуры в системе механотрансдукции мышечного волокна
Т. М. Мирзоев, Б. С. Шенкман 1005
- Роль метаболитов триптофанового обмена и короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе аутоиммунных заболеваний
О. П. Шатова, Е. М. Ягодкина, С. С. Кайдошко, А. А. Заболотнева, А. В. Шестопалов 1028
-

Экспериментальные статьи

- 5-HT₂-рецепторы и 5-ГИУК – терапевтические мишени оценки тяжести, прогрессирования и эффективности лечения у неполовозрелых самцов крыс в монокроталиновой модели легочной гипертензии
Д. Ф. Билалова, Р. Р. Нигматуллина, А. А. Мустафин 1045
- Возрастные особенности влияния холецистокинина на импульсную активность нейронов дорсомедиального и вентромедиального ядер гипоталамуса крыс
А. А. Спиричев, К. Ю. Моисеев, П. А. Анфимова, Г. А. Тарасова, П. М. Маслюков 1056
- Распределение напряжения кислорода на микрососудах и в ткани коры головного мозга крысы при артериальной гипоксии
Е. П. Вовенко, И. Б. Соколова 1068
- Исследование участия грелина в механизмах игровой зависимости у крыс после воздействия психогенных стрессоров в раннем онтогенезе
А. А. Лебедев, С. С. Пюрвеев, Э. А. Сексте, Б. А. Рейхардт, Е. Р. Бычков, П. Д. Шабанов 1080
- H₂S-опосредованная дилатация пиальных артерий у крыс разного возраста: вклад K_{ATP} и VК_{Ca}-калиевых каналов
О. П. Горшкова, И. Б. Соколова 1094
- Влияние формирования доминантно-субординантных отношений в модели резидент–интродер на тестикулярную функцию у лабораторных мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас
М. А. Клещев, А. В. Осадчук, Л. В. Осадчук 1108
- Сравнительный анализ нарушений механизмов регуляции сердечного ритма, вызванных у новорожденных крыс хлоридом никеля и ингибитором ацетилхолинэстеразы эзеринум
С. В. Кузнецов, Н. Н. Кузнецова 1124
- Устойчивость предсердного миокарда куриного эмбриона к ингибированию HCN-каналов и компонентов системы "Ca²⁺-часов"
Е. А. Лебедева, М. А. Гонотков 1140
-
-

CONTENTS

Reviews

- Mechanosensory Structures in the Mechanotransduction System of Muscle Fibers
T. M. Mirzoev and B. S. Shenkman 1005
- The Role of Tryptophan Metabolites and Short-Chain Fatty Acids in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases
*O. P. Shatova, E. M. Yagodkina, S. S. Kaydoshko,
A. A. Zabolotneva, and A. V. Shestopalov* 1028
-

Experimental Articles

- 5-HT₂-Receptors and 5-HIAA – Therapeutic Targets for Evaluation of Severity, Progression and Effectiveness of Treatment in Immature Male Rats in a Monocrotalin Model of Pulmonary Hypertension
D. F. Bilalova, R. R. Nigmatullina, and A. A. Mustafin 1045
- Age-Dependent Influence of Cholecystokinin on the Impulse Activity of Neurons in the Dorsomedial and Ventromedial Nuclei of the Hypothalamus in Rats
*A. A. Spirichev, K. Yu. Moiseev, P. A. Anfimova,
G. A. Tarasova, and P. M. Masliukov* 1056
- Distribution of Oxygen Tension on Microvessels and in Tissue of Rat Brain Cortex at Severe Arterial Hypocapnia
E. P. Vovenko and I. B. Sokolova 1068
- Studying the Involvement of Ghrelin in the Mechanism of Gambling Addiction in Rats after Exposure to Psychogenic Stressors in Early Ontogenesis
*A. A. Lebedev, S. S. Purveev, E. A. Sexte, B. A. Reichardt,
E. R. Bychkov, and P. D. Shabanov* 1080
- H₂S-Mediated Dilation of Pial Arteries in Rats of Different Ages: Contribution of K_{ATP} and BK_{Ca}-Channels
O. P. Gorshkova and I. B. Sokolova 1094
- The Effects of Social Hierarchy Establishment in Resident–Intruder Model on Testicular Function in Laboratory Mice of Different Inbred Strains
M. A. Kleshchev, A. V. Osadchuk, and L. V. Osadchuk 1108
- Comparative Analysis of Disorders of Heart Rhythm Regulation Mechanisms Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride and the Acetylcholinesterase Inhibitor Physostigmine (Eserine)
S. V. Kuznetsov and N. N. Kuznetsova 1124
- Resistance of Embryonic Chick Atria to Inhibition of HCN-Channels and Components of the “Ca²⁺-Clock”
E. A. Lebedeva and M. A. Gonotkov 1140
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МЕХАНОСЕНСОРНЫЕ СТРУКТУРЫ В СИСТЕМЕ
МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ МЫШЕЧНОГО ВОЛОКНА

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

¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

**E-mail: tmirzoev@yandex.ru*

Поступила в редакцию 12.05.2023 г.

После доработки 27.06.2023 г.

Принята к публикации 01.07.2023 г.

Способность скелетных мышц воспринимать механические стимулы и реагировать на них путем изменения внутриклеточных электрохимических и биохимических процессов (механотрансдукция) имеет важнейшее значение для регуляции физиологических процессов в мышечных волокнах. В настоящем обзоре представлена характеристика основных сарколеммальных, саркомерных и цитоскелетных механочувствительных структур, а также проанализированы механо-зависимые сигнальные пути и механизмы, участвующие в регуляции экспрессии генов, а также процессах синтеза и распада белка. В заключительной части обзора сформулированы специфические вопросы в области механотрансдукции скелетных мышц, требующие разрешения в дальнейших исследованиях. Понимание особенностей механотрансдукции в скелетных мышцах необходимо для разработки эффективных средств, направленных на лечение мышечных дистрофий, саркопении, а также профилактики мышечной атрофии, вызванной гипокинезией.

Ключевые слова: скелетная мышца, механосенсоры, механотрансдукция, механический сигнал, функциональная разгрузка, синтез белка, внутриклеточная сигнализация

DOI: 10.31857/S0869813923080083, EDN: GAJLSJ

ВВЕДЕНИЕ

Способность мышечного волокна воспринимать механические сигналы, обусловленные в том числе самой его механической (сократительной) деятельностью, и реагировать на них путем изменения внутриклеточных биохимических процессов (механотрансдукция), определяющих структурно-метаболический фенотип волокна, является одной из неотъемлемых характеристик скелетных мышц млекопитающих. В ответ на изменение механической нагрузки мышечные волокна/клетки способны значительно менять интенсивность экспрессии различных генов и характер метаболизма, что в итоге сказывается на морфологическом профиле мышечных волокон. Так, регулярная физическая нагрузка в виде силовых упражнений приводит к усилению интенсивности синтеза мышечных белков и последующей гипертрофии мышечных волокон, тогда как хроническая функциональная разгрузка (гипокинезия, пребывание в невесомости), напротив, приводит к резкому снижению интенсивности синтеза белка, увеличению протеолиза и, как следствие, атрофии волокон скелетных мышц [1–3].

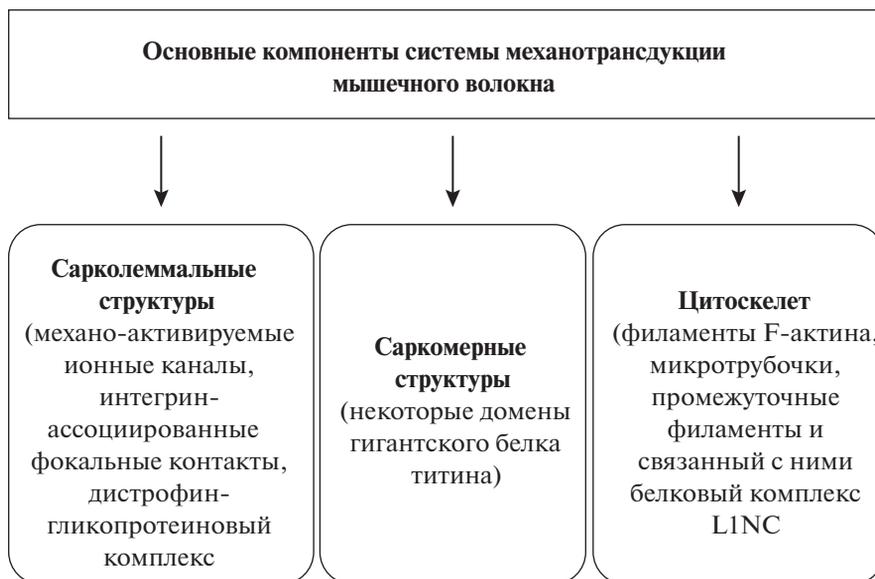


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая основные компоненты системы механотрансдукции мышечного волокна.

Сигнальные пути, влияющие на структуру и метаболизм мышечного волокна, запускаются двумя способами: во-первых, изменениями концентрации молекулярных мессенджеров, обусловленной мышечной активностью или ее снижением (АТФ, АДФ, АМФ, ионы кальция, протоны, лактат-ионы, окисленный и восстановленный НАД и др.), а во-вторых, непосредственно механическими сигналами, отражающими характер сократительной активности и механических возмущений, действующих на волокно (например, пассивное растяжение или укорочение).

Волокна скелетных мышц, выполняющих большой объем механической работы, снабжены соответствующими механосенсорными структурами, которые участвуют в восприятии и преобразовании механических возмущений в молекулярные сигналы, регулирующие мышечную пластичность. Анализ доступной литературы, посвященной механотрансдукции в поперечнополосатых мышцах, позволяет выделить следующие основные компоненты системы механотрансдукции мышечного волокна в зависимости от места их расположения: 1) сарколеммальные структуры (механо-активируемые ионные каналы, интегрин-ассоциированные фокальные контакты, дистрофин-гликопротеиновый комплекс (DGC)), 2) саркомерные структуры (отдельные домены белка титина) и 3) цитоскелетные структуры (микрофиламенты F-актина, промежуточные филаменты и связанный с ними белковый комплекс LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)) (рис. 1). При мышечном сокращении происходит скопление мышечных волокон вдоль структуры внеклеточного матрикса, в результате чего сарколеммальные механосенсоры испытывают состояние напряжения сдвига (shear stress). В условиях, при которых сокращающейся скелетной мышце приходится преодолевать сопротивление или удерживать внешний груз, длина саркомера мышечных волокон будет превышать минимальные значения, что формирует условия относительного растяжения мышцы. Этот фактор можно назвать фактором продольной механической нагрузки или продольной передачи силы (longitudinal force transmission) [4]. Такая продольная нагрузка может восприниматься как саркомерными, так и сарколеммальными механосенсорами.

Кроме того, генерируемая при мышечной работе сила передается от саркомерных структур к периферии мышечного волокна, проходя от Z-диска к цитоскелету и далее к структурам внеклеточного матрикса. Данный фактор принято называть фактором поперечной механической нагрузки или поперечной передачи силы (lateral force transmission) [4]. При этом большая часть генерируемой саркомерами силы в скелетных мышцах млекопитающих передается в поперечном направлении [5]. Ключевыми структурами, обеспечивающими передачу силы в поперечном направлении, являются интегрины, DGC, а также белки цитоскелета.

К настоящему моменту назрела необходимость обобщения имеющихся данных о роли различных компонентов системы механотрансдукции в регуляции синтеза и распада белка и экспрессии ряда генов, определяющих рост и развитие мышечных волокон, их атрофию или гипертрофию. В связи с этим, в настоящем обзоре будет представлена характеристика основных сарколеммальных, саркомерных и цитоскелетных механочувствительных структур мышечного волокна, а также проанализированы основные внутриклеточные сигнальные пути, активирующиеся в ответ на механические стимулы.

САРКОЛЕММАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ

Механо-активируемые ионные каналы

Механо-активируемые (МА) ионные каналы представляют собой трансмембранные белки способные активироваться (то есть открываться и пропускать различные ионы) в ответ на механическую деформацию клеточной мембраны (механическое напряжение мембраны, вызванное растяжением, напряжением сдвига и др.). В мышечных клетках (культура клеток, полученная из грудной мышцы куриного эмбриона) МА-каналы были впервые описаны Guharau и Sachs в 1984 г. путем обнаружения ионного тока одиночного канала методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) [6]. МА-каналы можно условно разделить на неселективные катионные каналы, обеспечивающие входящий ток ионов (например, ионов Ca^{2+} и Na^+ через каналы семейства Piezo) и селективные калиевые каналы, реализующие исходящий ток ионов K^+ (например, представители подсемейства двупоровых калиевых каналов TREK (TWIK-related K^+ -channel) и TRAAK (TWIK-related arachidonic acid activated K^+ -channel)) [7, 8]. Было установлено, что МА-каналы мышечных клеток проницаемы для ионов Ca^{2+} , Na^+ , K^+ и Li^+ [9, 10]. При этом для ингибирования данных каналов исследователи используют гадолиний, аминогликозиды (стрептомицин), а также пептид GsMTx-4, полученный из яда чилийского розового птицеда (*Grammostola rosea*) [11–13]. При этом важно отметить, что перечисленные ингибиторы МА-каналов нельзя назвать высокоспецифичными, а высокоселективных блокаторов данных каналов пока не выявлено. По современным представлениям активация МА-каналов в ответ на приложенное механическое напряжение может осуществляться как путем взаимодействия с окружающими канал липидами (force-from-lipid model), так и посредством взаимодействия каналов с белками подмембранного цитоскелета и (или) внеклеточного матрикса (force-from-filament model) [14]. В связи с этим на ионную проводимость данных каналов может оказывать существенное воздействие как содержание различных липидов в клеточной мембране (холестерин, сфингомиелин, церамид и др.), так и организация актиновой сети (филаменты F-актина) в районе сарколеммы. Для ознакомления с литературными данными (иногда весьма противоречивыми) о роли кортикального цитоскелета и мембранных липидов в модуляции активности МА-каналов читатель может обратиться к нескольким недавно опубликованным обзорам

[15–17]. Используя соль гадолиния и стрептомицин, в 2006 г. Spangenburg и McBride впервые установили, что для полной активации анаболического сигнального пути mTORC1/p70S6K в скелетной мышце (*m. tibialis anterior*) крысы после эксцентрических сокращений необходимы нормально функционирующие МА-ионные каналы (stretch-activated channels) [18]. Исследуя влияние механической разгрузки (методом антиортостатического вывешивания задних конечностей крысы) на процесс передачи механического сигнала, был обнаружен интересный феномен: после 24-часовой разгрузки анаболический ответ (т.е. интенсивность синтеза белка) изолированной камбаловидной мышцы на эксцентрическую нагрузку был значительно ниже, чем у изолированной мышцы, взятой у контрольного животного [19]. Этот эффект сохранялся и при более продолжительных экспозициях животных в условиях разгрузки. Учитывая вышеупомянутую работу Spangenburg and McBride, мы предположили, что обнаруженный нами феномен механо-анаболической резистентности мог быть связан с нарушениями в работе МА-каналов. Для блокирования этих каналов мы применили соль гадолиния. Оказалось, что обработка камбаловидной мышцы, изолированной у интактных контрольных животных, солью гадолиния, существенно снижала уровень фосфорилирования p70S6K в ответ на эксцентрическую нагрузку. В то же время обработка солью гадолиния мышцы, изолированной у животного, подвергнутого 7-суточному вывешиванию, не приводила к углублению эффекта снижения анаболического ответа на нагрузку [19]. Такие результаты свидетельствуют о том, что механизмы, затронутые действием разгрузки, сходны с механизмами, измененными под действием гадолиния. Следовательно, уменьшение амплитуды анаболического ответа изолированной мышцы на эксцентрическую нагрузку после вывешивания, по-видимому, обусловлено нарушением работы МА-ионных каналов. Природа описанного эффекта может быть связана с изменениями микроокружения МА-каналов. Так, ранее была выявлена зависимость работы МА-каналов (stretch-activated channels) от содержания холестерина в мембране. При удалении холестерина активность МА-каналов в клетках миелоидной лейкемии человека K562 резко снижалась [20], но восстанавливалась при экспериментальной дезинтеграции сети актиновых стресс-фибрилл [21]. На раннем этапе функциональной разгрузки скелетных мышц также наблюдается деструкция холестеринových рафтов в мышечных волокнах [22], по-видимому, вследствие накопления в них церамида [23, 24]. Поэтому не исключено, что уменьшение анаболического сигнального ответа на механический стимул (механо-анаболическая резистентность) может обуславливаться деструкцией холестеринových рафтов сарколеммы.

В нашей лаборатории также было установлено, что нормально функционирующие МА-ионные каналы необходимы для полной активации анаболических процессов в камбаловидной мышце крысы в остром периоде восстановления (12 ч реадaptации) после периода механической разгрузки [25]. Таким образом, можно сделать вывод о существовании связи между работой МА-ионных каналов и активацией анаболического mTORC1-зависимого сигнального пути. К настоящему времени точно установить молекулярный механизм, вовлеченный в проведение механического сигнала от МА-каналов к комплексу mTORC1, пока не удалось, однако некоторые литературные данные позволяют выдвинуть ряд сигнальных путей, которые могут быть задействованы в этом процессе. С одной стороны показано, что МА-каналы необходимы для синтеза оксида азота (NO) в миотубах в ответ на механическое воздействие в виде напряжения сдвига (shear stress) [26]. Увеличение продукции NO в этом случае может быть связано с Ca²⁺-зависимой активацией NO-синтазы [27]. Увеличение продукции NO может ингибировать активность киназы гликогенсинтазы GSK-3 (негативного регулятора анаболических процессов в клетке) посредством классического сигнального пути NO/гуанилатциклаза

(GC)/циклический гуанозинмонофосфат (cGMP)/протеинкиназа G (PKG) [28, 29]. NO-зависимая регуляция активности GSK-3 может оказывать влияние как на синтез белка, так и на трансформацию миозинового фенотипа мышечных волокон [29]. Еще один механизм, связывающий активацию МА-канала, вызванную механической нагрузкой, и регуляцию синтеза мышечного белка, может быть связан с сигнальным путем Ca^{2+} /кальмодулин (CaM)/ Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая протеинкиназа (CaMK)/JNK (c-jun N-terminal kinase)/p70S6K. Действительно, было показано, что CaMK может активировать JNK [30], а JNK, в свою очередь, активирует киназу p70S6 [31], участвующую в регуляции трансляции мРНК.

Говоря о МА-ионных каналах, возникает закономерный вопрос о молекулярной природе данных каналов в скелетной мышце млекопитающих. В 2005 г. Maroto и соавт. на ооцитах лягушки было установлено, что канонический катионный канал с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPC1, Transient Receptor Potential Canonical 1) является компонентом МА-каналов, активность которых регулируется напряжением липидного бислоя клеточной мембраны [32]. Позднее было подтверждено, что белок TRPC1 является компонентом МА-каналов и в клетках скелетных мышц, а также участвует в депо-управляемом входе ионов кальция [33]. При этом следует отметить, что не все исследователи поддерживают тезис о механо-зависимой функции каналов TRPC1 [34, 35]. В частности, ряд экспериментов показал, что каналы семейства TRP не являются “первичными механосенсорами” (primary mechanosensors), то есть не активируются непосредственно в ответ на растяжение плазматической мембраны, а скорее выполняют функцию “усилителей” (amplifiers) механо-зависимых сигнальных каскадов [36]. Так, Zano и соавт. продемонстрировали вовлечение TRPC1-каналов в развитие скелетной мышцы *in vitro* посредством кальций-зависимой активации сигнального пути АКТ/mTOR/p70S6K в период дифференцировки первичных миобластов, а также во время регенерации скелетной мышцы после ранения [37]. Кроме того, было показано, что снижение механической нагрузки на мышцы задних конечностей мышей (в течение 14 сут) приводит к достоверному снижению содержания белков TRPC1 и TRPC3 в камбаловидной мышце [38, 39]. Также было обнаружено, что ингибирование экспрессии TRPC1 (путем инъекции siRNA и электропорации) ухудшало восстановление массы камбаловидной мышцы, атрофированной вследствие механической разгрузки [39]. Нокаут или нокдаун гена TRPC1 у мышей выражается в уменьшении площади поперечного сечения мышечных волокон и снижении содержания миофибриллярных белков [39, 40]. Основываясь на вышеперечисленных данных о роли TRPC1 в мышечных клетках, можно предположить, что данная молекула может принимать участие в реализации анаболического сигнала в ответ на внешние механические воздействия. В 2010 г. научной группой, возглавляемой А. Pataroutian, на культуре мышечных нейробластов были впервые идентифицированы белки семейства Piezo (Piezo1 и Piezo2), представляющие собой МА-ионные каналы [41]. Спустя 5 лет была идентифицирована синтетическая молекула Yoda1, являющаяся специфическим активатором каналов Piezo1 [42]. Кроме Yoda1, были идентифицированы низкомолекулярные вещества Jedi1/2, способные селективно активировать каналы Piezo1 [43]. При этом Yoda1 и Jedi1/2 являются химическими активаторами каналов, присоединяясь к специфическим доменам белка Piezo1, что отличает их от неселективных ингибиторов МА-каналов, которые действуют не напрямую, а через окружающие МА-канал липиды. На сегодняшний день опубликовано несколько работ о роли Piezo1 в клетках скелетных мышц. Так, группой японских исследователей на культуре клеток C2C12 была показана важная роль активации Piezo1 для протекания морфогенеза во время образования миотуб при слиянии миобластов [44]. Bosutti и соавт. охарактеризовали клеточную локализацию Piezo1 в сателлитных клетках, миотубах и зрелых мышечных волокнах, а также проанализировали воздействие

активации Piezo1 с помощью Yoda1 на ключевые этапы миогенеза [45]. В частности, было показано, что применение Yoda1 стимулировало дифференцировку и слияние клеток, но не пролиферацию сателлитных клеток [45]. На культуре миотуб недавно была показана роль Piezo1 в высвобождении миокина (интерлейкина 6, IL-6) в ответ на инкубацию мышечных клеток с Yoda1 [46]. Однако это исследование противоречит опубликованным данным о том, что иммобилизация/атрофия скелетных мышц связана с инактивацией Piezo1 и последующей повышенной экспрессией IL-6 посредством транскрипционного фактора Krüppel-like factor-15 [47]. Выявление причин расхождения между этими двумя работами потребует дополнительных исследований.

Костамер мышечного волокна

Волокна поперечнополосатых мышц характеризуются наличием *костамеров* — особых белковых комплексов, соединяющих сарколемму с саркомерами в проекции Z-диска [48]. Весь ансамбль белковых молекул, составляющих костамер мышечного волокна, условно разделяют на два комплекса, а именно, дистрофин-гликопротеиновый комплекс (DGC) и белковый комплекс “интегрин—талин—винкулин” [48]. Ниже будет рассмотрена роль этих комплексов в передаче механического сигнала к внутриклеточным путям сигнальной трансдукции.

Дистрофин-гликопротеиновый комплекс

DGC, располагающийся как в сарколемме, так и непосредственно под ней, играет ключевую роль в поддержании целостности мембраны, а также в процессе передачи силы (force transmission) и механотрансдукции. DGC состоит из дистрофина, дистрогликанов (α - и β -), саркогликанов (α -, β -, γ - и δ -) и саркоспана [49] (рис. 2). Важность комплекса DGC в скелетных мышцах доказывается тем, что нарушения экспрессии белков DGC приводят к мышечным дистрофиям — заболеваниям, характеризующимся прогрессирующей потерей мышечной массы и силы, дегенерацией мышц [49]. При этом наиболее часто встречающаяся врожденная форма мышечной дистрофии связана с мутацией в гене белка дистрофина, что приводит к дефициту данного белка в мышечных волокнах и развитию летального заболевания (миодистрофия Дюшенна) [50].

Комплекс DGC взаимодействует через актиновый цитоскелет с фокальными контактами (focal adhesions, FA), представляющими собой скопление интегринов, соединяющих внеклеточный матрикс с подмембранным цитоскелетом через белки талин и винкулин. Недавно была предложена модель, согласно которой дистрофин выступает в качестве аллостерического регулятора фокальных контактов за счет увеличения напряжения винкулина и общих тяговых усилий (overall traction forces) мышечной клетки, что может приводить к усилению передачи силы через актиновый цитоскелет и последующей транслокации в ядро транскрипционного фактора YAP (Yes-associated protein) [51]. В мышечных клетках с мутациями в гене дистрофина наблюдается ослабление связи между DGC (дистрофином) и фокальными контактами. Эта приводит к уменьшению натяжения фокальных контактов, снижению передачи силы к ядру через актиновые нити и последующему снижению содержания YAP в ядре [51].

В серии элегантных экспериментов Barton впервые показала роль гамма-саркогликана (γ -SG) (используя мышей *gsg*-/-, то есть без гамма-саркогликана) и дистрофина (используя мышей *mdx*, то есть без дистрофина) в механотрансдукции в скелетных мышцах млекопитающих [52]. В состоянии покоя обе линии трансгенных мышей (*gsg*-/- и *mdx*) имели более высокое фосфорилирование ERK1 в *m. extensor digitorum longus*, а в мышцах мышей *gsg*-/- наблюдалось повышенное фосфо-

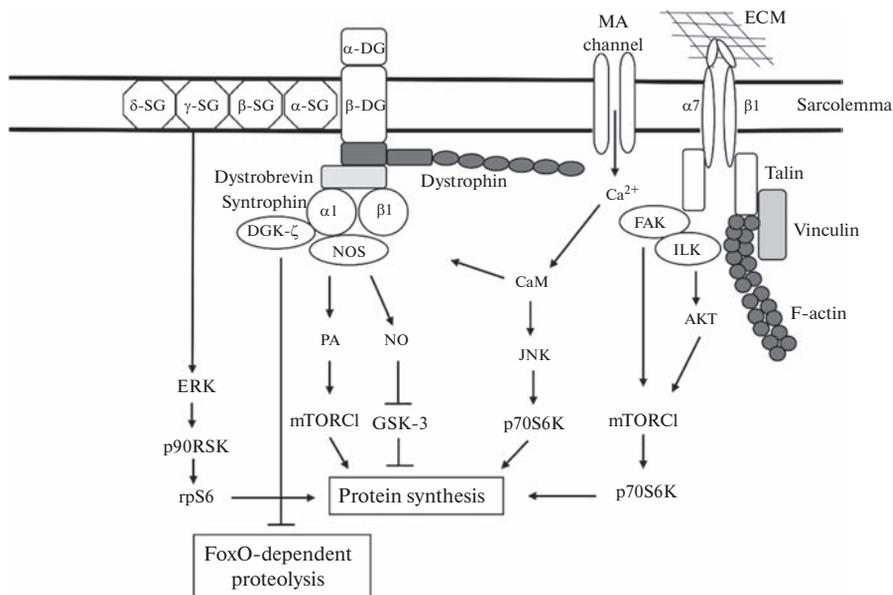


Рис. 2. Сарколеммальные компоненты системы механотрансдукции мышечного волокна и соответствующие механо-зависимые сигнальные пути, регулирующие синтез и распад белка. Модифицировано из [49]. Обозначения: DG – дистрогликан, SG – саркогликан, MA channel – механо-активируемый ионный канал, ECM – внеклеточный матрикс, $\alpha 7$ и $\beta 1$ – субъединицы интегрин, ERK – киназа, регулируемая внеклеточным сигналом, p90RSK – рибосомальная киназа p90, rpS6 – рибосомальный белок S6, FoxO – транскрипционный фактор, DGK- ζ – диацилглицеролкиназа (изоформа дзета), mTORC1 – мишень рапамицина млекопитающих (комплекс 1), NO – оксид азота, GSK-3 – (киназа гликогенсинтазы 3), CaM – кальций-кальмодулиновый комплекс, JNK – N-концевая киназа белка c-Jun, p70S6K – рибосомальная киназа p70, FAK – киназа фокальных контактов, ILK – киназа, связанная с интегрином, AKT – протеинкиназа B.

рирование ERK2 по сравнению с мышцами дикого типа [52]. Серия эксцентрических мышечных сокращений привела к увеличению фосфорилирования ERK1/2 в нормальной мышце, тогда как мышца *mdx* не демонстрировали изменений в фосфорилировании ERK1/2 после механического воздействия. В мышцах мышей *gsg*^{-/-} не наблюдалось значительного увеличения фосфорилирования ERK1 в ответ на эксцентрические сокращения, однако фосфорилирование ERK2 было более высоким, чем в группе мышей дикого типа [52]. Кроме того, отсутствие γ -SG в *m. extensor digitorum longus* мышца изменяло фосфорилирование p70S6K в ответ на серию растяжений изолированной мышцы: уровень фосфорилирования данной киназы в ответ на механическое воздействие был значительно выше, чем в мышце контрольных животных [53]. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие интактного γ -SG в мышечных волокнах препятствует гиперактивации mTORC1-зависимого анаболического сигнального пути.

Важно также отметить, что в волокнах скелетных мышц нейрональная NO-синтаза (nNOS) локализуется под сарколеммой, ассоциируясь с DGC посредством синтрофина и дистрофина [54, 55] (рис. 2). Следовательно, можно предположить, что нарушения в DGC могут повлиять на активность nNOS (фосфорилирование по Ser 1412) и продукцию NO. Действительно, Garbincius и Michele, используя культу-

ру кардиомиоцитов и методику циклических растяжений, показали, что DGC способствует механо-зависимой активации pNOS и синтезу NO, при этом активируя АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК) [56]. Важно заметить, что нарушение проведения механо-зависимого сигнала к системе синтеза NO в клетках с дефицитом дистрофина, полностью устранялось при фармакологической активации АМПК [56].

Ранее было показано, что в волокнах скелетных мышц с синтрофинами также локализована дзета изоформа диацилглицеролкиназы (DGK- ζ) [57] (рис. 2). Данная киназа играет важную роль в синтезе фосфатидной кислоты (РА) путем фосфорилирования диацилглицерола (DAG). В лаборатории доктора Hornberger было установлено, что в ответ на механическое растяжение в скелетной мышце происходит увеличение как количества DAG, так и киназной активности DGK- ζ , что приводит к повышенной концентрации РА, являющейся непосредственным активатором комплекса mTORC1 [58] (рис. 2). Более того, DGK- ζ не только участвует в активации анаболической сигнализации в ответ на механическую нагрузку, но также ингибирует сигнальные пути, связанные с убиквитин-протеасомной деградацией мышечных белков посредством регуляции экспрессии транскрипционного фактора FoxO [59] (рис. 2).

Интегрины

В скелетных мышцах комплекс DGC работает совместно с интегринными для передачи силы в поперечном направлении [4]. Интегрины представляют собой трансмембранные гетеродимеры нековалентно связанных α - и β -субъединиц [60] (рис. 2). Преобладающим интегрином в скелетных мышцах взрослого человека является интегрин $\alpha 7 \beta 1$, причем $\alpha 7$ -субъединица отвечает за связывание с ламинином в базальной мембране, а $\beta 1$ -субъединица участвует в связывании с актином через различные субсарколеммальные белки, такие как α -актинин, десмин и паксиллин [60]. В скелетных мышцах интегрины функционируют как рецепторы, которые опосредуют взаимодействие внеклеточного матрикса с сарколеммой мышечного волокна. Эта важная функция интегринов обуславливает интерес к исследованию интегриновых комплексов в механотрансдукции и передаче силы во время механических нагрузок. В период минимальной мышечной активности “внеклеточная” головка интегрин принимает изогнутую форму, что блокирует ее взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса [61]. При физической нагрузке “внеклеточная” головка интегрин выпрямляется, две субъединицы интегрин разделяются, и происходит связывание внеклеточного белка и распространение силы в поперечном направлении [61]. Данные литературы свидетельствуют, что в ответ на физическую нагрузку в виде бега по наклонной плоскости в скелетных мышцах мышей происходит значительное увеличение экспрессии mPNC $\alpha 7$ -интегрин (через 3 ч после окончания бега) [62], а также увеличение белкового содержания данного рецептора (через 24 ч после окончания бега) [63]. Lueders и соавт. показали, что через 24 ч после однократной эксцентрической нагрузки (бег по склону -20° , со скоростью 17 м/мин в течение 60 мин) у трансгенных мышей с дополнительной экспрессией $\alpha 7$ -интегрин mTORC1-зависимая анаболическая сигнализация была значительно активирована по сравнению с животными дикого типа [64]. Более того, саркоlemma мышей с повышенной экспрессией интегринов была лучше защищена от повреждений, вызванных эксцентрической нагрузкой [63].

Отсутствие $\alpha 7$ -интегрин в мышечных волокнах приводит к развитию деструктивных процессов схожих с миодистрофией Дюшенна [65]. В частности, наблюдаются некротические процессы в мышечной ткани, нарушается структура саркомеров,

волокна характеризуются наличием миомер с центральной локализацией [65]. С другой стороны, при отсутствии дистрофина (мышшная модель миодистрофии Дюшенна) была выявлена повышенная экспрессия $\alpha 7$ -интегрина, что рассматривается как механизм, компенсирующий опосредованную дистрофином связь сарколеммы с базальной мембраной [66]. При этом дополнительная экспрессия $\alpha 7\beta 1$ интегрин оказывает положительный эффект на скелетную и сердечную мышцы с дефицитом дистрофина [67].

С комплексом “интегрин–талин–винкулин” тесно связаны два регуляторных белка с киназной активностью: киназа фокальных контактов (focal adhesion kinase, FAK) и интегрин-зависимая киназа (integrin-linked kinase, ILK) (рис. 2). Из данных литературы следует, что FAK способствует фосфорилированию TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) по сайту Thr 1462 и последующей активации сигнального пути mTORC1/p70S6K в миотубах C2C12 [68]. При этом Klossner и соавт. показали, что в скелетной мышце FAK способствует фосфорилированию p70S6K независимо от протеинкиназы B/AKT [69]. FAK является механо-зависимой киназой, реагируя на механическую нагрузку, испытываемую скелетной мышцей. Так, содержание фосфорилированной FAK (Tyr 397) повышается после 1-суточной функциональной перегрузки (overload) камбаловидной мышцы крысы [70, 71]. Кроме того, повышенная экспрессия мРНК FAK наблюдалась после 7 суток механической перегрузки *m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* у мышей [72]. И наоборот, функциональная разгрузка (unloading) мышц в течение 7 дней приводила к снижению фосфорилирования FAK в скелетных мышцах крыс и человека [71, 73]. Примечательно, что повышенное содержание фосфорилированной FAK в *m. vastus lateralis* человека в ответ на физическую нагрузку коррелировало с содержанием винкулина и интегрин [74]. В нашей лаборатории было проведено исследование роли FAK в проведении механического стимула к анаболическому пути mTORC1 и синтезу белка в изолированной *m. soleus* крысы, атрофированной в результате 7-суточной функциональной разгрузки задних конечностей. Ингибирование активности FAK в атрофированной вследствие гравитационной разгрузки камбаловидной мышце крысы предотвратило снижение анаболического ответа (интенсивность белкового синтеза, фосфорилирование p70S6K), вызванного серией эксцентрических сокращений *ex vivo* [75]. Причина этого феномена пока не установлена, однако имея в виду, что передача сигнала от FAK к анаболическим сигнальным путям может быть связана с активацией актиновых стресс-фибрилл, которые оказывают влияние на активность MA-каналов [76, 77], ответы сигнальных мишеней этих механосенсорных структур (FAK и MA-каналов) могут быть реципрокны.

Основной функцией ILK является организация актинового цитоскелета путем рекрутирования актин-связывающих и актин-регулирующих белков, таких как парвин, паксиллин и киндлин, а также фосфорилирование нескольких ферментов, включая GSK-3 β и AKT [78]. В скелетных мышцах, в которых отсутствует ILK, обнаруживаются признаки мягкой формы дистрофии, при этом активация AKT-зависимого сигнального пути в ответ на физическую нагрузку в таких мышцах значительно снижена [78].

Таким образом, рассмотренные выше сарколеммальные механосенсорные структуры и ассоциированные с ними регуляторные ферменты (MA-каналы, дистрофин, саркогликан, NOS, DGK- ζ , интегрин, FAK, ILK) играют значительную роль в механо-зависимой регуляции внутриклеточных сигнальных процессов в скелетной мышце млекопитающих (рис. 2). Сложные взаимосвязи между этими механочувствительными сарколеммальными элементами предстоит исследовать в будущих экспериментах.

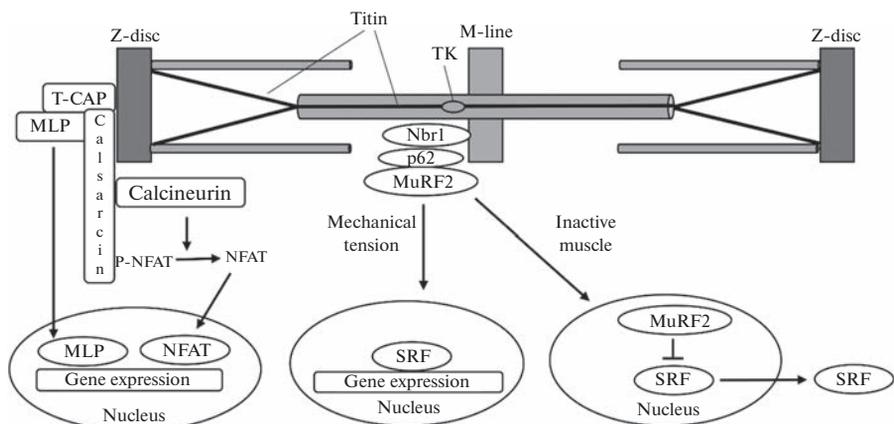


Рис. 3. Саркомерные титин-зависимые структуры, опосредующие механотрансдукцию в мышечном волокне. Модифицировано из [79]. Обозначения: T-CAP – телетонин, MLP – мышечный белок LIM, NFAT – ядерный фактор активированных T-клеток, SRF – фактор реагирования на сыворотку, MuRF – мышечная E3 убиквитин-лигаза, содержащая RING-домен, Nbr1 – белок, соседствующий с BRCA1.

САРКОМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ МЕХАНОТРАНСДУКЦИЮ

В течение последних 10–15 лет в литературе обсуждалась возможная роль гигантского саркомерного белка титина в качестве одного из важнейших механосенсоров в волокнах поперечнополосатых мышц млекопитающих [79–81]. Титин представляет собой гигантский белок (3.3–3.7 МДа), который охватывает половину саркомера мышечного волокна (от Z-диска до M-линии) и экспрессируется в виде множества сплайс-вариантов [80]. Учитывая гигантские размеры титина и его центральное положение внутри саркомера, данный белок выступает ключевой структурой мышечного волокна, способной воспринимать изменения механической нагрузки [80]. В литературе обсуждаются два ключевых механосенсорных комплекса, непосредственно связанных с молекулой титина. Первый белковый комплекс расположен в Z-диске саркомера. Он образован доменами титина, расположенными в Z-диске и ассоциированными с ними белками MLP (muscle LIM protein) и телетонином (T-CAP) (рис. 3). При этом белок MLP может перемещаться между цитоплазмой и ядром. В кардиомиоцитах было показано, что механический стресс способствует ядерной локализации MLP, опосредуя “запуск” гипертрофического процесса [82]. Также на культуре миобластов C2C12 было продемонстрировано, что дополнительная экспрессия MLP усиливает миогенез, тогда как ингибирование активности MLP блокирует терминальную дифференцировку миобластов [83]. При этом MLP активировал миогенез посредством взаимодействия с транскрипционным фактором MyoD [83]. Knöll и соавт. было предложено, что домены титина, MLP, T-CAP в сочетании со структурным белком Z-диска альфа-актанином образуют белковый комплекс, чувствительный к механическому растяжению [84, 85]. Было показано, что T-CAP взаимодействует с кальсарцином – белком, который связывает кальцинейрин с Z-диском [86] и ингибирует его фосфатазную активность [87]. Свободный кальцинейрин представляет собой Ca^{2+} -зависимую фосфатазу, способную дефосфорилировать транскрипционный фактор NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), индуцируя его транслокацию в ядро и активацию генов-мишеней [86] (рис. 3).

Было показано, что N2A-домен титина взаимодействует с мышечными белками семейства MARP (Muscle Ankyrin Repeat Proteins), в частности с анкирином-2 (Ankrd2), являющимся основным белком семейства MARP в скелетных мышцах человека [88]. Предполагается, что Ankrd2 играет важную роль в регуляции транскрипции, сборке миофибрилл, а изменение его экспрессии при нервно-мышечных расстройствах подразумевает его участие в развитии патологических состояний в скелетных мышцах млекопитающих [89]. Интересно заметить, что у трансгенных мышей, лишенных белков семейства MARP, мышечные волокна обладали большей, чем в норме, длиной саркомера в состоянии покоя, а также теряли жесткость. Такие волокна экспрессировали более длинную изоформу титина, чем у животных дикого типа, это указывает на то, что взаимодействие MARP с титином может оказывать влияние на пассивные механические свойства волокон скелетных мышц [90].

Вторым ключевым белковым комплексом, обладающим механосенсорными свойствами, является титин-киназный домен (ТК), расположенный на периферии М-линии саркомера (рис. 3). Было показано, что в активированном состоянии ТК непосредственно взаимодействует с убиквитин-ассоциированным белком Nbr1 (neighbor of BRCA1-gene-1), который образует сигнальный комплекс с белками p62 и MuRF2 (Muscle Ring Finger Protein 2) [91] (рис. 3). Было установлено, что при отсутствии механической нагрузки вследствие денервации в волокнах скелетных мышц происходит транслокация MuRF2 в ядро, причем накопление MuRF2 в мышечных ядрах наблюдается уже через 6 ч после денервации [91]. Одновременно с этим из ядра удаляется транскрипционный фактор SRF (serum-response factor) и соответственно подавляется транскрипция ряда SRF-зависимых генов [91] (рис. 3). В частности, важная роль SRF в регуляции транскрипции генов интерлейкина-4 (IL-4) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) была отмечена в скелетных мышцах мышей в период постнатального роста [92]. Кроме того, SRF является ключевым регулятором экспрессии ряда изоформ актина [93]. Важно также отметить, что кроме своей роли в “гипертрофической” передаче сигнала, белковый комплекс Nbr1/p62 может участвовать в регуляции внутриклеточных систем белковой деградации (убиквитин-протеасомный путь и аутофагия) [94, 95].

Позднее оказалось, что киназная активность ТК зависит от механического состояния титиновой молекулы. Связывание MuRF-2 и других лигандов возможно лишь при “снятии” аутоингибирования АТФ-связывающего сайта, которое происходит только при создании механического напряжения/растяжения титиновой молекулы [96]. Как показали сотрудники Labeit, на состояние ТК также оказывает влияние активность другой убиквитин-лигазы MuRF-1, которая связывается с другим доменом титиновой молекулы, находящемся в некотором отдалении от ТК [97]. При отсутствии механического напряжения участок титиновой молекулы между ТК и MuRF-1-связывающим сайтом принимает компактную конформацию, что позволяет молекуле MuRF-1 сблизиться с ТК и убиквитинировать его, тем самым модулируя его активность [97]. При растяжении молекулы титина происходит “развертывание” (unfolding) промежуточного сайта и дистанцирование MuRF-1 от ТК, что снижает его убиквитинизацию и повышает активность [97]. Таким образом, авторы цитируемой работы предлагают еще один механизм регуляции активности титин-киназы при изменении механического состояния волокна. Примечательно, что в нашей лаборатории впервые наблюдали ядерную локализацию обоих сплайс-вариантов убиквитин-лигазы MuRF (MuRF-1 и MuRF-2) в условиях функциональной разгрузки (при использовании общепринятой модели вывешивания задних конечностей крысы) [98]. Не исключено, что ядерная транслокация этих молекул обусловлена ослаблением их связывания с титином (см. выше).

Одним из важнейших свойств титина, с которым может быть связана его механосенсорная функция, является способность к значительным изменениям жесткости его “пружинного” домена PEVK (домен, обогащенный пролином [P], глутаматом [E], валином [V] и лизином [K]). В недавних экспериментах с односторонней денервацией диафрагмы группа исследователей сопоставила некоторые сигнальные процессы в мышцах мышей двух мутантных линий, различающихся повышенной и пониженной жесткостью молекулы титина [99]. Атрофия, вызванная односторонней денервацией диафрагмы, в этом эксперименте преодолевалась с помощью пассивного механического растяжения полу-диафрагмы, стимулирующего анаболические процессы и последующую гипертрофию [99]. Оказалось, что анаболический эффект растяжения был более выражен у мышей с повышенной жесткостью титина [99]. При этом было отмечено повышенное связывание белка семейства MARP с N2A доменом титина. Авторы этого исследования предполагают, что, связываясь с областью N2A титина, MARP1 может увеличивать жесткость титина, при этом формируя каркас для других титин-связывающих белков, чтобы облегчить передачу “гипертрофических” сигналов, стимулирующих экспрессию генов, отвечающих за анаболические процессы в волокне [99]. Так, механический сигнал мышечного растяжения мог бы трансформироваться в химический сигнал, стимулирующий синтез белка. Интересно отметить, что этой же группой исследователей недавно было установлено, что снижение максимальной силы диафрагмальной мышцы вследствие механической разгрузки (искусственная вентиляция легких в течение 8 ч) было предотвращено у мутантных мышей с пониженной жесткостью титина [100]. Для установления причин данного феномена потребуются дальнейшие исследования. Таким образом, накопленные к настоящему времени данные позволяют говорить о важной роли механосенсорных доменов молекулы титина и связанных с ними белковых комплексов в процессе механотрансдукции в мышечных волокнах.

ЦИТОСКЕЛЕТ И МЕХАНОТРАНСДУКЦИЯ

Клеточный цитоскелет, состоящий из актиновых филаментов, промежуточных филаментов и микротрубочек, представляет собой динамическую структуру, аналогичную системе “строительных лесов” (scaffold), на которую в значительной степени влияют внутренние и внешние механические раздражители [101]. Согласно концепции Ingber, структура любой клетки организована по архитектурному принципу “тенсегрити” (tensional integrity (tensegrity), т.е. “напряженносвязанная” конструкция), что необходимо для механической стабилизации клетки [101, 102]. С помощью модели “тенсегрити” объясняется, как клетка может воспринимать внешний механический сигнал, приложенный локально к интегринам/фокальным контактам, и одновременно передавать его через элементы цитоскелета во множество других мест в клетке (ядро, митохондрии и др.) [101, 102]. Действительно, литературные данные убедительно показывают, что существует непосредственная физическая связь между ключевыми компонентами цитоскелета (микротрубочки, микрофиламенты и промежуточные филаменты) и белками, находящимися во внешней ядерной мембране [103, 104]. Связь между цитоскелетом и ядром опосредована комплексом LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), представляющим собой белок несприн (nesprin), расположенный во внешней ядерной мембране, и белки SUN, которые находятся во внутренней ядерной мембране и взаимодействуют с ядерной ламиной [103, 104] (рис. 4). Ядерная ламина, в свою очередь, непосредственно связана с хроматином. Таким образом, механическое напряжение может передаваться непосредственно к хроматину, влияя на экспрессию различных генов. При этом домены неспринов взаимодействуют с доменами белка

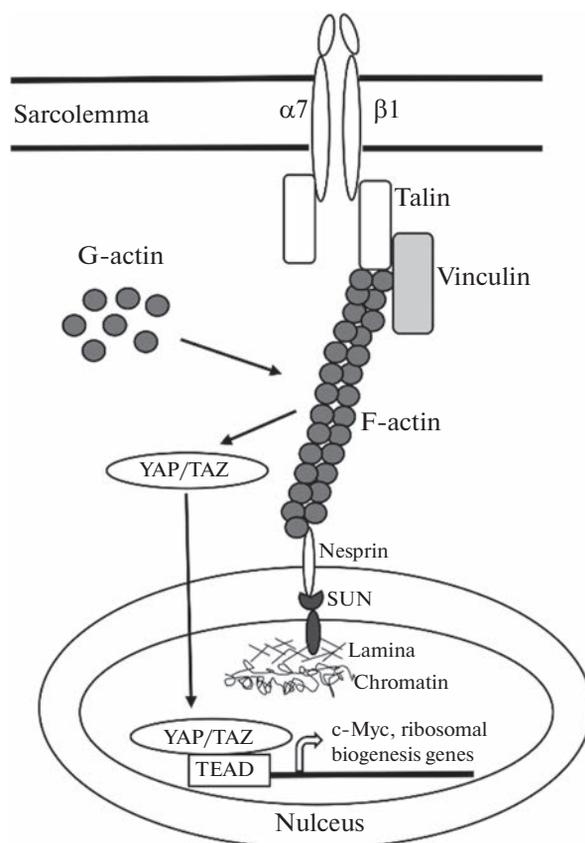


Рис. 4. Передача механического сигнала от сарколеммы к ядру посредством цитоскелета. Модифицировано из [112, 113]. Обозначения: $\alpha 7$ и $\beta 1$ – субъединицы интегрина, G-actin – глобулярный актин (мономерный), F-actin – фибриллярный актин (полимерный), YAP – коактиватор транскрипции, ассоциированный с белком Yes, TAZ – коактиватор транскрипции с PDZ-связывающим мотивом, TEAD – транскрипционный фактор, содержащий домен TEA.

SUN в пределах перинуклеарного пространства (пространство между внешней и внутренней ядерными мембранами), обеспечивая непрерывную связь между клеточным цитоскелетом и нуклеоскелетом [103]. Tajik и соавт. продемонстрировали, что локальный механический стресс, приложенный к интегринам клеточной мембраны, передается через актиновые филаменты на ядерный комплекс LINC, что приводит к растяжению хроматина и активации транскрипции [105]. При этом увеличение экспрессии исследуемого гена *DHFR* было обнаружено уже через 15 с после применения механического стресса [105].

В литературе описаны два ключевых механизма, с помощью которых механические силы преобразуются в биохимические изменения через актиновый цитоскелет [106]. Во-первых, механическое воздействие может менять структуру актиновых нитей таким образом, что изменяется сродство актин-связывающих и регуляторных белков к актину. При этом актин-связывающие белки под действием механической силы могут изменять свою конформацию, открывая сайты связывания для других регуляторных белков. Так, при приложении механического стресса

к актиновым фибриллам рекрутирование белка кофилина, расщепляющего актин, уменьшается, при этом связывание актина с миозином увеличивается [106]. Во-вторых, механические силы могут оказывать влияние на плотность и организацию сети актиновых нитей, влияя на скорость полимеризации актина при участии таких белков как профилин и формин [107]. Таким образом, актиновый цитоскелет способен активно реагировать на оказываемую на него механическую нагрузку, изменяя свою организацию и взаимодействие с другими белками.

В 2005 г. Hornberger и соавт. на культуре миотуб C2C12 впервые продемонстрировали роль актинового цитоскелета в механотрансдукции к анаболическому mTORC1-зависимому сигнальному пути [108]. Миотубы инкубировались в среде с цитохалазином (ингибитор полимеризации актина) в течение 45 мин, а затем подвергались циклическому растяжению (10 мин, растяжение на 15%, 1 Гц) [108]. После этого оценивалось фосфорилирование рибосомальной киназы p70S6 (маркер активности mTORC1) [108]. Применение цитохалазина полностью предотвратило вызванное механической нагрузкой увеличение фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6, что свидетельствовало о вкладе актинового цитоскелета в проведение механического сигнала к комплексу mTORC1 [108]. При этом нарушение актинового цитоскелета в этом эксперименте не повлияло на повышенное фосфорилирование протеинкиназы В (АКТ) и ERK в ответ на растяжение [108]. Кроме того, в литературе описана способность миозин-связанных актиновых стресс-фибрилл регулировать ядерную локализацию и активность транскрипционных коактиваторов YAP и TAZ, являющихся компонентами сигнального пути Hippo [109]. Данные коактиваторы транскрипции могут фосфорилироваться киназами LATS1/2, что приводит к выходу YAP/TAZ из ядра и, как следствие, снижению экспрессии ряда генов. Дефосфорилированные YAP и TAZ локализуются в ядре, где связываются с транскрипционными факторами, содержащими домен TEA (TEAD), и активируют экспрессию различных генов, связанных с ростом и пролиферацией клеток [109]. Согласно описанной в литературе модели, под воздействием механического напряжения, сократительные F-актиновые фибриллы способны передавать сигнал на удержание YAP и TAZ в ядре посредством пока неизвестных молекулярных механизмов [109] (рис. 4). Важность механо-зависимого белка YAP в регуляции анаболических/гипертрофических процессов в скелетных мышцах млекопитающих была впервые показана в работах Watt и соавт. и Goodman и соавт. в 2015 г. В частности, Watt и соавт. продемонстрировали, что у мышей с дополнительной экспрессией (overexpression) YAP наблюдались повышенный синтез мышечных белков и увеличение диаметра мышечных волокон и массы мышц [110]. И наоборот, подавление экспрессии гена YAP (YAP knockdown) привело к значительному снижению интенсивности белкового синтеза и атрофии мышечных волокон *m. tibialis anterior* [110]. Goodman и соавт. продемонстрировали увеличение экспрессии YAP на уровне мРНК и белка в *m. plantaris* мышцы в ответ на механическую нагрузку (overload), вызванную удалением мышцы-синергиста [111]. Более того, эти авторы показали, что мышечная гипертрофия, наблюдаемая в ответ на увеличенную экспрессию YAP, может быть связана с тем, что данный коактиватор транскрипции значительно усиливает промоторную активность генов Muc и MyoD, при этом снижая промоторную активность MuRF-1 [111]. Таким образом, регуляторный белок YAP может играть важную роль в механотрансдукции в волокнах скелетных мышц (рис. 4).

Интересно, что канонические, связанные с внутриволоконным метаболизмом, сигнальные пути оказывают регуляторные влияния на F-актиновый цитоскелет, что, очевидно, позволяет корректировать механотрансдукцию. Так, недавно показано, что АМПК может фосфорилировать тропомодулин-3 в цитозоле мышечных волокон, это приводит к перестройке цитоплазматической сети F-актина, способ-

ствующей, в частности, транслокации GLUT-4 в сарколемму и тем самым облегчающей глюкозный транспорт [114].

Уменьшение интенсивности механических сигналов или их отсутствие также сказывается на F-актиновом цитоскелете и его регуляторах. Ogneva и соавт. уже после 6 и 12 ч функциональной разгрузки (антиортостатического вывешивания крыс) обнаружили снижение содержания α -актинина-4 в мембранной фракции волокон камбаловидной мышцы [115]. Содержание этого белка в цитозоле, напротив, повышалось [115]. При этом в мембранной фракции уменьшалось содержание β - и γ -актина [115]. Эти изменения сопровождались снижением жесткости кортикального слоя волокна, измеренной методом атомной силовой микроскопии [115]. Интересно, что введение лецитина в мышцу вывешенных животных позволило предотвратить описанные изменения [116].

В 2021 г. Coleman и соавт. оценили роль ацетилованного тубулина в регуляции жесткости цитоскелета и механотрансдукции в поперечнополосатых мышцах [117]. Микротрубочки, обогащенные ацетилованным α -тубулином, увеличили жесткость цитоскелета и вязкоупругость мышечных волокон [117]. Эти изменения замедлили скорость сокращения и ослабления при ненагруженном сокращении волокон, а также увеличили продукцию активных форм кислорода в мышечных волокнах *m. flexor digitorum brevis*, подвергнутых циклическому пассивному растяжению с частотой 2 Гц [117].

Таким образом, интактный цитоскелет является необходимым условием для многих внутриклеточных биохимических реакций, возникающих в ответ на механические стимулы, а также обеспечивает физическую связь между пространственно разделенными механосенсорными элементами [106]. Так, как упоминалось выше, регуляция поверхностного натяжения клеточной мембраны, а, значит и активность МА-каналов и интегринов, зависит от взаимодействия с нижележащей кортикальной актиновой сетью и стресс-фибриллами. Аналогичным образом, приложение механического стресса к интегриновым рецепторам или актиновым стресс-фибриллам может приводить к увеличению ионной проводимости клеточной мембраны, что предполагает наличие взаимодействия между интегринными и МА-каналами [106].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов реализации механотрансдукции в скелетных мышцах млекопитающих и человека представляет собой активно развивающуюся область современной клеточной физиологии, биохимии и биофизики. Перед исследовательскими коллективами, занимающимися проблемами механотрансдукции в мышечных волокнах, стоят множество вопросов, ответы на которые потребуют многочисленных исследований в ближайшие годы и десятилетия. В частности, исследователям предстоит ответить на следующие вопросы. Принимают ли участие МА-каналы Piezo1 в реализации анаболического сигналинга в скелетной мышце в ответ на механические стимулы? Какова роль кортикального цитоскелета и липидных рафтов в регуляции активности каналов Piezo1 в волокнах скелетных мышц? Каким образом состав внеклеточного матрикса влияет на работу интегрин-зависимой системы передачи механического сигнала в скелетных мышцах? Как различные виды механической нагрузки (например, напряжение сдвига, пассивное растяжение волокон, электростимуляция, эксцентрические и концентрические сокращения и др.) воспринимаются разными компонентами системы механотрансдукции мышечных клеток/волокон. Влияет ли интенсивность физической нагрузки (высокоинтенсивная vs. низкоинтенсивная), ее длительность на общее количество и/или качество ключевых белковых комплексов (комплекс “интегрин–талин–винкулин”,

цитоскелетные белки, DGC, механочувствительные домены титина) определяющих процесс механотрансдукции в скелетных мышцах? Какие компоненты системы механотрансдукции мышечного волокна определяют изменения в экспрессии генов и регуляции метаболизма (синтез и распад белка) в условиях острой и хронической механической разгрузки двигательной системы?

В целом, механотрансдукция имеет важнейшее значение для регуляции ключевых физиологических процессов в клетке. Нарушение процесса механотрансдукции в волокнах скелетных мышц наблюдается при патологических состояниях (мышечные дистрофии, саркопения, кахексия), а также в условиях пониженной механической нагрузки на двигательный аппарат (постельная гипокинезия, иммобилизация, невесомость). Поэтому лучшее понимание особенностей механотрансдукции в скелетных мышцах позволит создать необходимый теоретический фундамент для разработки эффективных средств, направленных на лечение мышечных дистрофий и саркопении, а также профилактики мышечной атрофии, вызванной гипокинезией.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-75-10046).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Т.М.М. и Б.С.Ш.), сбор и обработка данных литературы (Т.М.М. и Б.С.Ш.), написание и редактирование манускрипта (Т.М.М. и Б.С.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Goldberg AL, Etlinger JD, Goldspink DF, Jablecki C* (1975) Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med Sci Sports* 7(3): 185–198.
2. *McGlory C, Phillips SM* (2015) Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135: 153–173. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.018>
3. *Bodine SC* (2013) Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2200–2208. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011>
4. *Hughes DC, Wallace MA, Baar K* (2015) Effects of aging, exercise, and disease on force transfer in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(1): E1–E10. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00095.2015>
5. *Ramaswamy KS, Palmer ML, van der Meulen JH, Renoux A, Kostrominova TY, Michele DE, Faulkner JA* (2011) Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats. *J Physiol* 589(5): 1195–1208. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.201921>
6. *Guharay F, Sachs F* (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352: 685–701.
7. *Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honore E* (1999) TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺-channel. *J Biol Chem* 274(3): 1381–1387. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1381>
8. *Herrera-Perez S, Lamas JA* (2023) TREK channels in Mechanotransduction: a Focus on the Cardiovascular System. *Front Cardiovasc Med* 10: 1180242. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1180242>

9. Franco A Jr, Lansman JB (1990) Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344(6267): 670–673.
<https://doi.org/10.1038/344670a0>
10. Franco-Obregon A Jr, Lansman JB (1994) Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol* 481(Pt 2): 299–309.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020440>
11. Franco A Jr, Winegar BD, Lansman JB (1991) Open channel block by gadolinium ion of the stretch-inactivated ion channel in mdx myotubes. *Biophys J* 59(6): 1164–1170.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82332-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82332-3)
12. Winegar BD, Haws CM, Lansman JB (1996) Subconductance block of single mechanosensitive ion channels in skeletal muscle fibers by aminoglycoside antibiotics. *J Gen Physiol* 107(3): 433–443.
<https://doi.org/10.1085/jgp.107.3.433>
13. Suchyna TM, Johnson JH, Hamer K, Leykam JF, Gage DA, Clemo HF, Baumgarten CM, Sachs F (2000) Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J Gen Physiol* 115(5): 583–598.
<https://doi.org/10.1085/jgp.115.5.583>
14. Martinac B, Poole K (2018) Mechanically activated ion channels. *Int J Biochem Cell Biol* 97: 104–107.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.02.011>
15. Vasileva V, Chubinskiy-Nadezhdin V (2023) Regulation of PIEZO1 channels by lipids and the structural components of extracellular matrix/cell cytoskeleton. *J Cell Physiol* 238(5): 918–930.
<https://doi.org/10.1002/jcp.31001>
16. Richardson J, Kotevski A, Poole K (2022) From stretch to deflection: the importance of context in the activation of mammalian, mechanically activated ion channels. *FEBS J* 289(15): 4447–4469.
<https://doi.org/10.1111/febs.16041>
17. Mirzoev TM (2023) Mechanotransduction for Muscle Protein Synthesis via Mechanically Activated Ion Channels. *Life (Basel)* 13(2): 341.
<https://doi.org/10.3390/life13020341>
18. Spangenburg EE, McBride TA (2006) Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation. *J Appl Physiol* (1985) 100(1): 129–135.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00619.2005>
19. Tyganov S, Mirzoev T, Shenkman B (2019) An Anabolic Signaling Response of Rat Soleus Muscle to Eccentric Contractions Following Hindlimb Unloading: A Potential Role of Stretch-Activated Ion Channels. *Int J Mol Sci* 20(5): 1165.
<https://doi.org/10.3390/ijms20051165>
20. Morachevskaya E, Sudarikova A, Negulyaev Y (2007) Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell Biol Int* 31(4): 374–381.
<https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.01.024>
21. Chubinskiy-Nadezhdin VI, Negulyaev YA, Morachevskaya EA (2011) Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. *Biochem Biophys Res Commun* 412(1): 80–85.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.046>
22. Petrov AM, Kravtsova VV, Matchkov VV, Vasiliev AN, Zefirov AL, Chibalin AV, Heiny JA, Krivoi II (2017) Membrane lipid rafts are disturbed in the response of rat skeletal muscle to short-term disuse. *Am J Physiol Cell Physiol* 312(5): C627–C637.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00365.2016>
23. Bryndina IG, Shalagina MN, Sekunov AV, Zefirov AL, Petrov AM (2018) Clomipramine counteracts lipid raft disturbance due to short-term muscle disuse. *Neurosci Lett* 66: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.009>
24. Petrov AM, Shalagina MN, Protopopov VA, Sergeev VG, Ovechkin SV, Ovchinina NG, Sekunov AV, Zefirov AL, Zakirjanova GF, Bryndina IG (2019) Changes in Membrane Ceramide Pools in Rat Soleus Muscle in Response to Short-Term Disuse. *Int J Mol Sci* 20(19): 4860.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194860>
25. Mirzoev TM, Tyganov SA, Petrova IO, Shenkman BS (2019) Acute recovery from disuse atrophy: the role of stretch-activated ion channels in the activation of anabolic signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316(1): E86–E95.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00261.2018>
26. Juffer P, Bakker AD, Klein-Nulend J, Jaspers RT (2014) Mechanical loading by fluid shear stress of myotube glycocalyx stimulates growth factor expression and nitric oxide production. *Cell Biochem Biophys* 69(3): 411–419.
<https://doi.org/10.1007/s12013-013-9812-4>
27. Tatsumi R, Wuollet AL, Tabata K, Nishimura S, Tabata S, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Allen RE (2009) A role for calcium-calmodulin in regulating nitric oxide production during skeletal

- muscle satellite cell activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(4): C922–C929.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00471.2008>
28. *Drenning JA, Lira VA, Simmons CG, Soltow QA, Sellman JE, Criswell DS* (2008) Nitric oxide facilitates NFAT-dependent transcription in mouse myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 294(4): C1088–C1095.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2007>
 29. *Mirzoev TM, Sharlo KA, Shenkman BS* (2021) The Role of GSK-3beta in the Regulation of Protein Turnover, Myosin Phenotype, and Oxidative Capacity in Skeletal Muscle under Disuse Conditions. *Int J Mol Sci* 22(10): 5081.
<https://doi.org/10.3390/ijms22105081>
 30. *Enslin H, Tokumitsu H, Stork PJ, Davis RJ, Soderling TR* (1996) Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10803–10808.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10803>
 31. *Martin TD, Dennis MD, Gordon BS, Kimball SR, Jefferson LS* (2014) mTORC1 and JNK coordinate phosphorylation of the p70S6K1 autoinhibitory domain in skeletal muscle following functional overloading. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(12): E1397–E1405.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00064.2014>
 32. *Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP* (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7(2): 179–185.
<https://doi.org/10.1038/ncb1218>
 33. *Sauc S, Frieden M* (2017) Neurological and Motor Disorders: TRPC in the Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol* 993: 557–575.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_28
 34. *Gottlieb P, Folgering J, Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Bowman C, Bichet D, Patel A, Sachs F, Martinac B, Hamill OP, Honore E* (2008) Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch* 455(6): 1097–1103.
<https://doi.org/10.1007/s00424-007-0359-3>
 35. *Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos Y, Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaja G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T* (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 455(3): 465–477.
<https://doi.org/10.1007/s00424-007-0314-3>
 36. *Nikolaev YA, Cox CD, Ridone P, Rohde PR, Cordero-Morales JF, Vasquez V, Laver DR, Martinac B* (2019) Mammalian TRP ion channels are insensitive to membrane stretch. *J Cell Sci* 132(23): jcs238360.
<https://doi.org/10.1242/jcs.238360>
 37. *Zanou N, Schakman O, Louis P, Ruegg UT, Dietrich A, Birnbaumer L, Gailly P* (2012) Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. *J Biol Chem* 287(18): 14524–14534.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341784>
 38. *Zhang BT, Yeung SS, Cheung KK, Chai ZY, Yeung EW* (2014) Adaptive responses of TRPC1 and TRPC3 during skeletal muscle atrophy and regrowth. *Muscle Nerve* 49(5): 691–699.
<https://doi.org/10.1002/mus.23952>
 39. *Xia L, Cheung KK, Yeung SS, Yeung EW* (2016) The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy. *J Physiol* 594(11): 3111–3126.
<https://doi.org/10.1113/JP271705>
 40. *Zanou N, Shapovalov G, Louis M, Tajeddine N, Gallo C, Van Schoor M, Anguish I, Cao ML, Schakman O, Dietrich A, Lebacqz J, Ruegg U, Roulet E, Birnbaumer L, Gailly P* (2010) Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 298(1): C149–C162.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00241.2009>
 41. *Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A* (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330(6000): 55–60.
<https://doi.org/10.1126/science.1193270>
 42. *Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, Petrassi HM, Schumacher AM, Montal M, Bandell M, Patapoutian A* (2015) Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife* 4: e07369.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07369>
 43. *Wang Y, Chi S, Guo H, Li G, Wang L, Zhao Q, Rao Y, Zu L, He W, Xiao B* (2018) A lever-like transduction pathway for long-distance chemical- and mechano-gating of the mechanosensitive Piezo1 channel. *Nat Commun* 9(1): 1300.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03570-9>
 44. *Tsuchiya M, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R,*

- Takayama Y, Tominaga M, Umeda M* (2018) Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nat Commun* 9(1): 2049.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04436-w>
45. *Bosutti A, Giniatullin A, Odnoshivkina Y, Giudice L, Malm T, Sciancalepore M, Giniatullin R, D'Andrea P, Lorenzon P, Bernareggi A* (2021) “Time window” effect of Yoda1-evoked Piezo1 channel activity during mouse skeletal muscle differentiation. *Acta Physiol (Oxf)* 233(4): e13702.
<https://doi.org/10.1111/apha.13702>
46. *Sciancalepore M, Massaria G, Tramer F, Zacchi P, Lorenzon P, Bernareggi A* (2022) A preliminary study on the role of Piezo1 channels in myokine release from cultured mouse myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 623: 148–153.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.059>
47. *Hirata Y, Nomura K, Kato D, Tachibana Y, Niikura T, Uchiyama K, Hosooka T, Fukui T, Oe K, Kuroda R, Hara Y, Adachi T, Shibasaki K, Wake H, Ogawa W* (2022) A Piezo1/KLF15/IL-6 axis mediates immobilization-induced muscle atrophy. *J Clin Invest* 132(10): 1–13.
<https://doi.org/10.1172/JCI154611>
48. *Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J* (2011) The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol* 31(2): 83–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ppedcard.2011.02.003>
49. *Wilson DGS, Tinker A, Iskratsch T* (2022) The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. *Commun Biol* 5(1): 1022.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03980-y>
50. *Patterson G, Conner H, Groneman M, Blavo C, Parmar MS* (2023) Duchenne muscular dystrophy: Current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach. *Eur J Pharmacol* 947: 175675.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175675>
51. *Ramirez MP, Anderson MJM, Kelly MD, Sundby LJ, Hagerty AR, Wenthe SJ, Odde DJ, Ervasti JM, Gordon WR* (2022) Dystrophin missense mutations alter focal adhesion tension and mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(25): e2205536119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2205536119>
52. *Barton ER* (2006) Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(2): C411–C419.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00192.2005>
53. *Moorwood C, Philippou A, Spinazzola J, Keyser B, Macarak EJ, Barton ER* (2014) Absence of gamma-sarcoglycan alters the response of p70S6 kinase to mechanical perturbation in murine skeletal muscle. *Skelet Muscle* 4: 13.
<https://doi.org/10.1186/2044-5040-4-13>
54. *Molza AE, Mangat K, Le Rumeur E, Hubert JF, Menhart N, Delalande O* (2015) Structural Basis of Neuronal Nitric-oxide Synthase Interaction with Dystrophin Repeats 16 and 17. *J Biol Chem* 290(49): 29531–29541.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680660>
55. *Abdelmoity A, Padre RC, Burzynski KE, Stull JT, Lau KS* (2000) Neuronal nitric oxide synthase localizes through multiple structural motifs to the sarcolemma in mouse myotubes. *FEBS Lett* 482(1–2): 65–70.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02038-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02038-X)
56. *Garbincius JF, Michele DE* (2015) Dystrophin-glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(44): 13663–13668.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1512991112>
57. *Abramovici H, Hogan AB, Obagi C, Topham MK, Gee SH* (2003) Diacylglycerol kinase-zeta localization in skeletal muscle is regulated by phosphorylation and interaction with syntrophins. *Mol Biol Cell* 14(11): 4499–4511.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e03-03-0190>
58. *You JS, Lincoln HC, Kim CR, Frey JW, Goodman CA, Zhong XP, Hornberger TA* (2014) The role of diacylglycerol kinase zeta and phosphatidic acid in the mechanical activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 289(3): 1551–1563.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.531392>
59. *You JS, Dooley MS, Kim CR, Kim EJ, Xu W, Goodman CA, Hornberger TA* (2018) A DGKzeta-FoxO-ubiquitin proteolytic axis controls fiber size during skeletal muscle remodeling. *Sci Signal* 11(530): eaao6847.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aao6847>
60. *Mayer U* (2003) Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem* 278(17): 14587–14590.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R200022200>

61. *Schwartz MA* (2010) Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a005066.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005066>
62. *Boppard MD, Volker SE, Alexander N, Burkin DJ, Kaufman SJ* (2008) Exercise promotes alpha7 integrin gene transcription and protection of skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(5): R1623–R1630.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00089.2008>
63. *Boppard MD, Burkin DJ, Kaufman SJ* (2006) Alpha7beta1-integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6): C1660–C1665.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00317.2005>
64. *Lueders TN, Zou K, Huntsman HD, Meador B, Mahmassani Z, Abel M, Valero MC, Huey KA, Boppard MD* (2011) The alpha7beta1-integrin accelerates fiber hypertrophy and myogenesis following a single bout of eccentric exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(4): C938–C946.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00515.2010>
65. *Mayer U, Saher G, Fassler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, Miosge N, Poschl E, von der Mark K* (1997) Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* 17(3): 318–323.
<https://doi.org/10.1038/ng1197-318>
66. *Hodges BL, Hayashi YK, Nonaka I, Wang W, Arahata K, Kaufman SJ* (1997) Altered expression of the alpha7beta1 integrin in human and murine muscular dystrophies. *J Cell Sci* 110(Pt 22): 2873–2881.
<https://doi.org/10.1242/jcs.110.22.2873>
67. *Burkin DJ, Wallace GQ, Milner DJ, Chaney EJ, Mulligan JA, Kaufman SJ* (2005) Transgenic expression of alpha7beta1 integrin maintains muscle integrity, increases regenerative capacity, promotes hypertrophy, and reduces cardiomyopathy in dystrophic mice. *Am J Pathol* 166(1): 253–263.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62249-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62249-3)
68. *Crossland H, Kazi AA, Lang CH, Timmons JA, Pierre P, Wilkinson DJ, Smith K, Szewczyk NJ, Atherton PJ* (2013) Focal adhesion kinase is required for IGF-1-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/mTOR/S6K1-associated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(2): E183–E193.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00541.2012>
69. *Klossner S, Durieux AC, Freyssenet D, Flueck M* (2009) Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK. *Eur J Appl Physiol* 106(3): 389–398.
<https://doi.org/10.1007/s00421-009-1032-7>
70. *Fluck M, Carson JA, Gordon SE, Ziemiecki A, Booth FW* (1999) Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol* 277(Pt 1): 152–162.
71. *Gordon SE, Fluck M, Booth FW* (2001) Selected Contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. *J Appl Physiol* (1985) 90(3): 1174–1183; discussion 1165.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.1174>
72. *Fortes MA, Pinheiro CH, Guimaraes-Ferreira L, Vitzel KF, Vasconcelos DA, Curi R* (2015) Overload-induced skeletal muscle hypertrophy is not impaired in STZ-diabetic rats. *Physiol Rep* 3(7): e12457.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12457>
73. *De Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ* (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* 585(Pt 1): 241–251.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>
74. *Li R, Narici MV, Erskine RM, Seynnes OR, Rittweger J, Pisot R, Simunic B, Fluck M* (2013) Costamere remodeling with muscle loading and unloading in healthy young men. *J Anat* 223(5): 525–536.
<https://doi.org/10.1111/joa.12101>
75. *Tyganov SA, Mirzoev TM, Rozhkov SV, Shenkman BS* (2019) Role of the focal adhesion kinase in the anabolic response to the mechanical stimulus in rat's atrophied postural muscle. *Aviakosm Ekol Med* 53(4): 74–79.
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2019-53-4-74-79>
76. *Sbrana F, Sassoli C, Meacci E, Nosi D, Squecco R, Paternostro F, Tiribilli B, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Formigli L* (2008) Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(1): C160–C172.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00014.2008>
77. *Martino F, Perestrelo AR, Vinarsky V, Pagliari S, Forte G* (2018) Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol* 9: 824.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>

78. Wang HV, Chang LW, Brixius K, Wickstrom SA, Montanez E, Thieyessen I, Schwander M, Muller U, Bloch W, Mayer U, Fassler R (2008) Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol* 180(5): 1037–1049. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707175>
79. Kotter S, Andresen C, Kruger M (2014) Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol Chem* 395(11): 1341–1352. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0178>
80. Kruger M, Kotter S (2016) Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front Physiol* 7: 76. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00076>
81. Gautel M (2011) Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch* 462(1): 119–134. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0946-1>
82. Boateng SY, Senyo SE, Qi L, Goldspink PH, Russell B (2009) Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J Mol Cell Cardiol* 47(4): 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.04.006>
83. Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ, Konieczny SF (1997) Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 17(8): 4750–4760. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4750>
84. Knoll R, Linke WA, Zou P, Miocic S, Kostin S, Buyandelger B, Ku CH, Neef S, Bug M, Schafer K, Knoll G, Felkin LE, Wessels J, Toischer K, Hagn F, Kessler H, Didie M, Quentin T, Maier LS, Teucher N, Unsold B, Schmidt A, Birks EJ, Gunkel S, Lang P, Granzier H, Zimmermann WH, Field LJ, Faulkner G, Dobbelsstein M, Barton PJ, Sattler M, Wilmanns M, Chien KR (2011) Telethonin deficiency is associated with maladaptation to biomechanical stress in the mammalian heart. *Circ Res* 109(7): 758–769. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.245787>
85. Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR (2002) The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 111(7): 943–955. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01226-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01226-6)
86. Frey N, Richardson JA, Olson EN (2000) Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14632–14637. <https://doi.org/10.1073/pnas.260501097>
87. Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rutten H, Gehring D, Kuhn C, Lutz M, Rothermel B, Bassel-Duby R, Richardson JA, Katus HA, Hill JA, Olson EN (2004) Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med* 10(12): 1336–1343. <https://doi.org/10.1038/nm1132>
88. Wette SG, Smith HK, Lamb GD, Murphy RM (2017) Characterization of muscle ankyrin repeat proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 313(3): C327–C339. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00077.2017>
89. Cenni V, Kojic S, Capanni C, Faulkner G, Lattanzi G (2019) Ankrd2 in Mechanotransduction and Oxidative Stress Response in Skeletal Muscle: New Cues for the Pathogenesis of Muscular Laminopathies. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 7318796. <https://doi.org/10.1155/2019/7318796>
90. Barash IA, Bang ML, Mathew L, Greaser ML, Chen J, Lieber RL (2007) Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(1): C218–C227. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00055.2007>
91. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edstrom L, Ehler E, Udd B, Gautel M (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308(5728): 1599–1603. <https://doi.org/10.1126/science.1110463>
92. Coletti D, Daou N, Hassani M, Li Z, Parlakian A (2016) Serum Response Factor in Muscle Tissues: From Development to Ageing. *Eur J Transl Myol* 26(2): 6008. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2016.6008>
93. Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007) Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C70–C81. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00386.2006>
94. Cha-Molstad H, Lee SH, Kim JG, Sung KW, Hwang J, Shim SM, Ganipiseti S, McGuire T, Mook-Jung I, Ciechanover A, Xie XQ, Kim BY, Kwon YT (2018) Regulation of autophagic prote-

- olysis by the N-recognin SQSTM1/p62 of the N-end rule pathway. *Autophagy* 14(2): 359–361.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1415190>
95. *Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW* (2007) Sequestosome 1/p62 – more than just a scaffold. *FEBS Lett* 581(2): 175–179.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.027>
96. *Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schafer LV, Brandmeier B, Grater F, Grubmuller H, Gaub HE, Gautel M* (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(36): 13385–13390.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805034105>
97. *Bogomolovas J, Fleming JR, Franke B, Manso B, Simon B, Gasch A, Markovic M, Brunner T, Knoll R, Chen J, Labeit S, Scheffner M, Peter C, Mayans O* (2021) Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep* 22(10): e48018.
<https://doi.org/10.15252/embr.201948018>
98. *Lomonosova YN, Turtikova OV, Shenkman BS* (2016) Reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway. *J Muscle Res Cell Motil* 37(1–2): 7–16.
<https://doi.org/10.1007/s10974-015-9428-y>
99. *Van der Pijl R, Strom J, Conijn S, Lindqvist J, Labeit S, Granzier H, Ottenheijm C* (2018) Titin-based mechanosensing modulates muscle hypertrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9(5): 947–961.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12319>
100. *Van den Berg M, Peters EL, van der Pijl RJ, Shen S, Heunks LMA, Granzier HL, Ottenheijm CAC* (2022) Rbm20(DeltaRRM) Mice, Expressing a Titin Isoform with Lower Stiffness, Are Protected from Mechanical Ventilation-Induced Diaphragm Weakness. *Int J Mol Sci* 23(24): 15689.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415689>
101. *Ingber DE* (2006) Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20(7): 811–827.
<https://doi.org/10.1096/fj.05-5424rev>
102. *Ingber DE* (2008) Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol* 97(2–3): 163–179.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.005>
103. *Iyer SR, Folker ES, Lovering RM* (2021) The Nucleoskeleton: Crossroad of Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Front Physiol* 12: 724010.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.724010>
104. *van Ingen MJA, Kirby TJ* (2021) LINCing Nuclear Mechanobiology With Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Cell Dev Biol* 9: 690577.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.690577>
105. *Tajik A, Zhang Y, Wei F, Sun J, Jia Q, Zhou W, Singh R, Khanna N, Belmont AS, Wang N* (2016) Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater* 15(12): 1287–1296.
<https://doi.org/10.1038/nmat4729>
106. *Kanoldt V, Fischer L, Grashoff C* (2019) Unforgettable force – crosstalk and memory of mechanosensitive structures. *Biol Chem* 400(6): 687–698.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0328>
107. *Courtemanche N, Lee JY, Pollard TD, Greene EC* (2013) Tension modulates actin filament polymerization mediated by formin and profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24): 9752–9757.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1308257110>
108. *Hornberger TA, Armstrong DD, Koh TJ, Burkholder TJ, Esser KA* (2005) Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(1): C185–C194.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00207.2004>
109. *Halder G, Dupont S, Piccolo S* (2012) Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(9): 591–600.
<https://doi.org/10.1038/nrm3416>
110. *Watt KI, Turner BJ, Hagg A, Zhang X, Davey JR, Qian H, Beyer C, Winbanks CE, Harvey KF, Gregorevic P* (2015) The Hippo pathway effector YAP is a critical regulator of skeletal muscle fibre size. *Nat Commun* 6: 6048.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7048>
111. *Goodman CA, Dietz JM, Jacobs BL, McNally RM, You JS, Hornberger TA* (2015) Yes-Associated Protein is up-regulated by mechanical overload and is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy. *FEBS Lett* 589(13): 1491–1497.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.047>

112. Olsen LA, Nicoll JX, Fry AC (2019) The skeletal muscle fiber: a mechanically sensitive cell. *Eur J Appl Physiol* 119(2): 333–349.
<https://doi.org/10.1007/s00421-018-04061-x>
113. Jabre S, Hleihel W, Coirault C (2021) Nuclear Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Cells* 10(2): 318.
<https://doi.org/10.3390/cells10020318>
114. Shrestha MM, Lim CY, Bi X, Robinson RC, Han W (2021) Tmod3 Phosphorylation Mediates AMPK-Dependent GLUT4 Plasma Membrane Insertion in Myoblasts. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 653557.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.653557>
115. Ogneva IV, Biryukov NS, Leinsoo TA, Larina IM (2014) Possible role of non-muscle alpha-actinins in muscle cell mechanosensitivity. *PLoS One* 9(4): e96395.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096395>
116. Ogneva IV, Biryukov NS (2016) Lecithin Prevents Cortical Cytoskeleton Reorganization in Rat Soleus Muscle Fibers under Short-Term Gravitational Disuse. *PLoS One* 11(4): e0153650.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153650>
117. Coleman AK, Joca HC, Shi G, Lederer WJ, Ward CW (2021) Tubulin acetylation increases cytoskeletal stiffness to regulate mechanotransduction in striated muscle. *J Gen Physiol* 153(7): .
<https://doi.org/10.1085/jgp.202012743>

Mechanosensory Structures in the Mechanotransduction System of Muscle Fibers

T. M. Mirzoev^{a, *} and B. S. Shenkman^a

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

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

The ability of skeletal muscles to sense mechanical stimuli and respond to them by changing intracellular electrochemical and biochemical processes (mechanotransduction) is of crucial importance for the regulation of physiological processes in muscle fibers. This review describes the main sarcolemmal, sarcomeric, and cytoskeletal mechanosensitive structures and analyzes mechano-dependent signaling pathways and mechanisms involved in the regulation of gene expression as well as muscle protein synthesis and degradation. The final part of the review formulates specific questions in the field of muscle mechanotransduction that need to be addressed in future studies. Understanding of skeletal muscle mechanotransduction is necessary for the development of effective measures aimed at the treatment of muscular dystrophies, sarcopenia, and prevention of disuse-induced muscle atrophy.

Keywords: skeletal muscle, mechanosensors, mechanotransduction, mechanical signal, mechanical unloading, protein synthesis, intracellular signaling

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ТРИПТОФАНОВОГО ОБМЕНА
И КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2023 г. О. П. Шатова^{1, 2, 4, *}, Е. М. Ягодкина¹, С. С. Кайдошко¹,
А. А. Заболотнева^{1, 4}, А. В. Шестопапов^{1, 3, 4}

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

²Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

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

⁴Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

*E-mail: shatova.op@gmail.com

Поступила в редакцию 03.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 13.07.2023 г.

С каждым годом распространенность аутоиммунных заболеваний в мире неуклонно растет. Этиология и патогенез аутоиммунных заболеваний крайне сложные и во многом остаются неясными. Тем не менее, все больше данных исследований последних лет указывает на критическую роль микроорганизмов в формировании нормального иммунного ответа и аутоиммунных реакций в организме хозяина. При этом одна из ведущих ролей отводится кишечной микробиоте, представленной триллионами микробов, образующих широкий спектр сигнальных и иммунорегуляторных метаболитов. Формируя сложную взаимозависимую систему “хозяин–микробиота”, симбиотические бактерии во многом определяют развитие и функционирование иммунных клеток человека. В настоящем обзоре мы рассматриваем роль кишечной микробиоты и ее ключевых метаболитов (а именно короткоцепочечных жирных кислот и метаболитов триптофана) в патогенезе аутоиммунных заболеваний и обсуждаем возможные механизмы влияния обозначенных сигнальных молекул на иммунные клетки хозяина.

Ключевые слова: аутоиммунитет, триптофановые метаболиты, короткоцепочечные жирные кислоты, микробиота, дисбиоз

DOI: 10.31857/S0869813923080095, EDN: NKMVBY

ВВЕДЕНИЕ

Аутореактивность или аутоиммунитет — это комплексный патологический процесс, в основе которого лежит нарушение толерантности и, как следствие, патологический иммунный ответ в отношении компонентов собственных тканей (аутоантигенов), приводящий к развитию широкого спектра аутоиммунных заболеваний [1]. В свою очередь аутоиммунные заболевания разделяют на органоспецифические (например, сахарный диабет 1-го типа (СД1Т), болезнь Крона и аутоиммунный тиреоидит) и системные (например, ревматоидный артрит и системная красная волчанка) [2]. С ростом распространенности аутоиммунных заболеваний и связанной с этим интенсификацией их исследования становится все более очевидной вовле-

ченность кишечной микробиоты в реакции аутоиммунного ответа. Ранее считалось, что развитие аутоиммунных заболеваний обусловлено преимущественно наследственной предрасположенностью, однако в настоящее время все большая роль отводится влиянию факторов окружающей среды, в том числе микробному воздействию. Этот факт связан с появлением “гигиенической гипотезы”, отмечающей протективные эффекты патогенов (возбудителей инфекций и паразитов) и комменсальной кишечной микробиоты против развития аутоиммунных заболеваний у хозяина [3]. В процессе эволюции микробиота стала неотъемлемым компонентом человеческого организма. Так, микроорганизмы, заселяющие кишечник, участвуют в пищеварении, обмене веществ, развитии органов и регуляции дифференцировки иммунных клеток и нейронов [4–6]. Большая часть микробиоты обитает во внешнем слое кишечной слизи и способствует развитию и функционированию иммунной системы хозяина посредством продукции своих метаболитов, молекулярных паттернов, ассоциированных с микроорганизмами, и антигенов. Нарушение баланса образующихся метаболитов или нарушение регуляции любого из процессов, сопутствующих их образованию, будет способствовать развитию воспаления и иммунопосредованным заболеваниям. Тримя наиболее изученными в настоящее время категориями метаболитов, участвующих во взаимодействиях “хозяин–микробиота”, являются (1) короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), продуцируемые бактериями в основном в результате ферментации неперевариваемых растительных волокон; (2) вторичные желчные кислоты, предшественники которых образуются в печени, а затем трансформируются микробиотой кишечника и (3) микробные метаболиты триптофана (Трп).

В настоящем обзоре мы рассматриваем роль кишечной микробиоты и ее метаболитов (а именно КЦЖК и метаболитов Трп) в патогенезе аутоиммунных заболеваний и обсуждаем возможные механизмы влияния обозначенных сигнальных молекул на иммунные клетки хозяина.

1. ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ АУТОРЕАКТИВНОСТИ

Механизмы влияния дисбиоза кишечной микробиоты на развитие аутоиммунных заболеваний до сих пор точно не определены. Предположительно, они могут включать в себя молекулярную мимикрию, нарушение функции кишечного барьера и развитие так называемого “синдрома протекающей кишки”, аутофагию эпителиальных клеток кишечника, формирование мембранных везикул и влияние микроРНК [7]. Более того, было показано, что системный аутоиммунитет очень сильно зависит от разнообразия и состава кишечного микробиома [8]. Несмотря на то, что в определении “аутоиммунного заболевания” отсутствует какая-либо информация о вовлеченности кишечной микробиоты в его патогенез, целый пласт научных исследований посвящен изучению роли таксономической и функциональной представленности микробиоты в механизмах развития аутоиммунных заболеваний [2, 9–10]. Аберрантный кишечный микробиом способствует развитию оксидативного стресса в кишечнике, его барьерной дисфункции, воспалению и аутореактивности [8]. Более того, дисбиоз кишечника связан с хроническим вялотекущим воспалением и с активацией аутореактивных CD4+ и CD8+ Т-клеток, запускающих спонтанные аутоиммунные реакции в органах-мишенях [10–12] (рис. 1).

У людей с различными аутоиммунными заболеваниями прослеживается тенденция к снижению биомассы и таксономического разнообразия микроорганизмов кишечника, метаболиты которых обладают иммуномодулирующими свойствами как, например, КЦЖК [13, 14] или метаболиты Трп [15, 16]. В противовес данному изменению обнаруживается увеличение количества сигнальных молекул, усилива-

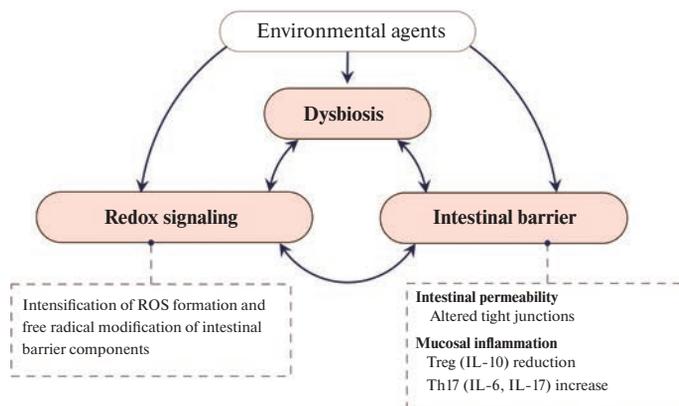


Рис. 1. Развитие дисбиоза кишечника способствует интенсификации образования реактивных форм кислорода (РФК) и окислительной модификации белков и липидов, что оказывает влияние на целостность кишечного барьера. IL – интерлейкин.

ющих активацию лимфоцитов, вовлеченных в развитие аутоиммунной провокации [14], а также возрастает содержание веществ, способствующих повышению проницаемости эпителиального барьера кишечника [17, 18].

В связи с предположением, что интенсификация свободнорадикального окисления способствует усугублению дисбиоза кишечника и является одним из главных патогенетических механизмов развития синдрома “протекающей кишки” и аутоиммунных реакций, было изучено влияние на микробиом кишечника N-ацетилцистеина (антиоксиданта, который является предшественником глутатиона) и детоксикации РФК [19]. Обработка N-ацетилцистеином приводила к отчетливым сдвигам в микробном сообществе кишечника, проявляющимся в виде изменений β -разнообразия и бактериальной представленности на уровне семейств. Установлено относительное увеличение бактериальных семейств *Akkermansiaceae*, *Erysipelotrichaceae* и *Muribaculaceae* и уменьшения *Rikenellaceae*. Добавление N-ацетилцистеина также приводило к обогащению на уровне рода *Akkermansia* и *Turicibacter*, в то время как произошло сокращение *Alistypes* [8].

Было показано, что за счет дисбиоза кишечника нарушается равновесие между Th17 и Treg [20], прослеживается проникновение микробных антигенов в подслизистую оболочку кишечника и системный кровоток, что и способствует развитию аутореактивности [21].

В табл. 1 мы суммировали некоторые изменения бактериальной представленности кишечной микробиоты при самых распространенных аутоиммунных заболеваниях. Так, установлено, что при многих системных аутоиммунных патологиях происходит изменение соотношения *Firmicutes* к *Bacteroidetes* (отношение F/B) и β -разнообразия кишечного микробиома [8]. Однако при СД1Т установлено увеличение отношения F/B, тогда как при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и системной красной волчанке отмечается снижение данного соотношения (табл. 1) [8].

Важно отметить, что при системной красной волчанке наблюдается транслокация *Enterococcus gallinarum* и *Lactobacillus reuteri* в некишечные ткани, и именно это может иметь решающее значение для развития системных аутоиммунных реакций [27].

Очевидно, что микробиота кишечника участвует в патогенезе различных кишечных и системных аутоиммунных патологий [28]. Одним из главных защитных механизмов от аутоагрессии является формирование кишечного барьера, целостность которого обеспечивает защиту от адаптивных иммунных реакций против микробио-

Таблица 1. Специфические девиации бактериальной представленности кишечной микробиоты при некоторых аутоиммунных заболеваниях

Аутоиммунные заболевания	Бактериальная представленность в кишечнике		Ссылка
	Повышение	Понижение	
СД1Г	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides</i> • <i>Streptococcus</i> • <i>Blautia</i> • <i>Bilophila</i> • <i>Parabacteroides</i> • <i>Ruminococcus</i> • <i>Veillonella</i> • <i>Clostridium</i> • <i>Escherichia</i> <p><i>Примечание:</i> некоторые исследования показали увеличение соотношения F/B, снижение <i>Proteobacteria</i> и <i>Bacteroidetes</i> либо не показали значимых различий. Наличие обратной зависимости количества аутоантител от <i>Streptococcus</i> и <i>Ruminococcaceae</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium</i> • <i>Roseburia</i> • <i>Faecalibacterium</i> • <i>Lachnospira</i> • <i>Haemophilus</i> • <i>Dialister</i> • <i>Acidaminococcus</i> 	
Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит)	<ul style="list-style-type: none"> • Адгезивно-инвазивная <i>E. coli</i> (AIEC) • <i>Proteobacteria</i> • <i>Fusobacteria</i> • <i>Bacteroides sp.</i> увеличиваются у пациентов с ВЗК за счет видов <i>Prevotella</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Akkermansia muciniphila</i> • <i>F. prausnitzii</i>, • <i>Bacteroides uniformis</i> 	[22]
Ревматоидный артрит	<ul style="list-style-type: none"> • Увеличение соотношения F/B • <i>Prevotella copri</i> • <i>Clostridium</i> • <i>Lactobacillus salivarius</i> 		[23]
Аутоиммунные заболевания щитовидной железы	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroidetes</i> • <i>Bacteroides</i> • <i>Lachnospiraceae</i> • <i>Bacteroides fragilis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Firmicutes</i> • <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus</i> • Снижение соотношения F/B 	[24]
Системная красная волчанка	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacteriaceae</i> и <i>Enterococcaceae</i> • Снижение соотношения F/B 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ruminococcaceae</i> 	[25, 26]

ты здорового человека [29]. Когда интактные комменсалы или патогены проникают через кишечный барьер, ряд защитных механизмов препятствует доступу бактерий в системный кровоток [7]. Одним из главных механизмов является функционирование брыжеечных лимфатических узлов [29]. Такие механизмы имеют значения только при кишечной или сосудистой патологии, при химиотерапии или при отсутствии функциональной врожденной иммунной системы [30], хотя недавние исследования показывают, что кишечные комменсалы могут находиться в лимфоидных тканях ЖКТ и у здоровых лиц. Поэтому остаются вопросы, насколько транслокация патобионтов критична для стимуляции системного аутоиммунитета [31]. Однако вне сомнения, метаболическая активность патобионтов будет играть не меньшую роль в аутоиммунной провокации, чем их непосредственная транслокация.

2. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Особенности кинуренинового метаболизма Trp

В последние два десятилетия сформировалась теория, согласно которой метаболизм Trp через кинурениновый путь вовлечен в иммунную функцию организма [32]. Известно, что Trp является эссенциальной аминокислотой для организма человека и утилизируется по доминантному кинурениновому пути (~95% катаболизма Trp) и трем минорным путям: 1) серотониновому (гидроксилирование Trp), 2) триптаминовому (диарбоксилирование Trp) и 3) индольному (трансаминирование Trp) [32].

Все метаболиты обмена Trp являются сигнальными молекулами и вовлечены как в регуляцию quorum sensing (QS) в микробиотической экосистеме кишечника, так и в регуляцию метаболизма и работы иммунной системы организма человека [33]. Метаболиты кинуренинового пути обмена Trp являются универсальными сигнальными молекулами [34], и большая часть Trp (около 90–95%) утилизируется печенью именно по кинурениновому пути [35]. Остальной Trp попадает в кровоток и доступен для использования клетками периферических тканей, такими как эндотелиальные клетки сосудов, фибробласты и иммунные клетки, обеспечивающие врожденный иммунитет [36]. При иммунной стимуляции срабатывает так называемый “кинурениновый переключатель” [37], и большая часть Trp поступает в иммунокомпетентные клетки и ими метаболизируется по кинурениновому пути. Так, показано, что после иммунной стимуляции клетки иммунной системы генерируют высокие уровни внутриклеточной хинолиновой кислоты и, следовательно, НАД⁺. В свою очередь, данное событие вовлечено в индукцию синтеза белков цитоскелета и регуляцию подвижности иммунных клеток [38, 39].

Ключевой фермент кинуренинового пути – индоламин-2,3-диоксигеназа 1 (IDO1) – один из основных регуляторов функционирования иммунных клеток, который контролирует баланс между стимуляцией и подавлением активности иммунного ответа в очагах локального воспаления и имеет, таким образом, отношение к широкому спектру аутоиммунных и воспалительных заболеваний [39, 40].

Первый этап кинуренинового пути включает окисление индольного кольца и катализируется двумя дифференцированно распределенными в организме человека ферментами: триптофан-2,3-диоксигеназой (TDO) (преимущественно экспрессируется в печени и головном мозге) и IDO (экспрессируется в большинстве периферических тканей) [41] (рис. 2).

TDO и IDO – ферменты-гемопротеины, которые превращают Trp в N-формилкинуренин в регуляторных скорость-лимитирующих реакциях. Активность IDO зависит от уровня провоспалительных цитокинов. Так, одним из самых мощных индукторов экспрессии IDO является интерферон- γ (INF- γ) [42]. Активность TDO регулируется доступностью Trp, при этом промотор данного регуляторного фермента содержит GRE (элемент глюкокортикоидной регуляции в ДНК), следовательно, экспрессия TDO зависит от уровня кортизола и активности его сигнального пути. Так, известно, что при стрессе происходит индукция экспрессии TDO [32].

Множество исследований посвящены изучению роли метаболитов кинуренинового пути обмена Trp в иммунной регуляции [28, 33, 36], а также анализу влияния кинуренина, кинуреновой кислоты, антралиловой кислоты, хинолиновой кислоты [25] и НАД⁺ на работу иммунокомпетентных клеток. Эти работы показывают, что именно нарушение метаболического звена кинуренинового обмена является одним из ключевых механизмов аутоиммунных провокаций [37].

Trp сигнальные молекулы оказывают свои эффекты AhR-зависимым (то есть через AhR-арилгидрокарбоновые рецепторы) [38] и AhR-независимым образом [34]. AhR в большом количестве представлены в энтероцитах и в иммунных клетках [35].

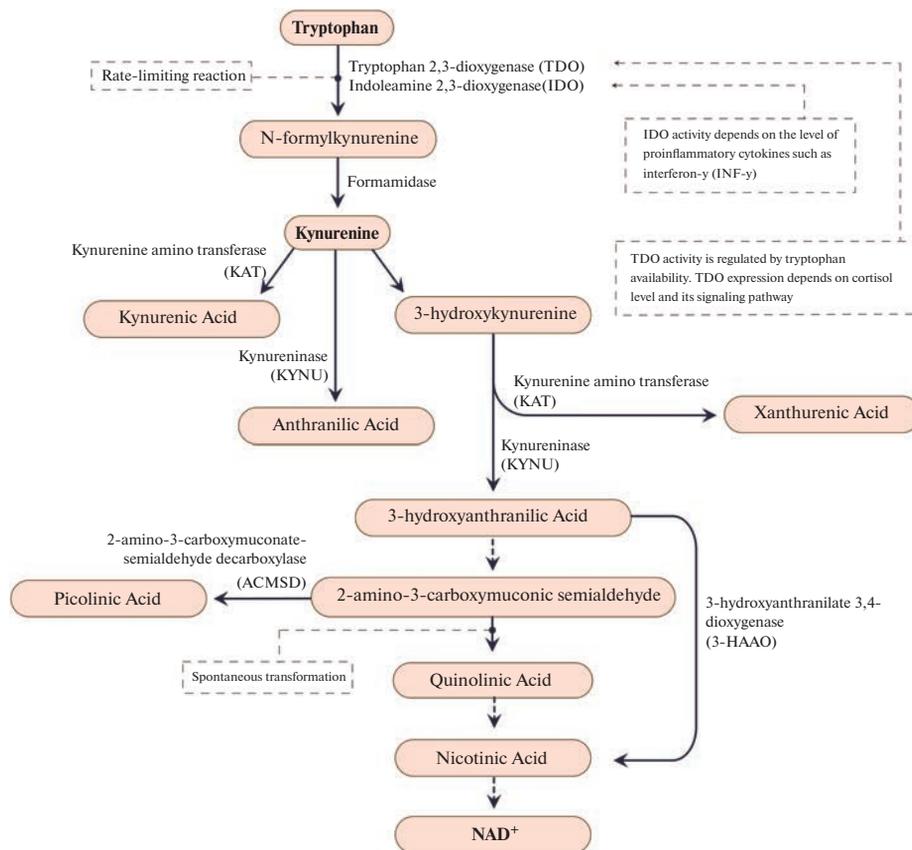


Рис. 2. Особенности кинуренинового метаболизма Трп. Под действием N-формилкинуренинформамидазы N-формилкинуренин превращается в кинуренин. Далее метаболизм кинуренина может пойти по одному из двух путей: 1) превращение в кинуреновую и антралиловую кислоты с помощью кинуренинаминотрансферазы (KAT) и кинурениназы (KYNU) соответственно, или 2) образование нейротоксического метаболита 3-гидроксикинуренина, который далее трансаминируется в ксантуреновую кислоту KAT. Затем 3-гидроксикинуренин превращается KYNU в иммуномодулирующий метаболит – 3-гидроксиантралиловую кислоту, которая может самопроизвольно превращаться в никотиновую кислоту через 3-гидроксиантралилат-3,4-диоксигеназу (3-HAAO). Далее 3-гидроксиантралилат превращается в нестабильный промежуточный 2-амино-3-карбоксимуконный полуальдегид, который спонтанно превращается в агонист рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) – хинолиновую кислоту или превращается в нейтропротекторную пиколиновую кислоту после ферментативного декарбокислирования с помощью 2-амино-3-карбоксимуконат-семиальдегиддекарбоксилазы (ACMSD). Хинолиновая кислота подвергается декарбокислированию с образованием никотиновой кислоты, которая является предшественником никотиамдадениндинуклеотида (НАД⁺).

Было установлено, что эффекты, опосредованные активацией AhR, вносят значительный вклад в поддержание целостности кишечного барьера, тем самым способствуя развитию иммунотолерантности [38].

В качестве лигандов AhR выступают как эндогенные (кинуренин, кинуреновая и ксантуреновая кислоты и др.), так и микробные метаболиты Трп (индол и его производные, а также триптамин). После активации AhR с лигандом транслицируется в ядро и активирует экспрессию генов, ответственных за синтез ИЛ – *IL-6* и *IL-22*

и *Cyp11A1* (цитохрома *P450 11A1*), а также важнейших ферментов кинуренинового пути – *IDO* и *TDO*, косвенно регулируя отношения между комменсальной микробиотой и хозяином [44].

Роль метаболизма короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в развитии аутоиммунных заболеваний

Одними из наиболее изученных микробных метаболитов, обладающих иммуносупрессивным действием, являются КЦЖК, такие как бутират, ацетат и пропионат. Данные метаболиты оказывают как прямое действие, проникая внутрь клетки через специальные транспортеры, так и опосредованное – через рецепторы, ассоциированные с G-белками [45].

КЦЖК попадают внутрь энтероцитов через натрий-зависимый монокарбоксилатный транспортер (sodium-coupled monocarboxylate transporter 1, *SMCT1*) и монокарбоксилатный транспортер 1-го типа (monocarboxylate transporter 1, *MCT1*). Внутри клетки данные метаболиты могут выступать в качестве энергетических субстратов, а в кровотоке (посредством *MCT4*) оказывают системные эффекты. Кроме того, бутират и пропионат могут ингибировать гистондеацетилазы (*HDAC*) 1-го и 3-го типов, за счет чего снижается деацетилирование как гистоновых, так и негистоновых белков [46]. В результате данных модификаций изменяется экспрессия генов, продукты которых ответственны за развитие воспаления [47]. Опосредованное действие осуществляется через рецепторы, связанные с G-белками (*GPCR41*, *GPCR43*, *GPCR109A*) [48], однако с рецептором к ниацину – *GPR109A* может связаться только бутират [49]. Через активацию данных рецепторов по пути *NF-κB* КЦЖК снижают синтез провоспалительных цитокинов, белков ответа острой фазы воспаления и циклооксигеназы-2 [50].

КЦЖК, являясь одними из главных энергетических субстратов для колоноцитов, способствуют снижению концентрации кислорода в эпителии толстой кишки, поскольку большое количество кислорода идет на их метаболизм. В результате происходит стабилизация фактора, индуцированного гипоксией 1 (hypoxia-inducible factor 1, *HIF1*). Транслокация в ядро *HIF1*, являющегося транскрипционным фактором, индуцирует экспрессию генов *OCLN* (*Occludin*) и *CLDN1* (*Claudin 1*), кодирующих белки плотных контактов – окклюдин и клаудин-1, что ведет к поддержанию целостности эпителиального барьера [51]. По нашему мнению, поддержание целостности барьера является одним из ведущих механизмов противодействия аутоагрессии, поскольку повышение проницаемости кишечника однозначно приведет к повышению транслокации бактериальных ДНК и липополисахаридов (ЛПС) в кровь. Также важно подчеркнуть значимость уменьшения локального воспаления, опосредованного снижением концентрации провоспалительных цитокинов. Мы считаем, что снижение биомассы бактерий, продуцирующих КЦЖК, должно привести к гиперпродукции провоспалительных цитокинов, опосредованной интенсификацией сигналинга по пути *NF-κB*, вследствие чего происходит гиперстимуляция кинуренинового пути в иммунных клетках. В свою очередь, срабатывание “кинуренинового переключателя” приводит к увеличению образования целого ряда различных сигнальных молекул *Tgr* обмена в организме человека [26].

3. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ МИКРОБИОТОЙ КИШЕЧНИКА

Молекулярная мимикрия

До сих пор остается не до конца ясным, является ли дисбиоз причиной или следствием аутоиммунных патологий. Многообразие перекрестных связей между микробиотой и хозяином обуславливает ее влияние на множество процессов, про-

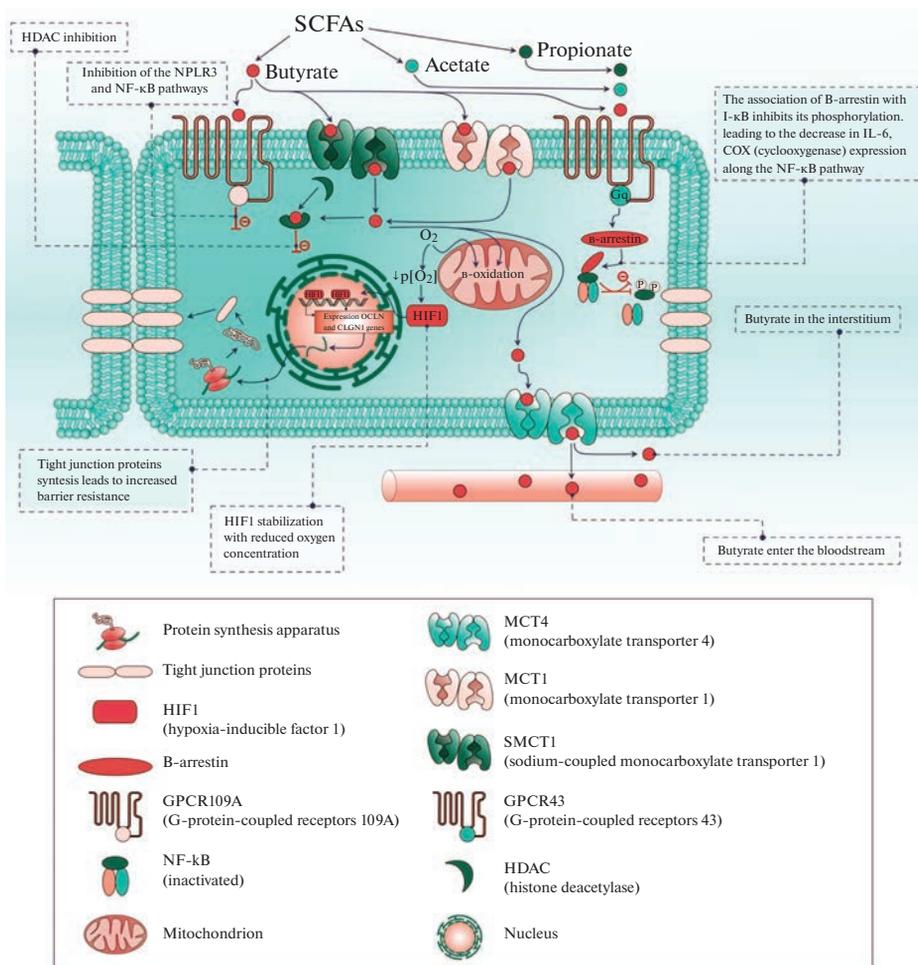


Рис. 3. Влияние КЦЖК на целостность кишечного барьера и синтез провоспалительных цитокинов энтероцитами. При взаимодействии КЦЖК с GPCR43 происходит ассоциация β-аррестина с ингибитором (I-кВ) и ингибируется фосфорилирование последнего, диссоциация I-кВ и NF-кВ не происходит. Результатом ингибирования пути NF-кВ является снижение синтеза провоспалительных цитокинов. Градиент концентрации кислорода, поддерживаемый в том числе за счет окисления бутирата, способствует поддержанию целостности кишечного барьера. Эффекты бутирата связаны со снижением уровней фактора некроза опухоли-α (TNF-α), IL-6 и подавлением активации инфламмосомы Nod-подобного рецептора семейства NALP 3 (NLRP3) через G-белок ассоциированный рецептор 109A (GPR109A).

текающих в организме: поддержание энергетического гомеостаза, регуляцию иммунных реакций, метаболизм ксенобиотиков и т.д. Несмотря на широкую распространенность аутоиммунных заболеваний, репертуар аутоантигенов является крайне ограниченным [53]. Интересным является то, что некоторые антигены микроорганизмов гомологичны человеческим аутоантигенам и могут стать индукторами развития различных аутоиммунных заболеваний. Данный механизм получил название “молекулярной мимикрии”. Так, гомология между мембранными липоолигосахарида-

ми *Campilobacter jejuni* и человеческими ганглиозидами (G) GM1 и GD1a индуцирует развитие синдрома Гийена–Барре, что было показано в исследовании на животных моделях [54]. Подобный механизм также характерен для патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, рассеянного склероза, системной красной волчанки и др. [2, 55, 56].

Активация иммунокомпетентных клеток

Другим механизмом, способствующим развитию аутоиммунных заболеваний, является опосредованная микробиотой активация иммунокомпетентных клеток (Th17) в кишечнике и стимуляция выработки провоспалительных цитокинов, что имеет двойственное значение. С одной стороны, это способствует поддержанию кишечного барьера в борьбе с патогенными микроорганизмами, а с другой стороны – провоцирует аутоиммунную агрессию [57]. Стоит также подчеркнуть, что при развитии аутоиммунных заболеваний наблюдается повышенная активность Th17 на фоне сниженной активности Treg. Данное соотношение может регулироваться как самой микробиотой, так и ее метаболитами. Например, КЦЖК способствуют увеличению числа Treg в слизистой оболочке кишечника [58] за счет влияния на дендритные клетки [59]. Таким образом, дисбиоз кишечника может увеличивать соотношение Th17/Treg, тем самым индуцируя провоспалительные реакции, способствующие развитию аутоиммунных заболеваний.

Увеличение проницаемости кишечного барьера

В недавних исследованиях было продемонстрировано, что аутоиммунные заболевания ассоциированы с развитием синдрома “дырявой кишки” и повышенной бактериальной транслокацией, вследствие которых развивается хроническое вялотекущее системное воспаление [60]. Проникновение в кровь и соответственно в ткани такого патобионта, как *Enterococcus gallinarum*, способствует развитию системной красной волчанки и аутоиммунного гепатита. При этом имеет значение не только увеличение концентрации циркулирующих бактериальных ЛПС в крови, но и индуцируемая *E. gallinarum* избыточная экспрессия на гепатоцитах эндогенного ретровирусного гликопротеина 70 и β_2 -гликопротеина I, которая в дальнейшем у генетически предрасположенных животных способствует развитию аутоиммунных реакций [61].

4. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ

Влияние бутирата на иммунокомпетентные клетки

Одним из важнейших факторов, имеющих значение в поддержании аутоотолерантности, является функционирование Treg клеток. Их способность к регуляции иммунных реакций возрастает за счет усиления экспрессии FoxP3 (forkhead box P3), индукции дифференцировки наивных CD4+ T-клеток в Treg под действием толерогенных дендритных клеток (DC). Важно отметить, что КЦЖК могут влиять на оба этих процесса [62].

В экспериментах *in vitro* исследовалось влияние ацетата, пропионата и бутирата на индуцированную ЛПС активацию DC, полученных из моноцитов человека. Было показано снижение экспрессии костимулирующих молекул (CD83, CD80, CD40), IL-10 и IL-12, а также снижение метаболической активности DC. При этом наиболее значимый эффект оказывал бутират, и в меньшей мере пропионат и ацетат. Культивирование DC, предварительно обработанных КЦЖК, с наивными CD4+ T-лимфоцитами усиливало дифференцировку последних в Treg, однако их фенотип в данном случае характеризовался низкой продукцией FoxP3 [63]. Подоб-

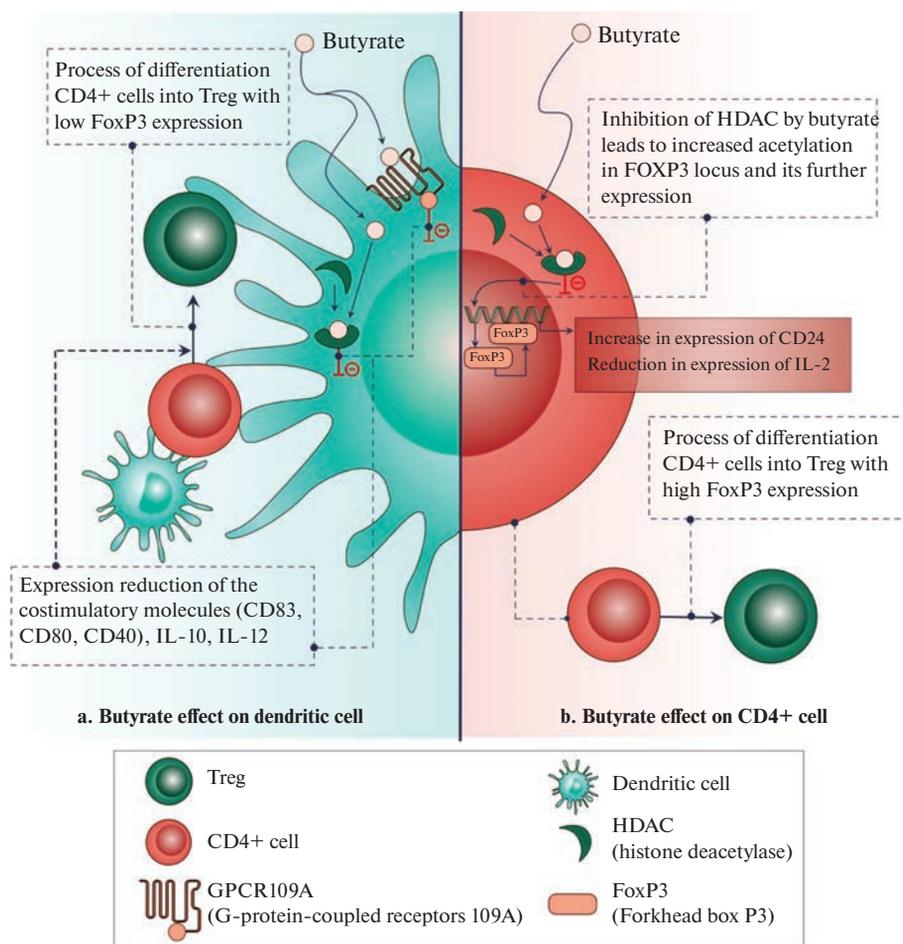


Рис. 4. (а) – влияние бутирата на DC, ведущее к дифференцировке CD4+ клеток в Treg с низкой экспрессией FoxP3. (б) – влияние бутирата на CD4+ клетки с их дальнейшей дифференцировкой в Treg с высокой экспрессией FoxP3.

ные эффекты бутират реализует путем ингибирования HDAC и через активацию GPR109A, которые в большом количестве представлены на DC, но отсутствуют на лимфоидных клетках [49].

Также было установлено, что в наивных CD4+ T-клетках бутират индуцирует экспрессию FoxP3 – транскрипционного фактора, способствующего активации и экспансии Treg [64]. FoxP3 подавляет выработку IL-2, но при этом увеличивает экспрессию CD25 – высокоаффинного рецептора данного цитокина [65]. Хотя функция Treg регулируется далеко не одним компонентом, а более сложной системой, включающей в себя другие транскрипционные факторы, генетические и эпигенетические элементы, а также сигналы тканевого микроокружения, FoxP3 является все же ключевым игроком [66]. Предполагается, что подобное влияние бутирата осуществляется благодаря ингибированию HDAC, а как следствие – усиленному ацетилированию в локусе FOXP3 [66].

Влияние метаболитов обмена Тгр на иммунокомпетентные клетки

Значительные изменения концентрации метаболитов кинуренинового пути, а также микробных производных Тгр выявляются при различных патологических состояниях: ожирении [26], аутоиммунных [67] и онкологических заболеваниях [68]. Так, при ожирении было показано повышение концентрации хинолиновой и кинуреновой кислот, кинуренина, 5-гидроксииндол-3-ацетата, индол-3-лактата, индол-3-ацетата и индол-3-бутирата в сыворотке крови, что говорит об интенсификации всех путей метаболизма Тгр в организме [26]. Для рассеянного склероза характерно снижение концентрации Тгр в сыворотке крови при одновременном повышении уровня кинуренина [67]. Подобные изменения связаны не столько с истощением пула Тгр, сколько с повышенной его утилизацией для восполнения потребности иммунной системы в продукции НАД⁺ [29].

Все больше данных указывают на то, что НАД⁺, известный как молекула, участвующая в энергетическом метаболизме, является одним из основных модуляторов иммунно-метаболических взаимосвязей. Концентрация НАД⁺ отражает его потребление и синтез *de novo* по кинурениновому пути, а также уровень экспрессии генов, кодирующих НАД-зависимые ферменты [69]. НАД⁺ участвует в модификации белков и сигнальных молекул, выступая в качестве кофермента сиртуинов (SIRTs), поли(АДФ-рибозо)-полимеразы (PARPs), АДФ-рибозотрансферазы (ARTs) и CD38/CD157 [70].

CD38 локализуется как на поверхности активированных Т-клеток, так и в их цитоплазме, а также обнаруживается в макрофагах, нейтрофилах и DC. Было показано, что при системной красной волчанке статистически значимо повышается экспрессия данной молекулы в CD8⁺ Т-лимфоцитах, НК-клетках и DC [71]. CD38 проявляет свойства АДФ-рибозилциклазы и циклической АДФ-рибозилгидролазы в реакциях образования циклического АДФ-рибозила (цАДФР) и АДФР соответственно, однако преимущественно выступает в качестве НАД-гликогидролазы в реакциях гидролиза НАД⁺ до АДФР и никотинамида. Продукты данных реакций участвуют в регуляции концентрации Ca²⁺ в цитоплазме, что необходимо для активации Т-клеток. Такие же свойства проявляет и CD157, однако обладает меньшим сродством к НАД⁺. Работа данных ферментов сопровождается истощением пула НАД⁺, что снижает его доступность для SIRTs, PARPs и ARTs [72].

Повышение доступности НАД⁺ для SIRT1 возможно характеризует его роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний в качестве провоспалительного агента. Так, установлено, что SIRT1 деацетирует транскрипционный фактор FoxP3, определяющий состояние Treg, что приводит к его деградации [73]. Также было показано, что SIRT1 связывает и деацетирует транскрипционный фактор RORγt – главный регулятор дифференцировки Th17. Таким образом, происходит ингибирование функции Treg на фоне усиления дифференцировки Th17, что ведет к изменению соотношения данных клеточных популяций [74].

Как говорилось выше, синтез кинуренинов контролируется IDO. При некоторых онкологических заболеваниях наблюдается повышенная экспрессия IDO, что позволяет опухолевым клеткам уклоняться от иммунного надзора и объясняет резистентность таких опухолей к иммунотерапии [23]. Ингибиторы IDO были предложены в качестве агентов для преодоления лекарственной устойчивости опухоли. Возможно, противоположный подход, способствующий повышению экспрессии фермента, был бы эффективен в борьбе с аутоиммунными заболеваниями. Действительно, было показано, что при стимуляции экспрессии IDO, опосредованной TGF-β и IFN-γ, в DC происходит формирование толерогенного фенотипа и диф-

ференцировка наивных CD4⁺ T-клеток в Treg, а также ингибируется переход Treg в провоспалительные Th17 [75].

В ответ на TGF- β происходит фосфорилирование двух иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIMs) киназами Src. Благодаря этому образуются сайты стыковки для связывания и активации тирозинфосфатаз SHP-1 и SHP-2, после чего они дефосфорилируют киназу IRAK, сдвигая баланс передачи сигналов NF- κ B по противовоспалительному пути [23]. При высокой концентрации IL-6 в начале воспалительной реакции IDO связывается с фактором SOCS3, что способствует его протеасомной деградации и, как следствие, снижению продукции кинуренина, обеспечивающей истощение T_H17 во внеклеточной среде, а также долгосрочных влияний, опосредованных AhR и сигналингом через фосфорилирование ITIM1 и ITIM2 [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что механизмы влияния кишечной микробиоты и ее дисбиоза на развитие аутоиммунных заболеваний точно не определены, очевидной является зависимость системных аутоиммунных реакций от разнообразия и состава кишечного микробиома. Аберрантный кишечный микробиом способствует развитию оксидативного стресса в кишечнике, барьерной дисфункции, воспалению и аутореактивности. Кроме того, изменение таксономического состава микробиоты влияет на ее метаболический профиль и способствует увеличению или, напротив, снижению продукции определенных сигнальных и иммунорегуляторных молекул, влияющих на дифференцировку, созревание и миграцию иммунных клеток. С другой стороны, повышение проницаемости кишечника, связанное с дисбиозом и изменением продукции КЦЖК и метаболитов триптофана, является одним из основных механизмов развития воспалительной реакции и аутоагрессии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

О.П.Ш. — идея статьи и написание разделов статьи; Е.М.Я. — идея статьи и написание разделов статьи; С.С.К. — идея статьи и написание разделов статьи, подготовка рисунков; А.А.З. — написание разделов статьи и коррекция текста; А.В.Ш. — научное консультирование и финальная правка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nasonov EL, Aleksandrova EN, Novikov AA* (2015) Autoimmune Rheumatic Diseases — Problems of Immunopathology and Personalized Treatment. *Proceed Vestn Ross Akad Medi Nauk* 70: 169–182.
<https://doi.org/10.15690/vramn.v70i2.1310>
2. *Wang L, Wang FS, Gershwin ME* (2015) Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 278: 369–395.
<https://doi.org/10.1111/joim.12395>
3. *Bach JF* (2018) The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol* 18: 105–120.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.111>

4. *Schroeder BO, Bäckhed F* (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 10: 1079–1089.
<https://doi.org/10.1038/nm.4185>
5. *Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK* (2016) The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 167(4): 915–932.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>
6. *Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E* (2017) Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17(4): 219–232.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
7. *Wang H, Wang G, Banerjee N, Liang Y, Du X, Boor PJ, Hoffman KL., Khan MF* (2021) Aberrant Gut Microbiome Contributes to Intestinal Oxidative Stress, Barrier Dysfunction, Inflammation and Systemic Autoimmune Responses in MRL/Lpr Mice. *Front Immunol* 12: 651191.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021>
8. *Greiling TM, Dehner C, Chen X, Hughes K, Iñiguez AJ, Boccitto M, Ruiz DZ, Renfro SC, Vieira SM, Ruff WE* (2018) Commensal Orthologs of the Human Autoantigen Ro60 as Triggers of Autoimmunity in Lupus. *Sci Transl Med* 10: eaan2306.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan2306>
9. *Ruff WE, Dehner C, Kim WJ, Pagovich O, Aguiar CL, Yu AT, Roth AS, Vieira SM, Kriegel C, Adeniyi O* (2019) Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity. *Cell Host Microbe* 26: 100–113.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.003>
10. *Horai R, Zárate-Bladés CR, Dillenburg-Pilla P, Chen J, Kielczewski JL, Silver PB, Jittayasothon Y, Chan CC, Yamane H, Honda K* (2015) Microbiota-Dependent Activation of an Autoreactive T Cell Receptor Provokes Autoimmunity in an Immunologically Privileged Site. *Immunity* 43: 343–353.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.014>
11. *Ruff WE, Kriegel MA* (2015) Autoimmune Host-Microbiota Interactions at Barrier Sites and Beyond. *Trends Mol Med* 21: 233–244.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.02.006>
12. *Cayres LC, de Salis, Rodrigues GSP, Lengert A, Biondi APC, Sargentini LD, Brisotti JL, Gomes E, de Oliveira GL* (2021) Detection of Alterations in the Gut Microbiota and Intestinal Permeability in Patients With Hashimoto Thyroiditis. *Front Immunol* 12: 579140.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.579140>
13. *Yuan X, Wang R, Han B, Sun CJ, Chen R, Wei H, Chen L, Du H, Li G, Yang Y* (2022) Functional and Metabolic Alterations of Gut Microbiota in Children with New-Onset Type 1 Diabetes. *Nat Commun* 13: 6356.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33656-4>
14. *Maffei C, Martina A, Corradi M, Quarella S, Nori N, Torriani S, Plebani M, Contreas G, Felis GE* (2016) Association between Intestinal Permeability and Faecal Microbiota Composition in Italian Children with Beta Cell Autoimmunity at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 32: 700–709.
<https://doi.org/10.1002/dmrr.2790>
15. *Siljander H, Honkanen J, Knip M* (2019) Microbiome and Type 1 Diabetes. *EBioMedicine* 46: 512–521.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.031>
16. *Walters WA, Xu Z, Knight R* (2014) Meta-Analyses of Human Gut Microbes Associated with Obesity and IBD. *FEBS Lett* 588: 4223–4233.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.039>
17. *Viladomiu M, Kivolowitz C, Abdulhamid A, Dogan B, Victorio D, Castellanos JG, Woo V, Teng F, Tran NL, Szczesnak A* (2017) IgA-Coated E. Coli Enriched in Crohn's Disease Spondyloarthritis Promote TH17-Dependent Inflammation. *Sci Transl Med* 9: eaaf9655.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9655>
18. *Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, Wu X, Li J, Tang L, Li Y* (2015) The Oral and Gut Microbiomes Are Perturbed in Rheumatoid Arthritis and Partly Normalized after Treatment. *Nat Med* 21: 895–905.
<https://doi.org/10.1038/nm.3914>
19. *Taneja V* (2014) Arthritis Susceptibility and the Gut Microbiome. *FEBS Lett* 588: 4244–4249.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.034>
20. *Gong B, Wang C, Meng F, Wang H, Song B, Yang Y, Shan Z* (2021) Association Between Gut Microbiota and Autoimmune Thyroid Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 774362.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.774362>
21. *Mu Q, Zhang H, Liao X, Lin K, Liu H, Edwards MR, Ahmed SA, Yuan R, Li L, Cecere TE* (2017) Control of Lupus Nephritis by Changes of Gut Microbiota. *Microbiome* 5: 73.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0300-8>

22. *Dei-Cas I, Giliberto F, Luce L, Dopazo H, Penas-Steinhardt A* (2020) Metagenomic Analysis of Gut Microbiota in Non-Treated Plaque Psoriasis Patients Stratified by Disease Severity: Development of a New Psoriasis-Microbiome Index. *Sci Rep* 10: 12754. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69537-3>
23. *Mondanelli G, Iacono A, Carvalho A, Orabona C, Volpi C, Pallotta MT, Matino D, Esposito S, Grohmann U* (2019) Amino Acid Metabolism as Drug Target in Autoimmune Diseases. *Autoimmun Rev* 18: 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.02.004>
24. *Dadvar S, Ferreira DMS, Cervenka I, Ruas JL* (2018) The Weight of Nutrients: Kynurenine Metabolites in Obesity and Exercise. *J Int Med* 284: 519–533. <https://doi.org/10.1111/joim.12830>
25. *Moffett JR, Arun P, Puthillathu N, Vengilote R, Ives JA, Badawy AAB, Namboodiri AM* (2020) Quinolate as a Marker for Kynurenine Metabolite Formation and the Unresolved Question of NAD⁺ Synthesis During Inflammation and Infection. *Front Immunol* 11: 31. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00031>
26. *Shestopalov AV, Shatova OP, Karbyshev MS, Gaponov AM, Moskaleva NE, Appolonova SA, Tute-lyan AV, Makarov VV, Yudin SM, Roumiantsev SA* (2021) “Kynurenine Switch” and Obesity. *Bull Siber Med* 20: 103–111. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-4-103-111>
27. *Hevia A, Milani C, López P, Cuervo A, Arbolea S, Duranti S, Turroni F, González S, Suárez A, Gueimonde M* (2014) Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *mBio* 5: e01548-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01548-14>
28. *Badawy AAB* (2017) Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int J Tryptophan Res* 10: 1178646917691938. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>
29. *Badawy AAB* (2019) Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention. *Egypt J Basic Clin Pharmacol* 9: 10.32527/2019/101415. <https://doi.org/10.32527/2019/101415>
30. *Yuasa HJ, Ball HJ* (2015) Efficient Tryptophan-Catabolizing Activity Is Consistently Conserved through Evolution of TDO Enzymes, but Not IDO Enzymes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 324: 128–140. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22608>
31. *Alvarado DM, Chen B, Iticovici M, Thaker AI, Dai N, VanDussen KL, Shaikh N, Lim CK, Guillemain GJ, Tarr PI, Ciorba MA* (2019) Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor and Notch Signaling to Increase Differentiation of Secretory Cells and Alter Mucus-Associated Microbiota. *Gastroenterology* 157: 1093–1108.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.013>
32. *Cecchi M, Paccosi S, Silvano A, Eid AH, Parenti A* (2021) Dexamethasone Induces the Expression and Function of Tryptophan-2-3-Dioxygenase in SK-MEL-28 Melanoma Cells. *Pharmaceuticals (Basel)* 14: 211. <https://doi.org/10.3390/ph14030211>
33. *Savitz J* (2020) The Kynurenine Pathway: A Finger in Every Pie. *Mol Psychiatry* 25: 131–147. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0414-4>
34. *Shatova OP, Shestopalov AV* (2023) Tryptophan Metabolism: A New Look at the Role of Tryptophan Derivatives in the Human Body. *Biol Bull Rev* 13: 81–91. <https://doi.org/10.1134/S2079086423020068>
35. *Jamshed L, Debnath A, Jamshed S, Wish JV, Raine JC, Tomy GT, Thomas PJ, Holloway AC* (2022) An Emerging Cross-Species Marker for Organismal Health: Tryptophan-Kynurenine Pathway. *Int J Mol Sci* 23: 6300. <https://doi.org/10.3390/ijms23116300>
36. *Chen Y, Guillemain GJ* (2009) Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *Int J Tryptophan Res* 2: 1–19. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s2097>
37. *Krupa A, Kowalska I* (2021) The Kynurenine Pathway – New Linkage between Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Endocrinopathies. *Int J Mol Sci* 22: 9879. <https://doi.org/10.3390/ijms22189879>
38. *Zádori D, Klivényi P, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L* (2012) Mitochondrial Disturbances, Excitotoxicity, Neuroinflammation and Kynurenines: Novel Therapeutic Strategies for Neurodegenerative Disorders. *J Neurol Sci* 322: 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.06.004>
39. *Silva S, Shimizu JF, Oliveira DM, de Assis LR, de Bittar C, Mottin M, Sousa BK, de P Mesquita NC, Regasini LO, Rahal P* (2019) A Diarylamine Derived from Anthranilic Acid Inhibits ZIKV Replication. *Sci Rep* 9: 17703. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54169-z>
40. *Marszałek-Grabska M, Walczak K, Gawel K, Wicha-Komsta K, Wnorowska S, Wnorowski A, Tur-ski WA* (2021) Kynurenine Emerges from the Shadows – Current Knowledge on Its Fate and

- Function. *Pharmacol Ther* 225: 107845.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107845>
41. Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y (2018) Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 13.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00013>
 42. Schiering C, Wincent E, Metidji A, Iseppon A, Li Y, Potocnik AJ, Omenetti S, Henderson CJ, Wolf CR, Nebert DW (2017) Feedback Control of AHR Signalling Regulates Intestinal Immunity. *Nature* 542: 242–245.
<https://doi.org/10.1038/nature21080>
 43. Neavin DR, Liu D, Ray B, Weinshilboum RM (2018) The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* 19: 3851.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123851>
 44. Liu M, Nieuwdorp M, de Vos WM, Rampanelli E (2022) Microbial Tryptophan Metabolism Tunes Host Immunity, Metabolism, and Extraintestinal Disorders. *Metabolites* 12: 834.
<https://doi.org/10.3390/metabol12090834>
 45. Horiuchi H, Kamikado K, Aoki R, Suganuma N, Nishijima T, Nakatani A, Kimura I (2020) Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis GCL2505 Modulates Host Energy Metabolism via the Short-Chain Fatty Acid Receptor GPR43. *Sci Rep* 10: 4158.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60984-6>
 46. Schilderink R, Verseijden C, Seppen J, Muncan V, van den Brink GR, Lambers TT, van Tol EA, de Jonge WJ (2016) The SCFA Butyrate Stimulates the Epithelial Production of Retinoic Acid via Inhibition of Epithelial HDAC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310: 1138–1146.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00411.2015>
 47. Fatahi Y, Heidari HR, Khosroushahi AY (2020) Review of Short-Chain Fatty Acids Effects on the Immune System and Cancer. *Food Biosci* 38: 100793.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100793>
 48. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA (2019) Corrigendum: Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 10: 1486.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01486>
 49. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi, Thangaraju M, Prasad PD, Manicasamy S, Munn DH (2014) Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. *Immunity* 40: 1486.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.007>
 50. Huang W, Man Y, Gao C, Zhou L, Gu J, Xu H, Wan Q, Long Y, Chai L, Xu Y (2020) Short-Chain Fatty Acids Ameliorate Diabetic Nephropathy via GPR43-Mediated Inhibition of Oxidative Stress and NF- κ B Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 4074832.
<https://doi.org/10.1155/2020/4074832>
 51. Kelly CJ, Zheng L, Campbell, EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A et al. (2015) Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* 17(5): 662–671.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>
 52. Li YJ, Chen X, Kwan TK, Loh YW, Singer J, Liu Y, Ma J, Tan J, Macia L, Mackay CR (2020) Dietary Fiber Protects against Diabetic Nephropathy through Short-Chain Fatty Acid-Mediated Activation of G Protein-Coupled Receptors GPR43 and GPR109A. *J Am Soc Nephrol* 31: 1267–1281.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2019101029>
 53. Williams SG, Wolin SL (2021) The Autoantigen Repertoire and the Microbial RNP World. *Trends Mol Med* 27: 422–435.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.02.003>
 54. Koga M, Gilbert M, Li Yuki N (2015) Complex of GM1-and GD1a-Likelipo-Oligosaccharide Mimics GM1b, Inducing Anti-GM1b Antibodies. *PLoS One* 10: e0124004.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124004>
 55. Kiseleva EP, Mikhailopulo KI, Sviridov OV, Novik GI, Knirel YA, Dey ES (2011) The Role of Components of Bifidobacterium and Lactobacillus in Pathogenesis and Serologic Diagnosis of Autoimmune Thyroid Diseases. *Benef Microbes* 2: 139–154.
<https://doi.org/10.3920/BM2010.0011>
 56. Elsayed NS, Aston P, Bayanagari VR, Shukla SK (2022) The Gut Microbiome Molecular Mimicry Piece in the Multiple Sclerosis Puzzle. *Front Immunol* 13: 972160.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972160>
 57. Kinashi Y, Hase K (2021) Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Front Immunol* 12: 673708.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673708>
 58. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS (2013) The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic T Reg Cell Ho-

- meostasis. *Science* 341: 569–573.
<https://doi.org/10.1126/science.1241165>
59. *Masetti G, Ludgate M.* (2020) Microbiome and Graves' Orbitopathy. *Eur Thyroid J* 9: 78–85.
<https://doi.org/10.1159/000512255>
60. *Paray BA, Albeshr MF, Jan AT, Rather IA* (2020) Leaky Gut and Autoimmunity: An Intricate Balance in Individuals Health and the Diseased State. *Int J Mol Sci* 21: 9770.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249770>
61. *Manfredo Vieira S, Hiltensperger M, Kumar V, Zegarra-Ruiz D, Dehner C, Khan N, Costa FRC, Tiniakou E, Greiling T, Ruff W* (2018) Erratum: The Report “Translocation of a Gut Pathobiont Drives Autoimmunity in Mice and Humans”. *Science* 359(6380): 1156–1161.
<https://doi.org/10.1126/science.aar7201>
62. *Kibbie JJ, Dillon SM, Thompson TA, Purba CM, McCarter MD, Wilson CC* (2021) Butyrate Directly Decreases Human Gut Lamina Propria CD4 T Cell Function through Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition and GPR43 Signaling. *Immunobiology* 226: 152126.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152126>
63. *Kaisar MM, Pelgrom LR, van der Ham AJ, Yazdanbakhsh M, Everts B* (2017) Butyrate Conditions Human Dendritic Cells to Prime Type 1 Regulatory T Cells via Both Histone Deacetylase Inhibition and G Protein-Coupled Receptor 109A Signaling. *Front Immunol* 8: 1429.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01429>
64. *Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikly S, Van Der Veeken J, Deroos P, Liu H, Cross JR, Pfeiffer K, Coffey PJ* (2013) Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation. *Nature* 504: 451–455.
<https://doi.org/10.1038/nature12726>
65. *Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF* (2006) FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* 126: 375–387.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>
66. *Raugh A, Allard D, Bettini M* (2022) Nature vs. Nurture: FOXP3, Genetics, and Tissue Environment Shape Treg Function. *Front Immunol* 13: 911151.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911151>
67. *Fathi M, Yakili K, Yaghoobpoor S, Tavasol, Jazi K, Mohamadkhani A, Klegeris A, McElhinney A, Mafi Z, Hajjesmaeili M* (2022) Dynamic Changes in Kynurenine Pathway Metabolites in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Front Immunol* 13: 1013784.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1013784>
68. *Li H, Ning S, Ghandi M, Kryukov GV, Gopal S, Deik A, Souza A, Pierce K, Keskula P, Hernandez D* (2019) The Landscape of Cancer Cell Line Metabolism. *Nat Med* 25: 850–860.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0404-8>
69. *Navarro MN, Gómez de las Heras MM, Mittelbrunn M.* (2022) Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism in the Immune Response, Autoimmunity and Inflammation. *Br J Pharmacol* 179: 1839–1856.
<https://doi.org/10.1111/bph.15477>
70. *Grahnert A, Grahnert A, Klein C, Schilling E, Wehrhahn J, Hauschildt S* (2011) NAD⁺: A Modulator of Immune Functions. *Innate Immun* 17: 212–233.
<https://doi.org/10.1177/1753425910361989>
71. *Burns M, Ostendorf L, Biesen R, Grützkau A, Hiepe F, Mei HE, Alexander T* (2021) Dysregulated Cd38 Expression on Peripheral Blood Immune Cell Subsets in SLE. *Int J Mol Sci* 22: 2424.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052424>
72. *Kar A, Mehrotra S, Chatterjee S* (2020) CD38: T Cell Immuno-Metabolic Modulator. *Cells* 9: 1716.
<https://doi.org/10.3390/cells9071716>
73. *Kwon HS, Lim HW, Wu J, Schnölzer M, Verdin E, Ott M* (2012) Three Novel Acetylation Sites in the Foxp3 Transcription Factor Regulate the Suppressive Activity of Regulatory T Cells. *J Immunol* 188: 2712–2721.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100903>
74. *Elkhal A, Bieffer HRC, Heinbokel T, Uehara H, Quante M, Seyda M, Schuitensmaker JM, Krenzien F, Camacho V, De La Fuente MA* (2016) NAD⁺ Regulates Treg Cell Fate and Promotes Allograft Survival via a Systemic IL-10 Production That Is CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent. *Sci Rep* 6: 22325.
<https://doi.org/10.1038/srep22325>
75. *Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S* (2011) Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is a Signaling Protein in Long-Term Tolerance by Dendritic Cells. *Nat Immunol* 12: 870–878.
<https://doi.org/10.1038/ni.2077>
76. *Buonaguro L, Mayer-Mokler A, Flohr C, Reinhardt C, Singh-Jasuja H, Accolla R, Tosi G, Ma YT, Adams D, Valmori D* (2017) Corrigendum to “New Vaccination Strategies in Liver Cancer”. *Cytokine Growth Factor Rev* 36: 125–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.06.010>

The Role of Tryptophan Metabolites and Short-Chain Fatty Acids in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases

O. P. Shatova^{a, b, d, *}, E. M. Yagodkina^a, S. S. Kaydoshko^a,
A. A. Zabolotneva^{a, d}, and A. V. Shestopalov^{a, c, d}

^a*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^b*Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia*

^c*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

^d*National Research Center of Endocrinology, Moscow, Russia*

*e-mail: shatova.op@gmail.com

Every year, the prevalence of autoimmune diseases in the world is steadily increasing. The etiology and pathogenesis of autoimmune disease are extremely complex and largely remain unclear. However, a growing body of research data in recent years points to the critical role of microorganisms in the formation of normal immune response and autoimmune reactions in the host organism. In this case, one of the leading roles is assigned to the intestinal microbiota, represented by trillions of microbes that form a wide range of signaling and immunoregulatory metabolites. Forming a complex interdependent host-microbiota system, symbiotic bacteria largely determine the development and functioning of human immune cells. In this review, we consider the role of the intestinal microbiota and its key metabolites (namely, short-chain fatty acids and tryptophan metabolites) in the pathogenesis of autoimmune disease and discuss possible mechanisms of the influence of these signaling molecules on host immune cells.

Keywords: autoimmunity, tryptophan metabolites, short chain fatty acids, microbiota, dysbiosis

5-НТ2-РЕЦЕПТОРЫ И 5-ГИУК – ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ, ПРОГРЕССИРОВАНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ У НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС В МОНОКРОТАЛИНОВОЙ МОДЕЛИ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

© 2023 г. Д. Ф. Билалова^{1, *}, Р. Р. Нигматуллина¹, А. А. Мустафин^{1, 2}

¹Казанский государственный медицинский университет,
Казань, Республика Татарстан, Россия

²Детская республиканская клиническая больница МЗ РТ,
Казань, Республика Татарстан, Россия

*E-mail: Diana_bilalova@hotmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 19.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

При легочной артериальной гипертензии подавление пролиферации эндотелиальных клеток сосудов и взаимодействие эндотелиальных с гладкомышечными клетками нарушены. Выявлено участие 5-НТ2а-рецепторов в митогенном действии на эндотелиальные, а 5-НТ2b-рецепторов на гладкомышечные клетки сосудов. Известно, что одним из основных органов, в котором происходит метаболизм серотонина, является легкое. В эндотелиальных клетках сосудов легких под действием фермента моноаминоксидазы А серотонин превращается в 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-ГИУК), которая впоследствии выводится с мочой. В настоящее время при лечении детей с легочной гипертензией не учитывается роль 5-НТ2-рецепторов. Нами модифицирована монокроталиновая модель легочной гипертензии для неполовозрелых крыс-самцов. Также разработана и апробирована схема введения блокатора 5-НТ2-рецепторов для профилактики и лечения легочной гипертензии у неполовозрелых крыс. В нашем исследовании выявлена положительная корреляция концентрации 5-ГИУК в моче со степенью легочной гипертензии, что может стать потенциальным маркером этого заболевания. Полученные данные свидетельствуют о развитии легочной гипертензии у неполовозрелых крыс самцов после однократного введения монокроталина в виде замещения легочной ткани фиброзной, развитием пневмосклероза и бронхоэктазов. Также у животных в данной модели формируются изменения структуры сердечной мышцы и сосудистой стенки с развитием фиброзной ткани, что может свидетельствовать о вовлеченности 5-НТ2-рецепторов в активацию фибробластов и соответственно в патогенез легочной гипертензии.

Ключевые слова: серотонин, легочная гипертензия, монокроталин, 5-НТ2а- и 5-НТ2b-рецепторы, неполовозрелые крысы, фиброз, 5-гидроксииндолуксусная кислота

DOI: 10.31857/S0869813923080022, EDN: NOKUOF

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большое внимание уделяется изучению серотонинергической системы. Достаточно хорошо изучены молекулярные и клеточные механизмы синтеза серотонина [1, 2], его метаболизма [3, 4], рецепторного взаимодействия [5, 6].

Естественное подавление пролиферации эндотелиальных клеток сосудов и взаимодействие эндотелиальных с гладкомышечными клетками оказываются при легочной артериальной гипертензии нарушенными.

Нейрогормон серотонин — представитель биогенных аминов, синтезируется серотонинергическими нейронами в ЦНС, а на периферии — клетками APUD-системы кишечника. Содержание серотонина в плазме крови незначительно, его основное депо — тромбоциты, где концентрация этого гормона в сотни раз выше [7, 8]. Серотонин выделяется под влиянием стимулов, активирующих тромбоциты: тромбин, коллаген, сам серотонин. Активация тромбоцитов приводит к выбросу серотонина, который через 5-НТ₂-рецептор, находящийся на мембране, приводит к активации других тромбоцитов [9, 10]. На мембране эндотелиальных клеток, так же, как и у тромбоцитов, имеется белок-переносчик (SERT), способный захватывать и накапливать серотонин в клетке. Выявлено митогенное влияние 5-НТ_{2a}-рецептора на эндотелиальные клетки, 5-НТ_{2b}-рецептора — на гладкомышечные клетки сосудов [11–13].

Широкий спектр эффектов серотонина объясняется наличием большого разнообразия серотониновых рецепторов [14, 15]. Синтезированы препараты с терапевтическим эффектом, основанным на стимуляции и блокаде серотониновых рецепторов [16, 17]. Выявлена эффективность блокаторов 5-НТ₂-рецепторов в предупреждении развития легочной гипертензии у крыс [18].

Основным органом, метаболизирующим серотонин, является легкое. В эндотелиальных клетках сосудов легких под действием фермента моноаминоксидазы А серотонин превращается в 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-ГИУК), которая впоследствии выводится с мочой [12, 19, 20]. Исследования показывают причастность серотонина и его рецепторов в развитие хронической сердечной недостаточности и в морфофункциональном ремоделировании миокарда [10, 21, 22].

В настоящее время для лечения легочной гипертензии у пациентов детского возраста используется ограниченный спектр лекарственных препаратов, что частично обусловлено сложностью и дороговизной создания лабораторной модели легочной гипертензии на животных неполовозрелого возраста. На данный момент существует несколько лабораторных моделей, разработанных на новорожденных ягнятах [18, 23], однако данные модели сложны для воспроизведения и требуют специальных хирургических навыков, что может усложнять серийные исследования новых типов препаратов, их терапевтические эффекты и побочные действия на неполовозрелый возраст.

Целью нашего исследования является разработка доступной модели легочной гипертензии, методов диагностики и лечения у неполовозрелых крыс с позиций серотонинергической регуляции с возможностью дальнейшего применения данных методов у детей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В работе были использованы крысы-самцы линии Wistar в возрасте 4 нед. массой тела 50–60 г, питомника “Пушино”. Крыс содержали в комнатах с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 22–26°C, относительная влажность 30–70%, световой режим день/ночь). Клетки были снабжены решеткой из нержавеющей стали с углублением для корма, поликарбонатной поилкой с крышкой-ниппелем из нержавеющей стали. В качестве подстилки использовали “Лигноцель” (ООО “Реттенмайер-Рус”). Использовали полнорационный комбикорм для мелких лабораторных животных для конвекционального содержания “Чара” (ЗАО “Ассортимент-Агро”). Корм давали *ad libitum* в кормовое углубление клетки,

фильтрованную водопроводную воду – также ad libitum в поилках. Замену клетки с подстилом осуществляли один раз в три дня, решетки с аксессуарами – один раз в неделю. Бутылки с водой заменяли на новые один раз в два дня. Влажную уборку комнат, где содержали животных, проводили ежедневно. Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Экспериментальные протоколы

Экспериментальные животные ($n = 60$) подразделялись на четыре группы: группы 1, 2, 3 включали крыс с однократным подкожным введением монокроталина (МСТ) (60 мг/кг): группа 1 (группа МСТ-контроль) получила однократное подкожное введение МСТ в дозе 60 мг/кг; группе 2 (МСТ-профилактика) предварительно вводили селективный блокатор 5-HT_{2a}/5-HT_{2c}-рецепторов – кетансерин в дозе 0.05 мг/кг, внутримышечно, за сутки до введения МСТ. Животным группы 3 (МСТ-лечение) вводили этот же блокатор дозе 0.05 мг/кг внутримышечно 1 раз в день на протяжении 4 нед., после введения МСТ. Группа 4 (контроль) ежедневно получала 0.9%-ный раствор NaCl подкожно (0.5 мл) без предварительного введения МСТ. Исследования каждой из групп проводились через 4 нед. после введения МСТ.

Метод иммуоферментного анализа (ИФА) для количественного определения 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в моче

Количественное определение 5-ГИУК в моче проводилось с помощью набора для ИФА (IBL, Гамбург, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. До проведения ИФА осуществлялось модифицирование 5-ГИУК метилированием. Набор ИФА для количественного определения 5-ГИУК основан на твердофазном конкурентном варианте ИФА. На поверхности лунок планшета (твердой фазе) иммобилизованы молекулы антигена. Молекулы модифицированной 5-ГИУК, содержащиеся в стандартах, контролях и исследуемых образцах, и иммобилизованные на твердой фазе конкурируют за ограниченное число центров связывания специфических антител антисыворотки. После того, как реакция связывания достигнет равновесия, несвязавшиеся с твердой фазой антигены и комплексы “антиген–антитело” удаляются промывкой. Антитела, связавшиеся с иммобилизованным на твердой фазе антигеном, выявляются с помощью конъюгата – антител к IgG кролика, меченных пероксидазой. В качестве субстрата используется тетраметилбензидин. Интенсивность цветовой реакции измерялась при длине волны 450 нм. Количество 5-ГИУК в исследуемых образцах рассчитывалось по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям в стандартах. Моча для определения 5-ГИУК собиралась в индивидуальных метаболических клетках в объеме 200 мкл в герметичную пробирку. Образцы хранились при температуре -20°C до проведения анализа. У контрольной группы метод забора мочи не отличался.

Инвазивное измерение давления в легочной артерии

Давление в легочной артерии измеряли инвазивным путем. Предварительно животных анестезировали внутривенным введением 30%-ного раствора уретана в дозе 800 мг/кг. Искусственную вентиляцию легких обеспечивали мешком Амбу через введенную в ротовую полость интубационную трубку диаметром 2.5 мм с раздуваемой для герметичности манжетой. Послойно вскрывали грудную клетку с последующим разведением краев грудины для визуализации сердца и сосудистого пучка. Производили канюляцию легочной артерии катетером диаметром 24 G (Va-

sofix® Certo, В. Braun, США), соединенным с магистралью, заполненной жидкостью для передачи колебаний давления. Последующее снятие цифровых данных осуществляли с помощью системы мониторинга Infinity® Acute Care System (Dräger, Германия). Далее производился забор крови, из которой затем отделяли плазму.

Гистологическое исследование препаратов

После проведения инвазивного исследования давления в легочной артерии выделяли сердце и разделяли его на отделы. При выделении правого желудочка оценивали макропрепарат для определения степени гипертрофии миокарда. Материал фиксировали в забуференном формалине в течение 6–24 ч, после чего препараты заливали в парафин по стандартной схеме. На стекла с электроадгезивным покрытием фиксировали парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм, приготовленные на микротоме (Microm HM 340E, Германия) из парафиновых блоков. Срезы подвергались депарафинированию и обезвоживанию посредством последовательной инкубации в толуоле – 2 смены по 5 мин, абсолютном этаноле – 2 смены по 5 мин, 95%-ном этаноле – 2 смены по 3 мин. Для определения морфологических изменений в структуре миокарда и сосудов проводилось стандартное окрашивание гематоксилином и эозином.

Для оценки развития и перестройки соединительной ткани сердца препараты окрашивали по Ван Гизону. При данном методе окрашивания коллагеновые и эластические волокна приобретают красный/ярко-розовый цвет, что позволяет количественно оценить их размеры на препарате.

Препарат миокарда правого желудочка, легочной артерии, легочной ткани фиксировался в парафин и проходил процесс депарафинизации по тому же принципу. Стекла со срезами переносились в дистиллированную воду. Далее происходила окраска железным гематоксилином Вейгерта в течение 3–15 мин, с последующим промыванием в проточной дистиллированной воде в течение нескольких минут. Следующий этап – это окраска красителем Ван Гизона в течение 5 мин, с последующей быстрой промывкой в дистиллированной воде (5–15 с). Срезы заключали в канадский бальзам после проведения через толуол и 96%-ный спирт. Время пребывания срезов в каждой порции составляло 1–2 мин. На микрофотографиях при помощи системы анализа изображений ImageJ количественно оценивались площади, окрашенные в красный/ярко-розовый цвет.

Статистический анализ

Результаты исследования подвергались статистической обработке с использованием программного комплекса Microsoft Office Excel 2010, Statistica V.10.0. Для проверки нормальности выборок использовался тест Колмогорова–Смирнова или Шапиро–Вилк (Shapiro–Wilk). Для дисперсионного анализа использовали тест ANOVA. Все результаты представлены в виде $M \pm SD$. Достоверность различий между средними величинами оценивалась по критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0.05$. Корреляционный анализ между рассматриваемыми признаками проводился по методу Пирсона. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95%-ного доверительного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наиболее выраженные статистически значимые различия между группами отмечались по концентрации 5-ГИУК. У животных 1-й группы концентрации 5-ГИУК в

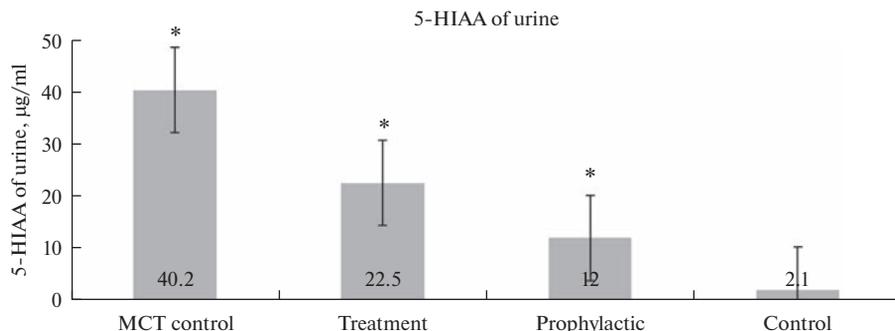


Рис. 1. Концентрация 5-ГИУК в моче у экспериментальных групп животных. * – $p < 0.001$.

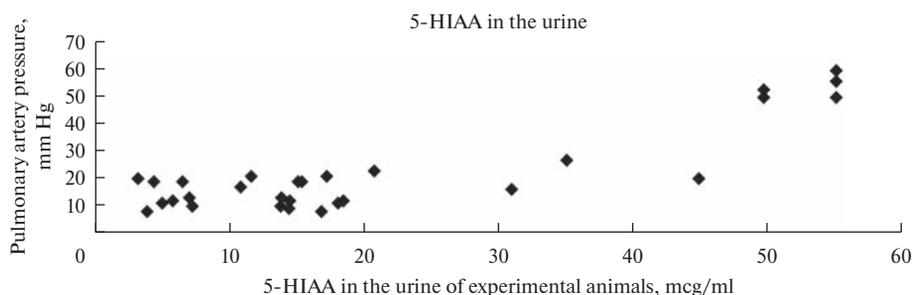


Рис. 2. Зависимость концентрации 5-ГИУК мочи крыс от давления в легочной артерии.

моче были максимальными и отличались от показателей 2-, 3-й и контрольной (4-й) группы в 2–4 раза ($p < 0.001$). У животных 2-й и 3-й группы уровень 5-ГИУК в моче был повышен относительно контрольной группы в 6–10 раз ($p < 0.05$) (рис. 1).

Полученные результаты показывают прямую положительную зависимость величины концентрации 5-ГИУК от степени легочной гипертензии (рис. 2).

При сравнительном анализе групп по уровню систолического артериального давления в легочной артерии были выявлены статистически значимые различия по уровню 5-ГИУК (рис. 3). В группе с выявленной легочной артериальной гипертензией уровень 5-ГИУК повышался более чем в 2 раза.

При гистологическом исследовании материалов выявлены статистически значимые различия степени развития фиброзной ткани. При исследовании легочной артерии выявлены статистически значимые различия в развитии фиброзной ткани между исследуемыми группами. У животных 1-й группы (МСТ-контроль) степень развития фиброзной ткани была максимальной и отличалась от показателей 2-й, 3-й и контрольной (4-й) групп в 2 раза ($p < 0.001$). У животных 2-й и 3-й групп (группы профилактики и лечения) в степени развития фиброзной ткани значимых межгрупповых различий не выявлено (рис. 4).

При оценке стенки легочной артерии 1-й группы выявлено снижение толщины мышечных волокон в 2 раза по сравнению с контрольной группой, однако статистически значимых различий между 1-й, 2-й и 3-й группами не выявлено (рис. 5).

В миокарде правого желудочка у животных 1-й группы (МСТ-контроль) степень развития фиброзной ткани была максимальной и отличалась от контрольной (4-й) группы в 3 раза ($p < 0.001$), от 2-й и 3-й групп в 2 раза ($p < 0.001$). У животных 2-й и 3-й групп степень развития фиброзной ткани достоверных различий не имела (рис. 6).

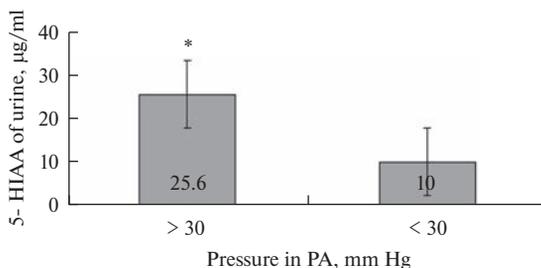


Рис. 3. Изменение концентрации 5-ГИУК в моче у крыс при нормальном и повышенном давлении в легочной артерии. * $p < 0.05$.

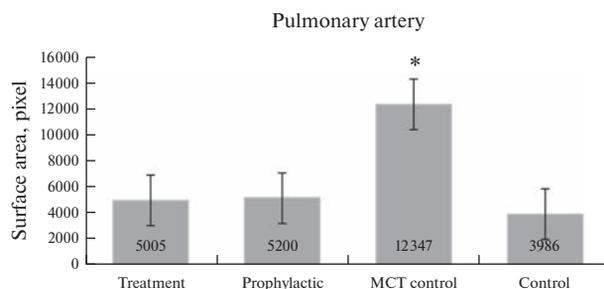


Рис. 4. Развитие фиброзной ткани в стенке легочной артерии при введении и без введения блокатора 5-НТ2а/с-рецепторов. * — $p < 0.001$.

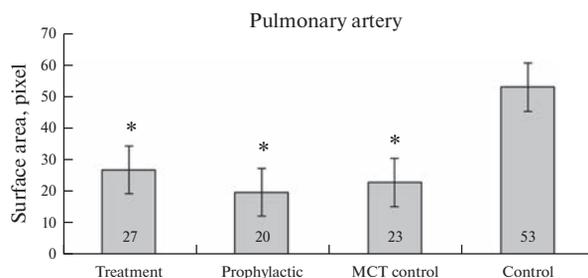


Рис. 5. Толщина волокон мышечного слоя в стенке легочной артерии при введении и без введения блокатора 5-НТ2а/с-рецепторов. * — $p < 0.001$.

При исследовании легочной ткани разделялись центральные и периферические отделы легких. Данные отделы отличались калибром сосудов, бронхов и плотностью легочной ткани. В тканях центрального отдела легких у животных 1-й группы (МСТ-контроль) степень развития фиброзной ткани была максимальной и отличалась от 2-й, 3-й и контрольной (4-й) групп в 4 раза ($p < 0.001$). У животных 2-й, 3-й и контрольной групп степень развития фиброзной ткани статистически значимых различий не имела (рис. 7а).

В тканях периферического отдела легких у животных 1-й группы (МСТ-контроль) степень развития фиброзной ткани была максимальной и отличалась от 2-й,

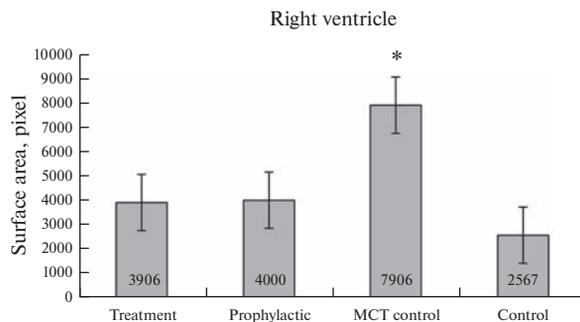


Рис. 6. Развитие фиброзной ткани в стенке правого желудочка при введении и без введения блокатора 5-HT_{2a/c}-рецепторов. * – $p < 0.001$.

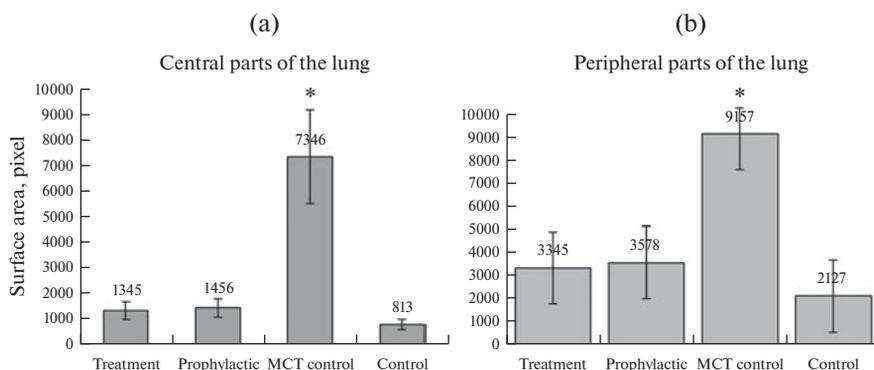


Рис. 7. Развитие фиброзной ткани в тканях легкого при введении блокатора 5-HT_{2a/c}-рецепторов с лечебной и профилактической целью. * – $p < 0.001$.

3-й и контрольной (4-й) групп в 4 раза ($p < 0.001$). В нижних отделах легких наблюдался выраженный склероз тканей с утолщением стенок сосудов и с формированием обширных бронхоэктазов (рис. 8a, b). У животных 2-й, 3-й и контрольной групп степень развития фиброзной ткани статистически значимых различий не имела (рис. 7a, b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотонинергическая система регуляции имеет непосредственное влияние на сердечно-сосудистую систему как в эмбриональном, так и в постнатальном развитии, что было хорошо изучено [11, 24]. В данном исследовании разработана доступная лабораторная модель легочной гипертензии в период интенсивного роста, то есть в пубертатном периоде онтогенеза животных. В проведенном исследовании показано статистически значимое снижение интенсивности развития легочной гипертензии и изменения легочной ткани путем исключения 5-HT_{2a}/5-HT_{2c}-рецепторов из патогенеза данного заболевания.

Наше исследование направлено на апробирование метода ранней диагностики легочной гипертензии, ее профилактики и лечения путем воздействия непосредственно на специфические рецепторы серотонина, вовлеченные в патогенез легочной гипертензии.

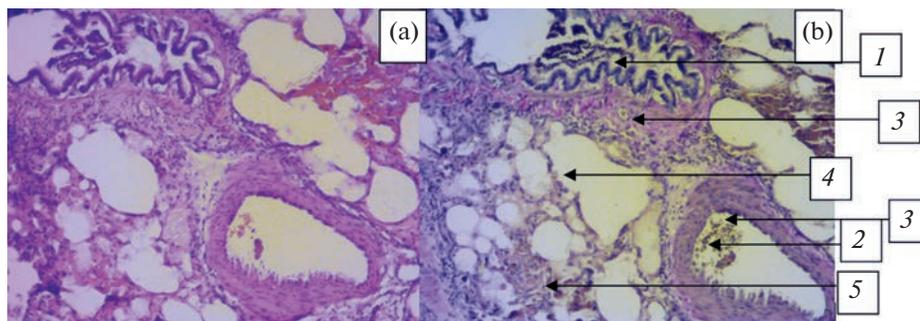


Рис. 8. Развитие фиброзной ткани, пневмосклероза, ателектазов в тканях легких после однократного введения монокроталина (группа МСТ-контроль). (а) – окраска гематоксилином и эозином; (б) – окраска по Ван Гизону. 1 – альвеола; 2 – сосуд; 3 – фиброзная ткань; 4 – ателектаз; 5 – пневмосклероз.

Анализ полученного материала свидетельствует о том, что потенциальными маркерами легочной гипертензии могут являться изменения концентрации 5-ГИУК в моче, которые имеют статистически значимую корреляцию со степенью легочной гипертензии. Данный метод диагностики является неинвазивным и легкодоступным в использовании, однако требует дальнейшего исследования его информативности на детях с легочной гипертензией. Полученные данные свидетельствуют о развитии легочной гипертензии у неполовозрелых крыс после однократного введения МСТ. Наблюдалось замещение легочной ткани фиброзной, развитие пневмосклероза и бронхоэктазов. Также происходило изменение структуры сердечной мышцы и сосудистой стенки с развитием фиброзной ткани, что может свидетельствовать о вовлеченности 5-НТ₂-рецепторов в активацию фибробластов и соответственно в патогенез легочной гипертензии. Изменение структуры сосудистой стенки с развитием фиброзной ткани может свидетельствовать о снижении функциональности сосудистой структуры, а именно снижении эластичности магистральных сосудов, что способствует увеличению давления в легочной артерии. Одновременно происходит утолщение сосудистой стенки за счет фиброзной ткани и гипоплазии мышечных волокон, что приводит к снижению проницаемости и способности к газообмену между легочной тканью и кровеносным руслом.

В приведенной модели легочной гипертензии у неполовозрелых крыс имеются структурные изменения, которые соответствуют продвинутой стадии легочной артериальной гипертензии в клинике, что позволяет предположить эффективность данной модели на практике.

Данные, полученные в результате введения селективного блокатора 5-НТ-рецепторов, позволяют сделать заключение о патогенетической составляющей серотонина в развитии легочной гипертензии и об эффективности лечения путем введения таргетной терапии.

Таким образом, можно предположить, что применение селективных блокаторов серотониновых рецепторов возможно расценивать в качестве специфической терапии легочной артериальной гипертензии, а предложенная модель может служить лабораторной моделью легочной гипертензии детского и подросткового возраста.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим

стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям локального этического комитета Казанского ГМУ, протокол № 3 от 22.03.2022. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00417, <https://rscf.ru/project/23-15-00417/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии финансовых или иных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции работы и планирование эксперимента (А.А.М., Р.Р.Н., Д.Ф.Б.), сбор данных (Д.Ф.Б., А.А.М., Р.Р.Н.), обработка данных (А.А.М., Р.Р.Н., Д.Ф.Б.), написание и редактирование статьи (А.А.М., Р.Р.Н., Д.Ф.Б.). Авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, а также гарантируют, что все вопросы по достоверности и надежности любой части работы надлежащим образом проанализированы и решены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cooper DM, Bierlaning CL, Halford MK (1996) Serotonin. *Mol Pharmacol* 29(2): 113–119.
2. Cote F, Thevenot E, Fligny C (2004) Disruption of the nonneuronal *5-HT_{1B}* gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13525–13530.
3. Билич ИА, Хамитов ХС (1977) Ацетилхолин и серотонин в норме и патологии желудочно-кишечного тракта. Казань. Татарск. книжн. изд. 1977: 142. [Bilich IL, Khamitov KhS (1977) Acetylcholine and serotonin are normal and enter the gastrointestinal tract. Kazan. Tat. Publ House. 1977: 142. (In Russ)].
4. Gillis CN, Pitt BR (1982) The fate of circulating amines within the pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol* 44: 269–281.
5. Choi DS, Maroteaux L (1996) Immunohistochemical localization of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. *FEBS Lett* 391(1–2): 45–51.
6. Tournois C, Mutel V, Manivet P, Launay JM, Kellermann O (1998) Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 273: 17498–17503.
7. Galiè N, Manes A, Branzi A (2004) Evaluation of pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Cardiol* 19(6): 575–581. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000142066.14966.85>
8. Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubreau P, Cerrina J, Duroux P, Drouot L (1995) Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 99(3): 249–254.
9. Houkin K, Nakayama N, Nonaka T, Koyanagi I (2005) The 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor antagonist sarpogrelate hydrochloride inhibits acute platelet aggregation in injured endothelium. *J Int Med Res* 34(1): 65–72.
10. Frille A, Rullmann M, Becker GA, Patt M, Luthardt J, Tiepolt S, Wirtz H, Sabri O, Hesse S, Seyfarth HJ (2021) Increased pulmonary serotonin transporter in patients with chronic obstructive pulmonary disease who developed pulmonary hypertension. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 48(4): 1081–1092. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05056-7>
11. Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9508–9513.
12. Mindubayeva F, Niyazova Y, Nigmatullina R, Kabiyeva S, Salikhova Y (2020) The system of serotonin and its metabolism in platelets in children with congenital heart defects of an early age. *Georg Med News* 298: 42–46.
13. Reyes-Palomares A, Gu M, Grubert F, Berest I, Sa S, Kasowski M, Arnold C, Shuai M, Srivas R, Miao S, Li D, Snyder MP, Rabinovitch M, Zaugg JB (2020) Remodeling of active endothelial enhancers is associated with aberrant gene-regulatory networks in pulmonary arterial hyperten-

- sion. *Nat Commun* 3 11(1): 1673.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15463-x>
14. *Нигматуллина РР, Земскова СН, Зефирова АЛ, Смирнов АВ* (2004) Клеточно-молекулярные механизмы функционирования и регуляции сердца : Учебно-методическое пособие для медицинских вузов. Казань. КГМУ 2004: 109. [*Nigmatullina RR, Zemskova SN, Zefirova AL, Smirnov AV* (2004) Cellular and molecular mechanisms of functioning and regulation of the heart. Kazan. KGMU 2004: 109. EDN EFFAZQ. (In Russ)].
 15. *Adham N, Kao HT, Schercter LE* (1993) Classification of receptors for serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 408–412.
 16. *Mindubayeva F, Niyazova Y, Nigmatullina R* (2020) Membrane serotonin transporter as a biomarker of pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart defect. *RJPT* 5(13): 2435–2438.
<https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00436.9>
 17. *Affas S, AlhajSakur A* (2019) New Simple Spectrophotometric Method for the Simultaneous Estimation of the Mixtures of Sildenafil and some Serotonin Reuptake Inhibitors. *Res J Pharm and Techn* 12(2): 711–716.
 18. *Martinho S, Adão R, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C* (2020) Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Pathophysiological Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Front Pediatr* 24(8): 342.
<https://doi.org/10.3389/fped.2020.00342>
 19. *Launay JM, Hervé P, Callebert J, Mallat Z, Collet C, Doly S, Belmer A, Diaz SL, Hatia S, Côté F, Humbert M, Maroteaux L* (2012) Serotonin 5-HT_{2B} receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension. *Blood* 119: 1772–1780.
 20. *Mustafin AA, Nigmatullina RR, Bilalova DF* (2018) Serotonin as the main cause of pulmonary hypertension: from hypothesis to medical practice. *Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sci* 3: 107–111.
 21. *Masarwa R, Bar-Oz B, Gorelik E, Reif S, Perlman A, Matok I* (2019) Prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and serotonin norepinephrine reuptake inhibitors and risk for persistent pulmonary hypertension of the newborn: a systematic review, meta-analysis, and network meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 220(1): 57.e1–57.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.08.030>
 22. *Kirillova V, Nigmatullina R, Dzhordzhikiya R, Kudrin V, Klodt P* (2009) Increased concentrations of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in blood plasma from patients with pulmonary hypertension due to mitral valve disease. *Bull Exp Biol Med* 147(4): 408–410.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0527-x>
 23. *Abman SH, Shanley PF, Accurso FJ* (1989) Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs. *J Clin Invest* 83(6): 1849–1858.
<https://doi.org/10.1172/JCI114091>
 24. *Delaney C, Gien J, Grover TR, Roe G, Abman SH* (2011) Pulmonary vascular effects of serotonin and selective serotonin reuptake inhibitors in the late-gestation ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301(6): L937–L944.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00198.2011>

5-HT₂-Receptors and 5-HIAA – Therapeutic Targets for Evaluation of Severity, Progression and Effectiveness of Treatment in Immature Male Rats in a Monocrotalin Model of Pulmonary Hypertension

D. F. Bilalova^{a, *}, R. R. Nigmatullina^a, and A. A. Mustafin^{a, b}

^a*Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia*

^b*Children's Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia*

^{*}*e-mail: Diana_bilalova@hotmail.com*

Suppression of the proliferation of vascular endothelial cells and the interaction of endothelial with smooth muscle cells in pulmonary hypertension (PH) are impaired. Participation of the 5-HT_{2a}-receptor in the mitogenic effect on endothelial, and 5-HT_{2b}-receptor – on vascular smooth muscle cells was revealed. The main organ that metabolizes serotonin is the lung. In the endothelial cells of the vessels of the lungs under the action of the enzyme monoamine oxidase And serotonin is converted to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), which is subsequently excreted in the urine. Currently, the

role of 5-HT₂-receptors is not taken into account in the treatment of children with pulmonary hypertension. We have modified the monocrotaline model of pulmonary hypertension for immature rats. A scheme for the administration of a 5-HT₂-receptor blocker for the prevention and treatment of pulmonary hypertension in immature rats was developed and tested. A positive correlation was found between the concentration of 5-HIAA in urine and the degree of pulmonary hypertension, which can become a potential marker of pulmonary hypertension. The data obtained indicate the development of pulmonary hypertension in immature rats after a single injection of monocrotaline in the form of replacement of lung tissue with fibrous tissue, the development of pneumosclerosis and bronchiectasis. Also, in animals in this model, changes in the structure of the heart muscle and vascular wall are formed with the development of fibrous tissue, which may indicate the involvement of 5HT₂-receptors in the activation of fibroblasts and, accordingly, in the pathogenesis of pulmonary hypertension.

Keywords: serotonin, pulmonary hypertension, monocrotaline, 5-HT_{2a}- and 5-HT_{2b}-receptors, 5-HIAA, immature rats, fibrosis

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ХОЛЕЦИСТОКИНИНА
НА ИМПУЛЬСНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ДОРСОМЕДИАЛЬНОГО
И ВЕНТРОМЕДИАЛЬНОГО ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА КРЫС**

© 2023 г. А. А. Спиричев¹, К. Ю. Моисеев¹, П. А. Анфимова¹,
Г. А. Тарасова¹, П. М. Маслоуков^{1, *}

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

*E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 11.05.2023 г.

После доработки 14.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Целью работы являлся анализ фоновой и вызванной внутривенным введением сульфатированного октапептида холецистокинина (ССК), а также антагониста холецистокинина проглумида импульсной нейронной электрической активности в дорсомедиальном (ДМЯ) и вентромедиальном (ВМЯ) ядрах гипоталамуса у самцов молодых (2–3 мес.), взрослых (12 мес.) и старых (24 мес.) крыс под уретановым наркозом. Средняя частота фоновой импульсации нейронов при внутривенном введении ССК у молодых крыс в ДМЯ достоверно снижалась с 1.5 ± 0.4 до 0.2 ± 0.1 имп./с, в ВМЯ – с 2.0 ± 0.4 до 0.9 ± 0.2 имп./с. Одновременное введение ССК и проглумида не приводило к изменению характера нейронной активности в данной возрастной группе. У взрослых и старых крыс средняя фоновая частота разрядов нейронов ДМЯ и ВМЯ была ниже в сравнении с молодыми крысами и под влиянием ССК и проглумида достоверно не менялась. В ДМЯ и ВМЯ большая часть нейронов ингибировалась ССК, при этом в ДМЯ процент ингибируемых ССК нейронов был выше по сравнению с ВМЯ. В ДМЯ молодых животных отсутствовали нейроны, активируемые ССК, которые появлялись у взрослых и старых животных.

Ключевые слова: гипоталамус, холецистокинин, импульсная активность, электрофизиология, старение

DOI: 10.31857/S0869813923080101, EDN: GKKVLT

ВВЕДЕНИЕ

Дорсомедиальное (ДМЯ) и вентромедиальное (ВМЯ) ядра гипоталамуса играют важную роль в регуляции метаболических процессов, энергетического обмена, модуляции различных поведенческих и физиологических ритмов, включая контроль времени питания, двигательной активности, секреции кортикостерона и циклов сна–бодрствования [1–4]. Активность нейронов гипоталамуса, в том числе нейронов ДМЯ и ВМЯ, помимо контроля со стороны других нервных центров, находится под влиянием гормонов. К числу гормонов, регулирующих потребление пищи, относится холецистокинин (ССК) [5].

ССК является также очень распространенным нейропептидом, экспрессирующимся как в центральной, так и в периферической нервной системе. ССК участвует в контроле приема пищи, подавляя аппетит, а также регулирует опорожнение желудка, желчного пузыря и экзокринную секрецию поджелудочной железы [6].

Рецепторы к ССК подразделяются на ССК1 и ССК2 [6], при этом в ДМЯ преобладают ССК2. ССК оказывает тормозящее влияние на нейроны ДМЯ в экспериментах *in vitro* на срезах мозга [7], а также на нейроны ВМЯ в опытах *in vivo* [8]. В то же время ССК способствует увеличению частоты импульсации нейронов ВМЯ *in vitro* [9].

Данные наших предыдущих исследований свидетельствуют, что при старении изменяется нейронная организация ДМЯ и ВМЯ [10, 11], а также функциональные особенности нейронов, в том числе наблюдается уменьшение частоты их импульсации [12, 13]. Старение сопровождается развитием возраст-зависимой патологии, в том числе ожирением и развитием метаболического синдрома [14]. При этом может снижаться чувствительность нейронов гипоталамуса к гормонам, регулирующим обмен веществ, например, к лептину и инсулину [15]. Тем не менее отсутствуют литературные данные относительно влияния на гипоталамус других гормонов, влияющих на пищевое поведение, в том числе ССК при старении. Целью настоящей работы был анализ фоновой и вызванной внутривенным введением сульфатированного октапептида холецистокинина (ССК), а также антагониста холецистокинина проглумида, импульсной нейронной электрической активности в дорсомедиальном (ДМЯ) и вентромедиальном (ВМЯ) ядрах гипоталамуса у самцов молодых (2–3 мес.), взрослых (12 мес.) и старых (24 мес.) крыс под уретановым наркозом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 2–3-месячных (молодые, $n = 42$, масса тела 160–180 г), 12-месячных (взрослые, $n = 49$, масса тела 320–340 г) и 24-месячных (старые, $n = 46$, масса тела 450–500 г) самцов крыс Вистар. Животные находились в стандартных условиях содержания, пищевая депривация перед экспериментом не проводилась, т.к. при таком состоянии эффекты ССК менее выражены [16]. Эксперименты выполнялись под уретановым наркозом в дозировке 1.3 г/кг *i.p.* По окончании эксперимента животных умерщвляли передозировкой уретана (3 г/кг).

Анестезированных крыс фиксировали в стереотаксисе (RWD, Китай) и производили трепанацию черепа в области проекции ДМЯ и ВМЯ. Нейронную активность регистрировали внеклеточно с помощью вольфрамового микроэлектрода (диаметр кончика 2–3 мкм, импеданс 1 МОм, Microprobes, США), который вводили вертикально в правое ДМЯ и ВМЯ. Координаты введения в соответствии с атласом мозга крысы [17] составляли (рис. 1): росто-каудально –3.0–3.3 мм от брегмы, медиально-латерально 0.3–0.5 мм (ДМЯ и ВМЯ); дорсально-вентрально: 8.1–8.4 мм (молодые), 8.3–8.6 мм (взрослые и старые) – ДМЯ, 9.2–9.4 мм (молодые), 9.4–9.6 мм (взрослые и старые) – ВМЯ. Вертикальное погружение электрода проводили при помощи одноосного гидравлического микроманипулятора MO-10 (Narishige, Япония). Электрическую активность усиливали и фильтровали с помощью усилителя переменного тока DAM 80 (World Precision Instruments, США) с полосой пропускания 300–10000 Гц. Оцифровка сигнала осуществлялась программно-аппаратным комплексом Micro1401 с использованием компьютерной программы Spike2 (все CED, Великобритания).

Регистрацию нейронной активности осуществляли через 1 ч после введения микроэлектрода. Эксперименты проводили на двух подгруппах крыс в каждой возрастной группе. В первой группе после регистрации фоновой активности спустя 10 мин внутривенно вводился ССК (сульфатированный октапептид, 20 мкг/кг, Tocris Bioscience, Великобритания). Способ введения и дозировка были выбраны с учетом литературных данных, где было показано, что внутривенное введение ССК в такой дозировке является эффективным при исследовании регистрации нейронной активности со стереотаксическим введением электродов в экспериментах *in vivo*

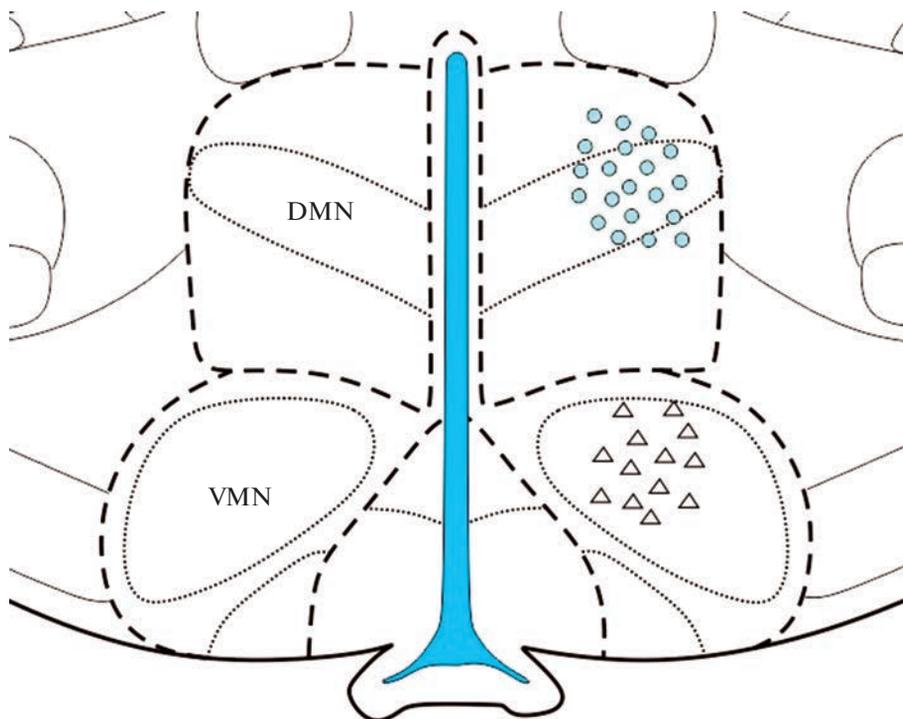


Рис. 1. Схема области регистрации нейронной активности в дорсомедиальном (DMN) и вентромедиальном (VMN) ядрах гипоталамуса (ростро-каудально: -3.12 мм от брегмы) согласно атласу мозга крысы [17]).

[8, 18]. Регистрацию нейронной активности после введения препаратов осуществляли спустя 5 мин после введения. Спустя 1 ч после восстановления характера фоновой активности вводился ССК вместе с антагонистом ССК проглумидом (1 мг/кг, Tocris Bioscience, Великобритания). Время регистрации нейронной активности после введения ССК, а также ССК + проглумид также составляло 10 мин. В контрольной подгруппе вместо ССК и проглумида вводился внутривенно 0.9%-ный раствор NaCl. Вещества вводились в объеме 0.1 мл/100 г массы тела.

В анализ были включены только нейроны со стабильным паттерном разряда на протяжении всего периода регистрации. Сортировку спайков с дальнейшим кластерным анализом проводили с использованием программного обеспечения Spike2 (Cambridge Electronic Design, Великобритания). По записям активности строили гистограммы изменения средней частоты разрядов (имп./с). Рассчитывали среднюю частоту спайков до и после введения ССК, а также после совместного введения ССК вместе с проглумидом.

По характеру изменения частоты импульсации в ответ на ССК, нейроны считались реагирующими на действие гормона, если частота изменялась на 20% по сравнению с фоновым значением. В соответствии с этим выделялись ингибируемые, активируемые и нечувствительные к действию ССК нейроны.

Для идентификации места введения электрода использовали гистологический метод. Место регистрации отмечали пропусканием постоянного тока (0.05 мА в течение 15 мин). После этого крыс перфузировали в 4%-ном забуференном форма-

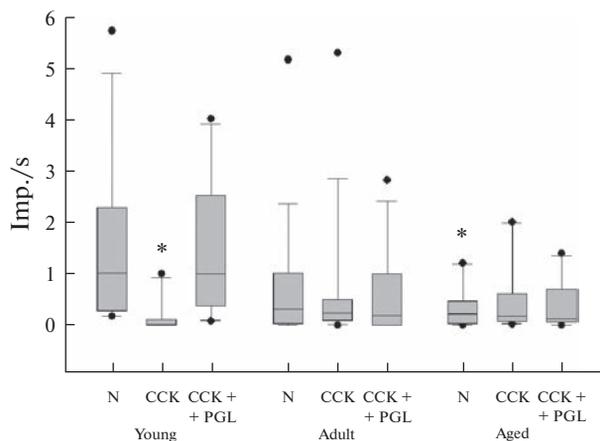


Рис. 2. Частота импульсов (Imp./s) нейронов ДМЯ до (N), после введения холецистокинина (ССК) и после совместного введения холецистокинина и проглумида (ССК + PGL) у молодых (young), взрослых (adult) и старых крыс (aged). Верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й проценти соответственно), горизонтальная линия внутри – медиана (50-й процентиль), концы отрезков – 10-й и 90-й проценти, точки – индивидуальные значения в выборке. * – $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с фоновой активностью молодых крыс.

лине и выделяли головной мозг, который дофиксировали в течение суток в этом же растворе. Делались серийные коронарные срезы медиобазальной области гипоталамуса толщиной 50 мкм с помощью криотома, срезы помещали на предметные стекла, а затем окрашивали тионином. Области повреждения определялись при помощи стереомикроскопа. Данные были исключены, если зарегистрированные нейроны не были расположены в ДМЯ или ВМЯ.

Для статистического анализа использовали программу Sigma Plot 12 (Systat Software, США). При проверке выборки на нормальность с использованием теста Шапиро–Уилка гипотеза о нормальном распределении значений переменной была отвергнута. Поэтому различия между группами анализировали с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Суммарно в ДМЯ была зарегистрирована активность 107 нейронов (30 от молодых, 38 от взрослых и 39 от старых крыс), в ВМЯ – 74 нейронов (28 от молодых, 24 от взрослых и 24 от старых крыс). Большинство нейронов ДМЯ и ВМЯ разряжалось аperiodично, небольшая часть имела строго постоянную частоту, также обнаруживались нейроны с разрядами в виде пачек из нескольких импульсов. У контрольных животных введение 0.9%-ного раствора NaCl вместо ССК и проглумида не изменяло частоту разрядов нейронов ВМЯ и ДМЯ.

Влияние ССК и проглумида на импульсацию нейронов ДМЯ

У молодых крыс при введении ССК средняя частота импульсации достоверно снижалась с 1.5 ± 0.4 до 0.2 ± 0.1 имп./с (рис. 2, 3, $p < 0.05$). После восстановления исходной частоты импульсации спустя 30 мин применение ССК и проглумида достоверно не изменяло частоту разрядов, которая в этой группе равнялась 1.4 ± 0.4 имп./с

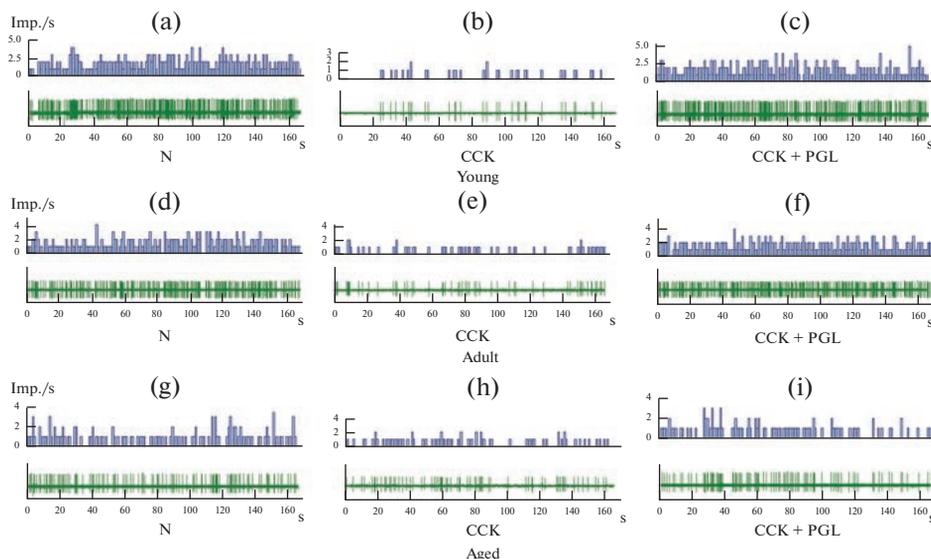


Рис. 3. Примеры фоновой активности отдельных нейронов ДМЯ до (N), после введения холецистокинина (ССК) и после совместного введения холецистокинина и проглумида (ССК + PGL) у молодых (a–c), взрослых (d–f) и старых крыс (g–i). В верхней части каждого примера – гистограмма изменения средней частоты разрядов (имп./с), в нижней – нативная спайковая активность. По оси ординат отложено время (s).

($p > 0.05$). При этом у молодых крыс большая часть нейронов (92%) ингибировалась ССК, 8% были не чувствительны к ССК, и отсутствовали нейроны, активируемые ССК (рис. 4).

У взрослых и старых крыс средняя частота импульсации в контроле была меньше и составляла 0.8 ± 0.3 у взрослых и 0.6 ± 0.1 имп./с у старых крыс (достоверные различия между молодыми и старыми крысами, $p < 0.05$). После введения ССК у взрослых частота импульсации равнялась 0.7 ± 0.3 , после проглумида – 0.7 ± 0.2 имп./с; у старых – 0.5 ± 0.2 и 0.6 ± 0.2 имп./с соответственно. В отличие от молодых крыс, частоты разрядов нейронов после введения ССК, а также ССК и проглумида у взрослых и старых животных достоверно не отличались от фоновых значений ($p > 0.05$).

У взрослых и старых крыс доля не чувствительных к ССК нейронов составляла 11%. При этом, в отличие от молодых, в этих возрастных группах обнаруживались активируемые ССК нейроны, доля которых составляла 7 и 14% соответственно.

Воздействие ССК и проглумида на частоту разрядов нейронов ВМЯ

В ВМЯ молодых крыс при введении ССК средняя частота импульсации достоверно снижалась с 2.0 ± 0.4 до 0.9 ± 0.2 имп./с ($p < 0.05$), хотя и в меньшей степени по сравнению с ДМЯ (рис. 5, 6). Так же, как и в ДМЯ, совместное введение ССК и проглумида достоверно не изменяло частоту разрядов, которая у молодых крыс составляла 1.8 ± 0.4 имп./с ($p > 0.05$).

У взрослых и старых крыс средняя частота импульсации в контроле равнялась 1.3 ± 0.4 у взрослых и 0.9 ± 0.2 имп./с у старых крыс. Так же, как и в ДМЯ, имелись достоверные различия между средней частотой разрядов между молодыми и старыми крысами ($p < 0.05$). После введения ССК у взрослых частота импульсации рав-

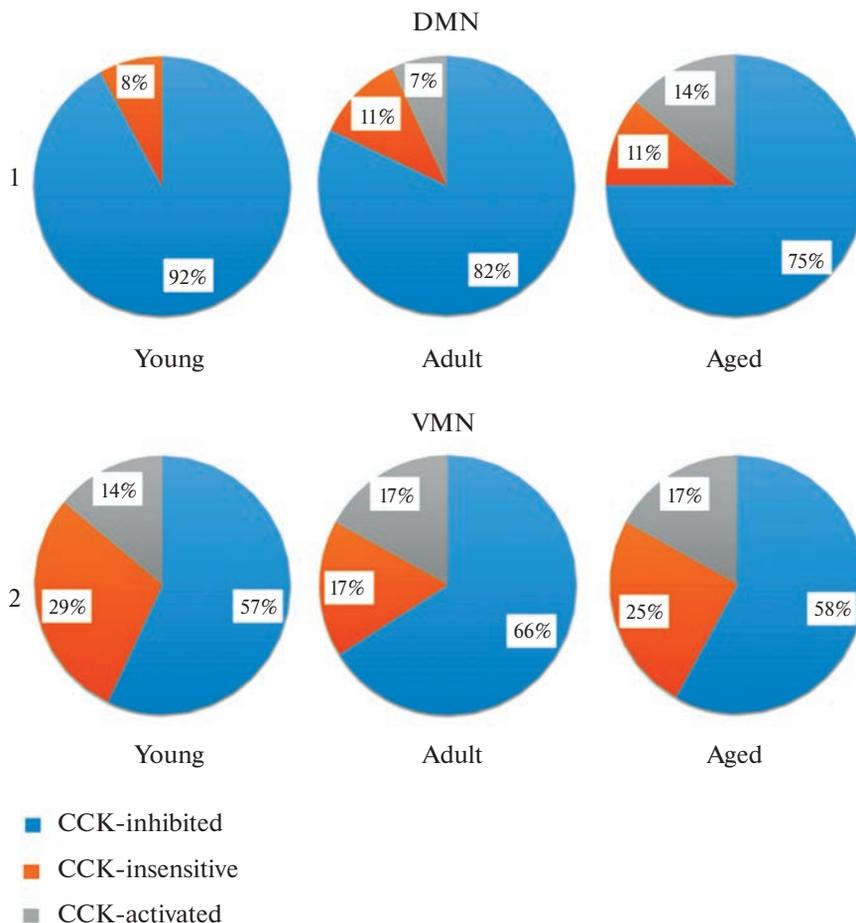


Рис. 4. Секторная диаграмма распределения нейронов, ингибируемых ССК (CCK-inhibited), индифферентных к ССК (CCK-insensitive) и активируемых ССК (CCK-activated) в ДМЯ (1) и ВМЯ (2).

нялась 0.7 ± 0.3 , у старых – 0.6 ± 0.2 имп./с. После введения ССК и проглумида – 1.3 ± 0.4 и 1.0 ± 0.2 имп./с соответственно. При этом средние частоты импульсации нейронов после введения ССК, а также ССК и проглумида у взрослых и старых животных достоверно не отличались от фоновых значений ($p > 0.05$).

Большинство нейронов ВМЯ ингибировались ССК у всех возрастных групп. При этом в отличие от ДМЯ, у всех возрастных групп отмечались нейроны, активируемые ССК, процент которых составлял от 14 до 17%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашей работы впервые позволили установить, что с возрастом происходит ослабление ингибирующих влияний ССК на нейроны ДМЯ и ВМЯ гипоталамуса. В отличие от молодых крыс, у взрослых 12-месячных и старых 24-месячных животных не наблюдались достоверные отличия по частоте импульсации нейронов до и после введения ССК. Частота фоновой импульсации нейронов ДМЯ и

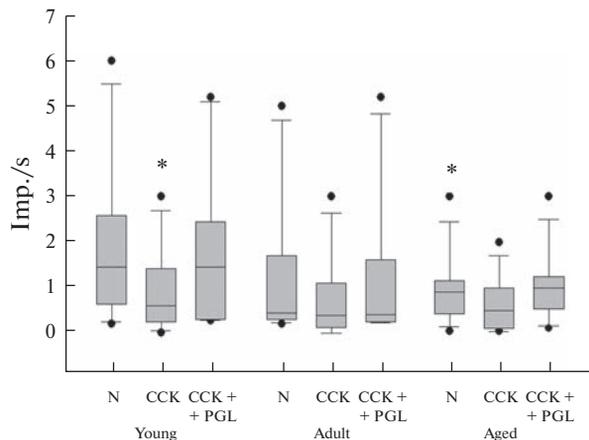


Рис. 5. Частота импульсов (Imp./s) нейронов ДМЯ до (N), после введения холецистокинина (ССК) и после совместного введения холецистокинина и проглумида (ССК + PGL) у молодых (young), взрослых (adult) и старых крыс (aged). Верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й проценти соответственно), горизонтальная линия внутри – медиана (50-й процентиль), концы отрезков – 10-й и 90-й проценти, точки – индивидуальные значения в выборке. * – $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с фоновой активностью молодых крыс.

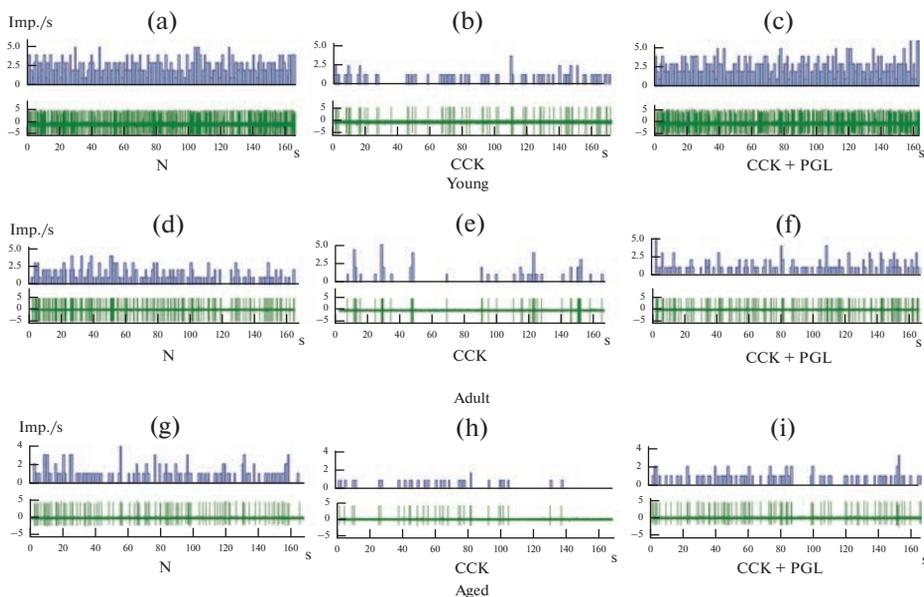


Рис. 6. Примеры фоновой активности отдельных нейронов ВМЯ до (N), после введения холецистокинина (ССК) и после совместного введения холецистокинина и проглумида (ССК + PGL) у молодых (а–с), взрослых (d–f) и старых крыс (g–i). В верхней части каждого примера – гистограмма изменения средней частоты разрядов (имп./с), в нижней – нативная спайковая активность. По оси ординат отложено время (s).

ВМЯ старых крыс была достоверно ниже по сравнению с молодыми животными, что соотносится с нашими ранее полученными данными [12, 13].

В медиобазальном гипоталамусе ССК экспрессируется главным образом в нейронах ДМЯ [19]. Данные литературы свидетельствуют, что ССК-содержащие нейроны ДМЯ колокализуют продинорфин и гастрин-высвобождающий пептид, но не содержат рецепторы к лептину и инсулину [20]. Активация этих нейронов приводит к прекращению приема пищи, вероятно, за счет вовлечения мезолимбической системы. Точные проекции этих нейронов не идентифицированы. В то же время известно, что часть нейронов ДМЯ, например, нейроны, высвобождающие пролактин-рилизинг-пептид, могут проецироваться в ядро одиночного пути, а их удаление ослабляет чувство насыщения, вызванное ССК [21]. Кроме того, NPY-содержащие нейроны ДМЯ могут косвенно влиять на передачу сигналов ССК через проекции к паравентрикулярному ядру гипоталамуса и латеральной гипоталамической области [22].

Введение ССК непосредственно в ДМЯ снижает потребление пищи, уменьшает экспрессию нейропептида NPY в этом ядре, а также увеличивает количество клеток, иммунопозитивных к гену раннего реагирования *c-fos* в паравентрикулярном, дугообразном и супрахиазматическом ядрах и ретрохиазматической области, а также в контрлатеральном ДМЯ. Этот паттерн активности отличается от такового при периферическом введении ССК, который действует короткое время и в первую очередь активирует нейроны в ядрах одиночного пути, *area postrema*, а также паравентрикулярном и дорсомедиальном ядрах [23]. В экспериментах *in vitro* на срезах гипоталамуса аппликация ССК вызывала увеличение амплитуды тормозных постсинаптических потенциалов в ДМЯ [7], а в ВМЯ вызывала увеличение частоты разрядов всех нейронов ядра [9].

При периферическом, в том числе внутривенном введении, ССК воздействует через афференты блуждающего нерва на ядро одиночного пути. Восходящие аксоны катехоламинергических нейронов заднего мозга, направляющиеся затем в паравентрикулярное ядро гипоталамуса и миндалину, опосредуют насыщающий эффект ССК на прием пищи [24–26].

По характеру ответной реакции на ССК, нами были выделены три группы нейронов ДМЯ и ВМЯ: ингибируемые ССК, активируемые ССК и нечувствительные к ССК. В ДМЯ с возрастом распределение функциональных групп между ингибируемыми и активируемыми ССК изменялось. При этом у молодых крыс в ДМЯ отсутствовали нейроны, активируемые ССК, а наибольший процент нейронов, активируемых ССК, наблюдался у старых животных. В ВМЯ с возрастом не наблюдалось выраженных изменений между долями этих групп, а численные значения соответствуют данным литературы, полученным на взрослых крысах [8]. С возрастом у человека содержание ССК в плазме крови увеличивается [27]. Увеличение содержания ССК может вызвать десенситизацию рецепторов [28], что объясняет отсутствие снижения частоты импульсации нейронов гипоталамуса в ответ на ССК при старении. Можно предположить, что при старении уменьшается и плотность рецепторов ССК2, это может приводить с возрастом также к уменьшению ответа на ССК.

Нейроны ВМЯ в меньшей степени ингибировались ССК по сравнению с ДМЯ даже у молодых животных. Также процент нейронов, ингибируемых ССК, был меньше в ВМЯ в сравнении с ДМЯ. В ВМЯ молодых крыс при введении ССК средняя частота импульсации уменьшалась в меньшей степени по сравнению с ДМЯ. Указанные различия по характеру воздействия ССК на нейроны, вероятно, связаны с функциональными особенностями этих двух ядер гипоталамуса. Оба ядра принимают участие в регуляции обмена веществ. При этом нейроны ДМЯ содержат медиаторы глутамат и ГАМК, следует отметить, что доля последнего преобла-

дает [29]. В ВМЯ преобладают глутаматергические нейроны, а доля ГАМК-ергических невелика [30]. Соматодендритное высвобождение ССК в нейронах ДМЯ способствует выделению ГАМК, предположительно, за счет пресинаптических ССК-рецепторов. В экспериментах *in vitro* на срезах гипоталамуса аппликация ССК вызывала увеличение амплитуды тормозных постсинаптических потенциалов в ДМЯ [7]. В то же время ССК *in vitro* при аппликации в ВМЯ вызывала увеличение частоты разрядов всех нейронов ядра [9]. Активация рецепторов ССК2, в свою очередь, может способствовать активации NMDA-рецепторов, что было показано в нейронах гиппокампа [31].

Снижение частоты импульсации нейронов ДМЯ и ВМЯ гипоталамуса при старении может быть связано с увеличением длительности следовой гиперполяризации, описанной в коре головного мозга и гиппокампе стареющих животных [32]. При этом с возрастом нарушается регуляция содержания Ca^{2+} в нейронах. Изменения Ca^{2+} -буферизации могут вызывать увеличение продолжительности Ca^{2+} -ответа и увеличение Ca^{2+} -зависимого K^+ -тока [33]. При старении в гипоталамусе отмечается гиперактивация астроцитарного пути ИККb/NF-kB, что вызывает редукцию тонких дистальных отростков астроцитов. Это вызывает, в свою очередь, уменьшение поглощения ГАМК астроцитами, увеличение уровня ГАМК во внеклеточном пространстве и последующую активацию внесинаптических нейрональных ГАМК_B-рецепторов [34], что также может приводить к торможению активности нейронов и снижению частоты фоновой импульсации у старых животных.

ССК, взаимодействуя с рецептором ССК2, вызывает выделение оксида азота, который, распространяясь ретроградно, усиливает высвобождение ГАМК из терминалей нейронов, иннервирующих орексигенные нейроны ДМЯ, тем самым угнетая нейронную активность последних [35]. Возрастные изменения на различных уровнях передачи ССК-сигнала также могут способствовать снижению чувствительности гипоталамуса к ССК у старых крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутривенное введение ССК приводит к снижению электрической активности нейронов ДМЯ и ВМЯ гипоталамуса у молодых крыс. У взрослых и старых крыс средняя фоновая частота разрядов нейронов ДМЯ и ВМЯ под влиянием ССК достоверно не меняется. Выявление нейрофизиологических механизмов, лежащих в основе этого явления, требует дальнейшего изучения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета Ярославского государственного медицинского университета, протокол № 60 от 16.02.2023.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-15-00039).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – П.М.М., сбор данных – А.А.С., К.Ю.М., П.А.А., обработка данных – А.А.С., К.Ю.М., П.А.А., Г.А.Т., П.М.М., написание и редактирование статьи – П.М.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ambler M, Hitrec T, Wilson A, Cerri M, Pickering A* (2022) Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus Promote, Prolong, and Deepen Torpor in the Mouse. *J Neurosci* 42: 4267–4277. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-21.2022>
2. *Mieda M, Williams SC, Richardson JA, Tanaka K, Yanagisawa M* (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12150–121505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604189103>
3. *Northeast RC, Vyazovskiy VV, Bechtold DA* (2020) Eat, sleep, repeat: the role of the circadian system in balancing sleep-wake control with metabolic need. *Curr Opin Physiol* 15: 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.02.003>
4. *Sanetra AM, Palus-Chramiec K, Chrobok L, Jeczmiern-Lazur JS, Gawron E, Klich JD, Pradel K, Lewandowski MH* (2022) High-Fat-Diet-Evoked Disruption of the Rat Dorsomedial Hypothalamic Clock Can Be Prevented by Restricted Nighttime Feeding. *Nutrients* 14: 5034. <https://doi.org/10.3390/nu14235034>
5. *Sayegh AI* (2013) The role of cholecystokinin receptors in the short-term control of food intake. *Prog Mol Biol Transl Sci* 114: 277–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386933-3.00008-X>
6. *Watts AG, Kanoski SE, Sanchez-Watts G, Langhans W* (2022) The physiological control of eating: signals, neurons, and networks. *Physiol Rev* 102: 689–813. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2020>
7. *Crosby KM, Baimoukhametova DV, Bains JS, Pittman QJ* (2015) Postsynaptic Depolarization Enhances GABA Drive to Dorsomedial Hypothalamic Neurons through Somatodendritic Cholecystokinin Release. *J Neurosci* 35: 13160–13170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3123-14.2015>
8. *Sabatier N, Leng G* (2010) Responses to cholecystokinin in the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus *in vivo*. *Eur J Neurosci* 31: 1127–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07144.x>
9. *Heidel E, Davidowa H* (1998) Interactive effects of cholecystokinin-8S and serotonin on spontaneously active neurons in ventromedial hypothalamic slices. *Neuropeptides* 32(5): 423–429. [https://doi.org/10.1016/s0143-4179\(98\)90066-x](https://doi.org/10.1016/s0143-4179(98)90066-x)
10. *Moiseev KY, Vishnyakova PA, Porseva VV, Masliukov AP, Spirichev AA, Emanuilov AI, Masliukov PM* (2020) Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing. *Nitric Oxide* 100–101: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.002>
11. *Masliukov PM, Nozdrachev AD* (2021) Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. *J Evol Biochem Phys* 57: 473–491. <https://doi.org/10.1134/S0022093021030030>
12. *Moiseev KY, Spirichev AA, Vishnyakova PA, Pankrasheva LG, Masliukov PM* (2021) Changes of discharge properties of neurons from dorsomedial hypothalamic nuclei during aging in rats. *Neurosci Lett* 762: 136168. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136168>
13. *Moiseev KY, Spirichev AA, Pankrasheva LG, Martyusheva AS, Abramova AY, Maslyukov PM* (2021) Spike Activity in the Ventromedial Nucleus of Rat Hypothalamus during Aging. *Bull Exp Biol Med* 171: 251–253. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05205-4>
14. *Анисимов ВН* (2008) Молекулярные и физиологические механизмы старения. В 2 т. СПб. Наука. [*Anisimov VN* (2008) Molecular and physiological mechanisms of aging. In 2 v. SPb. Nauka. (In Russ)].
15. *Carrascosa JM, Ros M, Andrés A, Fernández-Agulló T, Arribas C* (2009) Changes in the neuroendocrine control of energy homeostasis by adiposity signals during aging. *Exp Gerontol* 44: 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.05.005>
16. *Cawthon CR, de La Serre CB* (2021) The critical role of CCK in the regulation of food intake and diet-induced obesity. *Peptides* 138: 170492. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170492>
17. *Paxinos G, Watson C* (2017) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, compact 7th ed.* Elsevier. Acad Press.

18. *Kendrick K, Leng G, Higuchi T* (1991) Noradrenaline, dopamine and serotonin release in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat in response to intravenous cholecystokinin injections. *J Neuroendocrinol* 3(2): 139–144.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1991.tb00255.x>
19. *Watts AG, Kanoski SE, Sanchez-Watts G, Langhans W* (2022) The physiological control of eating: signals, neurons, and networks. *Physiol Rev* 102(2): 689–813.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2020>
20. *Imoto D, Yamamoto I, Matsunaga H, Yonekura T, Lee ML, Kato KX, Yamasaki T, Xu S, Ishimoto T, Yamagata S, Otsuguro KI, Horiuchi M, Iijima N, Kimura K, Toda C* (2021) Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence. *Mol Metab* 54: 101366.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101366>
21. *Dodd GT, Worth AA, Nunn N, Korpak AK, Bechtold DA, Allison MB, Myers MG Jr, Statnick MA, Luckman SM* (2014) The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab* 20: 639–649.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.022>
22. *Blevins JE, Morton GJ, Williams DL, Caldwell DW, Bastian LS, Wisse BE, Schwartz MW, Baskin DG* (2009) Forebrain melanocortin signaling enhances the hindbrain satiety response to CCK-8. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R476–R484.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90544.2008>
23. *Chen J, Scott KA, Zhao Z, Moran TH, Bi S* (2008) Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience* 152(1): 178–188.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.004>
24. *Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P* (2009) CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept* 157(1–3): 84–91.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.06.009>
25. *Cai H, Haubensak W, Anthony TE, Anderson DJ* (2014) Central amygdala PKC- δ (+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat Neurosci* 17(9): 1240–1248.
<https://doi.org/10.1038/nn.3767>
26. *D'Agostino G, Lyons DJ, Cristiano C, Burke LK, Madara JC, Campbell JN, Garcia AP, Land BB, Lowell BB, Dileone RJ, Heisler LK* (2016) Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. *Elife* 5: e12225.
<https://doi.org/10.7554/elife.12225>
27. *Berthélemy P, Bouisson M, Vellas B, Moreau J, Nicole-Vaysse, Albarede JL, Ribet A* (1992) Post-prandial cholecystokinin secretion in elderly with protein-energy undernutrition. *J Am Geriatr Soc* 40: 365–369.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1992.tb02136.x>
28. *Covasa M* (2010) Deficits in gastrointestinal responses controlling food intake and body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1423–R1439.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00126.2010>
29. *Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, Lowell BB* (2011) Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71: 142–154.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028>
30. *Yamamoto R, Ahmed N, Ito T, Gungor NZ, Pare D* (2018) Optogenetic Study of Anterior BNST and Basomedial Amygdala Projections to the Ventromedial Hypothalamus. *eNeuro* 5: ENEURO.0204–18.2018.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0204-18.2018>
31. *Xiao Z, Jaiswal MK, Deng PY, Matsui T, Shin HS, Porter JE, Lei S* (2012) Requirement of phospholipase C and protein kinase C in cholecystokinin-mediated facilitation of NMDA channel function and anxiety-like behavior. *Hippocampus* 22: 1438–1450.
<https://doi.org/10.1002/hipo.20984>
32. *Moore SJ, Cazares VA, Temme SJ, Murphy GG* (2023) Age-related deficits in neuronal physiology and cognitive function are recapitulated in young mice overexpressing the L-type calcium channel. *CaV* 1.3. *Aging Cell* 22: e13781.
<https://doi.org/10.1111/acel.13781>
33. *Sahu G, Turner RW* (2021) The Molecular Basis for the Calcium-Dependent Slow Afterhyperpolarization in CA1 Hippocampal Pyramidal Neurons. *Front Physiol* 12: 759707.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.759707>
34. *Sa M, Park MG, Lee CJ* (2022) Role of Hypothalamic Reactive Astrocytes in Diet-Induced Obesity. *Mol Cells* 45: 65–75.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2022.2044>
35. *Rust VA, Crosby KM* (2021) Cholecystokinin acts in the dorsomedial hypothalamus of young male rats to suppress appetite in a nitric oxide-dependent manner. *Neurosci Lett* 764: 136295.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136295>

Age-Dependent Influence of Cholecystokinin on the Impulse Activity of Neurons in the Dorsomedial and Ventromedial Nuclei of the Hypothalamus in Rats

**A. A. Spirichev^a, K. Yu. Moiseev^a, P. A. Anfimova^a,
G. A. Tarasova^a, and P. M. Masliukov^a, ***

^aYaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

**e-mail: mpm@ysmu.ru*

The aim of the work was to analyze the background and induced by the intravenous administration of the cholecystokinin sulfated octapeptide (CCK), as well as the cholecystokinin antagonist proglumide impulse neuronal electrical activity in the dorsomedial (DMN) and ventromedial (VMN) nuclei of the hypothalamus in young (2–3 months), adults (12 months) and aged (24 months) male rats under urethane anesthesia. The mean frequency of background discharges after the injection of CCK in young rats in the DMN significantly decreased from 1.5 ± 0.4 to 0.2 ± 0.1 impulse/s, in the VMN from 2.0 ± 0.4 to 0.9 ± 0.2 impulse/s. Simultaneous administration of CCK and proglumide did not lead to change of frequencies of neuronal activity in this age group. In adult and aged rats, the mean of the background frequency of discharges of neurons in the DMN and VMN was lower than in young rats and did not change significantly under the influence of CCK and proglumide. In DMN and VMN, the most of the neurons were inhibited by CCK, while in DMN the percentage of neurons inhibited by CCK was higher compared to VMN. The DMN of young animals lacked the CCK-activated neurons that appeared in adult and old animals. Thus, this study confirms the elevation theory of aging, which consists in a decrease in the sensitivity of the hypothalamus to homeostatic signals, in particular, hormones that regulate eating behavior.

Keywords: hypothalamus, cholecystokinin, impulse activity, electrophysiology, aging

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА НА МИКРОСОСУДАХ И В ТКАНИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПОКАПНИИ

© 2023 г. Е. П. Вовенко¹, *, И. Б. Соколова¹

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

*E-mail: vovenko@infran.ru

Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 01.07.2023 г.

Артериальная гипокания (АГ) как результат произвольной или принудительной гипервентиляции легких сопровождается снижением мозгового кровотока (вследствие повышения тонуса артериол) и повышением сродства кислорода к гемоглобину (вследствие увеличения рН крови). При АГ в мозг поступает недостаточное количество кислорода и в тканях формируются зоны с критически низким напряжением кислорода (pO_2). Характер распределения pO_2 в коре головного мозга при АГ изучен недостаточно. Цель работы: оценить эффективность снабжения кислородом ткани мозга на уровне артериальных и венозных микрососудов в условиях АГ. Для этого были поставлены следующие задачи: 1) изучить распределение напряжения кислорода на артериальных и венозных микрососудах коры головного мозга крысы; 2) провести анализ тканевых профилей pO_2 вблизи стенки этих микрососудов. На наркотизированных крысах линии Вистар, в условиях принудительной гипервентиляции ($P_aCO_2 = 17.1 \pm 0.7$ мм рт. ст.), изучено распределение напряжения кислорода на стенке пиальных и радиальных артериол с диаметром просвета 7–70 мкм и на стенке пиальных и восходящих (кортикальных) венул с диаметром просвета 7–300 мкм. В ткани, возле стенки кортикальных артериол и венул с диаметром просвета 10–20 мкм, определены профили тканевого pO_2 . В качестве контроля служили измерения pO_2 при спонтанном дыхании животного воздухом. Измерения pO_2 выполнены с помощью платиновых полярографических микроэлектродов с диаметром кончика 3–5 мкм. Визуализация кончика электрода и микрососудов осуществлялась с помощью микроскопа ЛЮМАМ-К1 с эпиобъективами контактного типа. В работе впервые представлены прямые измерения pO_2 на стенке артериол и венул коры головного мозга крысы и в ткани на разном удалении от стенки этих микрососудов при АГ. Показано, что АГ приводит к значительному ухудшению кислородного обеспечения коры головного мозга крысы, что проявляется достоверным снижением pO_2 на стенке венозных микрососудов, собирающих кровь от капилляров, и падением тканевого pO_2 в непосредственной близости от исследуемых микрососудов. Показано, что вклад артериол в кислородное обеспечение ткани головного мозга при гипокании, несмотря на повышенное pO_2 в их крови, существенно снижается. Состояние АГ приводит к значительному ухудшению снабжения кислородом коры головного мозга, несмотря на высокие показатели pO_2 в системной артериальной крови и в крови, оттекающей от коры головного мозга (сагиттальный синус).

Ключевые слова: артериальная гипокания, напряжение кислорода, гипервентиляция, pO_2 -микроэлектрод, артериола, венула, градиент pO_2 , тканевая гипоксия

DOI: 10.31857/S0869813923080113, EDN: LUCAFK

ВВЕДЕНИЕ

Состояния гипервентиляции легких, приводящие к снижению напряжения углекислого газа в артериальной крови ($P_a\text{CO}_2$) – артериальной гипокапнии (АГ), наблюдаются достаточно часто [1, 2]. Они могут быть обусловлены факторами загрязнения окружающей среды, повышенным нервным напряжением на рабочем месте, отравлением некоторыми химическими веществами. Нередко АГ возникает при заболеваниях легочной и сердечно-сосудистой систем, при нарушениях метаболизма и пр. [1]. Произвольная гипервентиляция используется при диагностике и с целью исследования особенностей течения заболеваний (для выявления и оценки тяжести патологий ЦНС, для определения адаптивных возможностей организма). Принудительная гипервентиляция легких применяется при реанимационных мероприятиях, главным образом при травмах головного мозга для снижения внутричерепного давления [3, 4].

В норме у человека $P_a\text{CO}_2$ составляет около 40 мм рт. ст. Колебания $P_a\text{CO}_2$ в ту или другую сторону могут вызывать значительные изменения в транспорте кислорода в головном мозге. Ряд авторов изучал влияние сниженного $P_a\text{CO}_2$ на различные параметры транспорта кислорода в тканях, такие как скорость кровотока, скорость потребления O_2 тканью мозга, объем циркулирующей в мозге крови, напряжение кислорода в тканях, в венозной крови, оттекающей от мозга и др. [5]. Основной причиной ухудшения оксигенации ткани мозга при АГ считается снижение скорости мозгового кровотока вследствие роста периферического сопротивления сосудов мозга [6, 7]. Согласно этим данным, объемная скорость кровотока в мозге при гипокапнии средней степени ($P_a\text{CO}_2 = 20\text{--}30$ мм рт. ст.) снижалась на 20–40% по сравнению с нормакапнией [7]. В результате в ткани головного мозга существенно снижалось напряжение кислорода [8]. Например, при $P_a\text{CO}_2 = 15\text{--}23$ мм рт. ст., тканевое $p\text{O}_2$ ($p_t\text{O}_2$) в среднем было ниже на 40% по сравнению с нормой [8, 9]. Поскольку эти данные были получены без локализации $p\text{O}_2$ -датчика относительно стенки микрососудов (артериол, капилляров, венул), оценить роль этих микрососудов в газообменных процессах между кровью и тканями при АГ не представляется возможным. Ранее было установлено, что газообмен между кровью и тканями происходит не только через стенку капилляров, но и через стенку более крупных микрососудов – артериол и венул [10]. Была показана важная роль этих микрососудов в процессах снабжения нервной ткани кислородом и стабилизации тканевого $p\text{O}_2$ [11]. Поверхность газообмена мельчайших венозных микрососудов сопоставима с таковой для капилляров мозга [12]. Поэтому даже небольшие изменения $p\text{O}_2$ в крови венул могут приводить к существенным сдвигам кислородного обеспечения коры головного мозга в целом. На текущий момент в литературе не обнаружены сведения о характере распределения $p\text{O}_2$ возле артериол и венул коры головного мозга при АГ. В связи с этим исследование распределения $p\text{O}_2$ на уровне артериальных и венозных микрососудов при АГ представляют значительный интерес.

Цель данного исследования заключалась в изучении распределения напряжения кислорода на артериальных и венозных микрососудах коры головного мозга крысы при АГ, вызванной гипервентиляцией легких, а также в анализе тканевых профилей $p\text{O}_2$ вблизи стенки этих микрососудов. Полученные данные позволили оценить эффективность снабжения кислородом ткани мозга через стенку этих микрососудов в условиях АГ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на крысах-самцах Wistar ($n = 24$), массой 220–250 г из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург, Россия).

Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением препарата золетил-100 (Virbac, Франция), 20 мг/кг. В бедренную артерию и вену животных вводили катетеры для контроля за артериальным давлением, отбора проб крови для анализа на газовый состав (ABL-330, Radiometer, Дания) и введения релаксанта и компенсирующих доз крови от крысы донора. Объем одной пробы крови составлял около 100 мкл. Кровопотерю компенсировали после взятия 5–7 проб.

Состояние артериальной гипоксии у животных достигалось с помощью принудительной гипервентиляции. В трахею крыс вводили канюлю, соединенную со специальной клапанной системой и системой увлажнения. В первой части эксперимента животные спонтанно дышали воздухом. Затем крыс подключали к аппарату искусственной вентиляции легких (УИДЖ-1, ЭМИБ, СССР) и устанавливали режим гипервентиляции. Животным внутривенно вводили миорелаксант tubocurarin chloridi 1%-ный раствор (Orion, Финляндия) в дозе 0.8–0.9 мг/кг в час. Минутный объем дыхания (МОД) регистрировали при помощи счетчика газа (тип РГ-7000, Россия), подключенного к выходному клапану дыхательной системы.

Методика визуализации микрососудов коры головного мозга и измерения напряжения кислорода в ткани мозга подробно была описана ранее [11]. Кратко, благодаря использованию темнопольных контактных эпиобъективов микроскопа ЛЮАММ-К1 (ЛОМО, Россия) глубина визуализации тканей достигала 50–70 мкм от поверхности мозга. Изображение микроскопического поля с помощью цветной цифровой камеры Moticam 2300 (Motic China Group Co) выводили на монитор компьютера и сохраняли для последующего анализа. Контакт фронтальной линзы объектива с тканью мозга предотвращал газообмен между орошающей жидкостью и областью измерения pO_2 . Кончик микроэлектрода под визуальным контролем, с помощью механического 3D-микроманипулятора, позиционировали относительно исследуемых микрососудов с точностью до 1–2 мкм. Размер микрообласти ткани под визуальным контролем составлял около 600×400 мкм.

Для стабилизации состояния животного измерения начинали не ранее чем через 15–20 мин после окончания хирургической операции. После проведения стандартной процедуры калибровки платинового полярографического микроэлектрода несколько раз измеряли напряжение кислорода на артериолах и венах коры головного мозга при дыхании животных воздухом (контроль). В этих же условиях определяли газовый состав системной артериальной крови (P_aO_2 , P_aCO_2 , pH), фиксировали артериальное давление и МОД. Затем животное переводили на искусственную вентиляцию легких, и в бедренную вену вводили дозу миорелаксанта. Через 5–10 мин после начала гипервентиляции легких вновь контролировали P_aO_2 , P_aCO_2 , pH, артериальное давление и МОД. Данные показатели многократно регистрировали по ходу эксперимента. Если уровень P_aCO_2 был ниже 25 мм рт. ст., то приступали к измерениям напряжения кислорода в коре головного мозга. В каждом эксперименте pO_2 измеряли не менее, чем на 15–20 микрососудах. Особое внимание уделяли тому, чтобы кровоток в исследуемом и близко расположенных микрососудах не был нарушен. Длительность гипоксического воздействия не превышала 40–50 мин.

В конце эксперимента из продольного сагиттального синуса отбирали пробы крови для анализа на газовый состав в специально заточенную стеклянную пипетку длиной около 110 мм, с входным диаметром 0.6–0.7 мм. Данная процедура явля-

Таблица 1. Основные системные показатели исследованных животных в условиях контроля и артериальной гипоксии

	Контроль	Гипоксия
Арт. давление, мм рт. ст.	110 ± 3 (<i>n</i> = 24)	118 ± 2 (<i>p</i> < 0.01, <i>n</i> = 85)
МОД, мл 100 г ⁻¹ мин ⁻¹	58 ± 5 (<i>n</i> = 24)	210 ± 7 (<i>p</i> < 0.001, <i>n</i> = 30)
Бедренная артерия		
pH	7.41 ± 0.01 (<i>n</i> = 24)	7.61 ± 0.01 (<i>p</i> < 0.001, <i>n</i> = 55)
P _a CO ₂	37.2 ± 0.5 (<i>n</i> = 24)	17.1 ± 0.7 (<i>p</i> < 0.001, <i>n</i> = 55)
P _a O ₂	83.5 ± 1.7 (<i>n</i> = 24)	108.2 ± 1.4 (<i>p</i> < 0.001, <i>n</i> = 55)
Продольный сагиттальный синус ^{*)}		
pH	—	7.56 ± 0.02 (<i>n</i> = 24)
PCO ₂	—	23.7 ± 1.0 (<i>n</i> = 24)
PO ₂	—	35.5 ± 0.8 (<i>n</i> = 24)

n — число измерений АД и МОД или количество проб крови для определения газового состава, взятых у всех животных в условиях нормо- и гипоксии. Для определения газового состава крови при АГ у некоторых животных было взято более, чем одна проба. *) — вследствие травматичности процедуры взятия крови из продольного сагиттального синуса анализ для условий контроля не проводился.

лась травматичной и после взятия пробы крови эксперимент прекращался, животное усыплялось введением повышенной дозы наркоза.

Кривую диссоциации оксигемоглобина (КДО) артериальной крови животных строили с помощью прибора Hem-O₂-Scan (AMINCO, США).

Статистическая обработка данных и построение графиков выполнены с помощью программ Statistica (ver. 8.0) и Origin Lab. (ver. 8.0). Все данные представлены в виде “среднее ± стандартная ошибка среднего”. Гипотезу нормальности исходных данных проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка W. Достоверность различия между средними определяли при помощи *t*-критерия Стьюдента. Уровень значимости принимали равным *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 представлены газовые показатели системной артериальной крови и крови сагиттального синуса при дыхании воздухом (контроль) и в условиях гипоксии (гипервентиляции).

На рис. 1а, б представлены результаты измерений рО₂ на стенке пиальных и пре-кортикальных артериол с диаметром просвета 7–70 мкм в контроле, т.е. при спонтанном дыхании животных атмосферным воздухом (а) и в условиях принудительной гипервентиляции (б). Каждый значок соответствует отдельному измерению рО₂. Пунктирными линиями обозначены 95%-ные доверительные интервалы линий регрессии. Среднее рО₂ на исследованных артериолах в контроле составило 61.1 ± 1.2 мм рт. ст. (*n* = 57), а при гипоксии достоверно повысилось до 73.3 ± 1.2 мм рт. ст. (*n* = 164) (*p* < 0.01). Средний диаметр исследованных артериол для групп (а) и (б) составил соответственно 34.3 ± 2.1 и 30.1 ± 1.2 мкм (*p* > 0.05).

Соответственно на рис. 1с, д представлено распределение напряжения кислорода на стенке пиальных и восходящих венул с диаметром просвета 7–300 мкм в контроле (светлые треугольники) и при гипоксии (черные треугольники). Гипоксия, вызванная принудительной гипервентиляцией легких, привела к достоверному падению рО₂ на исследованных венулах по сравнению с контролем.

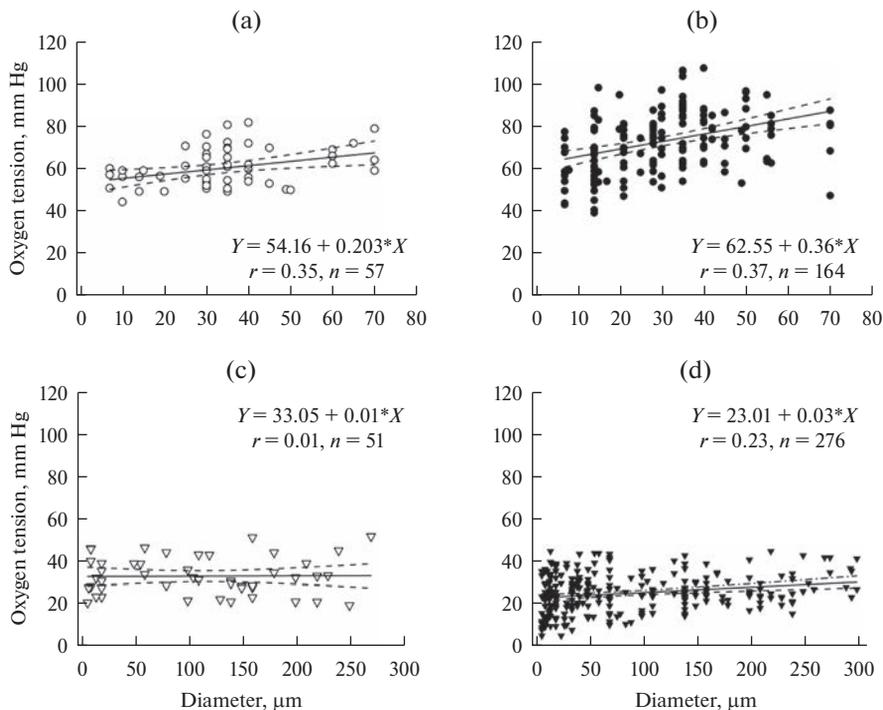


Рис. 1. Распределение напряжения кислорода (pO_2) на стенке пимальных и кортикальных артериол (a, b) и пимальных и восходящих (радиальных) венул (c, d) в контроле (a, c) и при артериальной гипокпапии (b, d). По оси абсцисс – внутренний просвет микрососуда, мкм. По оси ординат – напряжение кислорода, мм рт. ст. Пунктирными линиями обозначены 95%-ные доверительные интервалы для линий регрессии.

Для анализа диффузии кислорода из крови микрососудов в ткань при АГ регистрировали профили pO_2 в тканевой зоне, окружающей радиальные артериолы ($n = 17$) и восходящие кортикальные венулы ($n = 26$). С этой целью кончик микроэлектрода сначала позиционировали на стенке исследуемого микрососуда, затем с помощью механического микроманипулятора отводили от стенки в ткань с шагом 5–15 мкм, измеряя pO_2 в каждой точке [11]. Следует отметить, что указанные профили pO_2 в условиях АГ получены впервые.

Все исследованные профили pO_2 вблизи радиальных артериол были разделены на две группы в зависимости от скорости снижения p_tO_2 при удалении кончика микрососуда от стенки: группу А1 ($n = 12$), если на удалении 60 мкм от стенки $p_tO_2 \geq 10$ мм рт. ст.; группу А2 ($n = 5$), если на удалении 60 мкм от стенки $p_tO_2 < 10$ мм рт. ст. (рис. 2b). Профили pO_2 вблизи радиальных венул также были разделены на две группы в зависимости от скорости снижения p_tO_2 при удалении кончика микрососуда от стенки: группу V1 ($n = 13$), если на удалении 30 мкм от стенки $p_tO_2 \geq 10$ мм рт. ст.; группу V2 ($n = 13$), если на удалении 30 мкм от стенки $p_tO_2 < 10$ мм рт. ст. (рис. 2d).

При АГ рН артериальной крови увеличилось на 0.2 (табл. 1). Согласно эффекту Бора P50 (pO_2 полунасыщения гемоглобина крови кислородом) артериальной крови крысы снизилось с 34 мм рт. ст. (линия А) до 27–28 мм рт. ст. (линия В, рис. 3), что привело к смещению КДО влево.

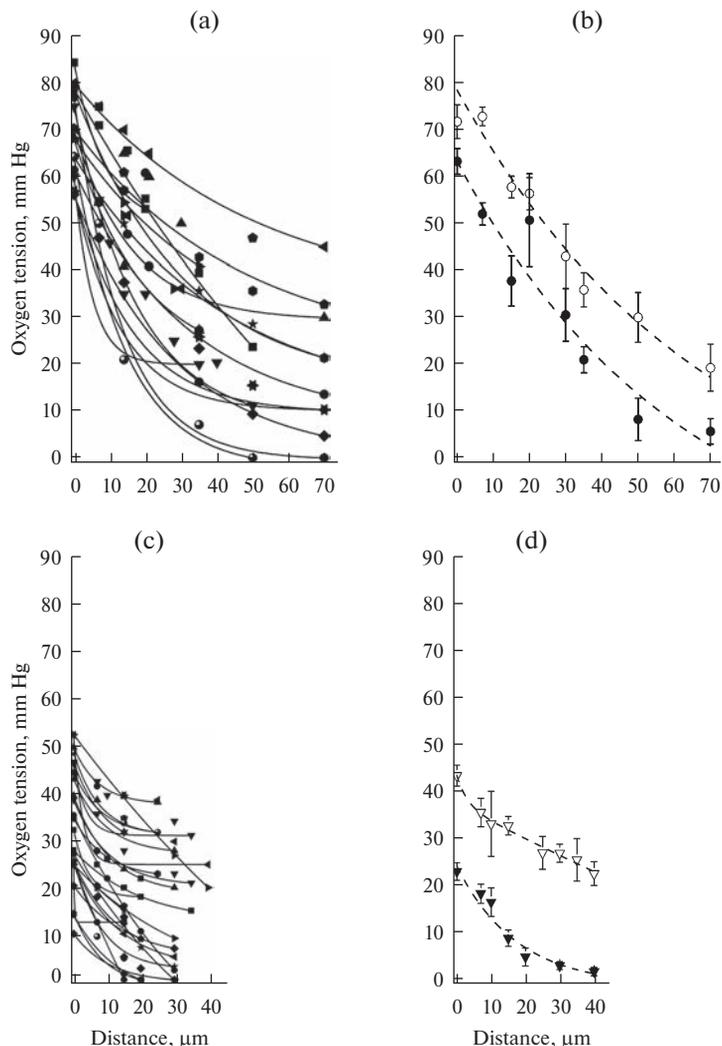


Рис. 2. Профили тканевого pO_2 вблизи стенки радиальных артериол (а) и восходящих (кортикальных) венул (с) коры головного мозга крысы при гипокапнии. По оси абсцисс – расстояние от стенки микрососуда, мкм. По оси ординат – напряжение кислорода, мм рт. ст. Каждый значок на графике соответствует отдельному измерению pO_2 . (b) – усредненные профили тканевого pO_2 возле радиальных артериол коры головного мозга крысы при гипокапнии. Обозначения: \circ – группа A1; \bullet – группа A2. (d) – усредненные профили тканевого pO_2 возле восходящих (кортикальных) венул коры головного мозга крысы при гипокапнии. Обозначения: \square – группа V1; \blacktriangledown – группа V2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Транспорт кислорода из крови микрососудов к клеткам тканей осуществляется путем физической диффузии под действием градиента напряжения кислорода. Согласно закону Фика, чем выше градиент pO_2 , тем, при прочих равных условиях, больше поток кислорода в ткань [13]. Для анализа транспорта кислорода в тканях организма чрезвычайно важно оценить напряжение кислорода в крови мельчайших микрососудов.

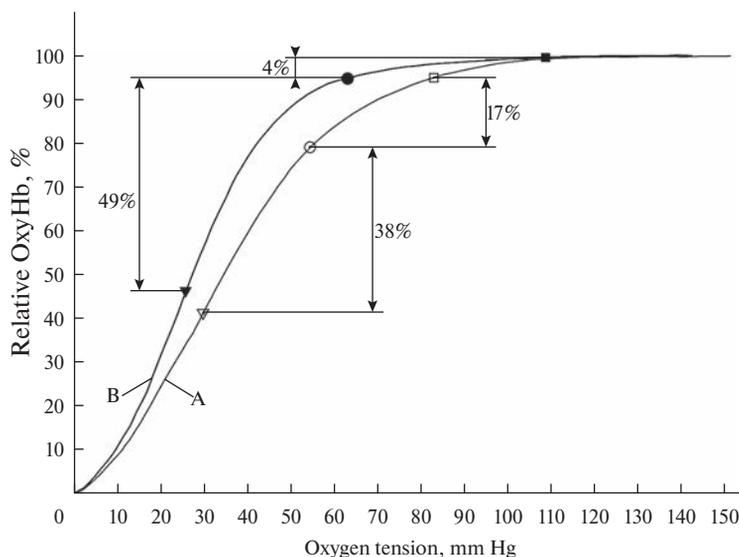


Рис. 3. Кривая диссоциации оксигемоглобина (КДО) артериальной крови крысы в контроле (А) и при гипокапнии (В). По оси абсцисс – напряжение кислорода, мм рт. ст. По оси ординат – степень насыщения кислородом гемоглобина крови, %. Обозначения для кривой А (контроль): □ – P_aO_2 ; ○ – pO_2 на артериолах с диаметром просвета 7–10 мкм; □ – pO_2 на венах с диаметром просвета 7–10 мкм. Обозначения для кривой В (гипокапния): ■ – P_aO_2 ; ● – pO_2 на артериолах с диаметром просвета 7–10 мкм; ▼ – pO_2 на венах с диаметром просвета 7–10 мкм. См. объяснение в тексте.

В данном исследовании напряжение кислорода измеряли на стенке микрососуда, максимально приближая кончик микроэлектрода к просвету сосуда, без прокола стенки. Такие измерения можно считать корректной оценкой pO_2 в крови этих микрососудов в силу незначительного трансмурального градиента pO_2 на стенке [14]. Поэтому применяемая нами методика измерения pO_2 , несмотря на инвазивность, обладает важным преимуществом: она обеспечивает прямые измерения pO_2 с высоким пространственным разрешением (единицы мкм) как на микрососудах, так и в тканях мозга. Разрабатываемые в последнее время оптические методы измерения pO_2 с использованием двухфотонной микроскопии и специальных флуоресцентных красителей позволяют оценивать параметры транспорта кислорода (pO_2 , поток эритроцитов, линейная скорость кровотока и пр.) преимущественно в крови микрососудов [15–17]. Большинство этих экспериментов выполнено при нормальных условиях (нормоксия, нормокапния) [15, 18, 19]. Представленные в данном исследовании результаты измерений pO_2 на микрососудах и в тканях коры головного мозга при АГ во многом являются приоритетными.

Распределение pO_2 на артериолах при дыхании воздухом соответствует нашим ранее полученным результатам [20]. Наблюдаемое снижение pO_2 на стенке артериол при уменьшении их калибра обусловлено диффузией кислорода из крови артериол через их стенку в ткань (рис. 1а) [10, 11].

Гипокапния, вызванная принудительной гипервентиляцией легких, привела к заметному изменению распределения pO_2 на артериолах мозга (рис. 1б). Вследствие увеличения P_aO_2 произошел рост pO_2 на артериальных микрососудах. Даже на мельчайших артериолах диаметром 7–20 мкм, из которых кровь поступает в капилля-

ры, pO_2 достоверно повысилось с 54.7 ± 1.5 ($n = 12$) до 64.4 ± 2.0 мм рт. ст. ($n = 48$) ($p < 0.05$). Повышенное pO_2 в крови артериол должно способствовать более интенсивной диффузии кислорода через их стенку в ткань мозга. Далее, однако, будет показано, что вклад артериол в кислородное обеспечение коры головного мозга при АГ существенно снижен по сравнению с нормой.

Распределение напряжения кислорода на венах коры головного мозга крыс характеризуется значительным разбросом значений, обусловленным различиями в условиях газообмена (скорость кровотока, уровень метаболизма ткани и пр.) в вышерасположенных участках капиллярной сети. Венозные микрососуды выполняют не только перенос крови и продуктов метаболизма из капилляров в крупные вены. Мельчайшие вены снабжают ткани кислородом и, в силу своей значительной газообменной поверхности, играют демпфирующую роль, особенно при экстремальных условиях транспорта кислорода [21]. Поэтому в современных моделях транспорта кислорода в тканях венозные микрососуды обязательно учитываются как важная сторона газообмена между кровью и тканями [12, 22].

Важно отметить, что в газообмене между кровью и тканями принимают участие преимущественно мельчайшие вены с диаметром просвета до 100 мкм [11]. В контроле среднее pO_2 на венах с диаметром просвета 7–100 мкм ($n = 22$) составило 33.6 ± 1.8 мм рт. ст., тогда как при АГ среднее pO_2 достоверно снизилось до 24.1 ± 0.7 мм рт. ст. ($n = 186$, $p < 0.001$). Средний диаметр просвета исследованных венул в выборке составил 35.7 ± 6.7 и 36.4 ± 1.9 мкм ($p > 0.05$) соответственно. На некоторых венах pO_2 составило 10–15 мм рт. ст., что существенно ниже “критического” pO_2 для венозного участка капилляров (рис. 1d) [23]. Основной причиной падения pO_2 в крови мельчайших микрососудов при АГ является снижение уровня мозгового кровотока вследствие констрикции пиальных и кортикальных артериол [3].

Из литературы известно, что радиальные артериолы коры головного мозга непосредственно снабжают кислородом тканевую зону на удалении до 60–70 мкм от их стенки [11, 24]. В этой тканевой зоне отсутствуют капилляры и обеспечение ее кислородом осуществляется исключительно за счет диффузии O_2 через стенку артериол [25, 26].

В данной работе впервые для условий артериальной гипоксии измерены профили тканевого pO_2 вблизи радиальных артериол и венул с диаметром просвета 10–20 мкм, позволяющие детализировать особенности диффузии O_2 через стенку этих микрососудов (рис. 2а, с). Способны ли артериолы и вены в условиях АГ обеспечивать кислородом тканевую зону вблизи их стенки? Уровень “критического” pO_2 для коры головного мозга, при котором наблюдаются признаки нарушения тканевого дыхания, составляет около 10 мм рт. ст. [26–28].

Можно заключить, что нервные клетки, локализованные вблизи стенки артериол группы А1, в условиях АГ получают достаточное количество кислорода, тогда как клетки, расположенные в тканевой зоне артериол группы А2, частично будут находиться в условиях гипоксии несмотря на то, что в крови этих артериол pO_2 выше 60 мм рт. ст. (рис. 2b). Тканевая гипоксия при АГ может вызвать дилатацию некоторых артериол и соответственно рост p_tO_2 вблизи стенки этих артериол [9]. Несмотря на то, что артериолы являются самым мощным источником кислорода в ткань (высокое pO_2 , интенсивный кровоток), суммарная площадь их газообменной поверхности существенно меньше площади газообмена для капилляров и мелких венул [22]. Тем не менее, согласно нашим оценкам и литературным данным, в нормальных условиях через стенку артериол разного калибра в ткань поступает до 30% всего кислорода, потребляемого корой головного мозга [11, 18, 26].

Согласно нашим данным, среднее pO_2 в крови венул группы V2 составило 23.1 ± 1.9 мм рт. ст. ($n = 13$), а в ткани, на удалении 15–20 мкм от стенки, – менее 10 мм рт. ст., что свидетельствует о наличии гипоксии вблизи этих микрососудов. Учитывая большую поверхность газообмена мельчайших венул, можно полагать, что значительная часть ткани в области венозного конца капилляров и мельчайших венул находится в условиях недостаточного кислородного обеспечения. При АГ наблюдались также венулы (группа V1), где условия газообмена сохранились близкими к контролю (нормоксемии): pO_2 на расстоянии 30 мкм от стенки составляло 20–30 мм рт. ст. (рис. 2с, d). Такие венулы, безусловно, остаются важным источником кислорода для ткани коры головного мозга крыс [29].

Важно отметить, что при АГ кривая диссоциации оксигемоглобина крови крысы, согласно эффекту Бора, смещается влево (рис. 3, линия B) [30, 31]. Это означает, что разгрузка кислорода из гемоглобина на уровне артериол и капилляров происходит при более низких pO_2 , что, наряду со снижением мозгового кровотока, приводит к существенному ухудшению кислородного обеспечения тканей.

Количественным показателем выхода кислорода из крови микрососудов может служить разность между насыщением кислородом (ΔS_{O_2}) на том или ином участке микрососудистой сети. Например, измерив pO_2 на мельчайших артериолах и венулах с диаметром просвета 7–10 мкм, можно приблизительно оценить долю кислорода, перешедшего в ткань из крови капилляров. Согласно нашим оценкам, при контроле (спонтанное дыхание воздухом) кровь десатурируется на уровне артериол на 17%, а на уровне капилляров – еще на 38% (рис. 3, линия A). При АГ кровь десатурируется на уровне артериол на 4%, а на уровне капилляров – еще на 49% (рис. 3, линия B). Таким образом, при гипокапнии, вследствие сдвига КДО влево, вклад артериол в кислородное обеспечение ткани головного мозга существенно снижается, несмотря на повышенное pO_2 в их крови. Капилляры и мельчайшие венулы, в силу огромной газообменной поверхности, являются основным источником кислорода в ткань коры головного мозга при выраженной артериальной гипокапнии.

В заключение, в условиях выраженной артериальной гипокапнии (принудительной вентиляции легких воздухом) впервые представлены прямые измерения величин pO_2 , полученных на стенке артериол и венул коры головного мозга крысы и в ткани на разном удалении от стенки этих микрососудов. Показано, что вклад артериол в кислородное обеспечение ткани головного мозга при гипокапнии, несмотря на повышенное pO_2 в их крови, существенно снижается. Состояние гипокапнии приводит к значительному ухудшению снабжения кислородом коры головного мозга, несмотря на высокие показатели pO_2 в системной артериальной крови и в крови сагиттального синуса.

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

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, проведение экспериментов, написание и редактирование текста – Е.П.В. Проведение экспериментов, обработка данных, обсуждение работы, подготовка черновика статьи – И.Б.С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Curley G, Kavanagh BP, Laffey JG* (2010) Hypocapnia and the injured brain: more harm than benefit. *Crit Care Med* 38(5): 1348–1359.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d8cf2b>
2. *Tavel ME* (2021) Hyperventilation Syndrome: Why Is It Regularly Overlooked? *Am J Med* 134(1): 13–15.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.07.006>
3. *Godoy DA, Rovegno M, Lazaridis C, Badenes R* (2021) The effects of arterial CO₂ on the injured brain: Two faces of the same coin. *J Crit Care* 61: 207–215.
<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.10.028>
4. *Kramer KEP, Anderson EE* (2022) Hyperventilation-Induced Hypocapnia in an Aviator. *Aerosp Med Hum Perform* 93(5): 470–471.
<https://doi.org/10.3357/AMHP.5975.2022>
5. *Ringer SK, Clausen NG, Spielmann N, Weiss M* (2019) Effects of moderate and severe hypocapnia on intracerebral perfusion and brain tissue oxygenation in piglets. *Paediatr Anaesth* 29(11): 1114–1121.
<https://doi.org/10.1111/pan.13736>
6. *Ito H, Kanno I, Ibaraki M, Hatazawa J, Miura S* (2003) Changes in human cerebral blood flow and cerebral blood volume during hypercapnia and hypocapnia measured by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(6): 665–670.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000067721.64998.F5>
7. *Harper AM, Glass HI* (1965) Effect of alterations in the arterial carbon dioxide tension on the blood flow through the cerebral cortex at normal and low arterial blood pressures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 28(5): 449–452.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.28.5.449>
8. *Nwaigwe CI, Roche MA, Grinberg O, Dunn JF* (2000) Effect of hyperventilation on brain tissue oxygenation and cerebrovenous PO₂ in rats. *Brain Res* 868(1): 150–156.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02321-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02321-0)
9. *Grote J, Zimmer K, Schubert R* (1981) Effects of severe arterial hypocapnia on regional blood flow regulation, tissue PO₂ and metabolism in the brain cortex of cats. *Pflugers Arch* 391(3): 195–199.
<https://doi.org/10.1007/BF00596170>
10. *Duling BR, Kuschinsky W, Wahl M* (1979) Measurements of the perivascular PO₂ in the vicinity of the pial vessels of the cat. *Pflugers Arch* 383(1): 29–34.
<https://doi.org/10.1007/BF00584471>
11. *Vovenko EP* (1999) Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflugers Arch* 437(4): 617–623.
<https://doi.org/10.1007/s004240050825>
12. *Sharan M, Popel AS, Hudak ML, Koehler RC, Traystman RJ, Jones MD, Jr* (1998) An analysis of hypoxia in sheep brain using a mathematical model. *Ann Biomed Eng* 26(1): 48–59.
<https://doi.org/10.1114/1.50>
13. *Steyn-Ross DA, Steyn-Ross ML, Sleight JW, Voss LJ* (2023) Determination of Krogh Coefficient for Oxygen Consumption Measurement from Thin Slices of Rodent Cortical Tissue Using a Fick's Law Model of Diffusion. *Int J Mol Sci* 24(7): 6450.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076450>
14. *Sharan M, Vovenko EP, Vadapalli A, Popel AS, Pittman RN* (2008) Experimental and theoretical studies of oxygen gradients in rat pial microvessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(9): 1597–1604.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.51>
15. *Lyons DG, Parpaleix A, Roche M, Charpak S* (2016) Mapping oxygen concentration in the awake mouse brain. *Elife* 5: e12024.
<https://doi.org/10.7554/eLife.12024>

16. *Li B, Esipova TV, Sencan I, Kilic K, Fu B, Desjardins M, Moeini M, Kura S, Yaseen MA, Lesage F, Ostergaard L, Devor A, Boas DA, Vinogradov SA, Sakadzic S* (2019) More homogeneous capillary flow and oxygenation in deeper cortical layers correlate with increased oxygen extraction. *Elife* 8: e42299. <https://doi.org/10.7554/eLife.42299>
17. *Shih AY, Driscoll JD, Drew PJ, Nishimura N, Schaffer CB, Kleinfeld D* (2012) Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7): 1277–1309. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.196>
18. *Sakadzic S, Mandeville ET, Gagnon L, Musacchia JJ, Yaseen MA, Yucel MA, Lefebvre J, Lesage F, Dale AM, Eikermann-Haerter K, Ayata C, Srinivasan VJ, Lo EH, Devor A, Boas DA* (2014) Large arteriolar component of oxygen delivery implies a safe margin of oxygen supply to cerebral tissue. *Nat Commun* 5: 5734. <https://doi.org/10.1038/ncomms6734>
19. *Parpaleix A, Goulam HY, Charpak S* (2013) Imaging local neuronal activity by monitoring PO₂ transients in capillaries. *Nat Med* 19(2): 241–246. <https://doi.org/10.1038/nm.3059>
20. *Vovenko EP, Chuikin AE* (2008) Oxygen tension in rat cerebral cortex microvessels in acute anemia. *Neurosci Behav Physiol* 38(5): 493–500. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-9007-4>
21. *Shonat RD, Johnson PC* (1997) Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study. *Am J Physiol* 272(5 Pt 2): H2233–H2240. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2233>
22. *Celaya-Alcala JT, Lee GV, Smith AF, Li B, Sakadzic S, Boas DA, Secomb TW* (2021) Simulation of oxygen transport and estimation of tissue perfusion in extensive microvascular networks: Application to cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 41(3): 656–669. <https://doi.org/10.1177/0271678X20927100>
23. *Ward J* (2006) Oxygen delivery and demand. *Surgery (Oxf)* 24(10): 354–360. <https://doi.org/10.1053/j.mpsur.2006.08.010>
24. *Sakadzic S, Yaseen MA, Jaswal R, Roussakis E, Dale AM, Buxton RB, Vinogradov SA, Boas DA, Devor A* (2016) Two-photon microscopy measurement of cerebral metabolic rate of oxygen using periarteriolar oxygen concentration gradients. *Neurophotonics* 3(4): 045005. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.4.045005>
25. *Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Lyden PD, Kleinfeld D* (2007) Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 365–370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609551104>
26. *Kasischke KA, Lambert EM, Panepento B, Sun A, Gelbard HA, Burgess RW, Foster TH, Nedergaard M* (2011) Two-photon NADH imaging exposes boundaries of oxygen diffusion in cortical vascular supply regions. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(1): 68–81. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.158>
27. *Scheufler KM, Lehnert A, Rohrborn HJ, Nadstawek J, Thees C* (2004) Individual value of brain tissue oxygen pressure, microvascular oxygen saturation, cytochrome redox level, and energy metabolites in detecting critically reduced cerebral energy state during acute changes in global cerebral perfusion. *J Neurosurg Anesthesiol* 16(3): 210–219. <https://doi.org/10.1097/00008506-200407000-00005>
28. *Zhang K, Zhu L, Fan M* (2011) Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases. *Front Mol Neurosci* 4: 5. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00005>
29. *Vovenko EP, Chuikin AE* (2010) Tissue oxygen tension profiles close to brain arterioles and venules in the rat cerebral cortex during the development of acute anemia. *Neurosci Behav Physiol* 40(7): 723–731. <https://doi.org/10.1007/s11055-010-9318-0>
30. *West JB* (2019) Three classical papers in respiratory physiology by Christian Bohr (1855–1911) whose work is frequently cited but seldom read. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 316(4): L585–L588. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00527.2018>
31. *Vovenko EP, Chuikin AE* (2013) Longitudinal Oxygen Tension Gradients in Small Cortical Microvessels in the Rat Brain on Development of Acute Anemia. *Neurosci Behav Physiol* 43(6): 748–754. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9804-2>

Distribution of Oxygen Tension on Microvessels and in Tissue of Rat Brain Cortex at Severe Arterial Hypocapnia**E. P. Vovenko^{a, *} and I. B. Sokolova^a**^a *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*^{*} *e-mail: vovenko@infran.ru*

Arterial hypocapnia (AH), induced by voluntary or forced hyperventilation of the lungs, is accompanied by a decrease in cerebral blood flow (due to an increase in the arteriole tone) and an increase in the affinity of hemoglobin for oxygen. As a result, an insufficient oxygen supply to cortical tissue take place and zones with a critically low oxygen tension (pO_2) are formed in brain tissue. The distribution of pO_2 to cerebral cortex during AH has not been studied enough. The aim of the work was to evaluate the effectiveness of oxygen supply to brain tissue at the level of arterial and venous microvessels at AH. To do this, the following tasks were set: 1) to study the distribution of the pO_2 on the arterial and venous microvessels of the rat cerebral cortex; 2) to analyze tissue pO_2 profiles near the walls of these microvessels. On anesthetized Wistar rats under conditions of forced hyperventilation ($P_aCO_2 = 17.1 \pm 0.7$ mm Hg), the distribution of oxygen tension on the wall of pial and radial arterioles with a lumen diameter of 7–70 μm and on the wall of pial and ascending venules with a lumen diameter of 7–300 μm was studied. In tissue, near the wall of cortical arterioles and venules with a lumen diameter of 10–20 μm , tissue pO_2 profiles were measured. Measurements of pO_2 during spontaneous breathing of the animal with air served as a control. All pO_2 measurements were made using platinum polarographic microelectrodes with a tip diameter of 3–5 μm . Visualization of the electrode tip and microvessels was carried out using a LUMAM-K1 microscope with epiobjectives of the contact type. This work presents for the first-time direct measurements of pO_2 on the walls of arterioles and venules of the rat cerebral cortex and in tissues at different distances from the walls of these microvessels at AH. It has been shown that AH results in significant decrease in the oxygen supply to cerebral cortex, that is manifested by a significant drop of the pO_2 's on venous microvessels and in tissue in the immediate vicinity of the studied microvessels. It has been shown, that the role of arterioles as a direct source of oxygen to brain tissue, is significantly reduced during arterial hypocapnia. Forced hyperventilation results in significant deterioration of oxygen supply to cerebral cortex, despite elevated pO_2 values in the systemic arterial blood and in blood of systemic cerebral veins (sagittal sinus).

Keywords: arterial hypocapnia, oxygen tension, hyperventilation, pO_2 microelectrode, arterioles, venules, pO_2 gradients, tissue hypoxia

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ГРЕЛИНА В МЕХАНИЗМАХ
ИГРОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ПСИХОГЕННЫХ СТРЕССОРОВ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. А. А. Лебедев^{1, *}, С. С. Пюрвеев^{1, 2}, Э. А. Сексте¹, Б. А. Рейхардт¹,
Е. Р. Бычков¹, П. Д. Шабанов¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Исследовали роль грелина в проявлении элементов игровой зависимости у крыс, подверженных ранним психогенным стрессам. Выращивание в условиях социальной изоляции или материнская депривация в раннем онтогенезе вызывали повышение риска в поведении и импульсивности в тесте Iowa Gambling Task: животные стремились получить более значимое пищевое подкрепление, но с низкой вероятностью его достижения. Материнская депривация или выращивание в социальной изоляции вызывали повышение уровня мРНК рецептора грелина соответственно в миндалине и гипоталамусе. Уровень экспрессии исследуемого гена в префронтальной коре не изменялся. Сделан вывод, что ранние психогенные стрессы вызывают дисбаланс системы регуляции грелина, что проявляется повышением уровня мРНК рецептора грелина в структурах головного мозга, а также элементами игровой зависимости у крыс. Представлена схема действия хронического стресса в онтогенезе на гипоталамическую систему грелина в головном мозге и на экстрагипоталамический уровень его регуляции.

Ключевые слова: игровая зависимость, материнская депривация, выращивание в изоляции, грелин, мРНК рецептора грелина

DOI: 10.31857/S086981392308006X, EDN: FCMBCJ

ВВЕДЕНИЕ

Средовые воздействия в раннем онтогенезе оказывают существенное влияние на функции у половозрелых особей [1]. Ранние психогенные стрессы влияют на процессы роста, обмена веществ, воспитательные реакции, действуют на пролиферацию, дифференцировку и миграцию нейронов [1] и приводят к посттравматическим стрессовым расстройствам (ПТСР) [2, 3]. Отлучение от матери (maternal separation, MS) и выращивание в изоляции (isolation rearing, IS) вызывают отдаленные расстройства поведения, мотиваций [4], появление депрессий, повышение тревожности и злоупотребления психоактивными средствами [5]. MS вызывает у животных стойкие изменения эмоциональных реакций и формирования зависимости от аддиктивных средств [6, 7]. MS включает ежедневное отделение (от 15 мин до 6 ч) пометов от самок в течение первых двух недель жизни. При IS производят отделение от самок после молочного вскармливания и содержание в одиночных клетках до

полового созревания. IS вызывает глубокие нейрохимические и поведенческие изменения у потомства, которые обнаруживаются во взрослом возрасте [8].

Грелин был впервые найден в конце двадцатого века. Он состоит из 28 аминокислот, образуется в слизистой оболочке желудка и гипоталамусе [9]. Существует 3 изоформы грелина из одного предшественника (ацилированный грелин, неацилированный грелин и обестатин) и две молекулярные формы грелинового рецептора GHSR1a и GHSR1b. Биологической активностью обладает только рецептор GHSR1a [10]. Грелиновые рецепторы находятся в желудке, надпочечниках, сердечной мышце, щитовидной железе, и головном мозге: в гипоталамусе, гипофизе, гиппокампе, миндалине, в стволе и коре мозга [11]. Грелин участвует в регуляции пищевого поведения [12], зависимости от психостимуляторов [13, 14] и алкоголя [14, 15], в реакциях на стрессорные воздействия [14, 16].

В настоящее время актуальным является исследование нехимических форм зависимостей, таких как игровая. В международных классификациях (ICD-11 и DSM-5) игровая зависимость определяется как самостоятельное заболевание и обладает основными свойствами, характерными для алкогольной или наркотической зависимости [17]. Для ее лечения не зарегистрировано еще ни одного лекарственного средства. При формировании игровой зависимости наблюдаются нарушения регуляции гормонов стресса, что связано с проявлениями повышенной импульсивности в поведении и высоким уровнем кортизола и адреналина [18]. В наших исследованиях показано, что антагонист грелиновых рецепторов [D-Lys3]-GHRP-6 снижает проявления импульсивности в поведении (поведения риска) в модели игровой зависимости у крыс, влияя на обмен дофамина [19].

В настоящее время для анализа поведения, связанного с импульсивностью и риском, в опытах на животных применяется метод Iowa Gambling Task. Он базируется на выборе величины подкрепления для увеличения значимости подкрепления. В наших исследованиях был использован вариант Iowa Gambling Task на лабораторных крысах в трехрукавном лабиринте [17, 20]. Показано, что активация и блокада рецепторов грелина вызывает изменение импульсивности и риска в Iowa Gambling Task и влияет на содержание эндогенного дезацил-грелина в лимбических структурах головного мозга у крыс [21]. В отличие от ряда аналогичных моделей, в нашем варианте не применялось наказание, исключительно только пищевое подкрепление. Отрицательным подкреплением служило отсутствие какого-либо подкрепления. Наша модель соответствует в большей степени не гемблингу (азартные игры с проигрышами), а скорее геймингу (компьютерные игры), что является перспективным для исследования и практического применения.

Целью исследования было изучение импульсивности в поведении и экспрессии гена *Ghsr* в гипоталамусе, миндалине, префронтальной коре (pFC) у крыс, подверженных ранним стрессам MS или IS.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 72 крысах линии Вистар массой 250–300 г (62 самцах и 10 самках). Животные были выращены в питомнике “Рапполово” (Тосненский район Ленинградской области). В виварии ФБГНУ “Институт экспериментальной медицины” животных содержали в стандартных клетках (40 × 50 × 20 см) при свободном доступе к воде и гранулированному корму. Использовали инвертированный свет с 8:00 до 20:00 и при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Подопытные животные после поступления из питомника проходили 2-недельный период карантина в виварии ФБГНУ “Институт экспериментальной медицины”. Самок крыс линии Вистар содержали в пластиковых клетках (40 × 50 × 20 см) по 5 особей с доступом к воде и пище *ad libitum*. В каждую клетку подсаживали по

одному самцу к пяти самкам, на следующий день у самок производили забор вагинальных мазков и исследовали их методом световой микроскопии. Если у самок в мазках обнаруживали сперматозоиды в стадию проэструса, то этот день считали началом беременности. После наступления беременности животных помещали в индивидуальную клетку. Беременность протекала 20 ± 2 дня. Для стрессирования потомства применяли методы MS или IS.

Модель отлучения от матери. Крысят со 2-го по 12-й день постнатального периода помещали в индивидуальные пластиковые стаканчики на 180 мин в течение 10 последовательных дней. Зрительный контакт с матерью был исключен. После MS и молочного вскармливания 20 крысят выращивали в стандартных клетках по 5 особей в каждой. В опыте использовали 20 самцов в возрасте 90–100 дней и массой 200–250 г [22].

Модель социальной изоляции. На 21-й день после рождения (сразу после молочного вскармливания) самцов рассаживали в индивидуальные клетки. В возрасте 90–100 дней животных использовали для изучения поведения. После каждого эксперимента животных возвращали в свои жилые клетки.

Вариант Iowa Gambling Task тест “вероятности и величины подкрепления”. Установка для подачи пищевого подкрепления включала стартовую площадку ($33 \times 50 \times 35$ см) и 3 рукава ($50 \times 15 \times 35$ см) (рис. 1). В конце каждого из рукавов находилась кормушка с автоматическим управлением. Пищевое подкрепление подавалось при достижении кормушки в каждом рукаве 3-рукавного лабиринта. Когда животное выходило из рукава на стартовую площадку, происходила подача следующего подкрепления. Обучение производили каждый день. Тестировали побежки к кормушке и возвращения в стартовую камеру в течение 10 мин и не подавали каких-либо дополнительных сигналов. Животных кормили ежедневно, ограничивая время питания 4 ч, при этом осуществлялся свободный доступ к воде [17]. Пищевую депривацию выдерживали перед каждым опытом в течение 20 ч. Животных обучали в 3-рукавном лабиринте в течение 21 дня. В качестве подкрепления служило семя подсолнуха. В первые дни эксперимента применяли тренировочный режим пищевого подкрепления. При каждом выборе рукава одно животное получало одно семя. При каждом выборе рукава 2 подавали два семени, и при каждом выборе рукава 3 осуществляли подачу трех семян. Тренировочный режим подачи пищевого подкрепления длился 5 дней. В течение последующих двух дней эксперименты не осуществляли [18]. На 8-й день обучения изменяли режим пищевого подкрепления. В рукаве 1 подавали два семени (режим подкрепления FR1-2). При этом каждое достижение кормушки подкреплялось пищей. В рукаве 2 подавали три семени в режиме FR2-3 и подкрепляли каждую вторую побежку к кормушке, в рукаве 3 подавали 4 семени в режиме FR3-4 (т.е. только каждая 3-я побежка к кормушке подкреплялась пищей). Таким образом, без вознаграждения оставались 1/2 заходов во 2-й рукав и 2/3 заходов в 3-й рукав лабиринта. В этом режиме крыс обучали 2 нед. Крыс, не совершавших заходы в рукава лабиринта, из эксперимента изымали (не более 15%) [18].

Метод ПЦР. После тестирования в лабиринте животных умерщвляли путем декапитации, извлекали на холоде структуры мозга (гипоталамус, миндалина, префронтальная кора), немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа. Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol (Ambion, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 20 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, Promega, США) [20]. ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей от 1 до 2 мкг кДНК (Синтол, Россия), смесь специфических прямых и

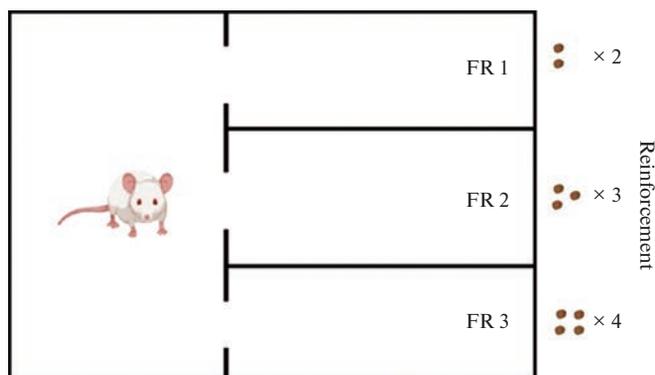


Рис. 1. Схема установки для определения вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте.

обратных праймеров, подобранных и синтезированных в компании “Beagle” (Россия) (табл. 1) [20]. Перед проведением экспериментов все праймеры прошли проверку на эффективность с пробами положительного контроля. Во всех постановках Real-Time PCR использовались отрицательные и положительные контроли, в конце реакции анализировали местоположение пиков кривых плавления для каждого комплекта праймеров. Полученные данные нормированы к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитаны в относительных единицах по отношению к уровню мРНК рецептора грелина в контрольной группе для каждой структуры мозга отдельно методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [20]. Ген домашнего хозяйства *Gapdh* был выбран, исходя из того, что ранее проведенные исследования свидетельствуют о незначительном изменении экспрессии данного гена при различных экспериментальных условиях [23].

Статистические методы анализа. Статистический анализ проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова. В тесте вероятности и величины подкрепления при сравнении числа посещений рукавов трехрукавного лабиринта использовали *t*-критерий Стьюдента. Для анализа морфологических и ПЦР данных применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. При парном сравнении групповых средних в post-hoc анализе использовали критерий Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде средних значений и стандартной ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали влияние стресса MS в раннем онтогенезе на импульсивный компонент игровой зависимости. В тесте величины и вероятности подкрепления (вари-

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Gapdh</i> NM_017008.4	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'
<i>Ghr</i> NM_032075.3	5'-CCTGGTGTCTTTGTCTCTTCTAC-3'	5'-GTTCTGCCTCTCCCAAGTCCC-3'

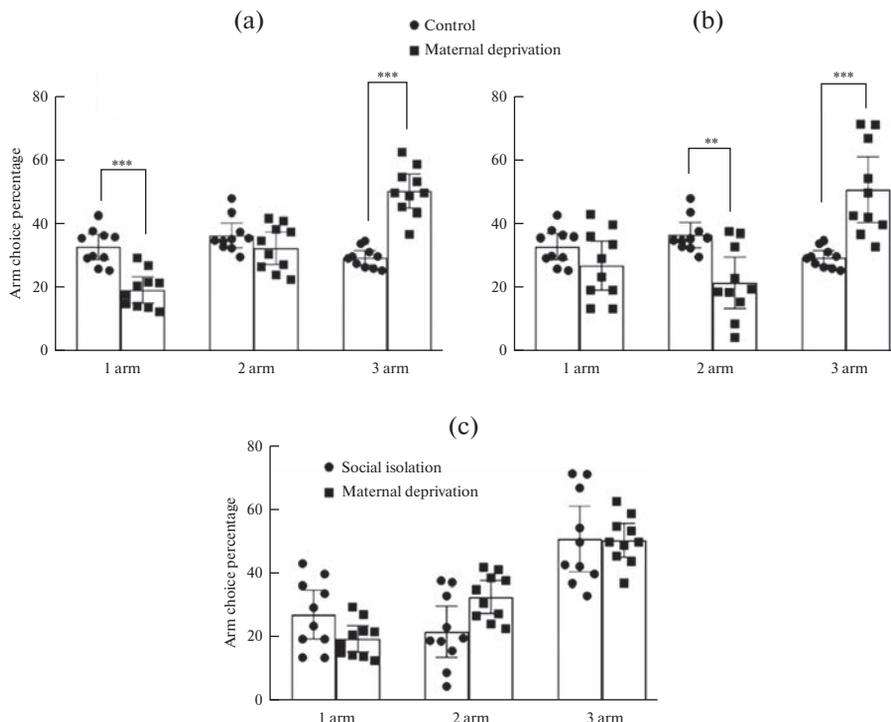


Рис. 2. Влияние различных видов стрессорного воздействия на импульсивный компонент игровой зависимости. (а) – влияние стресса материнской депривации в раннем онтогенезе на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. (б) – влияние стресса социальной изоляции после периода молочного вскармливания на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. (с) – влияние стресса социальной изоляции после периода молочного вскармливания в онтогенезе и стресса материнской депривации в раннем онтогенезе на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, *** – $p < 0.0001$ относительно контрольной группы животных.

анте IOWA теста) определяли количество побегов в каждый рукав трехрукавного лабиринта. Были изучены 2 группы животных: интактные крысы (контроль) и крысы MS (экспериментальная группа). В группе MS (со 2-х по 12-е сут) в 1.5 раза увеличивалось число заходов в 3-й рукав ($t(18) = 8.098$, $p < 0.0001$), что свидетельствует о выборе большей величины подкрепления при его низкой вероятности. Число заходов в 1-й рукав (вознаграждение с высокой вероятностью (100%)), но с наименьшим пищевым подкреплением) при этом снижалось ($t(18) = 5.316$, $p < 0.0001$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2а).

Исследовали влияние стресса IS после периода молочного вскармливания на импульсивный компонент игровой зависимости. В тесте величины и вероятности подкрепления (варианте IOWA теста) определяли количество побегов в каждый рукав лабиринта. Были изучены две группы животных: интактные крысы (контроль) и крысы IS (экспериментальная группа).

В группе IS увеличивалось число заходов в 3-й рукав лабиринта ($t(18) = 4.525$, $p = 0.0003$), что свидетельствует о выборе большей величины подкрепления при его низкой вероятности. Число заходов во 2-й рукав (вознаграждение с более высокой

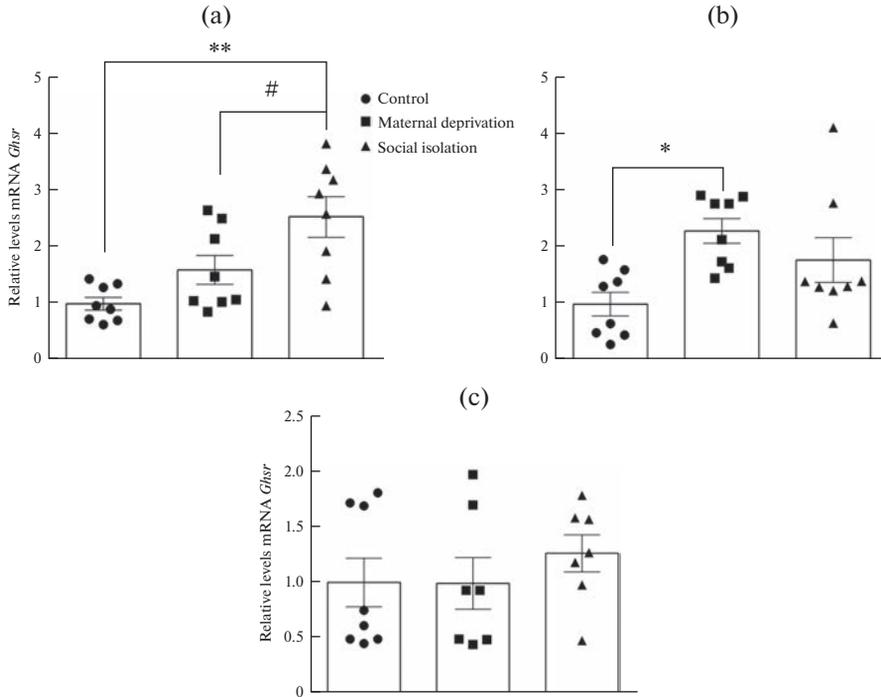


Рис. 3. Уровень мРНК рецептора грелина в гипоталамусе (а), миндалине (б), префронтальной коре (с) головного мозга крыс при различных видах стрессорного воздействия. * – $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # – $p < 0.05$ по отношению к группе материнской депривации. Данные нормированы к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитаны в относительных единицах по сравнению с контрольной группой методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

вероятностью (50%), но с меньшим пищевым подкреплением) при этом снижалось ($t(18) = 3.764, p = 0.0014$) по отношению к контрольной группы крыс (рис. 2б).

Проводили сравнительный анализ влияния стресса MS в раннем онтогенезе и IS после периода молочного вскармливания в онтогенезе на импульсивный компонент игровой зависимости. Исследованы две экспериментальные группы: крысы, выращенные в социальной изоляции, и крысы с отлучением от матери. В группе животных, выращенных в социальной депривации, число заходов в рукава лабиринта достоверно не отличалось от показателей, которые были зарегистрированы в группе крыс с материнской депривацией (рис. 2с).

Сравнительный анализ уровня мРНК рецептора грелина в структурах головного мозга у животных, подверженных стрессу материнской депривации и животных, выращенных в условиях социальной изоляции. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил влияние вида стрессорного воздействия на уровень мРНК рецептора грелина в гипоталамусе и миндалине у экспериментальных животных [$F(2,21) = 8.779, p = 0.0017$ и $5.165, p = 0.0150$ соответственно]. По данным post hoc анализа у крыс, выращенных в социальной изоляции, наблюдалось повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе по сравнению с животными контрольной группы и после материнской депривации ($p < 0.05$) (рис. 3а). Напротив, в миндалине увеличивался уровень мРНК рецептора грелина у крыс MS группы по сравнению с контролем ($p < 0.05$), при этом достоверных различий между животными IS группы

и контрольной группы не наблюдалось (рис. 3b). Достоверных изменений в уровне мРНК грелинового рецептора в rFC у крыс с MS и IS по сравнению с животными контрольной группы не отмечалось (рис. 3c).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращивание в условиях социальной изоляции вызывали стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости [20]. В группе крыс с материнской депривацией число заходов в 3-й рукав лабиринта увеличивалось в 1.5 раза, что свидетельствует о предпочтении выбора более высокой величины подкрепления при низкой вероятности получения вознаграждения. Число заходов в 1-й рукав (вознаграждение с высокой вероятностью (100%), но с наименьшим пищевым подкреплением) при этом снижалось. В группе крыс с социальной изоляцией также увеличивалось число заходов в 3-й рукав лабиринта. Число заходов во 2-й рукав (вознаграждение с более высокой вероятностью (50%), но с меньшим пищевым подкреплением) при этом уменьшалось. При этом число заходов в рукава лабиринта достоверно не отличалось от показателей в группе крыс с материнской депривацией. Полученные данные во многом согласуются с данными литературы. Разлучение с матерью в раннем онтогенезе вызывает стойкие изменения эмоциональных реакций, направленных на формирование зависимости от аддиктивных средств [6, 7]. Разлучение с матерью или выращивание в изоляции вызывают отдаленные расстройства поведения [4]. При этом наблюдаются повышение уровня тревожности, депрессий и злоупотребления психоактивными средствами [5]. Ранее в наших исследованиях было показано повышение импульсивного компонента игровой зависимости у крыс, выращенных в изоляции, по числу закапываний шариков в marble тесте [17]. Исследований игровой зависимости у животных после отлучения от матери в доступной литературе нами обнаружено не было, хотя у человека повышение ее проявлений является хорошо установленным фактом [24].

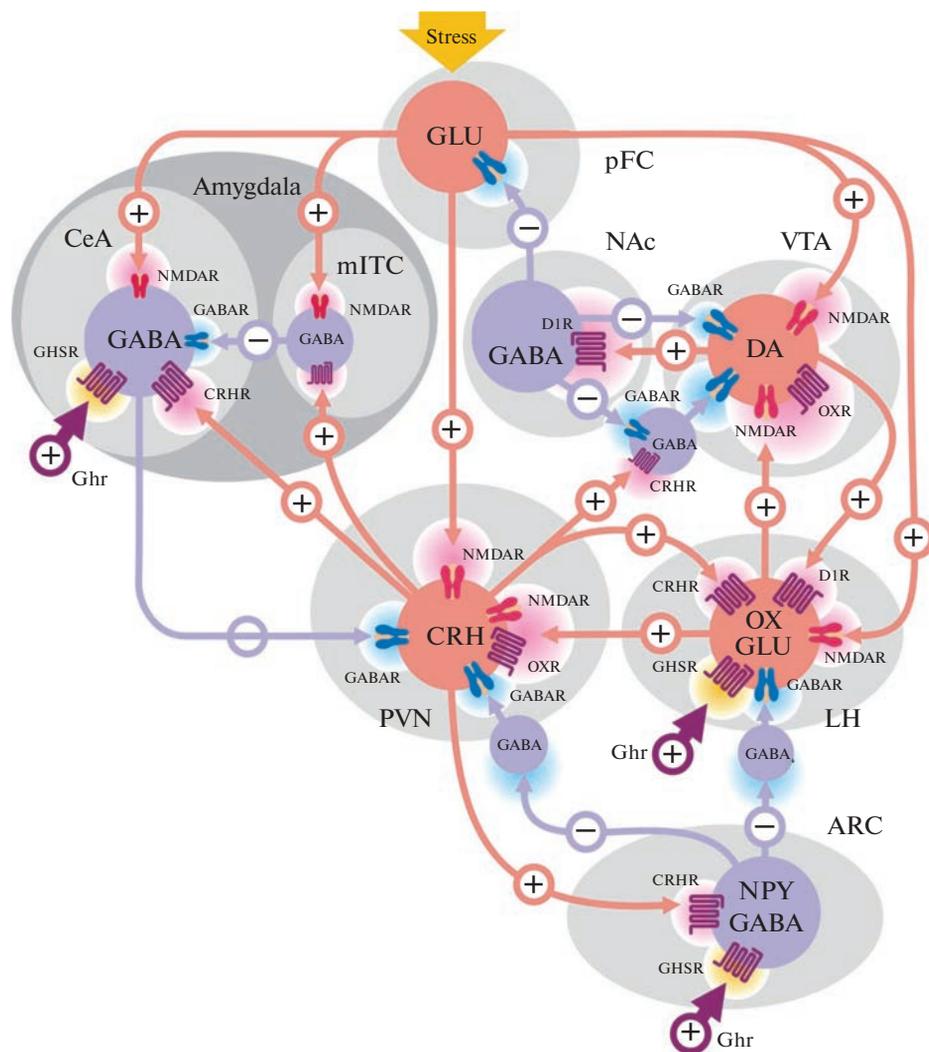
В настоящем исследовании изучали роль рецептора грелина в механизмах уязвимости к поведению риска [18] и импульсивности в поведении [25] на модели игровой зависимости у животных с различным индивидуальным опытом [17]. Хронический стресс отнятия от матери вызывал повышение уровня мРНК рецептора грелина в миндалине по отношению к контрольной группе крыс. Хронический стресс выращивания в условиях социальной изоляции вызывал повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе по отношению к контрольной группе крыс. Таким образом, отнятие от матери в раннем онтогенезе влияет преимущественно на экстрагипоталамический уровень регуляции грелина в головном мозге, в то время как выращивание в условиях социальной изоляции в большей степени связано с влиянием на гипоталамическую систему его регуляции. Показано, что наиболее высокий уровень мРНК рецептора грелина наблюдаются в гипоталамусе и гипофизе, а низкий – в гиппокампе, миндалине и в ядрах ствола мозга [26]. Грелин действует в первую очередь в гипоталамусе и стимулирует поведение приема пищи, направленное на регуляцию энергетического баланса [9]. Ранее в наших исследованиях показаны активация пищевого поведения и увеличение массы тела у крыс, выращенных в изоляции [27, 51]. Значение передачи сигналов грелина в областях мозга за пределами гипоталамуса заключается в его действии на обучение и память, вознаграждение и мотивацию, тревогу и депрессию [28]. Сравнительный анализ, проведенный в рамках работы, подтвердил преимущественное действие стресса отнятия от матери в раннем онтогенезе на экстрагипоталамический уровень

регуляции грелиновой системы мозга. Наблюдалось повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе у крыс, подверженных стрессу социальной изоляции, по сравнению с показателями у животных после стресса материнской депривации. В миндалине и префронтальной коре различий в уровнях мРНК рецептора грелина у крыс, выращенных в социальной депривации по сравнению с группой крыс, подверженных стрессу материнской депривации, отмечено не было.

В наших более ранних исследованиях показано, что после введения [D-Lys3] – GHRP-6 наблюдалось стремление получить подкрепление с высокой вероятностью (100%) в трехрукавном лабиринте, но наименьшей величиной вознаграждения, т.е. снизить риск получения пищевого подкрепления до минимума. Это было связано с повышением обмена дофамина в гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме [18]. При введении грелина отмечено увеличение соотношения побегов в сторону третьего рукава лабиринта с меньшей вероятностью, но высокой величиной подкрепления [21]. В исследованиях других авторов показано, что уровень грелина в сыворотке крови у пациентов с алкогольной зависимостью значительно повышен, а введение ацетил-грелина, лиганда грелинового рецептора [29], увеличивает тягу к алкоголю [30]. Хронические стрессы вызывают повышение содержания ацетил-грелина, которое сохраняется после прекращения воздействия стрессора [31, 32].

Возможными мишенями действия грелина в ответ на хронический стресс, по-видимому, являются нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN) [32], в которых отмечается высокая концентрация кортиколиберина (corticotropin-releasing hormone, CRH) [33]. Рецепторы грелина были найдены в паравентрикулярном ядре. Введение грелина повышало концентрацию c-fos-протеина в CRH-содержащих нейронах паравентрикулярного ядра и вызывало активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) [34]. Мишенью действия грелина при стрессе, по-видимому, также служит система расширенной миндалины, которая включает в себя центральное ядро миндалины (CeA), ядро ложа конечной полоски (BNST), безымянную субстанцию и прилежащее ядро (NAc) и является экстрагипоталамической системой CRH [35]. Структуры расширенной миндалины получают входы от дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (VTA) и составляют основную функциональную систему для реализации эмоционально-мотивационных эффектов различных наркотиков [36]. Блокада CRH нейромедиаторной передачи в CeA, BNST и NAc устраняет или значительно снижает активирующие эффекты аддиктивных средств [35]. Структуры расширенной миндалины, по-видимому, важны для реализации механизмов подкрепления [37]. Показано, что CeA и BNST оказывают регулирующее влияние на гипоталамус [38]. Психогенный стресс вызывает активацию путей в CeA, BNST, NAc, rFC и затем в CRH-нейронах PVN [39]. Введение грелина вызывает спайковую активность в CRH-содержащих нейронах, увеличивает уровень мРНК CRH в PVN и уровень кортикостерона в сыворотке крови у грызунов. Грелин может действовать на CRH-содержащие нейроны и через другие нейрохимические системы: орексина, нейропептида Y (NPY), моноаминергические нейроны, обладающие рецепторами грелина [40, 41].

Для описания влияния раннего опыта на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы традиционно применяется метод отлучения от матери [42]. Периодическое разлучение с матерью является мощным социальным хроническим стрессором, который может активировать реакцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у крысят во время периода гипореактивности в течение первых двух недель после рождения [43]. Разлучение с матерью может изменить нейроэндокринные и нейромедиаторные ответные реакции на стрессоры и при повторном воздействии привести к долгосрочному повышению реактивности оси гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, тревоге,



депрессии и злоупотреблению наркотиками во взрослом возрасте [44]. Показано, что содержание грелина в крови повышается при стрессе разлучения с матерью [45, 46]. Метод выращивания в изоляции после периода молочного вскармливания также традиционно используется для изучения влияния раннего опыта и фактора стресса социальной депривации на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [44]. Установлено, что у крыс, выращенных в условиях социальной депривации, повышается уровень тревожности, депрессивности и реактивности в ответ на подкрепляющие агенты среды, наблюдается гиперактивность и уязвимость к аддиктивному поведению [47]. Преобладание типичных паттернов поведения при социальной изоляции позволило нам специально выделить “синдром социальной изоляции” [47]. Результаты биохимических и молекулярных исследований подтвердили взаимосвязь нарушений поведения, вызванных социальной изоляцией, и изменением функционирования ряда нейрохимических систем мозга [48]. В настоящей работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращи-

Рис. 4. Участие грелина в активации CRH-нейронов гипоталамуса и CeA при хроническом психогенном стрессе в раннем онтогенезе. Приведена схема Рейхардта и Шабанова [49] в модификации. Грелин активирует NPY-нейроны ARC ядра, которые снижают тоническую активность гипотетических GABA-интернейронов, тормозящих активность CRH-нейронов PVN. Одновременно NPY-нейроны блокируют тоническое ингибирование OX-нейронов MCH/GABA-нейронами LH и GABA-интернейронами, находящимися за пределами LH. Активацию OX-нейронов LH осуществляют: (а) грелин посредством GHSR рецептора, (б) Glu-сигналы из rFC при вовлечении коры мозга в стресс-ответ, (в) через положительную обратную связь из VTA через D1R рецепторы. CRH-нейроны PVN модулируют GABA систему расширенной CeA. Активированные OX-нейроны стимулируют CRH-нейроны посредством секреции возбуждающих медиаторов OX/Glu в PVN. Кроме того, CRH-нейроны PVN и нейроны CeA получают Glu-сигнал при возбуждении rFC. В свою очередь, CRH-нейроны PVN посылают положительную обратную связь в отношении NPY-нейронов ARC и OX-нейронов LH. Кроме того, CRH-нейроны PVN могут модулировать GABA/Glu входы в DA-нейроны непосредственно или путем стимуляции нейронов LH, наряду с OX продуцирующих Glu. В конечном итоге, возбуждение CRH-нейронов PVN приводит к активации HPA-оси и повышению уровня кортикостерона, который оказывает мощное воздействие на структуры мозга. CRH – кортикотропин рилизинг гормон, CRHR – рецептор CRH, ARC – аркуатное ядро, PVN – паравентрикулярное ядро, LH – латеральный гипоталамус, VTA – вентральная область покрышки, CeA – центральное ядро миндалины; NAc – прилежащее ядро, rFC – префронтальная кора, NPY – нейропептид Y, Glu – глутамат, NMDAR – рецептор Glu, селективно связывающий N-метил-D-аспарат, GABA – гамма-аминомасляная кислота, GABAR – GABA-A рецептор GABA, OX – орексин, OXR – рецептор OX, DA – дофамин, D1R – возбуждающий рецептор DA первого типа, Ghr – грелин, GHSR – рецептор грелина, mITC – интернейроны миндалины.

вание в условиях социальной изоляции вызывали стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости [20].

На основании анализа литературных и собственных данных мы приводим гипотетическую схему участия грелина в активации CRH-нейронов гипоталамуса и CeA при хроническом психогенном стрессе в раннем онтогенезе (рис. 4).

Таким образом, в работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращивание в условиях социальной изоляции вызывают стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости. Отнятие от матери или выращивание в условиях социальной изоляции вызывали повышение уровня мРНК рецептора грелина соответственно в миндалине и гипоталамусе по сравнению с контрольной группой животных. Таким образом, в то время как выращивание в условиях социальной изоляции в большей степени связано с влиянием на гипоталамическую систему грелина в головном мозге, отнятие от матери в раннем онтогенезе влияет преимущественно на экстрагипоталамический уровень его регуляции. Можно заключить, что увеличение уровня мРНК рецептора грелина в головном мозге связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости у крыс, подверженных психотравмирующему воздействию в раннем онтогенезе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проведены в соответствии с этическими принципами, обозначенными в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г., и одобрены комиссией по биоэтике ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022–2025 гг.). “Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС”, шифр FGWG-2022-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л. — идея работы, планирование эксперимента, обсуждение, написание и редактирование статьи. С.С.П. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание и редактирование статьи. Э.А.С. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, проведение ПЦР анализа. Б.А.Р. — создание схемы действия стресса, обсуждение полученных данных. Е.Р.Б. — статистическая обработка данных, написание и редактирование статьи. П.Д.Ш. — общее руководство, обсуждение, написание и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ* (2006) Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol* 27(2): 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>
2. *Catani C, Jacob N, Schauer E, Kohila M, Neuner F* (2008) Family violence, war, and natural disasters: a study of the effect of extreme stress on children’s mental health in Sri Lanka. *BMC Psychiatry* 8(33). <https://doi.org/10.1186/1471-244X-8-33>
3. *Lang AJ, Aarons GA, Gearity J, Laffaye C, Satz L, Dresselhaus TR, Stein MB* (2008) Direct and indirect links between childhood maltreatment, posttraumatic stress disorder, and women’s health. *Behav Med* 33(4): 125–135. <https://doi.org/10.3200/BMED.33.4.125-136>
4. *Tata D* (2012) Maternal separation as a model of early stress: Effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hellenic J Psychol* 9: 84–101.
5. *Naqavi MR, Mohammadi M, Salari V, Nakhaee N* (2011) The relationship between childhood maltreatment and opiate dependency in adolescence and middle age. *Addict Health* 3(3–4): 92–98.
6. *Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W* (2013) Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol* 181: 306–309.
7. *Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ* (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73(3): 321–330.
8. *Krupina NA, Shisenova SD, Khlebnikova NN* (2020) Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex. *Brain Sci* 10(11): 1–29.
9. *Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
10. *Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A* (2009) Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 61(4): 430–481. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001958>
11. *Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M* (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metabol* 87(6): 2988. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8739>
12. *Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM* (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatr* 67(9): 880–886. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.030>
13. *Carroll ME, France CP, Meisch RA* (1979) Food deprivation increases oral and intravenous drug intake in rats. *Science (New York)* 205(4403): 319–321. <https://doi.org/10.1126/science.36665>

14. *Kharbanda KK, Farokhnia M, Deschaine SL, Bhargava R, Rodriguez-Flores M, Casey CA, Goldstone AP, Jerlhag E, Leggio L, Rasineni K* (2022) Role of the ghrelin system in alcohol use disorder and alcohol-associated liver disease: A narrative review. *Alcoholism, Clin and Exp Res* 46(12): 2149–2159. <https://doi.org/10.1111/acer.14967>
15. *Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, Engel JA* (2011) Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addiction Biol* 16(1): 82–91. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00231.x>
16. *Ducharme R, Anisman H, Abizaid A* (2010) Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 32(4): 632–639. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07310>
17. *Шабанов ПД, Якушина НД, Лебедев АА* (2020) Фармакология пептидных механизмов игрового поведения у крыс. *Вопр наркол* 4(187): 24–44. [*Shabanov PD, Yakushina ND, Lebedev AA* (2020) Pharmacology of peptide mechanisms of gambling behavior in rats. *Vopr Narkol* 4(187): 24–44. (In Russ)].
18. *Geisel O, Panneck P, Hellweg R, Wiedemann K, Muller CA* (2015) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with pathological gambling and internet use disorder. *Psychiatry Res* 226: 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.11.078>
19. *Lebedev AA, Karpova IV, Bychkov ER, Yakushina ND, Thyssen IY, Gramota KE, Efimov NS, Shabanov PD* (2022) The ghrelin antagonist [D-LYS3]-GHRP-6 decreases signs of risk behavior in a model of gambling addiction in rats by altering dopamine and serotonin metabolism. *Neurosci Behav Physiol* 52(3): 415–421. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01255-x>
20. *Сексте ЭА, Лебедев АА, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Шабанов ПД* (2021) Повышение уровня мРНК рецептора орексина первого типа (OX1R) в структурах головного мозга у крыс, склонных к импульсивности в поведении. *Биомед химия* 67(5): 411–417. [*Sekste EA, Lebedev AA, Bychkov ER, Airapetov MI, Gramota KE, Tissen IY, Shabanov PD* (2021) Increase in the level of orexin receptor 1 (OX1R) mRNA in the brain structures of rats prone to impulsivity in behavior. *Biomed Chem* 67(5): 411–417. (In Russ)].
21. *Лебедев АА, Хохлов ПП, Якушина НД, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Шабанов ПД* (2019) Фармакологический и биохимический анализ участия пептидной системы грелина в поведенческих проявлениях игровой зависимости у крыс. *Экспер клин фармакол* 82(6): 16–20. [*Lebedev AA, Khokhlov PP, Yakushina ND, Gramota KE, Tissen IY, Bychkov ER, Airapetov MI, Shabanov PD* (2021) Pharmacological and biochemical analysis of participation of the ghrelin peptide system in behavioral manifestations of gambling in rats. *Ekspert klin farmakol* 82(6): 16–20. (In Russ)].
22. *Балакина МЕ, Дегтярева ЕВ, Некрасов МС, Брус ТВ, Пурвеев СС* (2021) Воздействие раннего постнатального стресса на психоэмоциональное состояние и развитие склонности к чрезмерному употреблению высокоуглеводной пищи у крыс. *Рос биомед исследов* 6(2): 27–37. [*Balakina ME, Degtyareva EV, Nekrasov MS, Brus TV, Purveev SS* (2021) Effect of early postnatal stress upon psychoemotional state and development of excessive consumption of high-carbohydrate food in rats. *Russ Biomed Res* 6(2): 27–37. (In Russ)].
23. *Wang S, Wang J, Lv X* (2018) Selection of reference genes for expression analysis in mouse models of acute alcoholic liver injury. *Int J Mol Med* 41(6): 3527–3536. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3527>
24. *Yang B, Cai G, Xiong C, Huang J* (2021) Relative Deprivation and Game Addiction in Left-Behind Children: A Moderated Mediation. *Front Psychol* 12: 639051. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.639051>
25. *Sekste EA, Lebedev AA, Bychkov ER, Airapetov MI, Gramota KE, Thyssen IY, Shabanov PD* (2021) Increase in the level of orexin receptor 1 (OX1R) mRNA in the brain structures of rats prone to impulsivity in behavior. *Biomed Chem* 67(5): 411–417. <https://doi.org/10.18097/PBMC20216705411>
26. *Alvarez-Crespo M, Skibicka KP, Farkas I, Molnár CS, Eggecioglu E, Hrabovszky E, Lipsits Z, Dickson SL* (2012) The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PLoS One* 7(10): e46321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046321>
27. *Ветлугин ЭА, Бычков ЕР, Абросимов МЕ, Москалев АР, Пшеничная АГ, Пурвеев СС, Лебедев ВА, Лебедев АА, Шабанов ПД* (2022) Анксиолитическое и антидепрессивное действие SNAP 94847, антагониста рецептора 1-го типа меланин-концентрирующего гормона. *Педиатрия* 13(1): 25–34 [*Vetlugin EA, Bychkov ER, Abrosimov ME, Moskalyev AR, Pshenichnaya AG, Purveev SS, Lebedev VA, Lebedev AA, Shabanov PD* (2022) Anxiolytic and antidepressant effects of melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847. *Pediatrics* 13(1): 25–34. (In Russ)].

28. *Andrews ZB* (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34(1): 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.10.001>
29. *Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD* (2021) Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) in the brain. *Physiol Rep* 9(21): e15113.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15113>
30. *Leggio L, Zywiak WH, Fricchione SR, Edwards SM, de la Monte SM, Swift RM, Kenna GA* (2014) Intravenous ghrelin administration increases alcohol craving in alcohol-dependent heavy drinkers: a preliminary investigation. *Biol Psychiatry* 76(9): 734–741.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.019>
31. *Hemmann K, Raekallio M, Kanerva K, Hänninen L, Pastell M, Palviainen M, Vainio O* (2012) Circadian variation in ghrelin and certain stress hormones in crib-biting horses. *Veterin J* 193(1): 97–102.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.027>
32. *Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM* (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neurosci* 11(7): 752–753.
<https://doi.org/10.1038/nn.2139>
33. *Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M* (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7(2): e31462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031462>
34. *Cabral A, Portiansky E, Sánchez-Jaramillo E, Zigman JM, Perello M* (2016) Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67: 27–39.
<https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2016.01.027>
35. *Roik RO, Lebedev AA, Shabanov PD* (2019) The value of extended amygdala structures in emotive effects of narcogenic with diverse chemical structure. *Res Pharmacol* 5(3): 11–19.
<https://doi.org/10.3897/npharmacology.5.38389>
36. *Koob GF* (2009) Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* 56(1): 18–31.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.043>
37. *Klein AK, Brito MA, Akhavan S, Flanagan DR, Le N, Ohana T, Patil AS, Purvis EM, Provenzano C, Wei A, Zhou L, Etenberg A* (2017) Attenuation of the anxiogenic effects of cocaine by 5-HT1B autoreceptor stimulation in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychopharmacology* 234(3): 485–495.
<https://doi.org/10.1007/s00213-016-4479-3>
38. *Pina MM, Cunningham CL* (2017) Ethanol-seeking behavior is expressed directly through an extended amygdala to midbrain neural circuit. *Neurobiol Learning and Memory* 137: 83–91.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.11.013>
39. *Aguilera G, Liu Y* (2012) The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol* 33(1): 67–84.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.08.002>
40. *Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M* (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7(2): e31462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031462>
41. *Willesen MG, Kristensen P, Romer J* (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70(5): 306–316.
<https://doi.org/10.1159/000054491>
42. *Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM* (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61(1): 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.011>
43. *Zoicas I, Neumann ID* (2016) Maternal separation facilitates extinction of social fear in adult male mice. *Behav Brain Res* 297: 323–328.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.034>
44. *Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ* (2005) Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30(12): 2192–2204.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300769>
45. *Salzmann C, Otis M, Long H, Roberge C, Gallo-Payet N, Walker CD* (2004) Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. *Endocrinology* 145(4): 1810–1822.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1514>

46. Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet ER, Holsboer F, Müller MB (2006) Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol* 18(11): 865–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01482.x>
47. Шабанов ПД, Лебедев АА, Мещеров ШК (2002) Дофамин и подкрепляющие системы мозга. Санкт-Петербург. [Shabanov PD, Lebedev AA, MescheroV ShK (2002) Dopamine and reinforcing systems of the brain. Saint Petersburg. (In Russ)].
48. Лебедев АА, Москалев АР, Абросимов МЕ, Ветлугин ЭА, Пшеничная АГ, Лебедев ВА, Евдокимова НР, Бычков ЕР, Шабанов ПД (2021) Действие антагониста нейропептида Y BMS193885 на переедание и эмоциональные реакции, вызванные социальной изоляцией у крыс. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 19(2): 189–202. [Lebedev AA, Moskalev AR, Abrosimov ME, Vetlugin EA, Pshenichnaya AG, Lebedev VA, Evdokimova NR, Bychkov ER, Shabanov PD (2021) Effect of neuropeptide antagonist BMS193885 on overeating and emotional responses induced by social isolation in rats. *Rev Clin Pharmacol and Drug Therapy* 19(2): 189–202. (In Russ)].
49. Рейхардт БА, Шабанов ПД (2022) Грелиновые механизмы пищевого вознаграждения. Часть 2. Взаимодействие грелина с гормонами, нейропептидами и другими эндогенными лигандами. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 20(3): 229–254. [Reichardt BA, Shabanov PD (2022) Ghrelin mechanisms of nutritional reward. Part 2. Interaction of ghrelin with hormones, neuropeptides and other endogenous ligands. *Rev Clin Pharmacol and Drug Therapy* 20(3): 229–254. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF203229-254>

Studying the Involvement of Ghrelin in the Mechanism of Gambling Addiction in Rats after Exposure to Psychogenic Stressors in Early Ontogenesis

A. A. Lebedev^{a, *}, S. S. Purveev^{a, b}, E. A. Sexte^a, B. A. Reichardt^a,
E. R. Bychkov^a, and P. D. Shabanov^a

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

^b*St. Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia*

*e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

We investigated the role of ghrelin and its receptors in the manifestation of gambling addiction elements in rats exposed to early psychogenic stress. Rearing in conditions of social isolation or maternal deprivation in early ontogeny increased risk behavior and impulsivity in the Iowa Gambling Task test: animals sought more food reinforcement, but with a low probability. Maternal deprivation or rearing in social isolation increased expression of *Ghsr* in the amygdala and hypothalamus respectively. The level of expression of the gene under study in the prefrontal cortex did not change. It is concluded that early psychogenic stress causes an imbalance in the brain ghrelin regulatory system, which manifests itself in increased of *Ghsr* level as well as elements of gambling addiction. The scheme of the effect of chronic stress on the hypothalamic ghrelin system and on the extrahypothalamic regulation of ghrelin is presented.

Keywords: gambling, maternal deprivation, isolation rearing, ghrelin, mRNA ghrelin receptor

H₂S-ОПОСРЕДОВАННАЯ ДИЛАТАЦИЯ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА: ВКЛАД K_{ATФ} И VK_{Ca}-КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

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

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

*E-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Проведено исследование реакций пиальных артерий на воздействие экзогенного сероводорода и оценка вклада K_{ATФ}- и VK_{Ca}-каналов в H₂S-опосредованную дилатацию у крыс разного возраста. Методом прижизненной микрофотосъемки у крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 и 18 мес. исследовались реакции пиальных артерий различных диаметров на воздействие раствора донора экзогенного сероводорода — гидросульфида натрия (NaHS, 30 мкМ), а также их изменение при предварительном применении блокаторов калиевых каналов: K_{ATФ} (глибенкламид, 10 мкМ) и VK_{Ca} (тетраэтиламмоний, 2 мМ). Установлено, что у крыс с возрастом происходит угнетение H₂S-индуцированной дилатации пиальных артерий и увеличение констрикторных ответов на воздействие экзогенного сероводорода. Возрастные изменения H₂S-индуцированной дилататорной реакции пиальных артерий у крыс зависят от размера сосудов. С возрастом уменьшается число дилатаций артерий диаметром больше 20 мкм. При этом старение не влияет на дилатацию более мелких артерий. Эти нарушения могут быть связаны с изменениями процессов, обусловленных активацией калиевых каналов. Обнаружено, что старение сопровождается увеличением вклада K_{ATФ}-каналов в осуществление H₂S-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметров менее 40 мкм. Вклад VK_{Ca}-каналов в дилатацию с возрастом снижается: у 18-месячных крыс эти каналы практически не участвуют в H₂S-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметром более 20 мкм.

Ключевые слова: H₂S-опосредованная вазодилатация, K_{ATФ}-каналы, VK_{Ca}-каналы, старение, пиальные артериальные сосуды

DOI: 10.31857/S0869813923080034, EDN: WPAUXQ

ВВЕДЕНИЕ

С возрастом в сердечно-сосудистой системе происходят существенные физиологические изменения, приводящие к дисфункции и нарушению регуляции тонуса кровеносных сосудов. В основе этих процессов может лежать нарушение действия и/или эффективности сигнальных молекул [1]. Сероводород (H₂S) является одним из трех известных газотрансмиттеров, играющих значительную роль в развитии патологических процессов в сердечно-сосудистой системе [2]. Ключевые молекулярные механизмы, которые управляют процессом развития возрастной сосудистой дисфункции, могут находиться под его влиянием [3]. Однако влияние старения на сигнальную систему H₂S до конца не изучено.

H₂S в клетках продуцируется тремя ферментативными системами: цистатионин-γ-лиазой (CSE) и цистатионин-β-синтазой (CBS) и 3-меркаптопируватсульфуртрансферазой [4, 5]. В стенках церебральных артерий H₂S может синтезироваться как в гладкомышечных клетках, так и в эндотелии с помощью CSE- и CBS-ферментов [5]. H₂S является регулятором тонуса кровеносных сосудов, он принимает участие в осуществлении как сосудистой дилатации, так и констрикции [4, 6]. Механизмы H₂S-опосредованной вазодилатации включают активацию калиевых каналов, снижение внутриклеточного pH и метаболическое ингибирование [7]. Кроме того, возможна эндотелий-зависимая H₂S-индуцированная вазорелаксация, непосредственно не связанная с активацией каналов, включающая высвобождение NO [2, 7]. Исследования возрастных изменений H₂S-опосредованных сосудистых реакций немногочисленны и их результаты весьма противоречивы. В качестве одной из причин изменения H₂S-опосредованных реакций при старении указывается уменьшение концентрации H₂S в плазме крови [8], что может быть связано с изменением экспрессии CSE- и CBS-ферментов [9, 10] или окислительным повреждением этих белков [1]. Экспрессия ферментов, продуцирующих H₂S, и вазоактивные свойства H₂S во многом зависят от NO [4, 11, 12], уровень и доступность которого с возрастом снижается [13]. Одним из основных механизмов реализации вазодилаторного эффекта H₂S является активация калиевых каналов. В мозговых сосудах дилаторное действие H₂S преимущественно связывают с открытием АТФ-зависимых калиевых каналов (K_{АТФ}) [2, 6, 14]. Также показана H₂S-опосредованная активация кальций-чувствительных калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca}), потенциал-зависимых калиевых каналов и TRP-каналов, которая может приводить к гиперполяризации либо в эндотелии, либо в клетках гладкой мускулатуры сосудов и расширению сосудов [2, 15–17]. Некоторыми исследователями H₂S рассматривается как эндотелиальный гиперполяризующий фактор, который может действовать посредством активации кальций-чувствительных калиевых каналов малой и средней проводимости [15]. Литературные данные о возрастных изменениях экспрессии и функциональной активности калиевых каналов ограничены и противоречивы [18–20], высказываются даже предположения о существовании регионарных различий во влиянии старения на активность калиевых каналов [20]. Изменения функциональной активности этих каналов могут влиять на развитие возрастных нарушений H₂S-опосредованной вазодилатации. Целью данного исследования было изучение у крыс разного возраста роли H₂S-индуцированных процессов в дилатации мозговых сосудов и оценка возрастных изменений вклада калиевых каналов в H₂S-опосредованную дилатацию мозговых сосудов. В задачи исследования входило сравнительное изучение реакций пиальных артерий на воздействие экзогенного H₂S и вклада K_{АТФ}- и BK_{Ca}-каналов в осуществление H₂S-опосредованной дилатации у крыс в возрасте 4 и 18 мес.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 ($n = 15$, массой 328 ± 21 г) и 18 месяцев ($n = 12$, массой 390 ± 75 г). Использовались крысы из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург). До проведения эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

При проведении прижизненного исследования реакций пиальных артерий крыс наркотизировали золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). Показатель среднего АД, измеренного прямым методом через катетер в бедренной артерии [21], в течение всего эксперимента оставался примерно на одном уровне: у крыс в возрасте 4 мес. — 124 ± 3 мм рт. ст., а в возрасте 18 мес. — 128 ± 6 мм рт. ст. Температура тела животного при проведении эксперимента поддерживалась на уровне 38°C .

Визуализация пиальных артерий проводилась с помощью оригинальной установки [21], через отверстие в теменной области черепа животного ($S \approx 1 \text{ см}^2$). Твердая мозговая оболочка в пределах отверстия удалялась. Поверхность мозга непрерывно орошалась раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO_3 15.5; MgCl_2 1.2; CaCl_2 2.5; NaH_2PO_4 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Система орошения поверхности головного мозга включала в себя цилиндрические воронки ВД-1 на 125 мл со фторопластовыми кранами. Для раствора Кребса и всех используемых в эксперименте растворов использовались отдельные воронки, которые располагались на 50 см выше орошаемого поля, что позволяло жидкости самотеком поступать к поверхности мозга. При помощи тефлоновых трубок каждая из воронок присоединялась к капилляру, расположенному внутри стеклянного сосуда, по которому постоянно циркулировала вода с температурой 38°C , подаваемая перистальтическим насосом Унирол-01 (ООО «Партнер Про», Россия). Капилляр располагался в непосредственной близости от поверхности мозга и заканчивался короткой пипеткой, конец которой подводился к самому краю операционного поля. Система осуществляла медленную подачу жидкости (одинаковую для всех используемых растворов). При этом жидкость равномерно (без образования капель) поступала на поверхность мозга в течение всего процесса измерения диаметра пиальных сосудов, что исключало механическое воздействие. Об этом свидетельствовали изменения показателей колебания диаметра сосудов при орошении поверхности мозга раствором Кребса, которые не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. При смене орошающих жидкостей трубки оросительной системы и термостатируемый капилляр тщательно промывались.

Исследования реакций пиальных артерий проводились в 4 отдельных группах животных. У первых 2 групп: крысы в возрасте 4 мес. ($n = 7$) и крысы в возрасте 18 мес. ($n = 6$), исследовали реакции артерий на воздействие H_2S . В качестве донора экзогенного H_2S использовался раствор гидросульфида натрия (Sodium hydrosulfide monohydrate (NaHS), Sigma-Aldrich, 30 мМ, орошение поверхности головного мозга). Время орошения составляло 2 мин, т.к. предварительные эксперименты показали, что в этот промежуток времени в ответ на воздействие NaHS в данной концентрации достигается наибольший процент числа дилатаций пиальных артерий. После прекращения орошения поверхности мозга раствором NaHS проводили отмывку раствором Кребса в течение 20 мин. Предварительные эксперименты показали, что этого времени достаточно для полной отмывки и достижения размеров исследуемых сосудов исходных значений. В дальнейшем эксперимент продолжался на фоне блокады K_{ATP} -каналов раствором глибенкламида (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мМ, в растворе диметилсульфоксида (DMSO)). Проводилось предварительное орошение поверхности мозга раствором глибенкламида в течение 10 мин с последующим добавлением NaHS в раствор блокатора. Концентрация DMSO в применяемых растворах глибенкламида составляла 0.1%. В предварительно проведенной серии экспериментов было установлено, что орошение поверхности головного мозга раствором DMSO в этой концентрации достоверно не изменяет диаметр пиальных сосудов крыс.

В 2 других группах: крысы в возрасте 4 мес. ($n = 8$) и крысы в возрасте 18 мес. ($n = 6$) исследовали реакции сосудов на воздействие раствора NaHS в отсутствие и

на фоне блокады BK_{Ca}-каналов раствором тетраэтиламмоний хлорида (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 5 мин с последующим добавлением NaHS в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие раствора NaHS 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 NaHS внутри каждой из исследованных групп. Общая продолжительность эксперимента составляла 40–50 мин, после чего животных усыпляли передозировкой раствора золегила (60 мг/кг).

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью оригинальной компьютерной программы “Blood Vessel Media Analyzer” (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрен режим контраста и увеличения изображения, а также калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. По изменению числа артерий, сузившихся в ответ на воздействие блокатора, судили об изменении вклада калиевых каналов в базальный тонус сосудов. Изменение вклада исследованных каналов в H₂S-опосредованную дилатацию артерий оценивали, сравнивая число дилатированных сосудов и степень их дилатации в ответ на воздействие раствора NaHS до и после применения блокатора.

Изменение количества расширившихся, сузившихся и не прореагировавших на воздействие сосудов выражалось в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔД оценивали в процентах как разность между значениями диаметра после (D₂) и до (D₁) воздействия, отнесенную к диаметру сосуда D₁ перед воздействием:

$$\Delta D = (D_2 - D_1) / D_1 \times 100.$$

При значениях $5.0 \pm 0.5\%$ считали, что реакция отсутствует, т.к. такие изменения соответствовали колебаниям диаметра в покое.

Проведено измерение 725 участков пиальных артериальных сосудов диаметром от 12 до 99 мкм у крыс в возрасте 4 мес. и 612 участков — у 18-месячных крыс (диаметр от 9 до 85 мкм). У каждой крысы было измерено от 30 до 70 участков сосудов. Выраженность сосудистой реакции на воздействие H₂S может варьировать в зависимости от размера сосудов [6]. Поэтому для последующего анализа измеренные участки сосудов разделялись на группы в соответствии с их исходными диаметрами: мелкие (диаметром до 20 мкм), средние (от 20 до 40 мкм) и крупные (диаметром более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Проверка экспериментальных данных на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении 2 групп при нормальном характере распределения проводилось с использованием непарного *t*-теста. При сравнении более 2 групп применялся двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке отличным от нормального при сравнении 2 групп использовался *U*-критерий Манна–Уитни. Для сравнения большего числа групп применялся критерий Краскела–Уоллеса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна. Если исследование на нормальность показывало его отсутствие хотя бы для одной выборки, статистический анализ полу-

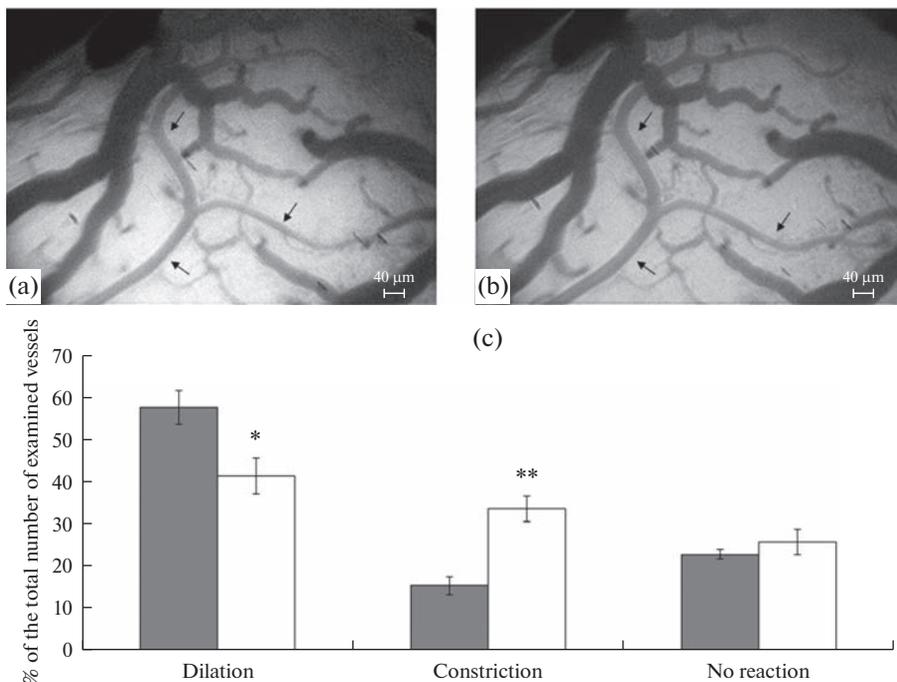


Рис. 1. Реакция пиальных артерий на воздействие раствора NaHS. Микрофотографии пиальных сосудов крыс в возрасте 4 мес., $\times 140$: (a) – исходное состояние; (b) – реакция на орошение поверхности головного мозга раствором NaHS (30 мкМ, 2 мин). Стрелками указан артериальный участок пиальной сосудистой сети. (c) – реакции пиальных артерий (% от общего числа исследованных артерий): темная заливка – крысы в возрасте 4 мес.; белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U -критерий Манна–Уитни).

ченных данных проводился с использованием непараметрических методов. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ответ на воздействие раствора NaHS у 4-месячных крыс преимущественной реакцией пиальных артерий была дилатация (58.26 \pm 4.09% из всех исследованных артерий), 15.8 \pm 2.11% сужалось, часть сосудов не изменяла диаметра (рис. 1). Наибольшее число дилатаций наблюдалось у артерий диаметром менее 20 мкм (75.63 \pm 4.28%). С увеличением диаметра артерий число дилатаций в ответ на воздействие NaHS достоверно уменьшалось ($p < 0.0001$, KW = 56.05, критерий Краскела–Уоллиса) и у артерий диаметром более 40 мкм составляло только 53.79 \pm 4.09% (рис. 2). Степень дилататорной реакции с увеличением диаметра артерий также достоверно снижалась ($p < 0.0001$, KW = 51.35, критерий Краскела–Уоллиса, табл. 1): с 38.65 \pm 4.84% у мелких артерий до 19.93 \pm 3.84% у артерий крупных диаметров.

Аппликация глибенкламида у 4-месячных крыс вызывала сужение в среднем около 50% артерий всех исследованных диаметров (рис. 3а). Число H₂S-опосредованных дилатаций на фоне предварительного введения глибенкламида изменялось только у мелких и средних артерий – уменьшалось в среднем на 20% (рис. 4а) без

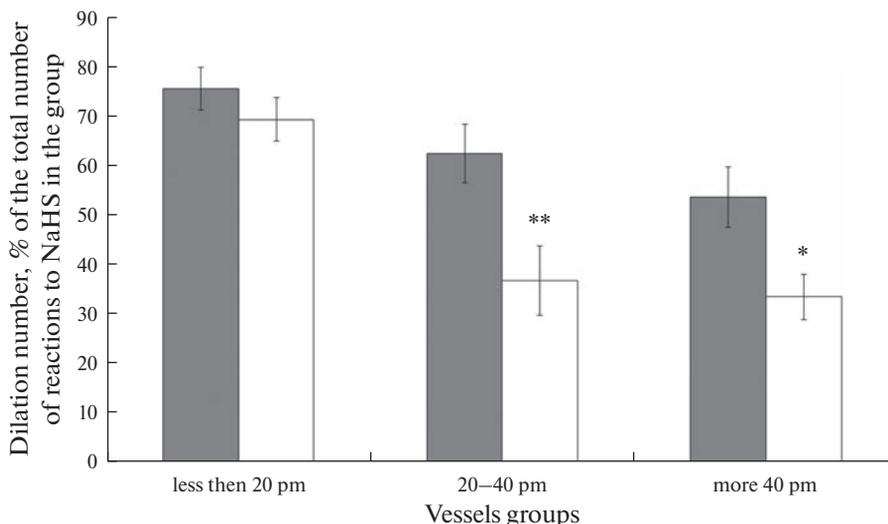


Рис. 2. Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие раствора NaHS, число дилатаций (% от общего числа реакций в группе сосудов). Темная заливка – крысы в возрасте 4 мес.; белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U -критерий Манна–Уитни).

достоверного изменения степени реакции. Воздействие ТЭА у крыс в возрасте 4 мес. приводило к констрикции в среднем 35–40% всех исследованных артерий (рис. 3b).

Число H₂S-опосредованных дилатаций на фоне введения ТЭА у 4-месячных животных уменьшалось. Наибольшее уменьшение числа дилатаций (на $72.29 \pm 4.16\%$) наблюдалось у мелких артерий ($p < 0.0001$, непарный t -тест). Число дилатаций артерий других диаметров уменьшалось примерно на 55% (рис. 4a). Степень H₂S-опосредованной дилатации артерий всех диаметров на фоне применения ТЭА снижалась (на $48.59 \pm 5.12\%$, $33.37 \pm 7.22\%$ и $47.52 \pm 4.07\%$ соответственно у мелких, средних и крупных артерий (U -критерий Манна–Уитни)).

У крыс в возрасте 18 мес., по сравнению с более молодыми животными, воздействие раствора NaHS вызывало дилатацию достоверно меньшего числа пиальных артерий ($p = 0.027$, $U = 18$, U – критерий Манна–Уитни) – $41.9 \pm 4.26\%$ из всех исследованных артерий. $34.07 \pm 3.06\%$ артерий сужалось, $26.33 \pm 2.99\%$ не изменяло

Таблица 1. Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие раствора NaHS, изменение диаметра

Группы артерий	4-месячные крысы ($n = 15$)		18-месячные крысы ($n = 12$)	
	Исходный диаметр, мкм	Диаметр после воздействия раствора NaHS, мкм	Исходный диаметр, мкм	Диаметр после воздействия раствора NaHS, мкм
Менее 20 мкм	15.14 ± 0.57	$21.18 \pm 1.07^{***}$	14.32 ± 0.96	$19.98 \pm 0.68^{***}$
20–40 мкм	29.61 ± 1.47	$36.91 \pm 1.36^{***}$	27.99 ± 2.01	$34.22 \pm 2.06^{**}$
Более 40 мкм	53.03 ± 1.11	$63.79 \pm 1.27^{***}$	48.69 ± 2.68	$57.01 \pm 2.95^*$

Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями исходного диаметра (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, непарный t -тест).

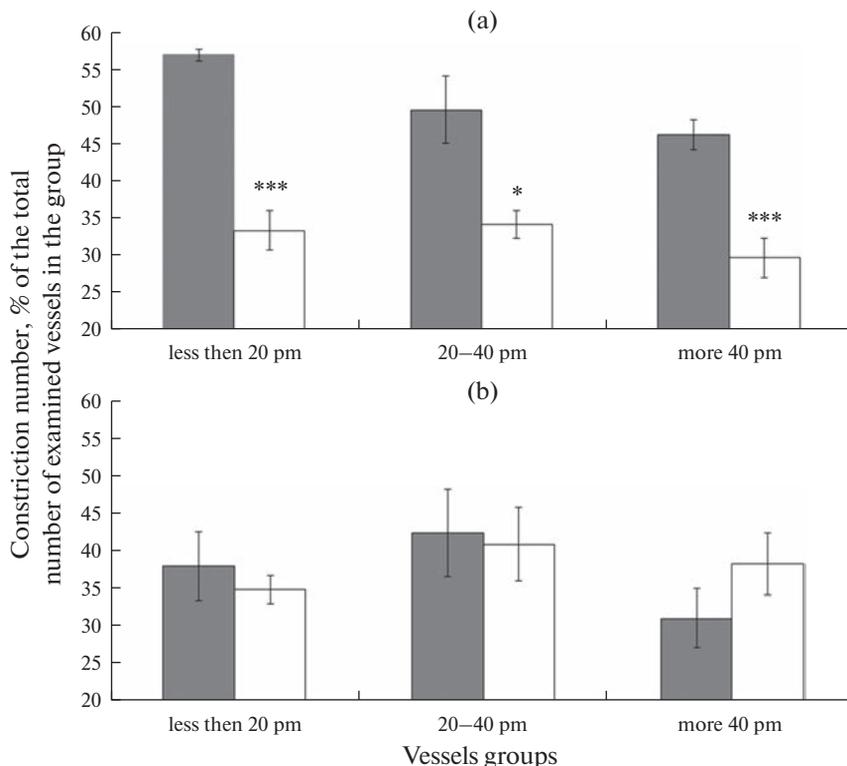


Рис. 3. Констрикторная реакция на воздействие блокаторов калиевых каналов, число констрикций (% от общего числа реакций на воздействие блокатора в группе сосудов): (а) – реакция на воздействие глибенкламида; (б) – реакция на воздействие ТЭА. Темная заливка – крысы в возрасте 4 мес.; белая заливка – крысы в возрасте 18 мес. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс в возрасте 4 мес. в (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, непарный t -тест).

диаметра (рис. 1). Дилатация преимущественно наблюдалась на мелких артериях (диаметром менее 20 мкм). Число H_2S -индуцированных дилатаций этих артерий составляло $69.4 \pm 4.46\%$ и достоверно не отличалось от соответствующих значений у 4-месячных крыс (рис. 2). Число дилатаций артерий диаметром более 20 мкм у 18-месячных крыс было в среднем на 40% меньше, чем у крыс в возрасте 4 мес. (рис. 2). Различий в степени H_2S -опосредованной дилатации у крыс разных возрастов обнаружено не было (табл.1).

Аппликация глибенкламида у 18-месячных крыс приводила к сужению в среднем около 30% артерий всех исследованных диаметров (рис. 3а). Число дилатаций на воздействие раствора NaHS на фоне введения глибенкламида изменялось у мелких и средних артерий – уменьшалось в среднем на 40% (рис. 4б). Степень дилатации достоверно не изменялась. Воздействие ТЭА вызывало сужение 35–40% артерий всех исследованных диаметров (рис. 3б). Число и степень H_2S -опосредованных дилатаций при применении ТЭА изменялись только у мелких артерий. Число дилатаций уменьшилось на $42.9 \pm 3.37\%$ ($p = 0.005$, непарный t -тест, рис. 4б), степень дилататорной реакции снижалась с $26.16 \pm 1.15\%$ до $21.98 \pm 0.86\%$.

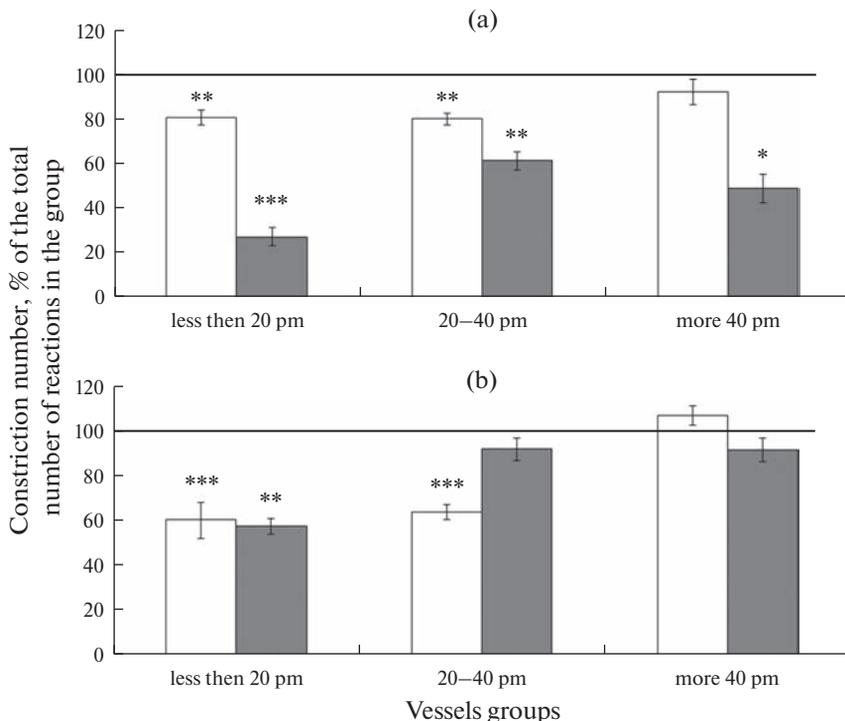


Рис. 4. Изменение дилаторной реакции пиальных артерий различных диаметров на воздействие раствора NaHS на фоне блокады калиевых каналов (число дилатаций, % от общего числа реакций в группе сосудов): (а) – крысы в возрасте 4 мес.; (б) – крысы в возрасте 18 мес. *Линия* – дилаторная реакция сосудов в группе на воздействие раствора NaHS без применения блокатора, принятая за 100%. *Белая заливка* – реакция на воздействие NaHS на фоне глибенкламида; *темная заливка* – реакция на воздействие NaHS на фоне ТЭА. Различия значимы по сравнению с соответствующими значениями при применении раствора NaHS без блокаторов (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, непарный t -тест).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Орошение поверхности головного мозга раствором NaHS в концентрации 30 мкМ у молодых крыс приводило к расширению в среднем 60% и сужению около 16% сосудов. У крыс в возрасте 18 мес. воздействие раствора NaHS в наших экспериментах вызывало дилатацию только 41% исследованных пиальных артерий. Число H₂S-опосредованных констрикций превышало аналогичный показатель у более молодых животных ($34.07 \pm 3.06\%$ из всех исследованных артерий, по сравнению с $15.8 \pm 2.11\%$ у крыс в возрасте 4 мес.). При этом число сосудов, не изменявших своего диаметра в ответ на воздействие NaHS, у крыс в возрасте 4-х и 18-ти месяцев достоверно не отличалось. Следует отметить, что разнонаправленная реакция артерий на любое воздействие характерно для функционирующей мозговой сосудистой сети [22]. Но в то же время возникновение констрикторной реакции в ответ на воздействие NaHS в достаточно низкой концентрации, наблюдаемое как у 4-, так и у 18-месячных крыс, может быть связано с разными уровнями напряжения кислорода на сосудистой стенке [12, 23]. В физиологическом диапазоне напряжения кислорода NaHS в концентрациях менее 100 мкМ вызывает расслабление сосудов, а в условиях более высоких уровней PO₂ могут возникать вазоконстрикторные реакции [12]. Механизмы, которые зависят от уровня O₂, включают взаимодействие

H_2S с гемовыми белками, такими как циклооксигеназа, и образование продуктов окисления сульфидов, таких как сульфит, тиосульфат и сульфат [24]. В литературе имеются сведения о существовании отличий показателей PO_2 в толще сосудистой стенки на разных уровнях мозговой сосудистой сети [25], это может быть одной из причин возникновения разнонаправленных реакций сосудов на воздействие H_2S . У 18-месячных крыс в наших экспериментах число констрикций на воздействие $NaHS$ практически в 2 раза превышало аналогичный показатель у крыс в возрасте 4 мес., что может быть связано с возрастным изменением уровня NO [26]. Ранее нами было установлено, что у 18-месячных крыс повышается роль индуцибельной NOS (iNOS) в дилатации [27]. NO , в больших количествах высвобождаемый при участии iNOS, может напрямую взаимодействовать с H_2S . Кроме того, в условиях развития возрастного окислительного стресса H_2S в присутствии АФК может взаимодействовать с окисленными формами NO или активными формами азота с образованием молекул нитрозотиола, HNO и др., что также может способствовать снижению дилататорной реакции сосудов и развитию вазоконстрикции в ответ на воздействие H_2S [11].

При анализе дилататорной реакции пиальных артерий различных диаметров на воздействие $NaHS$ нами было обнаружено, что число и степень дилатации зависят от диаметра сосудов. В возрасте 4 мес. наибольшее число и степень H_2S -опосредованных дилатаций отмечались на мелких пиальных артериях диаметром менее 20 мкм. При увеличении диаметра артерий число и степень дилатаций снижались. Такая картина ответной реакции сосудов различных диаметров на действие $NaHS$ может быть связана с доминированием отдельных внутриклеточных сигнальных систем на разных уровнях пиальной сосудистой сети. В более ранних наших работах было обнаружено различное участие NO и калиевых каналов в осуществлении дилатации пиальных артерий разных диаметров [21, 27, 28]. Проведенное нами сравнение H_2S -опосредованных дилатаций у 4- и 18-месячных крыс показало, что с возрастом уменьшается число дилатаций артерий диаметром больше 20 мкм (в среднем на 40%) без изменения степени реакции. При этом старение достоверно не влияет на дилатацию более мелких артерий.

Одним из основных механизмов реализации вазодилататорного ответа на воздействие H_2S является активация калиевых каналов мембран гладкомышечных клеток. Действие H_2S преимущественно связывают с открытием K_{ATP} -каналов [2, 6, 14]. Также показана H_2S -опосредованная активация кальций-чувствительных калиевых каналов различной проводимости, потенциал-зависимых калиевых каналов и TRP-каналов [2, 15–17]. В литературе имеются сведения о том, что у старых животных открыто больше калиевых каналов [20]. Сверхактивация каналов может снижать вазодилататорную реакцию за счет уменьшения миоэндотелиальной электрической проводимости [14, 29]. В предыдущих наших исследованиях было показано возрастное снижение вклада АТФ-зависимых калиевых каналов и кальций-чувствительных калиевых каналов большой проводимости в осуществление ацетилхолин-индуцированной дилатации пиальных артерий [21, 28]. Поэтому в данной работе мы провели сравнение вклада этих каналов в осуществление H_2S -опосредованной дилатации.

Применение глибенкламида, являющегося селективным ингибитором K_{ATP} -каналов [30], у 4-месячных крыс приводило к констрикции около 50% артерий всех диаметров. ТЭА – блокатор VK_{Ca} -каналов вызывал констрикцию 35–40% артерий. Блокаторы также изменяли число H_2S -опосредованных дилатаций. Глибенкламид уменьшал число дилатаций артерий диаметром менее 40 мкм в среднем на 20%. А блокада VK_{Ca} -каналов приводила к уменьшению числа и степени дилататорных

реакций артерий всех исследованных диаметров в 2 и более раз. Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс в возрасте 4 мес. и K_{АТФ}- и BK_{Ca}-каналы участвуют в поддержании базального тонуса и осуществлении H₂S-индуцированных дилататорных реакций пиальных артерий.

У крыс в возрасте 18 мес. число констрикций артерий всех исследованных диаметров на воздействие глибенкламида было значительно меньше (30%, по сравнению с 50% у 4-месячных крыс). Уменьшение участия K_{АТФ}-каналов в поддержании базального тонуса сосудов может быть обусловлено снижением их плотности в стенке пиальных артерий. Косвенным подтверждением этого предположения могут служить полученные нами ранее результаты [21], свидетельствующие об уменьшении у 18-месячных крыс числа дилатаций пиальных артерий на пинацидил, являющийся открывателем K_{АТФ}-каналов [30]. Число H₂S-опосредованных дилатаций на фоне применения глибенкламида так же, как и у 4-месячных крыс уменьшалось только у артерий диаметром менее 40 мкм. Но в 18-месячном возрасте блокада K_{АТФ}-каналов привела к снижению числа дилатаций в среднем на 40%, тогда как в 4-месячном – только на 20%. Следовательно, несмотря на возрастное снижение вклада K_{АТФ}-каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий, вклад этих каналов в осуществление H₂S-опосредованных дилатаций при старении возрастает. Старение сопровождается развитием окислительного стресса и выработкой активных форм кислорода (АФК) [31]. Возрастное увеличение вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов в H₂S-опосредованную дилатацию может быть связано с развитием окислительного стресса и выработкой большого количества АФК. В настоящее время получены фармакологические доказательства того, что активация K_{АТФ}-каналов мозговых сосудов может происходить под влиянием перекиси водорода и пероксинитрита [32]. Также причиной активации K_{АТФ}-каналов при старении может быть метаболическое активирование канала в результате развития возрастной митохондриальной дисфункции [33]. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению продукции АТФ, снижению уровня АТФ и повышению уровня АДФ в клетке. Такие изменения соотношения АТФ/АДФ являются ключевым моментом в процессе активации K_{АТФ}-каналов [34]. Однако, как указывалось выше, ранее нами было обнаружено, что вклад K_{АТФ}-каналов в дилатацию пиальных артерий с возрастом снижается. Это может быть связано с отличиями в механизмах реализации дилататорных ответов, обусловленных активацией K_{АТФ}-каналов. В более ранней нашей работе исследовалось возрастное изменение ацетилхолин-индуцированной дилатации. Предполагается, что ацетилхолин воздействует на сосудистую стенку, модулируя сигнальный каскад, включающий в себя протеинкиназы А и/или G, с последующей активацией K_{АТФ}-каналов, расположенных в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов [33, 34], в то время как H₂S непосредственно активирует K_{АТФ}-каналы путем регулирования экспрессии субъединиц канала [16], или сульфгидратирования Kir 6.1 субъединицы [35] и усиления ее связывания с фосфолипидом фосфотидилинозитол-(4,5)-бифосфатом (PIP₂) и снижения связывания Kir 6.1 с АТФ [4, 16].

Блокада BK_{Ca}-каналов у крыс в возрасте и 4-х и 18-ти месяцев в наших экспериментах вызывала констрикцию 35–40% артерий всех диаметров. Число и амплитуда H₂S-опосредованных дилатаций на фоне применения ТЭА у крыс обоих возрастов уменьшались только на мелких артериях (диаметром менее 20 мкм), но у молодых животных число дилатаций уменьшалось в среднем на 73%, а у 18-месячных – на 43%. Следовательно, вклад BK_{Ca}-каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий с возрастом не меняется, а их участие в H₂S-индуцированной дилатации

снижается. Активация VK_{Ca} -каналов H_2S в основном опосредована следующими механизмами. H_2S увеличивает вероятность открытия VK_{Ca} -каналов, и этот эффект связан с его восстанавливающим действием на сульфгидрильные группы субъединиц канала [36]. Кроме того, VK_{Ca} -каналы могут быть активированы увеличением притока Ca^{2+} , вызванным H_2S -опосредованной сульфгидратацией TRPV-каналов [16, 18]. В качестве одной из причин возникновения возрастной сосудистой дисфункции рассматривается изменение в гомеостазе Ca^{2+} , связанное с повреждением и нарушением функционирования митохондрий [37]. При этом могут быть затронуты несколько аспектов гомеостаза Ca^{2+} , таких как приток Ca^{2+} через открытые TRP-каналы, высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и процессы поглощения Ca^{2+} митохондриями. Это может приводить к накоплению Ca^{2+} в цитоплазме, изменению в буферизации Ca^{2+} митохондриями, образованию АФК [38, 39] и служить альтернативным источником Ca^{2+} для открытия VK_{Ca} -каналов [40]. Повышенная активность каналов может приводить к уменьшению миоэндотелиальной электрической проводимости и вазодилаторной реакции [18]. Возможно, это является одной из причин обнаруженного нами угнетения VK_{Ca} -индуцируемой H_2S -опосредованной вазодилатации у стареющих крыс. Одновременно с этим активность VK_{Ca} -каналов может снижать повышенный уровень АФК. В литературе имеются сведения о том, что усиление выработки активных форм кислорода ингибирует VK_{Ca} -каналы, снижая их чувствительность к Ca^{2+} и уменьшая вероятность и среднее время открытия канала [32, 41].

Таким образом, нами установлено, что у крыс с возрастом происходит угнетение H_2S -индуцированной дилатации пиальных артерий и увеличение констрикторных ответов на воздействие экзогенного H_2S . Уменьшается число H_2S -опосредованных дилатаций артерий диаметром больше 20 мкм. При этом старение не влияет на дилатацию более мелких артерий. В основе этих нарушений могут лежать изменения процессов, обусловленных активацией калиевых каналов. К 18 месяцам у крыс увеличивается вклад K_{ATP} -каналов в осуществление H_2S -опосредованной дилатации пиальных артерий диаметров менее 40 мкм. Одновременно с этим вклад VK_{Ca} -каналов в дилатацию снижается — у 18-месячных крыс эти каналы практически не участвуют в H_2S -опосредованной дилатации артерий диаметром более 20 мкм. Выявленные нами нарушения функциональной активности калиевых каналов могут служить терапевтическими мишенями для создания новых технологий, используемых при лечении возрастных сосудистых поражений головного мозга.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНАДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Predmore BL, Alendy MJ, Ahmed KI, Leeuwenburgh C, Julian D* (2010) The hydrogen sulfide signaling system: changes during aging and the benefits of caloric restriction. *Age (Dordr)* 32(4): 467–481.
<https://doi.org/10.1007/s11357-010-9150-z>
2. *Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, Dominic P, Kevil CG* (2023) Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat Rev Cardiol* 20(2): 109–125.
<https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>
3. *Wilkie SE, Borland G, Carter RN, Morton NM, Selman C* (2021) Hydrogen sulfide in ageing, longevity and disease. *Biochem J* 478(19): 3485–3504.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20210517>
4. *Гусакова СВ, Смаглий ЛВ, Бирулина ЮГ, Ковалев ИВ, Носарев АВ, Петрова ИВ, Реутов ВП* (2017) Молекулярные механизмы действия газотрансмиттеров NO, CO и H₂S в гладкомышечных клетках и влияние NO-генерирующих соединений (нитратов и нитритов) на среднюю продолжительность жизни. *Успехи физиол наук* 48(1): 24–52. [*Gusakova SV, Smaglyi LV, Birulina YG, Kovalev IV, Nosarev AV, Petrov IV, Reutov VP* (2017) Molecular mechanisms of action of gas transmitters NO, CO and H₂S in smooth muscle cells and effect of NO-generating compounds (nitrates and nitrites) on average life expectancy. *Uspekhi Fiziol Nauk* 48(1): 24–52. (In Russ)].
5. *Коцюба АЕ* (2011) Распределение НАДФН-диафоразы и ферментов синтеза сероводорода в стенке артерий головного мозга. *Вестн новых мед технол* 18(2): 255–256. [*Kotsyuba AE* (2011) Distribution of NADPH-diaphorase and enzyme synthesis of hydrogen sulfide in the walls of brain arterias. *Vestn novykh med tekhnol* 18(2): 255–256. (In Russ)].
6. *Dongó E, Kiss L* (2020) The potential role of hydrogen sulfide in the regulation of cerebrovascular tone. *Biomolecules* 10(12): 1685.
<https://doi.org/10.3390/biom10121685>
7. *Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A* (2018) Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem Pharmacol* 149: 42–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.017>
8. *Perridon BW, Leuvenink HG, Hillebrands JL, van Goor H, Bos EM* (2016) The role of hydrogen sulfide in aging and age-related pathologies. *Aging (Albany NY)* 8(10): 2264–2289.
<https://doi.org/10.18632/aging.101026>
9. *Calabrese V, Scuto M, Salinaro AT, Dionisio G, Modafferi S, Ontario ML, Greco V, Sciuto S, Schmitt CP, Calabrese EJ, Peters V* (2020) Hydrogen sulfide and carnosine: modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants (Basel)* 9(12): 1303.
<https://doi.org/10.3390/antiox9121303>
10. *Hine C, Zhu Y, Hollenberg AN, Mitchell JR* (2018) Dietary and endocrine regulation of endogenous hydrogen sulfide production: implications for longevity. *Antioxid Redox Signal* 28(16): 1483–1502.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7434>
11. *Liu Y-H, Lu M, Hu L-F, Wong PT-H, Webb G, Bian J-S* (2012) Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal* 17(1): 141–185.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4005>
12. *Yuan S, Shen X, Kevil CG* (2017) Beyond a gasotransmitter: hydrogen sulfide and polysulfide in cardiovascular health and immune response. *Antioxid Redox Signal* (27): 634–653.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7096>
13. *Sindler AL, Delp MD, Reyes R, Wu G, Muller-Delp JM* (2009) Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol* 587(15): 3885–3897.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172221>
14. *Parfenova H, Liu J, Hoover DT, Fedinec AL* (2020) Vasodilator effects of sulforaphane in cerebral circulation: A critical role of endogenously produced hydrogen sulfide and arteriolar smooth muscle K_{ATP} and BK-channels in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 40(10): 1987–1996.
<https://doi.org/10.1177/0271678X19878284>
15. *Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS* (2020) Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. *Front Pharmacol* 10: 1568.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>
16. *Liu XY, Qian LL, Wang RX* (2022) Hydrogen sulfide-induced vasodilation: the involvement of vascular potassium channels. *Front Pharmacol* 13: 911704.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.911704>

17. Wang YZ, Ngowi EE, Wang D, Qi HW, Jing MR, Zhang YX, Cai CB, He QL, Khattak S, Khan NH, Jiang QY, Ji XY, Wu DD (2021) The potential of hydrogen sulfide donors in treating cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci* 22(4): 2194.
<https://doi.org/10.3390/ijms22042194>
18. Behringer EJ, Hakim MA (2019) Functional interaction among K_{Ca} and TRP-channels for cardiovascular physiology: Modern perspectives on aging and chronic disease. *Int J Mol Sci* 20(6): 1380.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061380>
19. Hakim MA, Chum PP, Buchholz JN, Behringer EJ (2020) Aging alters cerebrovascular endothelial GPCR and K^+ channel function: divergent role of biological sex. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 75(11): 2064–2073.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glz275>
20. 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>
21. Gorshkova OP (2022) Age-related changes in the functional activity of ATP-sensitive potassium channels in rat pial arteries. *J Evol Biochem Phys* 58(2): 345–352.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020041>
22. Pourcyrous M, Chilakala S, Elbiad MT, Parfenova H, Leffler CW (2018) Does prolonged severe hypercapnia interfere with normal cerebrovascular function in piglets? *Pediatr Res* 84(2): 290–295.
<https://doi.org/10.1038/s41390-018-0061-5>
23. Gheibi S, Jeddi S, Kashfi K, Ghasemi A (2018) Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H_2S : Implications in hypertension. *Biochem Pharmacol* 149: 42–59.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.01>
24. Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR Jr, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O_2 -dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4): H1953–H1960.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01193.2006>
25. Wilson DF, Matschinsky FM (2020) Cerebrovascular Blood Flow Design and Regulation; Vulnerability in Aging Brain. *Front Physiol* 11: 584891.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.584891>
26. Szijártó IA, Markó L, Filipovic MR, Miljkovic JL, Tabelaing C, Tsvetkov D, Wang N, Rabelo LA, Witzernath M, Diedrich A, Tank J, Akahoshi N, Kamata S, Ishii I, Gollasch M (2018) Cystathionine γ -lyase-produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. *Hypertension* 71: 1210–1217.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10562>
27. Горшкова ОП (2022) Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пимальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс. *Интегра́т физио́л* 3(3): 373–383. [Gorshkova OP (2022) Features of mechanisms of NO-mediated dilation of pial arteries to acetylcholine in aging rats. *Integrat Fiziol* 3(3): 373–383. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377>
28. Gorshkova OP (2021) Age-related changes in the role of potassium channels in acetylcholine-induced dilation of pial arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Evol Biochem Phys* 57(1): 55–65.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021010051>
29. Beleznai TZ, Yarova PL, Yuill KH, Dora KA (2011) Smooth muscle Ca^{2+} -activated and voltage-gated K^+ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Microcirculation* 18: 487–500.
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00109.x>
30. Driggers CM, Shyng SL (2023) Mechanistic insights on K_{ATP} -channel regulation from cryo-EM structures. *J Gen Physiol* 155(1): e202113046.
<https://doi.org/10.1085/jgp.202113046>
31. Strickland M, Yacoubi-Loueslati B, Bouhaouala-Zahar B, Pender SLF, Larbi A (2019) Relationships between ion channels, mitochondrial functions and inflammation in human aging. *Front Physiol* 10: 158.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00158>
32. Tracy EP, Hughes W, Beare JE, Rowe G, Beyer A, LeBlanc AJ (2021) Aging-induced impairment of vascular function: mitochondrial redox contributions and physiological/clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 35(12): 974–1015.
<https://doi.org/10.1089/ars.2021.0031>
33. Pourbagher-Shahri AM, Farkhondeh T, Talebi M, Kopustinskiene DM, Samarghandian S, Bernatoniene J (2021) An overview of NO signaling pathways in aging. *Molecules* 26(15): 4533.
<https://doi.org/10.3390/molecules26154533>
34. Li Y, Aziz Q, Tinker A (2021) The pharmacology of ATP-sensitive K^+ -channels (K_{ATP}). *Handb Exp Pharmacol* 267: 357–378.
https://doi.org/10.1007/164_2021_466

35. *Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH* (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res* 109: 1259–1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
36. *Sidikova GF, Fuchs R, Kainz V, Weiger TM, Hermann A* (2014) Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H₂S). *Front Physiol* 431. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00431>
37. *Kirkham DL, Robinson AT, Rossman MJ, Seals DR, Edwards DG* (2021) Mitochondrial contributions to vascular endothelial dysfunction, arterial stiffness, and cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 320(5): H2080–H2100. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00917.2020>
38. *Venkatachalam K* (2022) Regulation of aging and longevity by ion channels and transporters. *Cells* 11(7): 1180. <https://doi.org/10.3390/cells11071180>
39. *Wilson C, Lee MD, Buckley C, Zhang X, McCarron JG* (2022) Mitochondrial ATP production is required for endothelial cell control of vascular tone. *Function* (Oxf). <https://doi.org/10.1093/function/zqac063>
40. *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>
41. *Sancho M, Kyle BD* (2021) The large-conductance, calcium-activated potassium channel: A big key regulator of cell physiology. *Front Physiol* 12: 750615. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750615>

H₂S-Mediated Dilation of Pial Arteries in Rats of Different Ages: Contribution of K_{ATP} and BK_{Ca}-Channels

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

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

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

Reactions of pial arteries to exogenous hydrogen sulfide exposure and assessment of the contribution of K_{ATP} and BK_{Ca}-channels to H₂S-mediated dilation was studied in rats of different ages. Intravital microphotography in Sprague–Dawley rats aged 4 and 18 months was used to study the reactions of pial arteries of various diameters to the exposure of exogenous hydrogen sulfide donor solution – sodium hydrosulfide (NaHS, 30 μM), as well as their change with the preliminary use of potassium channel blockers: K_{ATP} (glibenclamide, 10 μM) and BK_{Ca} (tetraethyl ammonium, 2 mM). It was found that inhibition of H₂S-mediated dilation of pial arteries and increase in constrictor responses to exogenous hydrogen sulfide exposure are taking place in rats with age. Age-related changes in H₂S-induced dilatory response of the pial arteries in rats depend on the size of the vessels. With age, there is a decrease in the number of dilations of pial arteries with a diameter of more than 20 μm. At the same time, aging does not affect the dilatation of smaller arteries. These disorders are probably associated with changes in the processes caused by the activation of potassium channels. It was found that aging is accompanied by the increasing of K_{ATP}-channels contribution to the implementation of H₂S-mediated dilation in pial arteries with diameters less than 40 μm. BK_{Ca}-channels contribution to the dilatation decreases with age. In 18 months, rats, these channels barely participate in H₂S-mediated dilation in arteries with diameters more than 20 μm.

Keywords: H₂S-mediated vasodilation, K_{ATP}-channels, BK_{Ca}-channels, aging, pial arterial vessels

**ВЛИЯНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ДОМИНАНТНО-СУБОРДИНАНТНЫХ
ОТНОШЕНИЙ В МОДЕЛИ РЕЗИДЕНТ–ИНТРУДЕР
НА ТЕСТИКУЛЯРНУЮ ФУНКЦИЮ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ
ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РТ И СВА/Lac**

© 2023 г. М. А. Клешев¹ *, А. В. Осадчук¹, Л. В. Осадчук¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

*E-mail: max82cll@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Известно, что репродуктивный успех самца зависит от способности к социальному доминированию, а также качества, количества сперматозоидов и адекватной продукции репродуктивных гормонов. Взаимосвязь между социальным доминированием и тестикулярной функцией может модулироваться генотипом и средовыми условиями формирования иерархии, в частности территориальным статусом самца (резидент или интродер), однако характер и механизмы этой взаимосвязи недостаточно исследованы. Целью настоящей работы стало исследование влияния предварительного освоения территории и генотипа на тестикулярную функцию при установлении доминантно-субординантных отношений в экспериментальной модели социального доминирования у лабораторных мышей, используя парадигму “резидент–интродер”. Для этого взрослому самцу-резиденту определенного генотипа (РТ или СВА/Lac), который проживал с самкой линии DD/He двое суток в экспериментальной клетке, подсаживали самца-интродера другой линии (РТ или СВА/Lac) и оценивали социальный статус самцов после установления иерархических отношений. Через 5 дней после формирования группы у самцов оценивали уровень тестостерона в сыворотке и содержание его в семенниках, а также сперматогенные параметры. Установлено, что формирование иерархических отношений не оказывает влияния на уровень тестостерона в крови и семенниках и долю морфологически аномальных головок сперматозоидов у самцов мышей обеих линий, но приводит к уменьшению количества эпидидимальных сперматозоидов у доминантов-интродеров линии РТ по сравнению с субординантами-интродерами этой линии, а также снижению подвижности сперматозоидов у подчиненных самцов линии СВА/Lac независимо от территориального статуса. Таким образом, установление доминантно-субординантных отношений в этологической модели социальной иерархии у лабораторных мышей оказывает влияние на сперматогенную функцию самцов уже через 5 дней после формирования группы, при этом характер этого влияния зависит от генотипа животного, его социального и территориального статуса (резидент или интродер).

Ключевые слова: социальное доминирование, лабораторные мыши, тестостерон, сперматогенез

DOI: 10.31857/S0869813923080046, EDN: NOYLJT

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что репродуктивный успех самца, который определяется как число фертильных потомков за определенный промежуток времени (одну попытку размножения, сезон размножения или всю жизнь животного), зависит от множества взаимодействующих факторов, в числе которых физическое здоровье и продолжительность жизни, способность к социальному доминированию, способность устанавливать взаимоотношения с партнером и многие другие [1]. Важнейшими факторами, предопределяющими репродуктивный успех самца, являются его способность достигать доминирующего положения в системе социальной иерархии и потенциальная фертильность, которая зависит от качества и количества сперматозоидов. Социальная иерархия – система взаимоотношений между особями в социальной группе, при которой одни члены группы (доминанты) получают преимущество в доступе к лимитирующим ресурсам среды по сравнению с другими (субординантами) [2, 3]. Многочисленные исследования показали, что доминанты, как правило, оставляют больше потомков, чем подчиненные животные [4]. Известно, что доминантные самцы имеют преимущественный доступ к самкам и могут чаще спариваться с ними по сравнению с подчиненными самцами [5]. Следовательно, морфологические, физиологические и поведенческие признаки, предопределяющие способность к социальному доминированию, позволяют самцам эффективно передавать генетическую информацию последующим поколениям и поэтому имеют важнейшее эволюционное значение. Кроме того, известно, что репродуктивный успех самца зависит от качества и количества его сперматозоидов, поскольку мужская фертильность напрямую зависит от числа сперматозоидов, их подвижности и морфологии [6]. Кроме того, у видов, для которых характерен промискуитет, в репродуктивном тракте самок наблюдается конкуренция сперматозоидов от нескольких самцов [7, 8]. В этих условиях, высокое качество эякулята в значительной мере предопределяет возможность самца оставить потомство. Поэтому конкуренция сперматозоидов, которая наблюдается у многих видов животных, в том числе и у домовых мышей [5, 9, 10], является важнейшим фактором, обеспечивающим эволюцию различных характеристик эякулята, включая количество, подвижность и морфологию сперматозоидов, а также биохимический состав семенной плазмы [11, 12].

Однако достижение доминирующего положения и продукция большого количества сперматозоидов являются достаточно энергозатратными процессами [13], поэтому в условиях социальной иерархии самцы используют разные стратегии для достижения репродуктивного успеха, находя компромисс (trade-off) между затратами на достижение доминирования и затратами на производство эякулята [12]. У многих видов животных самцы, которые занимают подчиненное положение в системе социальной иерархии, не несут значительных затрат энергии на агрессию и защиту участка обитания и демонстрируют более высокое качество эякулята по сравнению с доминантами. В ряде исследований показано, что по сравнению с доминантами субординанты обладают более богатым биохимическим составом семенной плазмы [5], более высоким качеством сперматозоидов при повторной эякуляции [14], более высокой подвижностью половых клеток [15, 16]. Однако для многих видов животных, включая грызунов, характерна иная картина взаимосвязи социального статуса и качества эякулята, при которой сперматогенные показатели у субординантов ниже таковых у доминантов [17, 18], хотя фертильность подчиненных животных не подавляется полностью [19]. Предполагается, что ухудшение сперматогенной функции у субординантов может происходить либо за счет социального стресса, возникающего при формировании иерархических отношений,

либо за счет специфических феромональных влияний доминирующего самца (см. обзор [20]).

Однако следует отметить, что даже у животных одного и того же вида, генотип [21] и средовые условия формирования иерархии [22], а также структура социальной группы в значительной мере предопределяют выбор стратегии достижения репродуктивного успеха и влияют на характер взаимосвязи между социальным статусом и качеством эякулята. Для лучшего понимания механизмов регуляции размножения, как в природных популяциях животных, так и в искусственных группировках, необходимо более глубокое исследование физиологических механизмов достижения компромисса между инвестициями в качество эякулята или поведение доминирования и взаимосвязи социального статуса животного и его репродуктивной функции, включая сперматогенез и секрецию тестостерона.

Знакомство с территорией является одним из наиболее важных факторов, влияющих на поведенческие и физиологические реакции при установлении и поддержании социальной иерархии. Защита территории и полового партнера может значительно усиливать агрессивность резидента [23, 24]. Агрессия резидента и попадание на новую территорию являются аверсивными факторами для интродера, увеличивая уровень социального стресса [25], что может модифицировать поведенческие и физиологические реакции при установлении иерархических отношений. Таким образом, территориальный статус животного наряду с генотипом может оказать существенное влияние на выбор им определенной репродуктивной стратегии, особенно при установлении иерархии, и модифицировать взаимосвязь между социальным статусом и сперматогенной функцией.

Удобным модельным объектом для исследования взаимосвязи между физиологическими параметрами, социальным доминированием и средовыми условиями формирования иерархии являются лабораторные мыши. Это обусловлено тем, что у этого вида животных в определенных условиях существования формируется четкая иерархическая структура группировок, которая хорошо воспроизводится при клеточном содержании. Кроме того, лабораторные мыши характеризуются сходными с дикими сородичами паттернами поведения при установлении и поддержании социальной иерархии, широким разнообразием инбредных линий, наличием разработанных тестов и моделей для изучения социального поведения. Ранее нами была разработана модель социального доминирования у лабораторных мышей в минимальном социуме. В этой модели пара самцов разных инбредных линий содержится в специальной экспериментальной клетке в течение определенного времени, и животные устанавливают между собой и поддерживают иерархические отношения. Данная модель хорошо воспроизводит паттерны поведения при формировании и поддержании иерархии у домовых мышей [26] и репродуктивные последствия социального доминирования [19, 27], а также позволяет создавать и исследовать разные средовые условия формирования иерархии. С использованием данной модели нами установлено, что поведение при установлении социальной иерархии, а также взаимосвязь между социальным статусом и тестикулярной функцией в значительной степени детерминированы генотипом животного. Однако взаимодействие генотипа и территориальных условий формирования социальной иерархии в регуляции репродуктивной функции при установлении социальной иерархии ранее не исследовалось.

Целью настоящей работы стало исследование влияния предварительного освоения территории и генотипа на тестикулярную функцию при установлении доминантно-субординантных отношений в экспериментальной модели социального доминирования у лабораторных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использовали самцов инбредных линий РТ и СВА/Лас, полученных из питомника вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животные этих линий существенно различаются по андрогенному статусу, количеству и качеству сперматозоидов [27], а также способности к социальному доминированию и выраженности агрессивного поведения. По сравнению с самцами линии СВА/Лас, животные линии РТ характеризуются более высоким стероидогенным потенциалом семенников [28], повышенными агрессивностью при формировании социальной иерархии и вероятностью социального доминирования [29].

Все животные содержались в стандартных пластиковых клетках при неинвертированном световом дне (12/12 ч), пищу и воду получали без ограничения.

Проведение эксперимента

Перед проведением эксперимента всех животных содержали в условиях социальной изоляции для снятия эффектов группового содержания. В работе использовали ранее разработанную [26] модель социальной иерархии в минимальном социуме. Однако, в отличие от оригинальной модели, при формировании социальной группы мы использовали экспериментальную парадигму “резидент–интродер”. К взрослому самцу-резиденту определенного генотипа (РТ или СВА/Лас), который проживал в экспериментальной клетке с самкой линии DD/He двое суток, подсаживали самца-интродера другой линии (РТ или СВА/Лас). После этого наблюдали за поведением животных при формировании доминантно-субординантных отношений. Социальный ранг определяли по асимметрии в проявлении агонистического поведения после установления иерархических отношений. В период поддержания иерархии доминанты проявляли только агрессивное поведение (наступательные атаки, биение хвостом и агрессивный груминг), а субординанты — только субмиссивное поведение (вертикальные позы подчинения и бегство). Более подробно методика проведения данного эксперимента, оценки социального статуса и агонистического поведения описана ранее [29]. Мыши содержались в парах в течение 5 дней, в конце этого срока животных декапитировали и оценивали гормональную и сперматогенную функцию семенников.

Оценка морфометрических показателей

Каждого самца взвешивали перед началом эксперимента и сразу после его окончания. Самцов декапитировали в одно и тоже время суток с 13:00 до 14:00 ч, собирали периферическую кровь, выделяли и взвешивали оба семенника и каудальных эпидидимиса на торсионных весах марки ВТ-500.

Исследование качества и количества эпидидимальных сперматозоидов

Исследовали качество и количество сперматозоидов, выделенных из обоих каудальных эпидидимисов и помещенных в культуральную среду DMEM (Медиген, Россия). Подход, основанный на изучении эпидидимальных сперматозоидов, является общепринятым для исследования качества сперматозоидов у грызунов [30, 31]. Недорогая и доступная среда DMEM уже была успешно апробирована на лабораторных мышках. Показано, что в этой культуральной среде подвижность остается стабильной в течение часа и такой же высокой, как и при использовании дорогостоящих сред, предназначенных для оплодотворения *in vitro* [31]. Немедленно после забоя

животного оба каудальных эпидидимиса помещали в 200 мкл среды DMEM. Затем эпидидимисы мелко измельчали и добавляли 800 мкл той же среды. После встряхивания на шейкере в течение 10 мин полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры Falcon с диаметром ячейки 70 мкм. Подвижность сперматозоидов определяли с использованием анализатора фертильности спермы SFA 500 (НПФ “Биола” г. Москва). Оценивали общую долю прогрессивно подвижных сперматозоидов и долю половых клеток, обладающих быстрым (>25 мкм/с) прогрессивным движением. Выделение сперматозоидов из каудальных эпидидимисов и измерение доли подвижных половых клеток производили в течение часа после декапитации животного при температуре среды $+37^{\circ}\text{C}$.

Количество эпидидимальных сперматозоидов подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом (при увеличении $\times 200$), после окраски суспензии сперматозоидов 1%-ным водным раствором эозина в течение ночи.

Оценивали морфологию головок сперматозоидов согласно методике [32]. Для этого 20 мкл окрашенной суспензии сперматозоидов наносили на предметное стекло и делали мазок. Мазок высушивали, фиксировали канадским бальзамом, покрывали покровным стеклом и исследовали под световым микроскопом ($\times 400$) первые 300 сперматозоидов, подсчитывая долю морфологически аномальных головок.

Определение содержания тестостерона в сыворотке крови и семенниках

Периферическую кровь центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об./мин при 4°C , сыворотку хранили при -20°C . Один семенник от каждого животного, выбранный случайным образом, гомогенизировали в фосфатном буфере и гомогенаты хранили при -20°C . Тестостерон в сыворотке крови и гомогенатах семенников определяли иммуноферментным методом с использованием набора “Стероид ИФА-тестостерон” (фирма “Алкор Био” Санкт-Петербург, Россия), согласно инструкции производителя. Градуировочную кривую для расчета содержания тестостерона в семенниках строили с использованием стандарта тестостерона после разведения фосфатным буфером, а для определения концентрации гормона в сыворотке — разведения бесстероидной мышинной сывороткой. Содержание тестостерона в семенниках выражали в нг/один семенник, а содержание гормона в сыворотке — в нг/мл.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica (версия 6.0). Поскольку самцы инбредной линии РТ на предварительно освоенной территории почти всегда становились доминантами, а интродеры СВА/Лас — субординантами, то из-за малого количества животных (одна пара самцов) данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас исключены из анализа и не представлены в статье. Для проверки данных на нормальность распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Поскольку распределение всех изучаемых показателей соответствовало нормальному закону, то для сравнения экспериментальных групп использовали параметрический тест множественного сравнения Дункана. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные на рисунках и в тексте представлены как средняя и ее ошибка ($\text{Mean} \pm SE$).

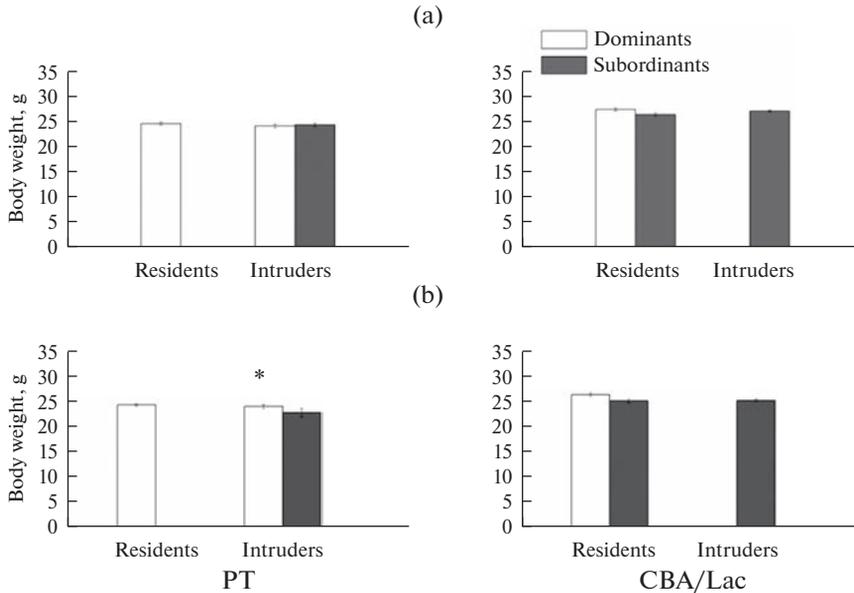


Рис. 1. Масса тела до формирования социальной группы (а) и в период стабильных иерархических отношений (б) у самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным (доминант или субординант) и территориальным (резидент или интродер) статусом. * – достоверность межранговых различий ($p < 0.05$). Число животных в группе варьировало от 27 до 52. Данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас не представлены.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и репродуктивных органов

На рисунке 1 представлены данные по массе тела самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным и территориальным статусом до формирования социальной группы (рис. 1а) и на пятый день после формирования экспериментальных групп (рис. 1б). Самцы линии РТ имели достоверно меньшую ($p < 0.01$) массу тела, чем самцы линии СВА/Лас, как до формирования социальной группы, так и при окончании эксперимента, на пятый день после ссаживания самцов. Масса тела до формирования социальной группы составляла 24.44 ± 0.19 г и 27.05 ± 0.18 г у самцов линии РТ и СВА/Лас соответственно. Масса тела на пятый день после формирования социальной группы составляла 23.82 ± 0.28 г и 25.53 ± 0.20 г у самцов линии РТ и СВА/Лас соответственно.

Достоверных различий по массе тела до формирования социальной группы между самцами с различным социальным и территориальным статусом вне зависимости от линии не установлено. В период стабильных иерархических отношений на 5-й день существования социальной группы масса тела (рис. 1б) доминантов-интродеров линии РТ была достоверно ($p < 0.05$) выше таковой у субординантов-интродеров этой же линии.

Масса семенников (рис. 2а) и каудальных эпидидимисов (рис. 2б) не отличалась у доминантов и субординантов обеих линий вне зависимости от территориальных условий формирования иерархии, различий между резидентами и интродерами по данным показателям также не установлено. Самцы линии РТ обладали достоверно

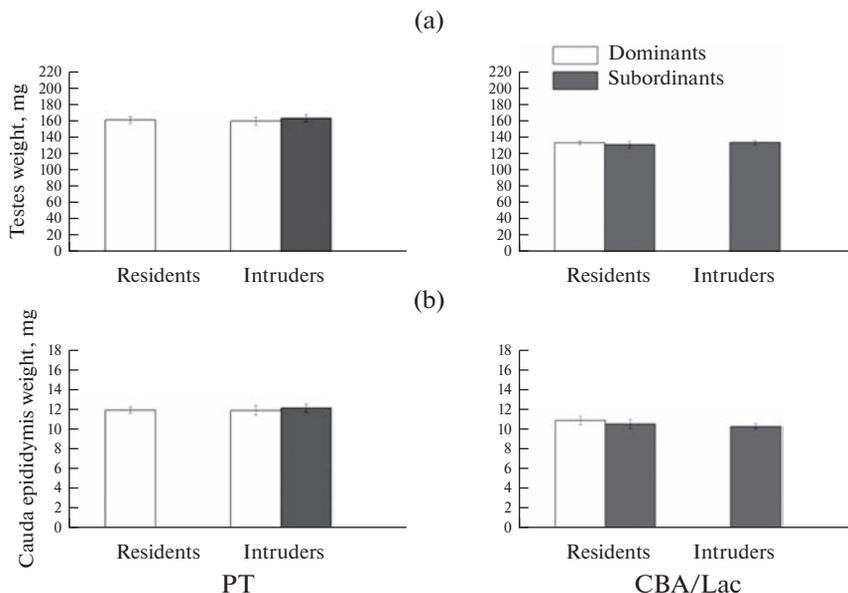


Рис. 2. Масса семенников (а) и каудальных эпидидимисов (б) у самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным (доминант или субординант) и территориальным (резидент или интродер) статусом. Число животных в группе варьировало от 27 до 52. Данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас не представлены.

($p < 0.05$) большей массой семенников (162.06 ± 2.62 мг) и каудальных эпидидимисов (11.99 ± 0.23 мг) по сравнению с самцами линии СВА/Лас, у которых масса семенников составляла 133.19 ± 1.71 мг, а масса каудальных эпидидимисов – 10.40 ± 0.21 мг.

Сперматогенная функция семенников

Число сперматозоидов в обоих каудальных эпидидимисах (рис. 3а) у доминантов-интродеров линии РТ было достоверно ниже, чем у субординантов-интродеров и доминантов-резидентов этой же линии. У самцов линии СВА/Лас с различным социальным и территориальным статусом не установлено достоверных различий между группами по числу сперматозоидов в каудальных эпидидимисах. Межлинейных различий по числу эпидидимальных сперматозоидов не установлено.

Доля аномальных головок сперматозоидов оказалась достоверно выше у самцов линии РТ ($12.38 \pm 0.76\%$), чем у самцов линии СВА/Лас ($6.73 \pm 0.33\%$) вне зависимости от социального и территориального статуса. Социальный и территориальный статус не оказали влияния на долю аномальных головок сперматозоидов у самцов обеих линий (рис. 3б).

Доля сперматозоидов с прогрессивным движением (рис. 4а) и быстрым (более 25 мкм/с) прогрессивным движением (рис. 4б) у доминантов-резидентов линии СВА/Лас оказалась достоверно выше, чем у субординантов этой линии, находившихся как на своей, так и на чужой территории. Влияния территориального статуса у субординантов линии СВА/Лас на долю подвижных сперматозоидов не установлено. Доля подвижных сперматозоидов и доля сперматозоидов с быстрым прогрессивным движением не отличалась у доминантов и субординантов линии РТ вне зависимости от территориального статуса животного, различий между резид-

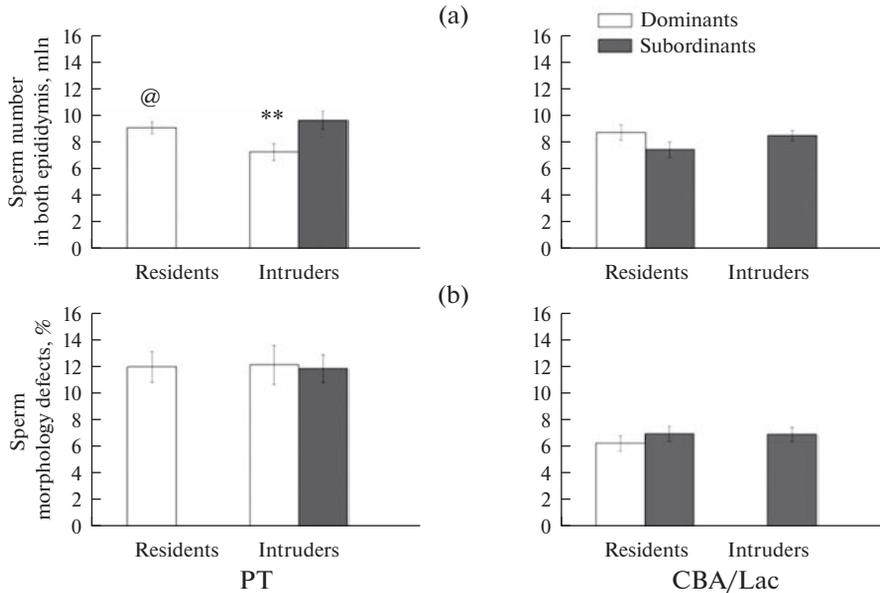


Рис. 3. Число сперматозоидов в каудальных эпидидимисах (а) и доля сперматозоидов с аномалиями головки (б) у самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным (доминант или субординант) и территориальным (резидент или интродер) статусом. ** – достоверность различий между доминантами и субординантами ($p < 0.01$). @ – достоверность влияния территориальных условий ($p < 0.05$). Число животных в группе варьировало от 27 до 52. Данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас не представлены.

дентами и интродерами этой линии также не установлено. Межлинейных различий по доле подвижных сперматозоидов не установлено.

Стероидогенная функция семенников

Социальный статус и территориальные условия формирования иерархии не оказали влияния на содержание тестостерона в крови (рис. 5а) и семенниках (рис. 5б) у самцов линий РТ. У резидентов линии СВА/Лас, которые становились доминантами, уровень тестостерона был несколько выше, чем у субординантов этой линии, находившихся на освоенной территории, однако различия между этими группами не достигали статистической достоверности. Межлинейных различий по данным показателям также не установлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Социальное доминирование связано со многими физиологическими признаками организма, в том числе и с тестикулярной функцией, которая включает в себя продукцию гормонов (в том числе тестостерона) и сперматогенез. У взрослых самцов тестостерон необходим для поддержания вторичных половых признаков, нормального протекания сперматогенеза, проявления доминантного и полового поведения. Однако взаимосвязь между тестикулярной функцией и социальным доминированием может быть достаточно сложной и модулироваться генотипом [27],

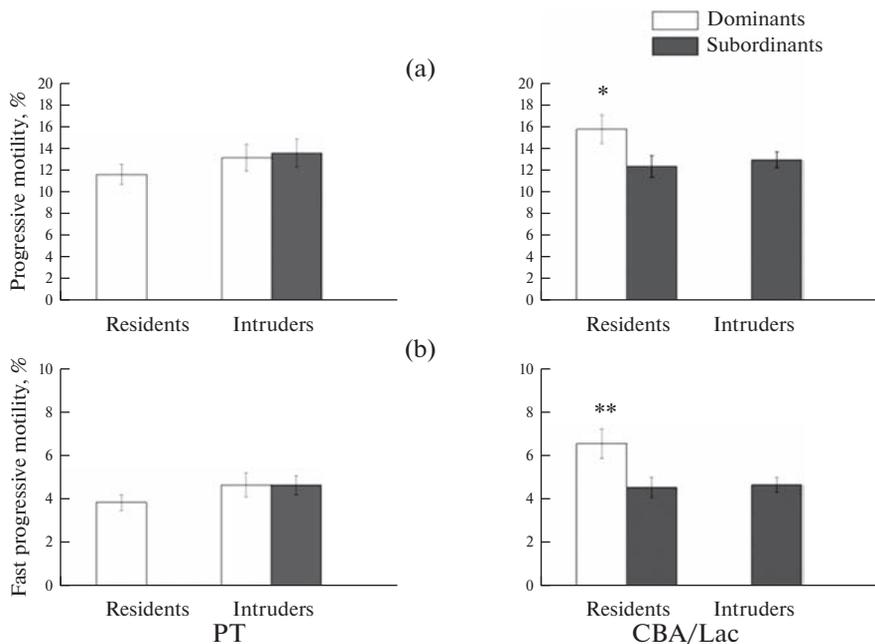


Рис. 4. Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов (а) и доля сперматозоидов с быстрым (>25 мкм/с) прогрессивным движением (б) у самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным (доминант или субординант) и территориальным (резидент или интродер) статусом. ** – достоверность различий между доминантами и субординантами ($p < 0.01$); * – достоверность различий между доминантами и субординантами ($p < 0.05$). Число животных в группе варьировало от 27 до 52. Данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас не представлены.

структурой социальной группы и средовыми условиями формирования иерархии [33], в частности территориальным статусом самца.

В проведенном нами исследовании не было выявлено взаимосвязи между базальным уровнем тестостерона, социальным рангом и территориальным статусом самцов мышей на 5-й день после формирования социальной группы, когда устанавливались стабильные доминантно-субординантные отношения. Эти данные соответствуют результатам, полученным ранее с использованием этологической модели минимального социума, где самцы содержались в парах в течение 30 дней [34], и согласуются с “гипотезой вызова”, согласно которой межранговые различия в продукции тестостерона проявляются главным образом в условиях социальной нестабильности, когда уровень тестостерона быстро увеличивается до физиологического максимума, способствуя достижению доминирующего положения, поиску партнера или борьбе за территорию [35].

Однако в нашем исследовании установлены межранговые различия по количеству эпидидимальных сперматозоидов и их подвижности, при этом направленность этих различий зависела от генотипа и территориального статуса самца. А именно, для самцов линии РТ, которые стали доминантами, находясь на территории, освоенной другим самцом, было характерно сниженное количество эпидидимальных сперматозоидов по сравнению с субординантами. С другой стороны, самцы линии СВА/Лас, которые доминировали на своей территории, характеризовались

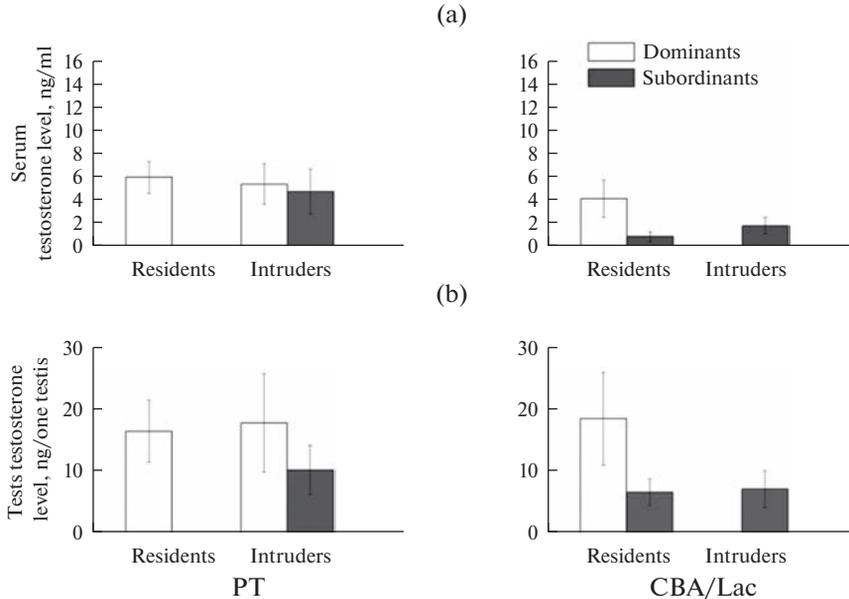


Рис. 5. Содержание тестостерона в сыворотке крови (а) и гомогенатах семенников (б) у самцов линий РТ и СВА/Лас с различным социальным (доминант или субординант) и территориальным (резидент или интродер) статусом. Число животных в группе варьировало от 27 до 52. Данные по подчиненным самцам-резидентам линии РТ и доминирующим самцам-интродерам линии СВА/Лас не представлены.

более высокой подвижностью сперматозоидов по сравнению с субординантами. Исследования на разных видах животных показали, что качество и количество сперматозоидов, а также биохимический состав семенной плазмы зависят от социального статуса животного, но направленность этой зависимости является видоспецифичной. В ряде исследований установлено, что самцы, занимающие подчиненное положение, могут иметь более высокое качество эякулята, по сравнению с доминирующими животными. Например, доминирующие самцы арктического гольца (*Salvelinus alpinus*) продуцировали меньше сперматозоидов с меньшей скоростью движения по сравнению с подчиненными [15]. Качество эякулята снижается к концу сезона спаривания у доминирующих баранов (*Ovis aries*), но сохраняется у субординантов, обеспечивая им репродуктивный успех [36]. Субдоминанты домовых воробьев (*Passer domesticus*) обладали более высокой подвижностью сперматозоидов и меньшим уровнем оксидативного стресса половых клеток по сравнению с доминантами и субординантами [16]. Предполагается, что у этих и других видов более высокое качество эякулята у подчиненных животных повышает их шансы на успешное размножение, в то время как доминанты реализуют другую стратегию для достижения репродуктивного успеха, инвестируя в поведение доминирования, что обеспечивает преимущественный доступ к самкам. Однако, по данным многочисленных исследований, для грызунов, включая домовых мышей, характерна противоположная картина – качество эякулята у доминантов выше, чем у субординантов [5, 13, 37]. В исследованиях на моделях социальной иерархии у домовых мышей показано, что доминирующие самцы характеризуются более высоким количеством эпидидимальных сперматозоидов и их подвижностью по сравнению с подчиненными [17]. В нашем исследовании также показано, что доминанты линии

СВА/Лас характеризуются более высокой подвижностью сперматозоидов, чем субординанты. Предполагается, что у грызунов социальный стресс и/или специфические хемосенсорные сигналы доминирующего самца могут подавлять сперматогенную функцию субординантов [20, 37], что, вероятно, является одним из механизмов ограничения размножения у подчиненных животных. Однако результаты нашего исследования показывают, что эффекты социального доминирования на сперматогенные показатели у домашних мышей зависят от территориального статуса и генотипа животного. Поскольку направленность эффектов социального доминирования у самцов-интродеров линии РТ не соответствует классической для домашних мышей картине, возникает вопрос о причине такого несоответствия. В прежних исследованиях с использованием этологической модели социальной иерархии у лабораторных мышей показано, что субординанты линии СВА/Лас характеризовались снижением количества и подвижности сперматозоидов по сравнению с доминантами [38], а кроме того, самцы этой линии демонстрировали увеличение подвижности сперматозоидов при содержании с самкой [39]. Однако сперматогенные показатели у самцов линии РТ в тех же самых условиях оказались резистентны к любым социальным воздействиям, что, как предполагается, обусловлено сниженной чувствительностью самцов этой линии к хемосигналам, несущим информацию о социальном окружении [38]. Кроме того, самцы линии РТ были более агрессивны и чаще становились доминантами, чем самцы линии СВА/Лас при формировании иерархии как на своей, так и на чужой территории [29]. Проявление агрессии и достижение доминирующего положения сопряжено со значительными энергетическими затратами и сопровождаются высоким уровнем социального стресса, который в наибольшей степени выражен у интродеров [25]. Исходя из наших данных можно предположить, что уменьшение количества эпидидимальных сперматозоидов у доминантов-интродеров линии РТ, отличавшихся высоким уровнем агрессивности при формировании иерархических отношений даже на чужой территории, могло быть обусловлено высоким уровнем стресса у этих животных. В то же самое время, снижение подвижности сперматозоидов у субординантов линии СВА могло быть обусловлено хемосигналами от доминирующих самцов, либо социальным стрессом, вызванным интенсивной агрессией самца-резидента. Данные предположения, безусловно, нуждаются в экспериментальной проверке и представленная этологическая модель, которая позволяет воспроизводить различные средовые условия формирования иерархии и создавать социальные группы из животных разного генотипа, может быть перспективной для изучения механизмов снижения сперматогенной функции у самцов разного социального статуса.

Интересно, что эффекты социального доминирования на сперматогенез проявлялись за относительно короткое время, уже через 5 дней после формирования группы, в то время как продолжительность сперматогенеза у домашних мышей составляет 35 дней [40]. В настоящее время получен ряд данных, указывающих на то, что количество и качество сперматозоидов у животных может изменяться в зависимости от социального окружения особи за короткое время, меньшее, чем продолжительность сперматогенеза. Предъявление запаха конкурирующего самца в течение 30 мин приводило к увеличению количества сперматозоидов в семявыносящих путях у луговой полевки *Microtus pennsylvanicus* [41]. Доминанты европейской рыжей полевки (*Myodes glareolus*) обладали более высоким числом эпидидимальных сперматозоидов, повышенной долей подвижных и морфологически нормальных половых клеток по сравнению с подчиненными животными уже через 7 дней после формирования социальной группы [30]. Подвижность сперматозоидов у лабораторных мышей увеличивалась через 5 дней после подсадки самки [39]. Предполагается, что изменение скорости транспорта сперматозоидов в семявыносящих путях

и накопления их в каудальных отделах эпидидимисов, а также модуляция созревания сперматозоидов в эпидидимисах являются основными механизмами быстрого изменения качества эякулята в ответ на социальную конкуренцию [42]. Продвижение сперматозоидов через семявыносящие пути осуществляется благодаря сокращениям гладкой мускулатуры и движениям ресничек эпителия и у домовых мышей занимает около 10 дней [43]. Кроме того, в эпидидимисе осуществляются процессы созревания сперматозоидов, включая приобретение способности к движению и оплодотворению [44]. Работа гладкой мускулатуры семявыносящих протоков, секреция различных факторов, необходимых для созревания сперматозоидов, регулируется вегетативной нервной системой, различными паракринными факторами, а также метаболитами тестостерона – дигидротестостероном и эстрадиолом [45]. Изменения в нервной регуляции, а также секреции гормонов и паракринных факторов под влиянием социального окружения особи могут достаточно быстро влиять на транспорт сперматозоидов в семявыносящих путях и созревание сперматозоидов в эпидидимисах, изменяя скорость их накопления в каудальных отделах, а также влияя на подвижность и морфологию половых клеток.

В настоящем исследовании установлено, что социальный ранг не влиял на долю морфологических аномалий сперматозоидов вне зависимости от территориального статуса самца. Полученные данные соответствуют результатам, полученным ранее [38] с использованием этологической модели минимального социума и свидетельствуют о том, что процессы спермиогенеза, лежащие в основе формирования видоспецифичной формы головки сперматозоида, являются устойчивыми к социальным факторам, влияющим на тестикулярную функцию в условиях доминантно-субординантных отношений. Известно, что встречаемость морфологических аномалий сперматозоидов является важнейшим показателем фертильности самцов [46], поскольку нарушения процесса спермиогенеза приводят не только к появлению морфологических дефектов половых клеток, но и к нарушению компактизации хроматина, увеличению уровня оксидативного стресса и повышению фрагментации ДНК сперматозоидов [47, 48]. Следовательно, устойчивость процессов спермиогенеза к факторам, обуславливающим подавление репродукции у субординантов, повышает их шансы на достижение репродуктивного успеха и позволяет подчиненным животным оставаться в репродуктивном резерве популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление доминантно-субординантных отношений в этологической модели социальной иерархии у лабораторных мышей оказывает влияние на сперматогенную функцию самцов уже через 5 дней после формирования группы, при этом характер этого влияния зависит от генотипа животного, его социального ранга и территориального статуса. Генетически детерминированный высокий уровень агрессивности при формировании социальной иерархии на территории, освоенной другим самцом, может приводить к ослаблению сперматогенной функции у доминантов по сравнению с подчиненными животными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания FWNR-2022-0021. “Генофонды населения Сибири, генетические маркеры заболеваний человека и молекулярные основы формирования патологических процессов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.В.О., А.В.О.), сбор экспериментальных данных (М.А.К.), анализ полученных результатов (М.А.К., А.В.О.), написание и редактирование рукописи (М.А.К., Л.В.О.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moreno J* (2019) Reproductive Success. Encyclopedia of Animal Behavior, 2nd edition 2: 94–100.
2. *Громов ВС* (2008) Пространственно-этологическая структура популяций грызунов. М.: Товарищество научн издан КМК. [*Gromov VS* (2008). Spatial and ethological structure of rodent populations. М. Tovarishchestvo nauchnyh izdanij KMK. (In Russ)].
3. *Drews K* (1993) The concept and definition of dominance in animal behavior. *Behavior* 125: 283–313.
4. *Ellis L* (1995) Dominance and reproductive success among nonhuman animals: a cross-species comparison. *Ethol Sociobiol* 164: 257–333.
5. *Bayram HL, Franco C, Brownridge P, Claydon AJ, Koch N, Hurst, JL, Beynon RJ, Stockley P* (2020) Social status and ejaculate composition in the house mouse. *Philosophical Transact Royal Societ London Series B Biol Sci* 375: 20200083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0083>
6. *Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM* (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reproduct Update* 16: 231–245. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
7. *Stockley P* (2004) Sperm competition in mammals. *Hum Fertility (Cambridge, England)* 7: 91–97. <https://doi.org/10.1080/14647270410001699054>
8. *Firman RC* (2020) Of mice and women: advances in mammalian sperm competition with a focus on the female perspective. *Philosophical Transact Royal Societ London Series B Biol* 375: 20200082. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0082>
9. *Dean MD, Ardlie KG, Nachman MW* (2006) The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). *Mol Ecol* 15: 4141–4151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03068.x>
10. *Rolland C, Macdonald DW, Fraipont M, Berdoy M* (2003) Free female choice in house mice: leaving best for last. *Behaviour* 140: 1371–1388.
11. *Ramm SA, Schärer L, Ehmcke J, Wistuba J* (2014) Sperm competition and the evolution of spermatogenesis. *Mol Hum Reproduct* 20: 1169–1179. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau070>
12. *Parker GA* (2020) Conceptual developments in sperm competition: a very brief synopsis. *Philosophical Transact Royal Societ London Series B Biol* 375: 20200061. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0061>
13. *Schradin C, Eder S, Müller K* (2012). Differential investment into testes and sperm production in alternative male reproductive tactics of the African striped mouse (*Rhabdomys pumilio*). *Horm Behav* 61: 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.03.002>
14. *Cornwallis CK, Birkhead TR* (2008) Plasticity in reproductive phenotypes reveals status-specific correlations between behavioral, morphological, and physiological sexual traits. *Evol Int J Organic Evol* 62: 1149–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00346.x>

15. *Rudolfson G, Figenschou L, Folstad I, Tveiten H, Figenschou M* (2006) Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proceed Biol Sci* 273: 325–332.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3305>
16. *Mora A, Meniri M, Gning O, Glauser G, Vallat A, Helfenstein F* (2017) Antioxidant allocation modulates sperm quality across changing social environments. *PLoS One* 12: e0176385.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176385>
17. *Koyama S, Kamimura S* (2000) Influence of social dominance and female odor on the sperm activity of male mice. *Physiol & Behav* 71: 415–422.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00361-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00361-9)
18. *Koyama S, Kamimura S* (1999). Lowered sperm motility in subordinate social status of mice. *Physiol & Behav* 65: 665–669.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00205-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00205-4)
19. *Kleshchev MA, Osadchuk LV* (2014) Social domination and reproductive success in male laboratory mice (*Mus musculus*). *J Evol Biochem Physiol*, 50: 201–206.
20. *Koyama S* (2004) Primer effects by conspecific odors in house mice: a new perspective in the study of primer effects on reproductive activities. *Horm Behav* 46: 303–310.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.002>
21. *Neff BD, Svensson EI* (2013) Polyandry and alternative mating tactics. *Philosophical Transact Royal Societ London Series B Biol* 368(1613): 20120045.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0045>
22. *Kustra MC, Alonzo SH* (2020) Sperm and alternative reproductive tactics: a review of existing theory and empirical data. *Philosophical Transact Royal Societ London Series B Biol* 375: 20200075.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0075>
23. *Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJ* (2013) The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *J Visualiz Exp* 77: e4367.
<https://doi.org/10.3791/4367>
24. *Hayashi S, Tomihara K* (2000) The influence of female on male territorial dominance and female preference in dwelling place in laboratory mice. *J Ethology* 18: 47–51.
25. *Martinez M, Calvo-Torrent A, Pico-Alfonso M* (1998) Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggressiv Behav* 24: 241–256.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2337\(1998\)24:4<241::aid-ab1>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2337(1998)24:4<241::aid-ab1>3.0.co;2-m)
26. *Bragin AV, Osadchuk LV, Osadchuk AV* (2006) The experimental model of establishment and maintenance of social hierarchy in laboratory mice. *Zhurn Vyssh Nervn Deiat im IP Pavlova* 56: 412–419.
27. *Osadchuk LV, Salomacheva IN, Osadchuk AV* (2010) Genotype-related changes in the reproductive function under social hierarchy in laboratory male mice. *Zhurn Vyssh Nervn Deiat im IP Pavlova* 60: 339–351
28. *Zarubina EA, Osadchuk LV* (2011) Phenogenetic analysis of testicular responsiveness to choriionic gonadotropin in inbred mouse strains. *Russ J Genet* 47: 221–225.
29. *Kleshchev MA, Osadchuk AV, Osadchuk LV* (2022) Peculiarities of agonistic and marking behavior in male laboratory mice (*Mus musculus*) of different inbred strains during the formation of social hierarchy. *Biol Bull* 49: 1626–1637.
30. *Kruczek M, Styrna J* (2009) Semen quantity and quality correlate with bank vole males' social status. *Behav Proc* 82: 279–285.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.07.009>
31. *Tayama K, Fujita H, Takahashi H, Nagasawa A, Yano N, Yuzawa K, Ogata A* (2006) Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: a simple and inexpensive method. *Reproduct Toxicol* 22: 92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.11.009>
32. *Daev EV, Dukel'skaia AV* (2003) The female pheromone 2,5-dimethylpyrazine induces sperm head abnormalities in male CBA mice. *Russ J Genet* 39: 969–974.
33. *Williamson CM, Lee W, Romeo RD, Curley JP* (2017) Social context-dependent relationships between mouse dominance rank and plasma hormone levels. *Physiol & Behav* 171: 110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.038>
34. *Osadchuk LV, Gutorova NV, Kleshchev MA* (2014) Testicular testosterone production in male mice of inbred strains PT and CBA/Lac after a long-term period of stable social hierarchy. *Ross Fiziol Zhurn im IM Sechenova* 100: 465–472.
35. *Wingfield JC, Hegner RE, Dufty AM, Ball GF* (1990) The “Challenge Hypothesis”: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *Am Nat* 136: 829–846.

36. Preston BT, Stevenson IR, Pemberton JM, Wilson K (2001) Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature* 409: 681–682.
<https://doi.org/10.1038/35055617>
37. Lemaître JF, Ramm SA, Hurst JL, Stockley P (2012) Sperm competition roles and ejaculate investment in a promiscuous mammal. *J Evol Biol* 25: 1216–1225.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02511.x>
38. Gutorova NV, Kleshev MA, Osadchuk LV (2012) A role of long-term social interactions in the control of spermatogenesis in male mice of inbred strains pt and CBA/Lac. *Russ J Physiol* 98: 854–861.
39. Kleshev MA, Osadchuk LV (2012) Modification of the testicular function in laboratory male mice during social interactions: effect of female presence. *Bull Exper Biol Med* 153: 240–243.
<https://doi.org/10.1007/s10517-012-1686-8>
40. *Physiology of Reproduction* (2014) / Editors: Tony Plant Anthony. Zeleznik Acad Press, 2684 p.
41. Delbarco-Trillo J, Ferkin MH (2004) Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature* 431: 446–449.
<https://doi.org/10.1038/nature02845>
42. Parker GA, Pizzari T (2010) Sperm competition and ejaculate economics. *Biol reviews Cambridge Philosophical Societ* 85: 897–934.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00140.x>
43. Fernandez CD, Porto EM, Arena AC, Kempinas W (2008) Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl* 31: 427–437.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x>
44. James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A (2020) The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *Int J Mol Sci* 21: 5377.
<https://doi.org/10.3390/ijms21155377>
45. Marchiani S, Tamburrino L, Muratori M, Baldi E (2017) Epididymal sperm transport and fertilization. In: *Endocrinology of the testis and male reproduction*. M. Simoni, I.T. Huhtaniemi (eds). Springer 457–478.
46. Teves ME, Roldan ERS (2022) Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiol Rev* 102: 7–60.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2020>
47. Daris B, Goropevsek A, Hajnik N, Vlaisavljević V (2010) Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Archiv Gynecol Obstetrics* 281: 363–367.
<https://doi.org/10.1007/s00404-009-1140-y>
48. Oumaima A, Tesnim A, Zohra H, Amira S, Ines Z, Sana C, Intissar G, Lobna E, Ali J, Meriem M (2018) Investigation on the origin of sperm morphological defects: oxidative attacks, chromatin immaturity, and DNA fragmentation. *Environment Sci Pollut RES Internat* 25: 13775–13786.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1417>

The Effects of Social Hierarchy Establishment in Resident–Intruder Model on Testicular Function in Laboratory Mice of Different Inbred Strains

M. A. Kleshchev^{a, *}, A. V. Osadchuk^a, and L. V. Osadchuk^a

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

^{*}*e-mail: max82cll@bionet.nsc.ru*

Male reproductive success is known to be related with ability to social dominance and number and quality of spermatozoa as well as the production of reproductive hormones. The relationships between social dominance and testicular function are affected by genotype and environmental conditions of social hierarchy formation, and male territorial status (resident or intruder). However, the mechanisms of these relationships are still poorly understood. The aim of this study was to investigate effects of genotype and of familiarization with the habitat on testicular function during social hierarchy formation in experimental model of social hierarchy in laboratory mice using resident-intruder paradigm. Male of certain inbred strain (PT or CBA/Lac strain) was placed to experimental cage where male (resident) of other inbred strain (PT or CBA/Lac strain) has been living

two days with female of DD/He strain. Social rank for each male was assessed after social hierarchy formation. Then testosterone level in serum and testes and epididymal sperm quality were estimated after five days after the group formation. It was shown that social hierarchy formation did not affect testosterone level in serum and testes as well as percentage of sperm heads with abnormal morphology. However, the establishment of social hierarchy resulted in decreased sperm number in dominant-intruders of PT strains as well as decreased progressive sperm motility in subordinants of CBA/Lac strain regardless territorial status. To conclude, social hierarchy formation in experimental model of social hierarchy in laboratory mice affects epididymal sperm quality already five days after group formation, with pattern of these relationships depending on genotype, social rank and territorial status.

Keywords: social dominance, laboratory mice, testosterone, spermatogenesis

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ
СЕРДЕЧНОГО РИТМА, ВЫЗВАННЫХ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС
ХЛОРИДОМ НИКЕЛЯ И ИНГИБИТОРОМ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЭЗЕРИНОМ**

© 2023 г. С. В. Кузнецов¹, *, Н. Н. Кузнецова¹

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

**E-mail: ksv@iephb.ru*

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 02.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

В экспериментах на 3-дневных новорожденных крысятах проведен сравнительный анализ показателей variability сердечного ритма (ВСР) после инъекции животным ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эзерина ($\frac{3}{4}$ LD₅₀) и блокатора кальциевых каналов Т-типа (Т-VDCC) Ni²⁺ (ED₁₀₀). Оба препарата вызывают возникновение феноменологически сходного патологического сердечного ритма с выраженными брадикардическими комплексами (ПСРБК). Анализ показателей ВСР показал, что нарушение механизмов регуляции сердечного ритма при отравлении крысят NiCl₂ и при активации холинореактивных структур, вызванных ингибированием АХЭ, развиваются по сходной схеме. В обоих случаях наблюдается падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF (преимущественно симпатические) и HF (парасимпатические влияния). Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы (VLF-диапазон). Установлено, что в условиях премедикации Н- или М-холинолитиками, в тех случаях, когда у крысят не развиваются нарушения сердечного ритма, общим является первоначальное снижение выраженности нейрогуморальных и последующее увеличение симпатических и, в меньшей степени, парасимпатических влияний. При этом состояние вагосимпатического баланса не является определяющим. В том случае, когда после премедикации влияние нейрогуморальных факторов усиливается, то в дальнейшем происходит снижение доли нервных влияний и возникновение ПСРБК. Полученные данные позволяют полагать, что у новорожденных крысят как прямая блокада Т-VDCC, так и опосредуемое через М₃-подтип мускариновых холинорецепторов изменение тока I_{CaT}, приводит к нарушению работы пейсмекеров и развитию ПСРБК.

Ключевые слова: новорожденные крысы, дизритмия, variability сердечного ритма, кальциевые каналы, хлорид никеля, холинэргическая система, эзерин, холинолитики

DOI: 10.31857/S0869813923080058, EDN: LQQYSP

ВВЕДЕНИЕ

В раннем перинатальном онтогенезе крыс у 60% плодов и 25% интактных новорожденных животных наблюдается возникновение нерегулярных брадикардиче-

ских колебаний сердечного ритма с длительностью в несколько секунд [1, 2]. Количество и амплитуда брадикардических комплексов резко усиливается после инъекции животным ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ) фосфакола или эзерина, что приводит к развитию патологического сердечного ритма с выраженными брадикардическими комплексами (ПСРБК) и часто становится причиной гибели животного [2, 3]. При изучении влияния на сердечный ритм новорожденных крысят никеля, являющегося блокатором низкоамплитудных кальциевых каналов Т-типа (T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, T-VDCC), мы обнаружили, что его введение также приводит к возникновению ПСРБК, феноменологически сходного с “эзериновой” аритмией. Вызванный хлоридом никеля (NiCl_2) ПСРБК имеет отчетливую возрастную динамику, возникает у 100% 3-дневных крысят и не наблюдается после 15-го дня постнатального развития [4].

В мировой литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению нарушений механизмов регуляции сердечного ритма у новорожденных животных после отравления ионами никеля. Более того, имеется крайне мало публикаций, касающихся влияния никеля на вариабельность сердечного ритма (ВСР) у взрослых животных и человека. Имеющиеся работы рассматривают последствия подострых и хронических интратрахеальных воздействий сульфата никеля [5] или мелкодисперсных твердых частиц, включающих в том числе и никель [6, 7].

Таким образом, основной задачей нашего исследования стало проведение анализа динамики изменения показателей ВСР у 3-дневных крысят в условиях блокады ионами никеля кальциевых каналов. Это должно способствовать раскрытию механизмов, приводящих к развитию у новорожденных патологической аритмии. Учитывая тот факт, что возникновение ПСРБК, вызванного эзеринем, может быть остановлено предварительной блокадой М- (М-ХР) [8] или Н-холинорецепторов (Н-ХР) [9], мы предположили, что премедикация холиноблокаторами может оказаться эффективной и при отравлении крысят никелем. Поэтому дополнительное внимание было уделено изучению сдвигов показателей ВСР после премедикации животных холинолитиками с последующим введением NiCl_2 .

МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Работа выполнена на крысятах *Rattus norvegicus f. domestica* 3-дневного возраста. Всего в опытах использовано 58 крысят с массой тела 9.2 ± 0.2 г без разделения по полу. Все экспериментальные процедуры соответствовали требованиям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (Протокол № 7-2/2020), основанным на директиве Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях”.

Экспериментальная установка и методы регистрации

Животных помещали в экранированную камеру с температурой $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Контроль температуры осуществляли с помощью цифрового термометра RST-02100 (RST, Швеция). Регистрацию физиологических показателей проводили на ненаркотизированных крысятах в условиях мягкой фиксации животных. Исследовали ЭКГ и показатели внешнего дыхания. В целях снижения уровня артефактов, при регистрации ЭКГ у крысят применяли нестандартное отведение от теменной части головы и крестцовой области. Для анализа частоты дыхания (ЧДД) осуществляли регистрацию экскурсии грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика VP-102 (RTF, Германия). В экспериментах использовали усилители био-

потенциалов ИУ-40 (производство ЭПМ НИИЭМ РАМН). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от 0.15 до 30 Гц, ЭКГ – от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП Е14-440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Построение периодограмм сердечного ритма и анализ регистрируемых сигналов проводили в программе “PowerGraph 3.3.11” (ООО “ДИСофт”, Россия) и “Origin 2019” (OriginLab Corporation, США). Спектральный анализ периодограмм осуществляли по алгоритму быстрого преобразования Фурье по 32768 точкам с использованием окна Уолша (Welch). Сердечную деятельность оценивали по двум параметрам – средней частоте сердечных сокращений (ЧСС) и показателю ВСР. Анализ ВСР осуществляли, исходя из адаптированного для новорожденных крысят [3, 8, 9] разделения спектра периодограмм на следующие диапазоны: VLF – 0.03–0.3 Гц; LF – 0.3–0.8 Гц; HF – 0.8–2.5 Гц.

Использованные фармакологические препараты

В процессе исследования было проведено 7 серий экспериментов. У интактных крысят после 15-минутного периода адаптации в течение 30 мин регистрировали сердечный и дыхательный ритм. После регистрации фоновых физиологических показателей первой группе крысят внутрибрюшинно вводили шестиводный хлористый никель (7791-20-0, Sigma-Aldrich) в дозе 109 мг/кг (в пересчете на безводный NiCl_2). По полученным нами ранее данным, эта доза вызывает у 100% 3-дневных крысят единообразные изменения сердечного и дыхательного ритма [4]. Второй группе крысят осуществлялось внутрибрюшинное введение ингибитора АХЭ эзерина (Physostigmine, “MP Biomedical”, США) в дозе 1.3 мг/кг ($\frac{1}{4}$ LD_{50}), которая позволяла получить четкую реакцию исследуемых систем на действие эзерина при минимальном (менее 20%) уровне смертности животных [2]. Регистрацию сердечного и дыхательного ритмов проводили в течение 30 мин. Данная эпоха анализа была выбрана исходя из ранее полученных данных о длительности максимально выраженной реакции крысят на введение эзерина и хлорида никеля [2, 4]. Для оценки динамики развития изменений физиологических показателей (ЧСС, ВСР) 30-минутную запись разбивали на 3 фрагмента по 10 мин. При последующей обработке часть записей была отбракована из-за наличия артефактов в периодограммах сердечного ритма во время аритмии, в итоге для окончательного анализа были отобраны данные, полученные на 44 крысятах.

В дополнительных сериях экспериментов перед введением крысятам NiCl_2 осуществляли премедикацию животных одним из нижеперечисленных препаратов: Н-холинолитиком бензогексонием (Hexamethonium, гексаметония бензосульфонат “Вектор ГНЦ вирусологии и биотехнологии”, Россия) внутрибрюшинно в дозах 1 и 20 мг/кг; селективным Н-холинолитиком преимущественно центрального действия этерофеном (1-(diethylamino)butan-2-yl 2,2-diphenylacetate, (ИЭМ-506)) в дозе 10 мг/кг в/бр; неселективным М-холинолитиком атропином (A0132 Sigma-Aldrich, США) (1 мг/кг, в/бр). Введение хлорида никеля проводили через 15 мин при премедикации этерофеном и через 20 мин – в случае бензогексония или атропина. Расчеты показателей ЧДД, ЧСС и ВСР осуществляли по 10-минутным фрагментам записей, сделанным непосредственно перед инъекцией NiCl_2 . Общее время исследования каждого животного составляло от 90 до 95 мин.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли в программе “Origin 2019”. Статистически обработанные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). После проверки нормальности распределения, выполненной

по критерию Шапиро–Уилка, для определения достоверности различий между группами использовали парный тест Стьюдента и, в ряде случаев, однофакторный дисперсионный анализ, при отсутствии нормального распределения и при анализе показателей ВРС использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ВСП после инъекции эзерина и хлорида никеля

Возникновение ПСРБК после инъекции новорожденным крысам ингибиторов АХЭ было подробно описано нами ранее [2, 3]. В настоящем исследовании введение эзерина, как препарата сравнения, выполнялось с целью сопоставления динамики изменения показателей ВСП после повышения уровня активации холинореактивных структур (ХРС) и после введения крысам NiCl_2 , осуществляемых в одинаковых условиях проведения экспериментов. Анализ полученных данных показал, что после введения препаратов у животных наблюдаются качественно и количественно сходные изменения как периодограмм сердечного ритма, так и их спектров (рис. 1).

При отравлении крысят эзеринотом ЧСС достоверно падает за время наблюдения в среднем на 47% (с 248.7 ± 4.8 до 132.5 ± 16.8 в мин), а ЧДД – на 55% (с 81.3 ± 2.7 до 36.9 ± 3.4 в мин). Сопоставимое снижение частоты сердцебиений и дыхания наблюдаются у животных на протяжении 30 мин после инъекции хлорида никеля. Предварительное введение холиноблокаторов также приводит к снижению ЧСС и ЧДД, которое продолжается и после инъекции крысам NiCl_2 (табл. 1). Видно, что практически во всех случаях угнетение частоты дыхания оказывается более выраженным, чем степень развивающейся брадикардии.

Развитие брадикардии у крысят может быть связано с изменениями вагосимпатического баланса (ВСБ). Вместе с тем известно, что у новорожденных крысят созревание парасимпатических и симпатических влияний на сердце еще окончательно не закончено. Для оценки баланса гуморально-метаболических и нервных влияний на активность сердечных пейсмекеров нами был проведен анализ ВСП.

Следует отметить, что даже у взрослых животных интерпретация генеза волн разных частотных диапазонов различается при трактовке результатов разными исследователями. При работе с новорожденными крысами эта проблема становится еще более острой. Поэтому, основываясь на данных литературы и наших собственных исследований [3, 8–10], при дальнейшем обсуждении мы будем придерживаться следующей классификации: диапазон VLF отражает вклад различных нейрогуморальных (церебральных эрготропных, гуморально-метаболических и др.) факторов и центральных симпатoadренальных влияний; LF формируется преимущественно симпатическими влияниями с возможным включением и парасимпатического элемента; HF-диапазон в значительной мере является отражением дыхательной аритмии и связан преимущественно с парасимпатическими влияниями.

Установлено, что при интоксикации эзеринотом идет постепенное развитие реакции, достигающее максимума в последний триместр наблюдения. Максимум реакции после инъекции хлорида никеля наблюдается в первые 20 мин после инъекции. В обоих случаях мы наблюдаем падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF и HF (табл. 2, рис. 2а, б). Значительное, на 70–76%, снижение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы. Падение парасимпатических влияний на 54–55% приводит к смещению ВСБ в сторону усиления симпатических нервных влияний (табл. 2, рис. 3а, б). В целом,

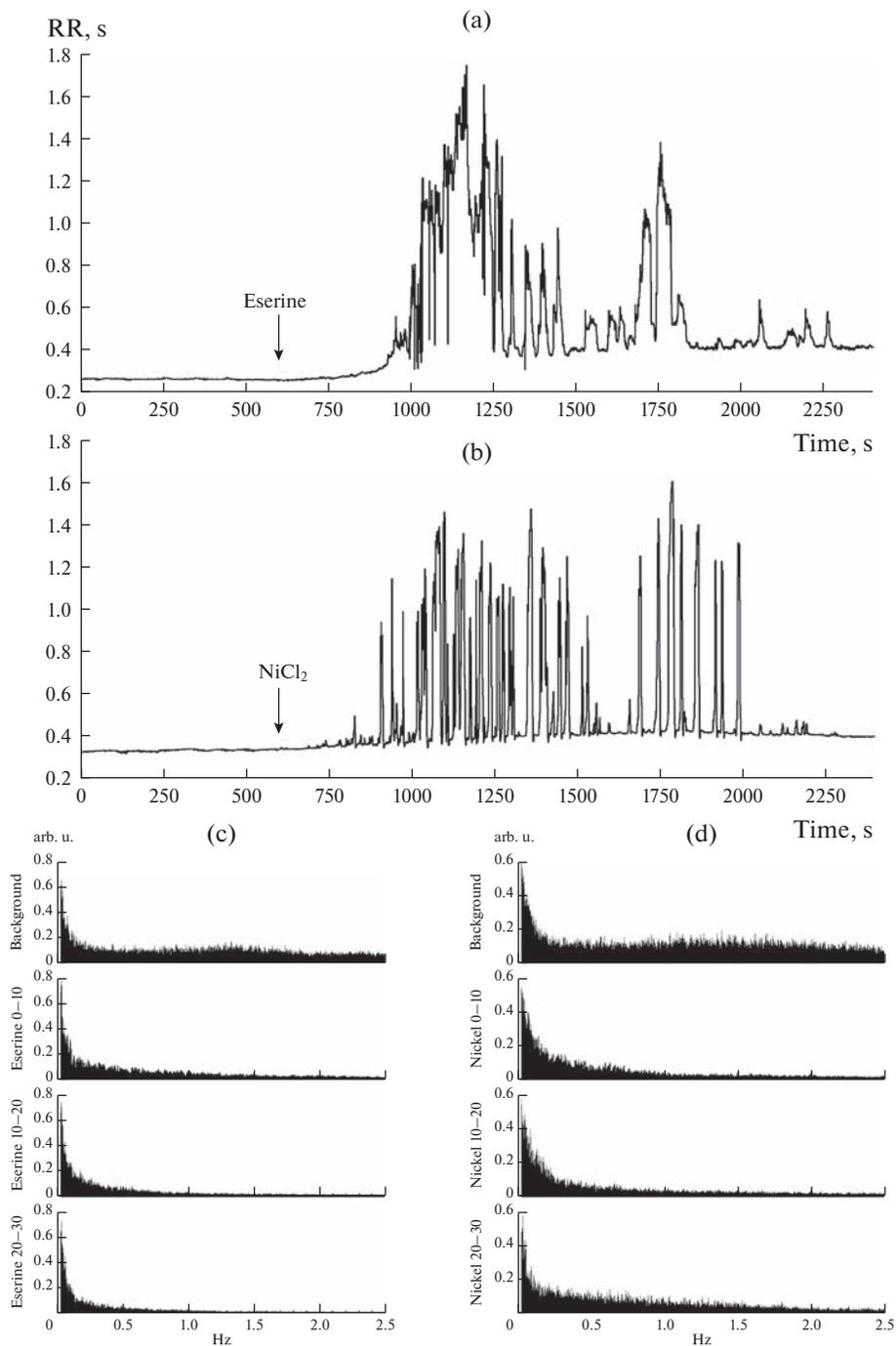


Рис. 1. Индивидуальные периодограммы сердечного ритма у 3-дневных крысят после введения им эзерина (a) и NiCl₂ (b). Усредненные спектры периодограмм до и после введения эзерина (c) и NiCl₂ (d). Стрелки на (a) и (b) указывают момент инъекции препаратов.

Таблица 1. ЧСС и ЧДД у интактных 3-дневных крысят до и после фармакологических воздействий

Показатель (в мин)	Группа, (эпоха анализа)				
	Фон (10 мин)	Премедикация (10 мин)	% к фону	Никель (<i>n</i> = 9) (30 мин)	% к фону
ЧСС	268.6 ± 24.6	—	—	188.8 ± 12.0*	70
ЧДД	75.8 ± 7.4	—	—	35.6 ± 3.7*	51
Бензогексоний 1 мг/кг (<i>n</i> = 7)					
ЧСС	307.8 ± 5.7	270.5 ± 12.5*	88	246.0 ± 6.0*	80
ЧДД	80.1 ± 2.4	61.8 ± 5.8*	77	23.3 ± 1.8*	29
Бензогексоний 20 мг/кг (<i>n</i> = 6)					
ЧСС	287.3 ± 16.0	206.0 ± 16.2*	70	203.6 ± 11.1*	70
ЧДД	82.5 ± 7.3	73.0 ± 8.7	90	35.7 ± 2.4*	46
Этерофен (<i>n</i> = 7)					
ЧСС	266.0 ± 12.7	221.7 ± 15.9	83	189.7 ± 14.8*	71
ЧДД	73.5 ± 7.2	63.3 ± 7.3	86	40.5 ± 3.6*	56
Атропин (<i>n</i> = 8)					
ЧСС	305.7 ± 16.7	245.3 ± 17.3*	81	202.5 ± 11.2*	67
ЧДД	81.3 ± 14.8	60.0 ± 7.8	78	47.0 ± 5.8	63

Здесь и в табл. 2–5: * $p < 0.05$ – достоверность различий между фоном и опытом. ЧДД – частота дыхательных движений, ЧСС – частота сердечных сокращений.

анализ ВСР показал, что нарушение механизмов регуляции сердечного ритма при отравлении крысят NiCl_2 и при активации ХРС, вызванных ингибированием АХЭ, развиваются по очень сходной схеме.

Начиная свое исследование, мы рассматривали возникновение ПСРБК, вызванное активацией ХРС после ингибирования АХЭ, как в определенной степени эталонный процесс, который может иметь общие звенья или общие конечные точки приложения с патологической аритмией, наблюдаемой у крысят после инъекции NiCl_2 . Известно, что к моменту рождения у крысы существует период потенциального вегетативного дисбаланса, когда парасимпатическая иннервация сердца установлена, но симпатическая иннервация еще не развита. В этот период у крысят отмечается положительный хронотропный ответ при активации М-ХР, а в крови могут циркулировать катехоламины из мозгового слоя надпочечников, и это будет в первую очередь адреналин, а не норадреналин [11]. В экспериментах на 2-дневных крысятах нами было установлено, что после однократного введения ингибитора АХЭ фосфакола (параоксона) в дозе 1 мг/кг ($1/25$ ЛД₅₀) наблюдается достоверное, на 68% угнетение активности АХЭ эритроцитов и на 93% от уровня интактных животных – бутирилхолинэстеразы плазмы крови, что должно сопровождаться повышением количества вне- и внутрисинаптического АХ [3].

В экспериментах на 1–8-недельных крысятах была показана важная роль М₃-под-типа холинорецепторов в регуляции сердечного ритма новорожденных крысят. Установлено, что именно М₃-, а не М₂-ХР участвуют в регуляции хронотропной функции сердца. Установлено, что в отличие от 3-недельных и более взрослых крыс, у 7-дневных животных блокада М₃-ХР вызывает урежение ЧСС, что может

Таблица 2. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ и эзерина

Показатели	Фон	Препарат, период исследования		
		0–10	10–20	20–30
NiCl₂ (n = 9)				
VLF (y.e.)	33.23 ± 4.44	34.84 ± 5.57	32.33 ± 5.89	27.30 ± 3.59*
LF (y.e.)	30.67 ± 3.89	21.94 ± 6.88*	16.93 ± 4.84*	26.07 ± 7.07*
HF (y.e.)	103.29 ± 10.65	22.53 ± 5.53*	23.27 ± 7.54*	39.56 ± 13.51*
To (y.e.)	167.18 ± 12.50	79.32 ± 17.20*	72.53 ± 17.21*	92.93 ± 23.21*
VLF, %	19.9	43.9	44.6	29.4
LF, %	18.3	27.7	23.3	28.0
HF, %	61.8	28.4	32.1	42.6
LF/HF, y.e.	0.297	0.974	0.727	0.659
ЧСС в мин	268.6 ± 24.6	222.9 ± 16.0	176.1 ± 17.5*	167.3 ± 14.1*
Эзерин (n = 7)				
VLF (y.e.)	29.23 ± 3.44	31.39 ± 2.88	31.03 ± 1.74	26.54 ± 1.56
LF (y.e.)	26.21 ± 3.17	22.29 ± 3.72*	15.82 ± 1.21*	12.02 ± 1.42*
HF (y.e.)	81.66 ± 8.78	28.89 ± 7.25*	17.09 ± 1.21*	14.02 ± 1.13*
To (y.e.)	137.10 ± 14.52	82.57 ± 10.14*	63.94 ± 3.85*	52.58 ± 3.32*
VLF, %	21.3	38.0	48.6	50.4
LF, %	19.1	27.0	24.7	22.9
HF, %	59.6	35.0	26.7	26.7
LF/HF, y.e.	0.321	0.772	0.926	0.858
ЧСС в мин	248.7 ± 4.8	161.9 ± 13.5*	103.9 ± 11.2*	131.6 ± 9.7*

Здесь и в табл. 3–5: эпоха анализа 10 мин. Значения показателей VLF, LF, HF, To даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Дополнительно диапазоны VLF, LF, HF представлены в процентах от общей мощности спектра.

быть связано с особенностями иннервации сердца в этом возрасте [12, 13]. Эти данные нашли подтверждение в экспериментах, выполненных на препаратах предсердного и желудочкового миокарда однодневных, трехнедельных и взрослых крыс. Стимуляция M₃ подтипа холинорецепторов (M₃-XP) в предсердном миокарде вызывает уменьшение длительности потенциалов действия, приблизительно одинаково выраженное у новорожденных и взрослых крыс, в то время как в желудочковом миокарде новорожденных крысят, более чем в 3 раза превосходящее эффект у взрослых животных. Установлено, что количество мРНК гена M₃-XP как в предсердном, так и в желудочковом миокарде снижается по мере взросления животного. Можно заключить, что вклад M₃-рецепторов в реализацию холинэргических воздействий на миокард снижается в постнатальном онтогенезе, что связано с уменьшением экспрессии гена M₃-XP по сравнению с геном M₂-XP [14].

Основываясь на данных литературы [14, 15] можно полагать, что увеличение уровня АХ, образующегося в организме новорожденных крысят после ингибирования АХЭ, опосредованно через M₃-XP запускает каскад внутриклеточных реакций,

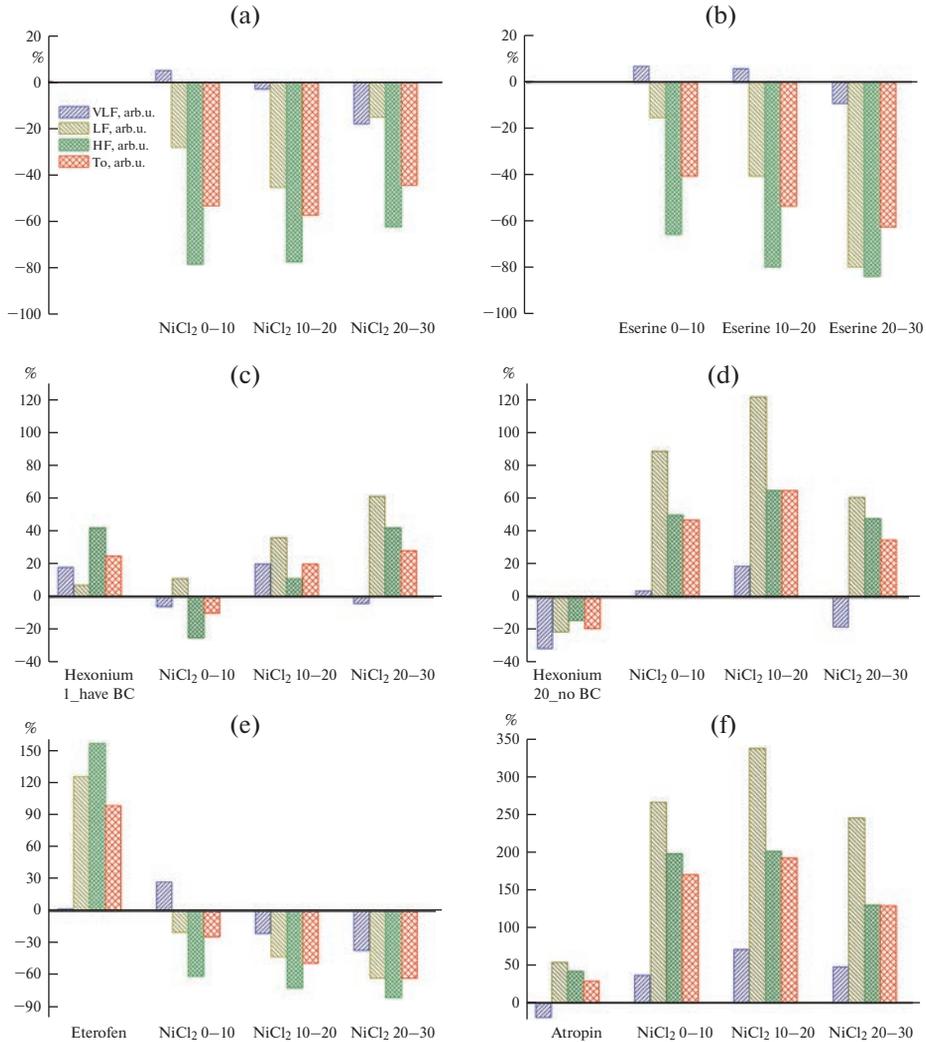


Рис. 2. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят после фармакологических воздействий в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%. Значения показателей VLF, LF, HF, To даны в нормированном виде (максимумы мощности индивидуальных спектров приняты за 1). Информация о наличии или отсутствии достоверности различий между фоном и опытом представлена в табл. 2–5.

которые в конечном итоге меняют активность T-VDCC и, как следствие, работу пейсмекеров. Однако, если в случае холинергической активации происходит усиление кальциевого тока T-типа, то Ni²⁺ его, наоборот, угнетает.

Мы установили, что изменение баланса между нервными и нейрогуморальными факторами регуляции сердечного ритма может являться триггером для развития патологической аритмии. Если в случае с активацией холинергической системы сдвиги показателей ВСП в целом объяснимы, то механизмы, влияющие на ВСП после введения крысятам никеля, требуют отдельного рассмотрения. Показано, что эффекты, наблюдающиеся у взрослых крыс после острого воздействия NiCl₂, вы-

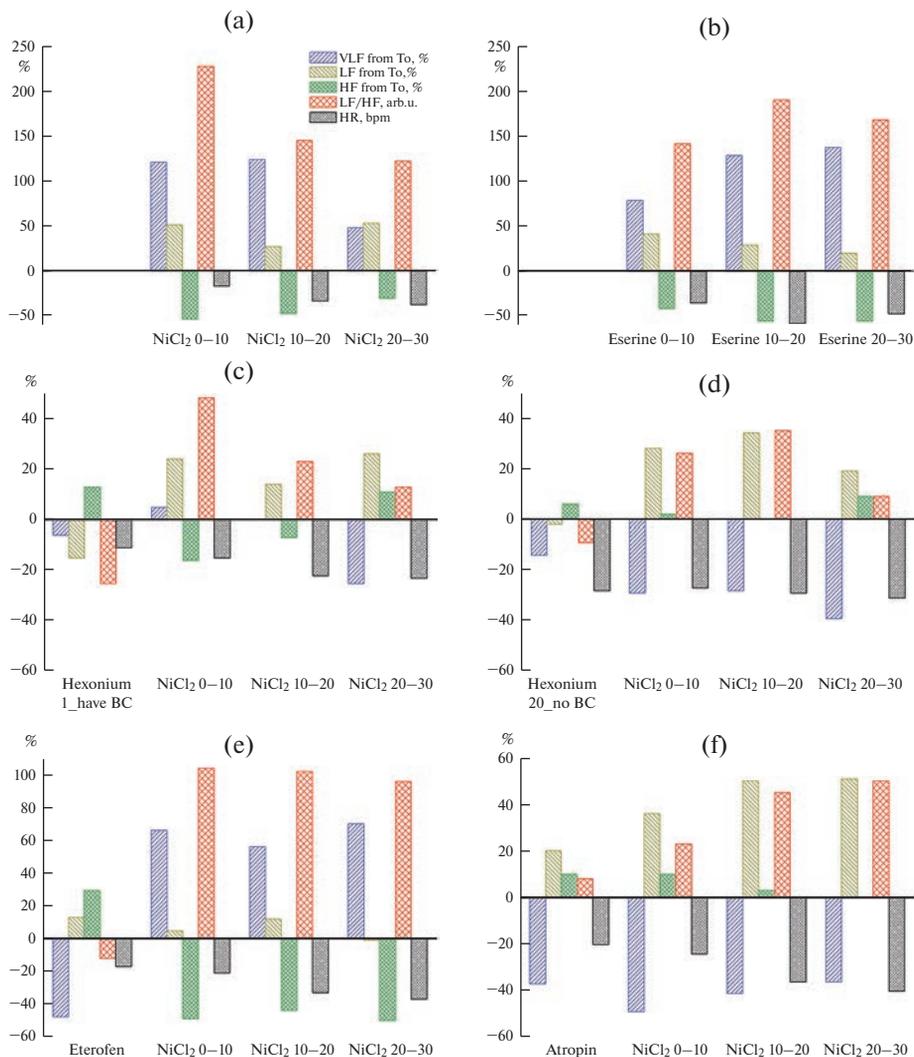


Рис. 3. Сдвиг показателей ВСП у 3-дневных крысят после фармакологических воздействий в % от исходного (фонового) уровня, принятого за 100%. Диапазоны VLF, LF, HF представлены в % от общей (To) мощности спектра. Коэффициент LF/HF рассчитан исходя из усредненных нормированных показателей LF и HF. ЧСС (HR) представлена в уд./мин.

званы комбинированным действием катехоламинов, высвобождаемых надпочечниками, и катехоламинов, высвобождаемых из эфферентных нервов [16]. Однако механизмы, лежащие в основе потенцирующего действия никеля на адренергические структуры, не раскрыты. С другой стороны, известно, что дифференциальная секреция адреналина и норадреналина из медуллы надпочечников жестко регулируется центральными и периферическими механизмами. АХ вызывает выброс катехоламинов хромаффинными клетками через М- и Н-ХР [17, 18]. Было показано, что в хромаффинных клетках взрослой крысы цАМФ-рекрутированные кальциевые каналы $\alpha 1H$ (Cav3.2) усиливают секреторную активность и оказываются эф-

фактивно связанными с секреторным аппаратом, контролируя быстрый экзоцитоз катехоламинов [19]. Вместе с тем следует отметить, что несмотря на то, что у 19–20-дневных эмбрионов крыс около 50% хромаффинных клеток демонстрируют наличие I_{CaT} , эффективно блокируемого Ni^{2+} , данный ток оказался неспособным индуцировать экзоцитоз катехоламинов, но, по мнению авторов работы, это связано не с недостаточным притоком Ca^{2+} через $Ca_v3.2$, а обусловлено функциональной незрелостью механизма экзоцитоза [20]. Таким образом, нельзя исключить, что колебания уровня нейрогуморальных влияний, наблюдаемых нами у крысят после инъекции эзерина или $NiCl_2$, могут быть вызваны изменением секреторной активности хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников, но окончательные выводы об участии в этом процессе кальциевых каналов Т-типа могут быть сделаны только после проведения дополнительных исследований.

Премедикация холинолитиками

Ранее было показано, что премедикация новорожденных крысят М- или Н-холинолитиками позволяет блокировать развитие патологического сердечного ритма после инъекции эзерина. Наиболее эффективных результатов удалось достичь при использовании Н-холиноблокатора бензогексония и М-холиноблокатора метацина [8, 9]. Премедикация атропином при ингибировании АХЭ оказала менее стабильный защитный эффект. Вместе с тем наши предварительные эксперименты показали, что эффективность применения атропина для премедикации отравления никелем оказалась выше, чем метацина. При выборе препаратов для предотвращения развития ПСРБК, вызванной $NiCl_2$, мы исходили из задачи воздействовать на максимально возможный спектр рецепторов, участие которых в механизмах регуляции сердечного ритма может иметь критическое значение.

Таким образом, следующим этапом нашей работы стало исследование эффекта блокады Н-ХР бензогексонием. Введение препарата в дозе 1 мг/кг должно заблокировать только парасимпатические ганглии. Проведенный анализ показал, что первоначальное повышение мощности всех диапазонов спектра периодограмм, особенно диапазона HF, сменяется преобладанием симпатических влияний. Премедикация холинолитиком не устраняет возникновения ПСРБК при последующем введении крысятам $NiCl_2$. Повышение дозы бензогексония до 20 мг/кг вызывает блокаду как парасимпатических, так и симпатических ганглиев. При этом премедикация бензогексонием в этой дозе, как это было показано нами ранее в экспериментах с последующей инъекцией эзерина [8], препятствует возникновению ПСРБК. Анализ ВСР показал, что основным отличием по сравнению с реакцией на малую дозу препарата является наблюдаемое уже с первых минут после введения никеля снижение роли нейрогуморальных факторов и усиление нервных влияний, преимущественно симпатических (табл. 3; рис. 2с, d, 3с, d). Нарушений синусового ритма сердца не возникает и брадикардические комплексы не наблюдаются.

Как и в случае с инъекцией низкой дозы бензогексония, введение Н-холинолитика центрального действия этерофена сопровождается усилением общей мощности спектра периодограмм и в 2.6 раза более выраженным усилением парасимпатических влияний. Последующее введение $NiCl_2$ приводит к изменениям показателей ВСР, качественно не отличающимся от наблюдаемых после воздействия хлорида никеля без премедикации (табл. 2, 4; рис. 2е, 3е).

Расположение Н-ХР в структурах головного мозга обуславливает их основную модулирующую функцию, приводящую к усилению высвобождения нейротрансмиттеров и влияющую на возбудимость нейронов. Имеющиеся данные свидетель-

Таблица 3. Изменение показателей ВСР у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации бензогексонием

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Бензогексоний	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
Подгруппа 1 (n = 7), доза 1 мг/кг С брадикардическими комплексами					
VLF (y.e.)	29.15 ± 2.94	34.29 ± 4.37	27.37 ± 3.93	34.91 ± 8.03*	28.02 ± 7.28
LF (y.e.)	14.52 ± 1.89	15.46 ± 3.16*	16.12 ± 3.39*	19.76 ± 5.50*	23.38 ± 5.79*
HF (y.e.)	29.37 ± 6.15	41.67 ± 13.55*	21.99 ± 8.29*	32.64 ± 6.08*	41.72 ± 4.94*
To (y.e.)	73.04 ± 10.34	91.42 ± 18.67*	65.47 ± 9.82*	87.30 ± 16.64*	93.13 ± 17.80*
VLF, %	39.9	37.5	41.8	40.0	30.1
LF, %	19.9	16.9	24.6	22.6	25.1
HF, %	40.2	45.6	33.6	37.4	44.8
LF/HF, y.e.	0.494	0.371	0.733	0.605	0.560
ЧСС в мин	307.8 ± 5.7	270.5 ± 12.5*	262.0 ± 9.4*	240.8 ± 7.4*	235.3 ± 2.6*
Подгруппа 2 (n = 6), доза 20 мг/кг Без брадикардических комплексов					
VLF (y.e.)	25.92 ± 2.21	17.97 ± 2.04*	27.05 ± 3.27	30.71 ± 2.02*	21.26 ± 5.04*
LF (y.e.)	22.42 ± 6.54	17.64 ± 4.10*	42.44 ± 6.37*	49.65 ± 8.23*	36.08 ± 5.42*
HF (y.e.)	63.28 ± 23.79	54.18 ± 11.55*	94.92 ± 9.35*	104.24 ± 15.33*	93.65 ± 25.53*
To (y.e.)	111.62 ± 28.47	89.80 ± 14.77*	164.42 ± 7.39*	184.60 ± 19.20*	150.99 ± 34.14*
VLF, %	23.2	20.0	16.5	16.6	14.1
LF, %	20.1	19.7	25.8	26.9	23.9
HF, %	56.7	60.3	57.7	56.5	62.0
LF/HF, y.e.	0.354	0.326	0.447	0.476	0.385
ЧСС в мин	287.3 ± 16.0	206.0 ± 16.2*	208.5 ± 14.6*	203.0 ± 10.2*	199.3 ± 18.6*

ствуют о том, что Н-ХР способны регулировать функции сердечно-сосудистой системы (ССС) через нервную систему и ненейрональные ткани. Показано, что активация Н-ХР ствола мозга у взрослых крыс приводит к изменению спектральных показателей вагосимпатического баланса (к сдвигу коэффициента LF/HF) [21]. Одним из важных звеньев регуляции сердечного ритма является так называемый “центральный контур регуляции” – многоуровневая система, включающая в себя многочисленные звенья от подкорковых центров продолговатого мозга до гипоталамо-гипофизарного уровня вегетативной регуляции и коры головного мозга [10]. Проведенная нами в ходе экспериментов премедикация крысят центральным Н-холинолитиком этерофеном, показавшим свою высокую эффективность при блокаде центральных Н-ХР [22], оказалась неэффективной при отравлении крысят NiCl₂, что может служить основанием для исключения центрального контура регуляции сердечного ритма из основных источников возникновения ПСРБК.

Премедикация атропином вызывает первоначальное снижение мощности спектра VLF-диапазона, которое после инъекции NiCl₂ сменяется усилением, несопоставимым с ростом мощности спектра LF и, несколько меньше, HF диапазонов. Это приводит к значительному уменьшению доли нейрогуморальных влияний и усилению доли нервных влияний с преобладанием симпатических (табл. 5; рис. 2f, 3f).

Таблица 4. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации этерофеном

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Этерофен (n = 7)	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
VLF (у.е.)	32.73 ± 5.18	33.48 ± 2.32	41.47 ± 5.01*	25.84 ± 1.76*	20.63 ± 1.40*
LF (у.е.)	17.96 ± 4.59	40.41 ± 11.38*	14.37 ± 2.26*	10.15 ± 0.70*	6.62 ± 0.91*
HF (у.е.)	45.99 ± 8.20	117.82 ± 21.72*	18.00 ± 3.14*	12.88 ± 1.59*	8.62 ± 1.07*
To (у.е.)	96.68 ± 15.30	191.70 ± 33.20*	73.84 ± 10.26*	48.87 ± 2.70*	35.87 ± 3.03*
VLF, %	33.9	17.5	56.2	52.9	57.5
LF, %	18.6	21.1	19.5	20.8	18.5
HF, %	47.6	61.5	24.4	26.4	24.0
LF/HF, у.е.	0.391	0.343	0.799	0.788	0.768
ЧСС в мин	266.0 ± 12.7	221.7 ± 15.9	210.0 ± 17.3	177.3 ± 12.8*	181.3 ± 14.6*

Таблица 5. Изменение показателей ВСП у 3-дневных крысят после введения NiCl₂ на фоне премедикации атропином

Показатели	Препарат, период исследования				
	Фон	Атропин (n = 8)	NiCl ₂		
			0–10	10–20	20–30
VLF (у.е.)	26.03 ± 5.80	21.13 ± 3.44*	35.64 ± 3.22*	44.55 ± 6.68*	38.46 ± 5.62*
LF (у.е.)	18.01 ± 2.39	27.69 ± 4.64*	65.83 ± 12.41*	78.73 ± 23.46*	62.08 ± 15.83*
HF (у.е.)	60.51 ± 11.87	85.73 ± 17.96*	180.52 ± 33.02*	182.09 ± 54.82*	139.20 ± 30.11*
To (у.е.)	104.55 ± 12.47	134.56 ± 21.31*	281.99 ± 45.11*	305.38 ± 83.18*	239.74 ± 48.69*
VLF, %	24.9	15.7	12.6	14.6	16.0
LF, %	17.2	20.6	23.3	25.8	25.9
HF, %	57.9	63.7	64.0	59.6	58.1
LF/HF, у.е.	0.298	0.323	0.365	0.432	0.446
ЧСС в мин	305.7 ± 16.7	245.3 ± 17.3*	230.7 ± 14.6*	194.0 ± 10.5*	182.8 ± 11.7*

Атропин является неселективным блокатором M-XP и его аффинность к M₂-XP несколько ниже, чем к M₃. В отличие от M₃-XP, активация M₂-XP приводит к снижению уровня цАМФ и внутриклеточного Ca²⁺. Соответственно результирующий эффект блокады M-XP атропином будет зависеть от целого ряда факторов, включая плотность каждого из подтипов M-XP в предсердиях и желудочках [23].

Мы установили, что премедикация ганглиоблокатором бензогексонием купировала развитие аритмии при условии блокады не только парасимпатических ганглиев, но и преганглионарных окончаний симпатических ганглиев. Вместе с тем сравнение динамики показателей ВСП, наблюдаемой после введения крысятам высокой дозы бензогексония и после инъекции атропина, свидетельствует о наличии качественных различий в характере развивающихся изменений. Это может быть связано с различиями в локализации блокируемых холинорецепторов. Как было показано П.П. Денисенко [24], бензогексоний, в отличие от атропина, блокирует

Н-ХР надпочечников, что приводит к снижению выброса адреналина хромаффинными клетками. В экспериментах, выполненных на изолированном перфузируемом надпочечнике крысы, также было установлено, что блокада Н-ХР бензогексоном ингибирует вызванное трансмуральной электрической стимуляцией увеличение выработки адреналина и норадреналина, в то время как блокада М-ХР атропином практически не угнетает секреции катехоламинов. Эти результаты показывают, что секреция катехоламинов, вызванная выбросом эндогенного АХ, преимущественно опосредована никотиновыми рецепторами [25].

В свете развития дальнейших исследований, требуется отметить еще один момент. Известно, что Ni^{2+} может блокировать не только кальциевые каналы Т-типа, но и натрий-кальциевый обменник (Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX). Для блокады NCX необходима концентрация никеля, более, чем в 10 раз выше, чем в случае с T-VDCC [26–28]. Используемая в нашей работе доза хлорида никеля 109 мг/кг соответствует максимальному расчетному значению концентрации $NiCl_2$ в цельной крови 5.1 мМ (~2.3 мМ в пересчете на плазму крови), что достаточно для ингибирования Cav3.2, но, вероятно, мало для блокады NCX. Однако, учитывая, что в экспериментах *ex vivo*, выполненных на препаратах ткани предсердий мышей с нокаутом по NCX, было обнаружено наличие периодических всплесков Ca^{2+} -переходов, сопровождавшихся ростом диастолического Ca^{2+} и перемежающихся длительными паузами [29], вопрос об участии NCX в патогенезе ПСРБК остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые проведен анализ показателей ВСР в условиях интоксикации новорожденных крысят $NiCl_2$. Установлено, что инъекции крысятам эзерина или $NiCl_2$ вызывают возникновение ПСРБК и развиваются по сходной схеме. В обоих случаях наблюдается падение общей мощности спектра и абсолютных значений мощности диапазонов LF (преимущественно симпатические) и HF (парасимпатические влияния). Значительное падение уровня нервных влияний приводит к тому, что доминирующую роль в регуляции сердечного ритма начинают играть нейрогуморальные факторы (VLF-диапазон). Если после премедикации Н- или М-холинолитиками мощность спектра VLF-диапазона снижается, то развития ПСРБК у крысят не происходит. Если же мощность спектра VLF-диапазона увеличивается, то в дальнейшем происходит снижение доли нервных влияний, особенно парасимпатических, и у крысят возникает ПСРБК (рис. 2, 3). Усиление влияния нейрогуморальных факторов, в частности циркулирующего в крови адреналина, может играть роль триггера, повышающего чувствительность T-VDCC и приводящего в итоге к нарушениям кальциевого тока, что в свою очередь вызывает нарушение работы пейсмекеров и развитие патологического сердечного ритма. Нельзя исключить, что наблюдаемое у интактных плодов и новорожденных крыс возникновение нерегулярных брадикардических колебаний сердечного ритма также может быть связано с периодическим изменением уровня нейрогуморальных влияний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской ака-

демии наук (Протокол № 7-2/2020), основанным на директиве Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00967-23-00.

ВКЛАД АВТОРОВ.

С.В.К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, написание статьи. Н.Н.К. осуществляла подготовку и проведение экспериментов, а также обработку данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Timopheeva OP, Vdovichenko ND, Kuznetsov SV* (2012) Dynamics of the formation of rhythmic activity of the heart in fetuses and newborn rats. *Bull Exp Biol Med* 152 (4): 397–401. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1537-7>
2. *Sizonov VA, Dmitrieva LE* (2018) Heart Rhythm Disturbances Caused by Injection of Cholinesterase Inhibitor Physostigmine to Rats during the Early Ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 165(1): 44–47. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4095-9>
3. *Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM* (2005) Change of parameters of functioning of the cardiovascular and respiratory systems in rats of different ages under effects of low doses of the cholinesterase inhibitor phosphacol. *J Evol Biochem Physiol* 41(2): 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055x>
4. *Kuznetsov SV, Kuznetsova NN* (2022) Effects of Ni²⁺ on Heart and Respiratory Rhythms in Newborn Rats. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1367–1380. <https://doi.org/10.1134/S0022093022050088>
5. *Chuang HC, Hsueh TW, Chang CC, Hwang JS, Chuang KJ, Yan YH, Cheng TJ* (2013) Nickel-regulated heart rate variability: the roles of oxidative stress and inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 266(2): 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.006>
6. *Hu J, Fan H, Li Y, Li H, Tang M, Wen J, Huang C, Wang C, Gao Y, Kan H, Lin J, Chen R* (2020) Fine particulate matter constituents and heart rate variability: A panel study in Shanghai, China. *Sci Total Environ* 747: 141199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141199>
7. *Liberda EN, Zuk AM, Tsuji LJS* (2021) Heart rate variation and human body burdens of environmental mixtures in the Cree First Nation communities of Eeyou Istchee, Canada. *Environ Int* 146: 106220. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106220>
8. *Sizonov VA, Dmitrieva LE, Kuznetsov SV* (2019) The Effect of M-Cholinoreceptor Blockade on Functional Activity of Somatomotor, Cardiovascular and Respiratory Systems in Newborn Rats upon Activation of Cholinoreactive Structures. *J Evol Biochem Physiol* 55(3): 198–207. <https://doi.org/10.1134/S0022093019030050>
9. *Sizonov VA, Dmitrieva LE* (2019) Changes in Activities of Somatovisceral Systems in Newborn Rats under Conditions of Nicotinic Cholinoreceptor Blockage and Activation of Cholinoreactive Structures. *Bull Exp Biol Med* 167(2): 220–226. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04495-z>
10. *Baevsky RM, Chernikova AG* (2017) Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods. *Cardiometry* 10: 66–76. <https://doi.org/10.12710/CARDIOMETRY.2017.10.6676>
11. *Robinson RB* (1996) Autonomic receptor – effector coupling during post-natal development. *Cardiovasc Res* 31 (Issue suppl 1): E68–E76. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00151-4)
12. *Zefirov TL, Gibina AE, Salman MAH, Ziyatdinova NI, Zefirov AL* (2007) M₃ cholinergic receptors are involved in postnatal development of cholinergic regulation of cardiac activity in rats.

- Bull Exp Biol Med 144(8): 171–173.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0281-x>
13. *Ziyatdinova NI, Sergeeva AM, Dementieva RE, Zefirov TL* (2012) Peculiar Effects of Muscarinic M₁, M₂, and M₃ Receptor Blockers on Cardiac Chronotropic Function in Neonatal Rats. Bull Exp Biol Med 154(1): 1–2.
<https://doi.org/10.1007/s10517-012-1859-5>
 14. *Tapilina SV, Abramochkin DV* (2016) Decrease in the Sensitivity of Myocardium to M3 Muscarinic Receptor Stimulation during Postnatal Ontogenesis. Acta Naturae 8(2): 127–131.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-127-131>
 15. *Wang Y, Morishima M, Ono K* (2022) Protein Kinase C Regulates Expression and Function of the Cav3.2 T-Type Ca²⁺ Channel during Maturation of Neonatal Rat Cardiomyocyte. Membranes (Basel) 12(7): 686.
<https://doi.org/10.3390/membranes12070686>
 16. *Alvarez C, Bladé C, Cartañà J* (1993) α 2-adrenergic blockade prevents hyperglycemia and hepatic glutathione depletion in nickel-injected rats. Toxicol Appl Pharmacol 121(1): 112–117.
<https://doi.org/10.1006/taap.1993.1135>
 17. *De Diego AM, Gandía L, García AG* (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. Acta Physiol (Oxf) 192(2): 287–301.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01807.x>
 18. *Criado M* (2018) Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. Pflugers Arch – Eur J Physiol 470: 13–20.
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-2050-7>
 19. *Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V* (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited Cav3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. Biophys J 90(5): 1830–1841.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071647>
 20. *Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T* (2001) Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. J Physiol 537(1): 35–44.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0035k.x>
 21. *Sallam MY, El-Gowilly SM, Fouda MA, Abd-Alhaseeb MM, El-Mas MM* (2019) Brainstem cholinergic pathways diminish cardiovascular and neuroinflammatory actions of endotoxemia in rats: Role of NF κ B/ α 7/ α 4 β 2AChRs signaling. Neuropharmacology 157: 107683.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107683>
 22. *Лосев НА, Сапронов НС, Хныченко ЛК, Шабанов ПД* (2015) Фармакология новых холинэргических средств (фармакология – клинике). СПб. Арт-Экспресс. [Losev NA, Sapronov NS, Khnychenko LK, Shabanov PD (2015) Pharmacology of new cholinergic agents (pharmacology to the clinic). SPb. Art-Express. (In Russ)].
 23. *Wang Z, Shi H, Wang H* (2004) Functional M₃ muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. Br J Pharmacol 142(3): 395–408.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705787>
 24. *Денисенко ПП* (1959) Ганглиолитики. Л. Медгиз. [Denisenko PP (1959) Gangliolitiki. L. Medgiz. (In Russ)].
 25. *Nagayama T, Matsumoto T, Kuwakubo F, Fukushima Y, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T, Satoh S* (1999) Role of calcium channels in catecholamine secretion in the rat adrenal gland. J Physiol 520(2): 503–512.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00503.x>
 26. *Kimura J, Miyamae S, Noma A* (1987) Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. J Physiol 384: 199–222.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016450>
 27. *Reppel M, Fleischmann BK, Reuter H, Pillekamp F, Schunkert H, Hescheler J* (2007) Regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange current in the normal and failing heart. Ann N Y Acad Sci 1099: 361–372.
<https://doi.org/10.1196/annals.1387.065>
 28. *Cheng H, Smith GL, Hancox JC, Orchard CH* (2011) Inhibition of spontaneous activity of rabbit atrioventricular node cells by KB-R7943 and inhibitors of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. Cell Calcium 49(1): 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.008>
 29. *Torrente AG, Zhang R, Zaini A, Giani JF, Kang J, Lamp ST, Philipson KD, Goldhaber JI* (2015) Burst pacemaker activity of the sinoatrial node in sodium-calcium exchanger knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 112(31): 9769–9774.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505670112>

Comparative Analysis of Disorders of Heart Rhythm Regulation Mechanisms Induced in Newborn Rats by Nickel Chloride and the Acetylcholinesterase Inhibitor Physostigmine (Eserine)

S. V. Kuznetsov^{a,*} and N. N. Kuznetsova^a

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

**e-mail: ksv@iephb.ru*

A comparative analysis of heart rate variability (HRV) indices after injection of the acetylcholinesterase inhibitor (AChE) physostigmine ($\frac{3}{4}$ LD₅₀) and the T-type calcium channel blocker (T-VDCC) Ni²⁺ (ED₁₀₀) into animals was performed in experiments on 3-day-old newborn rats. Both drugs cause phenomenologically similar pathological heart rhythm with significant bradycardia complexes (PHRBC). Analysis of HRV indices showed that the disturbance of heart rhythm regulation mechanisms in NiCl₂ poisoning of rats and in cholinoreactive structure activation caused by AChE inhibition develop according to a similar pattern. In both cases there is a decrease in the total power of the spectrum and the absolute power values of the LF (predominantly sympathetic) and HF (parasympathetic influences) bands. Significant decrease in the level of nerve influences leads to the fact that the dominant role in the regulation of heart rhythm begins to play neurohumoral factors (VLF-band). It was found that under conditions of premedication with H- or M-cholinolytics, when rats do not develop cardiac rhythm disturbances, the initial decrease in the severity of neurohumoral and subsequent increase in sympathetic and, to a lesser extent, parasympathetic influences is common. In this case, vagosympathetic balance is not decisive. In case the influence of neurohumoral factors increases after premedication, then later there is a decrease in the proportion of nerve influences and the occurrence of PHRBC. The obtained data suggest that in newborn rats both direct blockade of T-VDCC and changes in I_{CaT} current mediated through M₃-subtype muscarinic cholinoreceptors lead to disruption of pacing and development of PHRBC.

Keywords: newborn rats, dysrhythmia, heart rate variability, calcium channels, nickel chloride, cholinergic system, physostigmine (eserine), cholinolytics

УСТОЙЧИВОСТЬ ПРЕДСЕРДНОГО МИОКАРДА КУРИНОГО ЭМБРИОНА К ИНГИБИРОВАНИЮ HCN-КАНАЛОВ И КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ “Ca²⁺-ЧАСОВ”

© 2023 г. Е. А. Лебедева¹, *, М. А. Гонотков¹

¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*E-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru

Поступила в редакцию 22.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

В настоящее время клеточные основы автоматизма сердца эмбрионов, в частности вклад различных ионных механизмов, до конца не ясны и активно изучаются. С помощью микроэлектродной техники мы исследовали фармакологическую чувствительность клеток водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона (HH36) к ивабрадину (ингибитор HCN-каналов, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f), рианодину (агоноист рианодиновых рецепторов) и SN6 (ингибитор Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма). Установлено, что у клеток правого предсердия, обладающих фазой медленной диастолической деполяризации, экспозиция ивабрадина (3 мкМ) не вызвала достоверных изменений электрофизиологических параметров потенциалов действия. Рианодин (1 мкМ) и SN6 (10 мкМ) при добавлении в перфузирующий раствор вызывали сходные эффекты – повышение частоты генерации потенциалов действия в среднем на 15%. При этом не зарегистрировано нарушения автоматизма или прекращения спонтанной активности. Полученные результаты позволяют заключить, что HCN4-каналы, рианодиновые рецепторы и Na⁺/Ca²⁺-обменный механизм на данном этапе эмбрионального развития не являются определяющими для поддержания автоматизма клеток правого предсердия у куриного эмбриона. Вероятно, ионные токи, протекающие через эти каналы и играющие важную роль в электрофизиологии у взрослых животных, в эмбриональном миокарде выполняют модулирующую функцию.

Ключевые слова: куриный эмбрион, HCN-каналы, рианодиновые рецепторы, Na⁺/Ca²⁺-обменный механизм, автоматизм, ивабрадин, рианодин

DOI: 10.31857/S0869813923080071, EDN: WAXHUW

ВВЕДЕНИЕ

Сердце является первым органом, формирующимся во время эмбриогенеза. Его функционирование имеет решающее значение для развития и выживания эмбриона. Несмотря на недавние достижения в медицине, генетике и физиологии механизмы формирования спонтанных импульсов, роль отдельных ионных токов в инициации автоматизма, а также возникновения дисфункции развивающегося сердца в настоящее время до конца не ясны [1].

Поскольку большая часть эмбриональных кардиомиоцитов обладает автоматизмом и способна генерировать электрические импульсы, то представления о роли

ионных токов в эмбриональном миокарде сложились на основе работ, выполненных на кардиомиоцитах желудочков куриных [2–4] и мышинных [5] эмбрионов или стволовых клеток различного происхождения [6–8]. Однако ведущая область сокращений эмбрионального сердца формируется в зоне венозного синуса и будущего предсердия [9, 10], и уже на стадии трубчатого сердца примитивные предсердие и желудочек демонстрируют разную морфологию потенциалов действия [9, 11]. Это позволяет предположить, что и механизмы, инициирующие электрические импульсы, могут иметь различия в зависимости от зоны эмбрионального миокарда. Очевидно, что знание функционирования клеток желудочков эмбриональных сердец или эмбриональных стволовых клеток недостаточно для понимания механизмов автоматизма клеток водителя ритма эмбрионального миокарда [9].

У взрослых животных спонтанное сокращение миоцитов возникает в области синусно-предсердного узла и инициируется сложной связанной системой клеточных “часов”. Первая подсистема, называемая “мембранными часами”, включает сарколеммальные ионные каналы, в частности HCN-каналы, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f). Вторая подсистема, называемая “Ca²⁺-часами”, относится к механизмам, ответственным за регуляцию внутриклеточной концентрации Ca²⁺: высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы активирует направленный внутрь ток Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма (I_{NCX}), который способствует медленной диастолической деполяризации [12–14].

Наиболее перспективным в настоящее время является рассмотрение становления этих двух механизмов в период эмбриогенеза, поскольку позволит не только понять процессы генерации и регуляции автоматизма, но и расшифровать клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе врожденных сердечных патологий, что будет содействовать разработке способов направленного фармакологического регулирования активности клеток [10].

Поэтому целью нашей работы стало с использованием микроэлектродной техники и специфических фармакологических веществ оценить функциональный вклад HCN-каналов, по которым протекает ток I_f , рианодиновых рецепторов и Na⁺/Ca²⁺-обменного механизма в генерацию электрических импульсов миокарда куриного эмбриона. В отличие от предыдущих работ, наше исследование проведено на спонтанно сокращающихся препаратах правого предсердия куриного эмбриона в условиях, когда сохраняется электрическое взаимодействие между клетками, и в зоне, где возникает электрическая активность сердца.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оплодотворенные яйца породы кросс КОББ-500 (*Gallus gallus*), полученных с АО “Птицефабрика Зеленецкая”, помещали в инкубатор с регулируемой температурой (38.5°C) и влажностью (55%). В экспериментах использовали эмбрионов в возрасте 10 ± 1 сут (примерно на стадии HH36 по классификации Hamburger и Hamilton [15]). На этой стадии сердце уже имеет четыре камеры, заканчивается формирование синусно-предсердного узла, но при этом влияние нервной системы незначительно.

После извлечения эмбриона, производили декапитацию и вырезали сердце, которое помещали в нормальный солевой раствор следующего состава (мМ): 140 NaCl; 10 NaHCO₃; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 1 MgSO₄; 0.33 Na₂HPO₄, 10 глюкоза; 5 HEPES (pH 7.4). Затем отрезали желудочки и левое предсердие, правое предсердие вскрывали и расправляли таким образом, чтобы был доступ к области клапанов каудальной полый вены – места формирования электрических импульсов. Спонтанно со-

кращающийся препарат помещали в проточную, аэрируемую, термостатируемую камеру (31°C). Потенциалы действия регистрировали с помощью стандартного микроэлектродного метода регистрации биоэлектрических потенциалов.

Для фармакологического анализа использовали ивабрадин (блокатор HCN-каналов, 3 мкМ), рианодин (агонист рианоудиновых рецепторов, 1 мкМ) и SN6 (блокатор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма, 10 мкМ). Все компоненты изготовлены фирмой Sigma-Aldrich (США).

Для анализа зарегистрированных потенциалов действия использовали программу PowerGraph Professional версия 3.3 (DIsoft, РФ), а также оригинальные программы вычисления параметров потенциалов действия в программной среде Delphi, разработанной старшим научным сотрудником Института физиологии Коми НЦ УрО РАН д.б.н. Артеевой Н.В. Значимость различий параметров потенциала действия определяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок и U -критерия Манна–Уитни для несвязанных ($p < 0.05$). Результаты представлены в виде средней арифметической \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольном растворе в правом предсердии в области клапана каудальной полой вены со стороны субэндокарда зарегистрированы потенциалы действия (ПД), по своей конфигурации схожие с ПД клеток рабочего миокарда предсердия, однако обладающие фазой медленной диастолической деполяризации (фаза 4, пейсмейкерный потенциал). Частота генерации ПД этих клеток в среднем составила 168 ± 29 имп./мин, а скорость фазы быстрой деполяризации (dV/dt_{\max}) и скорость фазы медленной диастолической деполяризации (V_4) – 102 ± 35 В/с и 39 ± 14 мВ/с соответственно ($n = 22$).

С помощью специфических блокаторов ионных каналов у данного типа клеток был оценен вклад HCN-каналов, рианоудиновых рецепторов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в формировании автоматизма.

Эффекты ивабрадина на генерацию ПД у куриных эмбрионов

Ивабрадин представляет собой селективный блокатор семейства HCN-каналов, по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f , “funny” ток). Добавление в перфузирующий раствор ивабрадина (3 мкМ, $n = 9$) не вызывало достоверных изменений в конфигурации электрофизиологических параметров ПД у клеток правого предсердия куриного эмбриона (рис. 1а, табл. 1).

Эффекты рианодина на генерацию ПД у куриных эмбрионов

Экспозиция рианодина в концентрации 1 мкМ ($n = 7$) приводила к укорочению фазы медленной диастолической деполяризации. В результате частота генерации ПД увеличивалась на $15 \pm 8\%$ (рис. 1б, табл. 1). Нарушения ритмической активности, появление пауз или прекращения генерации ПД при действии рианодина не зарегистрировано даже при продолжительной экспозиции (60 мин).

Эффекты SN6 на генерацию ПД у куриных эмбрионов

В серии экспериментов с SN6 (10 мкМ, $n = 11$) установлено, что пять препаратов правого предсердия куриного эмбриона из одиннадцати оказались к нему не чувствительны – добавление в перфузирующий раствор блокатора не приводило к изменениям конфигурации ПД. У оставшихся шести препаратов экспозиция SN6 вызывала повышение частоты генерации ПД на $15 \pm 9\%$ за счет укорочения дли-

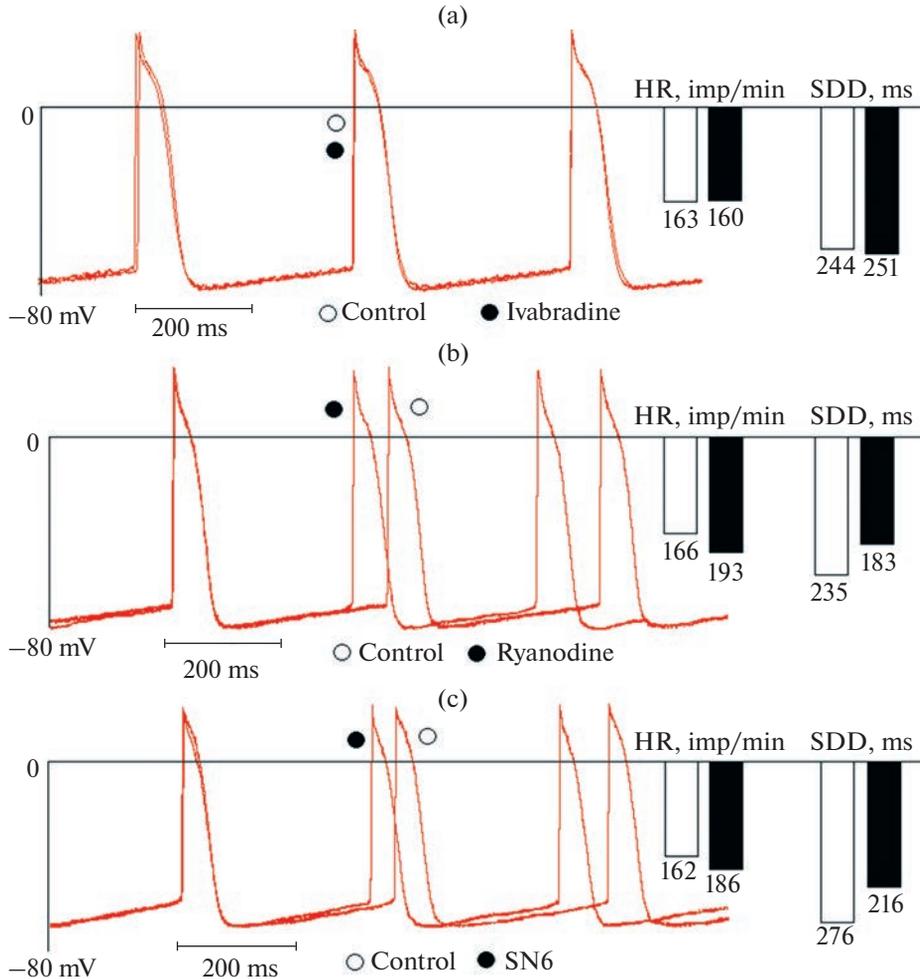


Рис. 1. Конфигурация потенциалов действия клеток правого предсердия куриного эмбриона в контроле и при действии различных ингибиторов. (а) – эффекты ивабрадина (3 мкМ), ингибитора HCN-каналов; (б) – эффекты рианодина (1 мкМ), агониста RyR-каналов; (с) – эффекты SN6 (10 мкМ), ингибитора $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. HR – частота генерации ПД, имп./мин; SDD – длительность медленной диастолической деполяризации, мс.

тельности фазы медленной диастолической деполяризации на $18 \pm 9\%$ по сравнению с контролем (рис. 1с, табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время все больше работ демонстрируют, что механизм спонтанной деполяризации клеток водителя ритма сердца обусловлен взаимодействием мембранных и кальциевых часов. При этом предполагается, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм играет основную роль в сопряжении внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} и деполяризацией мембраны [12–14]. Однако каким образом эти механизмы возникают и взаимодействуют в эмбриональном сердце, остается неясным.

Таблица 1. Электрофизиологические параметры ПД в контроле и при действии блокаторов ионных каналов у клеток, работающих в режиме водителя ритма правого предсердия куриного эмбриона

Параметры ПД	Контроль <i>n</i> = 9	Ивабрадин, 3 мкМ <i>n</i> = 9	Контроль <i>n</i> = 7	Рианодин, 1 мкМ <i>n</i> = 7	Контроль <i>n</i> = 6	SN6, 10 мкМ <i>n</i> = 6
E_{\max}	-81 ± 7	-79 ± 7	-74 ± 7	-77 ± 5	-80 ± 7	-78 ± 5
АПД	104 ± 13	103 ± 7	95 ± 9	99 ± 12	104 ± 11	103 ± 7
ДПД ₂₀	34 ± 7	42 ± 10	32 ± 9	30 ± 13	43 ± 13	37 ± 16
ДПД ₉₀	80 ± 10	84 ± 11	75 ± 9	72 ± 13	88 ± 15	81 ± 18
ЧСС	168 ± 10	166 ± 17	174 ± 19	$200 \pm 16^*$	146 ± 17	$168 \pm 15^*$
МДД	251 ± 27	252 ± 42	247 ± 31	$205 \pm 31^*$	303 ± 38	$251 \pm 26^*$
dV/dt_{\max}	108 ± 32	103 ± 33	86 ± 32	83 ± 36	101 ± 44	86 ± 43
V_4	40 ± 17	44 ± 18	55 ± 13	68 ± 19	36 ± 4	$47 \pm 12^*$

E_{\max} – максимальный диастолический потенциал, мВ; АПД – амплитуда ПД, мВ; ДПД₂₀ и ДПД₉₀ – длительность потенциала действия на уровне 20 и 90% реполяризации, мс; ЧСС – частота генерации ПД, имп./мин; МДД – длительность медленной диастолической деполаризации, мс; dV/dt_{\max} – скорость фазы быстрой деполаризации, В/с; V_4 – скорость фазы медленной диастолической деполаризации, мВ/с; *n* – количество препаратов; * – $p < 0.05$ достоверность различий по сравнению с контролем.

С помощью фармакологического анализа мы провели оценку вклада HCN-каналов, рианодиновых рецепторов и Na^+/Ca^{2+} -обменного механизма в генерацию электрических импульсов эмбрионального миокарда куриного эмбриона.

Роль HCN-каналов в генерации электрических импульсов

Семейство HCN-каналов (HCN1–4), по которым протекает ток, активируемый гиперполяризацией (I_f , “funny” ток), является одним из важных механизмов генерации импульсов у взрослых животных [13]. Установлено, что у куриных эмбрионов каналы HCN4 экспрессируются уже на стадии сердечной трубки по всему миокарду, но по мере формирования сердца их экспрессия постепенно ограничивается проводящей системой [16]. В то же время установлено, что диапазон активации I_f в препаратах предсердия куриных эмбрионов составляет от -120 до -90 мВ, что ниже физиологического диапазона мембранных потенциалов этих клеток, и добавление I_f в модель электрической активности не влияло на частоту генерации ПД [2, 3].

С помощью ивабрадина мы проанализировали функциональный вклад HCN4-каналов в генерацию электрической активности клеток правого предсердия куриного эмбриона. Несмотря на то, что зарегистрированные ПД обладали пейсмекерным потенциалом, ивабрадин не оказывал достоверного эффекта на электрофизиологические параметры ПД.

Полученные нами данные и анализ литературы позволяют предположить, что HCN-каналы, по-видимому, играют важную роль в качестве факторов морфогенетического контроля во время кардиогенеза [16, 17], но их вклад в автоматизм пейсмекерных клеток эмбрионального миокарда незначителен.

Роль рианодиновых рецепторов в генерации электрических импульсов

Спонтанное высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, также известное как “ Ca^{2+} -часы”, было предложено в качестве еще одного механизма генерации синусового ритма [12].

Известно, что у взрослых животных рианодин в концентрации 0.3–3 мкМ, в которой он является агонистом рианодиновых рецепторов, на первых минутах вызы-

вает небольшое увеличение частоты сердечных сокращений. Предполагается, что рианодин увеличивает выброс Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула, что приводит к усилению работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. Однако дальнейшая экспозиция рианодина приводит к постепенному замедлению сердечного ритма на 14–30% [18–20].

В наших экспериментах при добавлении рианодина (1 мкМ) в перфузирующий раствор на первой минуте экспозиции мы наблюдали повышение частоты генерации ПД в среднем на 15%, которое сохранялась в течение всей экспозиции (до 60 мин). Нами не было зафиксировано замедление частоты спонтанных сокращений. Истощение запасов саркоплазматического ретикулула, вызванное открытием рианодиновых рецепторов, не приводило к замедлению электрических импульсов в эмбриональном миокарде курицы, которое было получено ранее у взрослых животных [20].

Роль $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерации электрических импульсов

Считается, что высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула через рианодиновые рецепторы (RyR), способствует поздней части диастолической деполаризации, активируя $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм (I_{NCX}) [14]. Однако оценка потенциальной роли $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерировании электрических импульсов клеток водителя ритма сердца затруднена из-за отсутствия селективных и высокоэффективных блокаторов [21]. В настоящее время наиболее селективными ингибиторами $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма считаются некоторые производные бензилоксифенила (KB-R7943, SEA0400, SN6 и YM-244769) [21, 22]. У взрослых животных ингибирование $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма приводит к снижению частоты спонтанных сокращений и нарушениям функции клеток водителя ритма [14, 21, 23].

Для изучения вклада $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма в генерацию электрической активности эмбрионального миокарда мы использовали SN6 (10 мкМ). Анализ полученных данных показал, что добавление SN6 в перфузирующий раствор приводило к укорочению фазы 4, что в результате повышало частоту генерации ПД на 15%. Несмотря на то, что есть данные о том, что SN6 может частично ингибировать K^+ - и Ca^{2+} -токи [22], мы не наблюдали достоверных изменений в других параметрах ПД (рис. 1с, табл. 1). Это позволяет предположить, что достоверные эффекты SN6, полученными нами на эмбриональном миокарде курицы, связаны преимущественно с ингибированием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма. Даже при длительной экспозиции нами не было зарегистрировано снижение частоты генерации ПД, появление аритмий или прекращение генерации электрических импульсов, которые получены для сердца взрослых животных [14, 21, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами фармакологический анализ показал, что повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , вызванное ингибированием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменного механизма или открытием рианодиновых рецепторов, приводит не к замедлению спонтанной активности, а к ее ускорению. Это позволяет заключить, что несмотря на наличие экспрессии каналов RyR и NCX1 в эмбриональном сердце курицы [4, 24, 25], их функциональный вклад в электрические процессы незначителен. Вероятно, на данном этапе эмбриогенеза еще нет тесной связи между механизмами мембранных часов и Ca^{2+} -часов и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм не играет важной роли.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что HCN4-каналы, рианодиновые рецепторы и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменный механизм на данном этапе эмбрионального развития не являются определяющими для поддержания автоматизма клеток правого предсердия у куриного эмбриона. Вероятно, ионные токи, протекающие через эти каналы и играющие важную роль в электрофизиологии у взрослых животных, в эмбриональном миокарде несут модулирующую функцию.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальный протокол соответствовал международным правилам “Для использования лабораторных животных” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8-е издание, опубликованное National Academies Press (US) 2011 г.) и был одобрен независимым комитетом по биоэтике Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (заключение от 25.12.2017 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ:

Работа выполнена в рамках общей темы Программы фундаментальных исследований Российской академии наук лаборатории физиологии сердца ИФ Коми НЦ УрО РАН (№ 0415-2019-0006).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка идеи и дизайна исследования, планирование экспериментов (Е.А.Л., М.А.Г.), проведение экспериментальной работы и обработка полученных результатов (Е.А.Л., М.А.Г.), написание и редактирование текста статьи (Е.А.Л., М.А.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sedmera D, Kockova R, Vostarek F, Raddatz E* (2015) Arrhythmias in the developing heart. *Acta Physiol (Oxf)* 213 (2):303–320.
<https://doi.org/10.1111/apha.12418>
2. *Brochu RM, Clay JR, Shrier A* (1992) Pacemaker current in single cells and in aggregates of cells-dissociated from the embryonic chick heart. *J Physiol* 454: 503–515.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019276>
3. *Krogh-Madsen T, Schaffer P, Skriver AD, Taylor LK, Pelzmann B, Koidl B, Guevara MR* (2005) An ionic model for rhythmic activity in small clusters of embryonic chick ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): 398–413.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00683.2004>
4. *Shepherd N, Graham V, Trevedi B, Creazzo TL* (2007) Changes in regulation of sodium/calcium exchanger of avian ventricular heart cells during embryonic development. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5): 1942–1950.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00564.2006>
5. *Wang P, Tang M, Gao L, Luo H, Wang G, Ma X, Duan Y* (2013) Roles of I(f) and intracellular Ca^{2+} release in spontaneous activity of ventricular cardiomyocytes during murine embryonic development. *J Cell Biochem* 114 (8): 1852–1862.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24527>
6. *Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K* (1997) Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2): 149–162.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00193-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00193-4)
7. *Sartiani L, Bettiol E, Stilitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME* (2007) Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 25(5): 1136–1144.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0466>

8. *Barbuti A, Crespi A, Capilupo D, Mazzocchi N, Baruscotti M, DiFrancesco D* (2009) Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells. *J Mol Cell Cardiol* 46(3): 343–351.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.001>
9. *Ophof T* (2007) Embryological development of pacemaker hierarchy and membrane currents related to the function of the adult sinus node: implications for autonomic modulation of biopacemakers. *Med Biol Eng Comput* 45(2): 119–132.
<https://doi.org/10.1007/s11517-006-0138-x>.
10. *Goenezen S, Rennie MY, Rugonyi S* (2012) Biomechanics of early cardiac development. *Biomech Model Mechanobiol* 11(8): 1187–1204.
<https://doi.org/10.1007/s10237-012-0414-7>
11. *Polo-Parada L, Zhang X, Modgi A* (2009) Cardiac cushions modulate action potential phenotype during heart development [corrected]. *Dev Dyn* 238(3): 611–623.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21879>
12. *Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM* (2010) A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circul Res* 106(4): 659–673.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206078>
13. *DiFrancesco D, Noble D* (2012) The funny current has a major pacemaking role in the sinus node. *Heart Rhythm* 9(2): 299–301.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.09.021>
14. *Morotti S, Ni H, Peters CH, Rickert C, Asgari-Targhi A, Sato D, Glukhov AV, Proenza C, Grandi E* (2021) Intracellular Na⁺ Modulates Pacemaking Activity in Murine Sinoatrial Node Myocytes: An in Silico Analysis. *Int J Mol Sci* 22(11): 5645.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115645>
15. *Hamburger V, Hamilton HL* (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88(1): 49–92.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1050880104>
16. *Vicente-Steljn R, Passier R, Wisse LJ, Schalij MJ, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Jongbloed MRM* (2011) Funny current channel HCN4 delineates the developing cardiac conduction system in chicken heart. *Heart Rhythm* 8(8): 1254–1263.
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.03.043>
17. *Pitcairn E, Harris H, Epiney J, Pai VP, Lemire JM, Ye B, Shi NQ, Levin M, McLaughlin KA* (2017) Coordinating heart morphogenesis: A novel role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels during cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Commun Integr Biol* 10(3): e1309488.
<https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1309488>
18. *Joung B, Tang L, Maruyama M, Han S, Chen Z, Stucky M, Jones LR, Fishbein MC, Weiss JN, Chen P-S, Lin S-F* (2009) Intracellular calcium dynamics and acceleration of sinus rhythm by beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 119(6): 788–796.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817379>
19. *Gao Z, Chen B, Joiner M-LA, Wu Y, Guan X, Koval OM, Chaudhary AK, Cunha SR, Mohler PJ, Martins JB, Song L-S, Anderson ME* (2010) I(f) and SR Ca(2+) release both contribute to pacemaker activity in canine sinoatrial node cells. *J Mol Cell Cardiol* 49 (1): 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.03.019>
20. *Rigg L, Terrar DA* (1996) Possible role of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in pacemaking in guinea-pig sino-atrial node. *Exp Physiol* 81(5): 877–880.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003983>
21. *Tóth A, Kiss L, Varró A, Nánási PP* (2009) Potential therapeutic effects of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases. *Curr Med Chem* 16(25): 3294–3321.
<https://doi.org/10.2174/092986709788803268>
22. *Niu C-F, Yasuhide W, Ono K, Iwamoto T, Yamashita K, Satoh H, Urushida T, Hayashi H, Kimura J* (2007) Characterization of SN-6, a novel Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor in guinea pig cardiac ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 573(1–3): 161–169.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.033>
23. *Sanders L, Rakovic S, Lowe M, Mattick PAD, Terrar DA* (2006) Fundamental importance of Na⁺-Ca²⁺ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. *J Physiol* 571(3): 639–649.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.100305>
24. *Linask KK, Han MD, Artman M, Ludwig CA* (2001) Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. *Dev Dyn* 221(3): 249–264.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.1131>
25. *Dutro SM, Airey JA, Beck CF, Sutko JL, Trumble WR* (1993) Ryanodine receptor expression in embryonic avian cardiac muscle. *Dev Biol* 155(2): 431–441.
<https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1041>

Resistance of Embryonic Chick Atria to Inhibition of HCN-Channels and Components of the “Ca²⁺-Clock”

E. A. Lebedeva^{a, *} and M. A. Gonotkov^a

^a*Institute of Physiology Komi Science Center, Ural Branch Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

**e-mail: lebedeva.physiol.komisc@ya.ru*

Despite its medical importance, the cellular mechanisms activity and the contribution of various ion channels of embryonic heart automatism are not yet fully understood. In this study we investigated the effects of specific ion-channel inhibitors on the generation of action potentials in pacemaker cells of the right atrium in chicken embryos (HH36). We used microelectrode technique and evaluated the sensitivity of pacemaker cells to ivabradine (inhibitor of HCN-channels, through which the hyperpolarization-activated current, I_p), ryanodine (agonist of ryanodine receptors) and SN6 (inhibitor of Na⁺/Ca²⁺-exchange). It was found that the right atrium cells have a phase of slow diastolic depolarization. However, these cells were not sensitive to ivabradine (3 μM). We did not register significant changes in the electrophysiological parameters of action potentials. When ryanodine (1 μM) and SN6 (10 μM) were added to the perfusion solution, we observed similar effects: spontaneous rate the generation of action potential increased by 15%. Disturbance of rhythmic activity or disruption of the generation of electrical impulses were not observed in right atrial samples of chicken embryos. The obtained results allow us to conclude that, at this of embryonic development stage, HCN4-channels, ryanodine receptors, and the Na⁺/Ca²⁺-exchange are not decisive for maintaining the automatism of the right atrial cells in the chick embryo. We assume that the ion currents flowing through these channels are important in electrophysiology in adult animals, but they have a modulating function in the embryonic myocardium.

Keywords: embryonic chick, HCN-channels, ryanodine receptors, Na⁺/Ca²⁺-exchange, automatism