



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

www.sciencejournals.ru

Журнал публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи по различным проблемам эволюционной, сравнительной и экологической физиологии, биохимии и морфологии



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 1, 2023

Все статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в "Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology" ISSN 0022-0930, ©Pleiades Publishing, Ltd.

ОБЗОРЫ

Лимфодренажная система мозга: новый игрок в нейронауке

*О. В. Семякина-Глушковская, Д. Э. Постнов, А. П. Хороводов,
Н. А. Наволокин, Ю. Г. Г. Курти*

3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Изучение защитного и антиоксидантного действия инсулина
на нейроны коры мозга крыс при депривации глюкозы и кислорода *in vitro*

И. О. Захарова, И. И. Зорина, Л. В. Баюнова, А. О. Шпаков, Н. Ф. Аврова

20

Влияние условий соревнования на амплитуды вызванных потенциалов
при творческой и нетворческой деятельности

Ж. В. Нагорнова, Н. В. Шемякина

32

Уменьшение аутофагической и апоптотической гибели нейронов
в СА1 районе гиппокампа и лобной коре мозга крыс
введенным интраназально инсулином при ишемии и реперфузии переднего мозга

*Е. А. Фокина, И. О. Захарова, Л. В. Баюнова, Д. К. Аврова,
И. О. Илясов, Н. Ф. Аврова*

43

Влияние различных агонистов рецептора лютеинизирующего гормона
на стероидогенез в яичниках половозрелых самок крыс

*А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, Е. А. Фокина, И. А. Лебедев,
В. Н. Сорокоумов, Л. В. Баюнова, А. О. Шпаков*

54

Биоэлектрический импеданс миокарда левого желудочка и легкого крыс
после тренировок принудительным плаванием и последующим детренингом

Н. Л. Коломеец, А. Г. Ивонин, Е. А. Пешкин, И. М. Рощевская

65

Поправка

76

Contents

Vol. 59, No. 1, 2023

REVIEWS

Lymphatic Drainage System of the Brain: a New Player in Neuroscience

*O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, D. E. Postnov, A. P. Khorovodov,
N. A. Navolokin, and Yu. G. G. Kurthz*

3

EXPERIMENTAL ARTICLES

Protective and Antioxidant Effects of Insulin on Rat Brain Cortical Neurons
in a Model of Oxygen and Glucose Deprivation *in vitro*

I. O. Zakharova, I. I. Zorina, L. V. Bayunova, A. O. Shpakov, and N. F. Avrova

20

The Impact of Competitive Conditions on Amplitudes of Event-Related Potentials
during Verbal Creative and Non-Creative Task Performance

Zh. V. Nagornova and N. V. Shemyakina

32

Intranasal Insulin Decreases Autophagic and Apoptotic Death of Neurons
in the Rat Hippocampal C1 Region and Frontal Cortex under Forebrain Ischemia-Reperfusion

*E. A. Fokina, I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, D. K. Avrova,
I. O. Ilyasov, and N. F. Avrova*

43

Effect of Different Luteinizing Hormone Receptor Agonists
on Ovarian Steroidogenesis in Mature Female Rats

*A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, E. A. Fokina, I. A. Lebedev,
V. N. Sorokoumov, L. V. Bayunova, and A. O. Shpakov*

54

Bioelectrical Impedance of the left Ventricular Myocardium, Lung
in Rats after Forced Swimming Training and Subsequent Detraining

N. L. Kolomeyets, A. G. Ivonin, E. A. Peshkin, and I. M. Roshchevskaya

65

Erratum

76

ЛИМФОДРЕНАЖНАЯ СИСТЕМА МОЗГА: НОВЫЙ ИГРОК В НЕЙРОНАУКЕ

© 2023 г. О. В. Семячкина-Глушковская^{1,*}, Д. Э. Постнов¹,
А. П. Хороводов¹, Н. А. Наволокин¹, Ю. Г. Г. Куртц^{1,2,3}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

² Берлинский университет Гумбольдта, Берлин, Германия

³ Потсдамский институт изучения климатических изменений, Потсдам, Германия

*e-mail: glushkovskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 29.07.2022 г.

После доработки 27.11.2022 г.

Принята к публикации 29.11.2022 г.

Лимфатическая система играет важную роль в дренаже тканей, выведении из них ненужных метаболитов и токсинов, а также это ключевая площадка, где разворачиваются сценарии иммунных реакций, защищая организм от бактерий и вирусов. В центральной нервной системе (ЦНС) дренажные процессы протекают с такой же интенсивностью, что и в периферических тканях. Мозг активно обменивается с кровью питательными соединениями и выделяет ненужные метаболиты, используя дренажные пути, которые тесно связаны с периферической лимфатической системой. Эти же пути являются “воротами” для трафика иммунных клеток и антител в ЦНС, которые могут осуществлять “центральный” иммунитет. За двухвековую историю изучения дренажных процессов мозга накоплено множество фактов, косвенно свидетельствующих о существовании лимфатических сосудов в ЦНС. Однако даже с появлением высоких технологий визуализации структур мозга и переломного события в нейронауке, когда перекрыли менингеальные лимфатические сосуды (МЛС), ученые не продвинулись дальше подтверждения уже существующего факта о присутствии лимфатической сети исключительно в оболочках мозга, но не в его тканях. Отметим, что переоткрытие МЛС американскими учеными не явилось поистине новым для науки, поскольку их впервые описал итальянский анатом Масканини еще 2 века назад и его результаты были подтверждены во многих других исследованиях, выполненных на оболочках мозга человека, макака, грызунов, собак, кроликов и Zebrafish. Поэтому в научной общественности “забытые” МЛС не были признаны как новое открытие. Данный обзор освещает переломные изменения в нейронауке, когда на сцену выходит новый игрок, расставляющий на свои логичные места двухвековые усилия ученых объяснить, как выводятся из мозга ненужные молекулы и токсины, а также как осуществляются дренаж и иммунитет в ЦНС. Это важная информативная платформа как для принципиально новых фундаментальных знаний о лимфатической системе оболочек мозга, так и для развития инновационных технологий нейрореабилитации на основе управления лимфодренажными процессами выведения токсинов и ненужных молекул из ЦНС.

Ключевые слова: лимфатическая система, менингеальные лимфатические сосуды, лимфатическая гипотеза, механизмы дренажа тканей головного мозга, лимфовыведение метаболитов и токсинов

DOI: 10.31857/S0044452923010084, **EDN:** GXTLSK

ЧАСТЬ 1. ЛИМФАТИЧЕСКИЕ И ВЕНОЗНЫЕ ПУТИ ДРЕНАЖА ТКАНЕЙ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА

С точки зрения анатомии своеобразие мозга проявляется в том, что он заключен в полости ригидного черепа объемом, в среднем, 1900 мл. При этом в мозге постоянно образуются жидкости — спинномозговая (СМЖ) и интерстициальная (ИСЖ). СМЖ генерируется в системе желудочков головного мозга со скоростью 350 мкл/мин (у человека) [1]. Всего в мозге у человека 140 мл СМЖ

(30 мл в желудочках, 110 мл в подпаутинном пространстве) [2] и 280 мл в ИСЖ [2], которая образуется как путем прохождения жидкостей через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в периваскулярное пространство (ПВП) и частичного проникновения туда СМЖ, так и за счет метаболизма нервных клеток [3, 4], что, однако, составляет всего 10% от общего объема ИСЖ (~ 28 нл $г^{-1} мин^{-1}$) [4] (рис. 1а и 1б). Таким образом, для мозга, который находится в лимитированном костном пространстве, накопление жидкостей внутри черепа является кри-

тичным и дренаж его тканей лежит в основе сохранения гомеостаза ЦНС.

Дренаж тканей мозга осуществляется двумя механизмами, лимфатическими и венозными. Научная концепция лимфатического дренажа была заложена более чем 100 лет назад. Первая работа в этой области была опубликована в 1869 г. Schwalbe, который ввел краситель Berlin Blue в подпаутинное пространство собак и наблюдал его лимфатическое выведение, минуя венозный путь [5]. Позже в 1872 г. Quincke создал концепцию о лимфатическом выведении СМЖ через пути выхода черепно-мозговых нервов [6], что через 3 года было подтверждено в работе Key и Retzius [7] (рис. 1 d). В 1966 г. Földi впервые в экспериментах на собаках описал менингеальные лимфатические сосуды (МЛС) на фоне блокады лимфатического оттока СМЖ в глубокие шейные лимфатические узлы [8]. В 1951 г. Simmonds исследовал лимфатическое выведение радиоактивного альбумина из подпаутинного пространства овец и показал, что около 30% его абсорбируется в глубоких шейных лимфоузлах [9, 10]. При совершенствовании методов количественного анализа содержания радиоактивного трейсера в тканях было доказано, что 50% радиоактивного альбумина выводится по лимфатическому пути [11]. При повышении давления в жидкостях мозга, доля выведения СМЖ по лимфатическому пути существенно возрастает [12–16].

Впоследствии в этом направлении было выполнено множество подобных работ, доказывающих вовлечение периферической лимфатической системы в процессы дренажа тканей головного мозга мышей, крыс, кроликов, морских свинок, овец, собак, макак и человека.

В отношении человека также существуют клинические результаты, указывающие на лимфатические пути дренажа СМЖ. Smith и соавт. [17] показали, что клетки опухолей мозга могут метастазировать в глубокие шейные лимфатические узлы. McComb [18] наблюдал развитие гидроцефалии у детей при обструкции решетчатой кости.

Ключевую роль в лимфатическом выведении СМЖ отводят решетчатой кости [19] (рис. 1). Этот путь дренажа впервые был описан Schwalbe и впоследствии подтвержден во многих других исследованиях [5, 19–21]. Jackson в 1979 г. обнаружил, что блокада лимфатического оттока из ЦНС за счет обструкции носовых ходов способствует ретроградному проникновению вирусов в ткани мозга [20]. Si и соавт. в опытах на крысах выявили, что блокада лимфатического оттока СМЖ сопровождается развитием более тяжелой формы инсульта у крыс с формированием периваскулярного отека и повышением внутричерепного давления [21]. Удаление глубоких шейных лимфоузлов, первой анатомической станции сбора СМЖ, стекающей из ЦНС с растворенными в ней ненужными соединениями,

приводит к развитию когнитивного дефицита у мышей [22] и некрозу нейронов у кроликов [23].

Неизвестно, как именно СМЖ выводится из ЦНС на периферию через решетчатую кость. Рисунок 1с схематично отражает гипотезу [19], согласно которой СМЖ может выводиться из решетчатой кости по лимфатическим сосудам тремя механизмами: 1) лимфососуды плотно прилегают к обонятельным нервам, образуя лимфатический “воротник” и непосредственно контактируют с подпаутинным и субдуральным пространствами, тем самым имея прямую связь с СМЖ; 2) второй сценарий повторяет первый, но отличается тем, что сеть лимфососудов не плотно прилегает к обонятельным нервам и СМЖ может стекать в пространства решетчатой кости, откуда она поступает в лимфососуды путем простой диффузии; 3) третий сценарий предполагает, что лимфососуды не связаны непосредственно с решетчатой костью и оболочками мозга, они располагаются в обонятельном эндотелии, где осуществляют дренаж пассивно стекающей СМЖ.

Помимо решетчатой кости, обсуждаются и другие анатомические пути лимфатического вывода СМЖ, включая лимфатические сосуды, идущие вдоль черепно-мозговых нервов [19, 24, 25] (рис. 1d). В некоторых экспериментах сообщается, что такой путь выведения радиоактивных белков из мозга кроликов может составлять 90% [26]. Существуют данные, указывающие на лимфатическое выведение СМЖ через зрительные и слуховой тракты [27].

Пахионовы грануляции представляют собой небольшие (до 300 мкм в диаметре) выпуклые образования паутинной оболочки головного мозга, выпячивающиеся через твердую оболочку. Большая часть грануляций сосредоточена в верхнем сагитальном синусе, однако они встречаются во всех синусах, связанных с твердой мозговой оболочкой. Через грануляции СМЖ выходит из-под подпаутинного пространства в венозную систему с помощью пиноцитоза [28] и путем пассивной диффузии через 100 мкм каналы между грануляциями паутинной оболочки [29]. На разных видах животных установлено, что в условиях нормы вклад лимфатических и венозных процессов дренажа в ЦНС примерно равен [11]. Однако существуют основания полагать, что в силу анатомической и функциональной недоразвитости Пахионовых грануляций у новорожденных, для них лимфатические процессы дренажа могут быть основными [30, 31].

Более детально с результатами различных междисциплинарных научных групп, освещающих механизмы дренажа тканей головного и спинного мозга, можно познакомиться в следующих ключевых обзорах [20, 32–39].

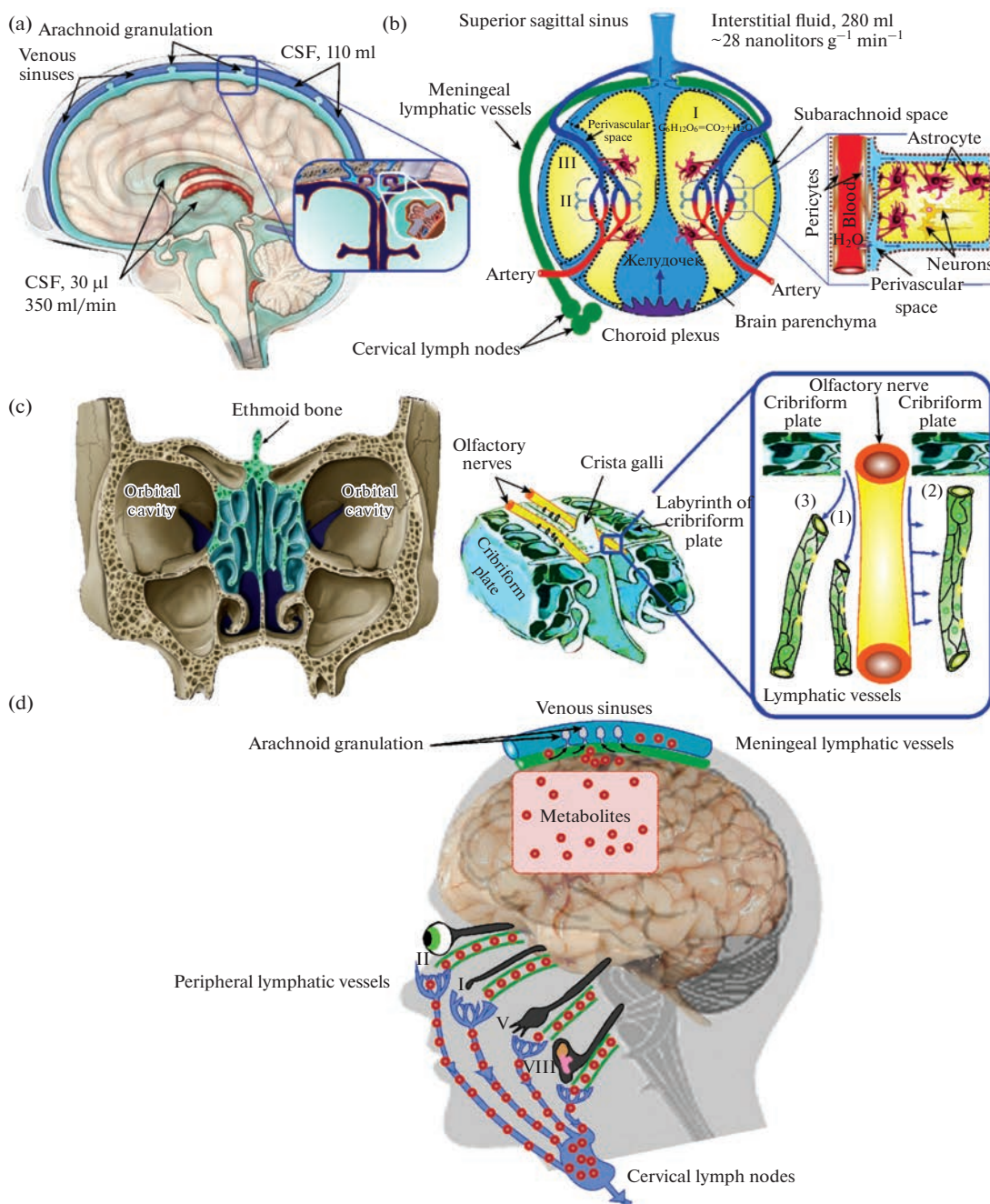


Рис. 1. Образование и циркуляция спинномозговой (СМЖ на рис. CSF) и интерстициальной (ИСЖ) жидкостей в тканях мозга человека: (a) — образование СМЖ в системе желудочков мозга со скоростью 350 мкл/мин и распределение СМЖ в подпаутинном пространстве головного и спинного мозга, а также частично в периваскулярные пространства (ПСП); (b) — модели образования ИСЖ в тканях мозга, где (I) отражает образование ИСЖ за счет метаболизма тканей мозга, что составляет 10% от общего объема ИСЖ (280 мл), (II) отражает образование ИСЖ за счет движения жидкостей через ГЭБ и (III) за счет стекания СМЖ из подпаутинного пространства в ПВП. Стрелками показано движение жидкостей через ГЭБ в ПВС с последующей диффузией вдоль пограничных “пустых” зон с глией и астроцитами, так называемых “специальных маршрутов” с наименьшим гидростатическим сопротивлением [3]; (c) — схематичное изображение решетчатой кости и дренажа СМЖ по лимфатическим сосудам тремя механизмами: 1) лимфососуды плотно прилегают к обонятельным нервам, образуя лимфатический “воротник” и непосредственно контактируют с подпаутинным и субдуральным пространствами, тем самым имея прямую связь с СМЖ; 2) второй сценарий повторяет первый, но отличается тем, что сеть лимфососудов не плотно прилегает к обонятельным нервам и СМЖ может стекать в пространства решетчатой кости, откуда она поступает в лимфососуды путем простой диффузии; 3) третий сценарий предполагает, что лимфососуды не связаны непосредственно с решетчатой костью и оболочками мозга, они располагаются в обонятельном эндотелии, где осуществляют дренаж пассивно стекающей СМЖ; (d) — альтернативные пути дренажа тканей ЦНС через периневральные пространства: I — обонятельного; II — зрительного; V — тройничного; VIII — преддверно-улиткового нервов.

ЧАСТЬ 2. ГЛИМФАТИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА: БОЛЬШЕ ВОПРОСОВ, ЧЕМ ОТВЕТОВ

Вплоть до сегодняшнего дня базовый пласт знаний о лимфатических процессах дренажа тканей мозга был построен на тех фактах, что в экспериментах вводили различные соединения в ткани мозга или непосредственно в СМЖ и наблюдали их выведение/накопление в лимфатических узлах шеи (см. часть 1). С переоткрытием МЛС стали появляться сведения об их вовлеченности в выведение исследуемых трейсеров (красителей [40], бета-амилоида [41], клеток глиобластомы и меланомы [42], эритроцитов [43, 44]) из тканей мозга грызунов и человека в периферическую лимфатическую систему. Однако оставалось неясным, как жидкости, метаболиты и ненужные соединения из паренхимы мозга достигают путей, лимфатических или венозных, для их выведения на периферию.

Десять лет назад была предложена “глимфатическая” (по аналогии со словом “лимфатическая”) гипотеза, предлагающая определенные механизмы и сценарий движения жидкостей мозга в ходе его самоочищения [45, 46]. Данная научная концепция построена на данных двухфотонной микроскопии о том, что введение красителей в большую цистерну сопровождается их диффузией вдоль ПВП проникающих мозговых артерий с последующим появлением вдоль мозговых вен. На основе данных результатов была построена гипотеза, объясняющая движение красителей, а в последующем и бета-амилоида, через глию, которой отдали функцию лимфатической системы, отсюда название глимфатическая система. Согласно данной гипотезе движение жидкостей мозга и растворенных в них молекул осуществляется от ПВП артерий к венам через ткани паренхимы [45, 46]. Отметим, что глимфатическая гипотеза построена сугубо на результатах поверхностных изображений, полученных методом двухфотонной микроскопии (глубина не более 300 мкм). При этом движение молекул через ткани мозга, а также четкой идентификации их перемещения вдоль мозговых вен не было. Nlادku обсуждает, что в мире вообще никто не видел движение молекул от артерий к венам в паренхиме мозга [38]. Возникло множество фундаментальных работ, вскрывающих физиологические ошибки и даже несостоятельность глимфатической гипотезы [32, 38, 36, 47]. Ниже мы обсуждаем мировую тенденцию в современной интерпретации данной гипотезы, включая российские работы [48, 49]. Эволюция представлений о путях движения мозговых жидкостей проиллюстрирована на рис. 2.

Глимфатическая гипотеза появилась не на пустом месте. К 2012 г. имелось согласованное мнение специалистов о том, что в особых условиях жидкости головного мозга могут проникать вглубь паренхимы [51, 52], а также потом попадать в кровь [53]. Однако все эти данные были получены *ex vivo*

и не было ясности, возможно ли это в условиях нормального функционирования организма.

В частности, было показано, что при неблагоприятных условиях имеет место течение жидкости из паренхимы мозга через “предпочтительные маршруты”, которыми служат ПВП вдоль глии и астроцитов (см. рис. 1b) и субэпендимальные пространства [1, 18, 54, 55].

Движущей силой этого движения считалось небольшое гидростатическое давление, создаваемое секрецией жидкости через ГЭБ [12–16, 54] или движениями стенок артерий [56]. Rennels и соавт. после инъекции пероксидазы хрена в боковые желудочки кошки наблюдали появление трейсера в коре больших полушарий через 6 мин, что приблизительно равно времени, необходимому для движения СМЖ из желудочков в подпаутинное пространство [57]. Это означает, что проникновение трейсера из подпаутинного пространства в паренхиму происходит практически мгновенно!

Таким образом, было известно, что движение жидкостей и приносимых ими веществ в паренхиму мозга в определенных ситуациях может происходить быстро. Однако не было ясно, как это может обеспечить дренаж тканей.

Авторы глимфатической гипотезы представили новые экспериментальные данные и на их основе предложили понятную и, как казалось вначале, непротиворечивую картину.

Их эксперименты *in vivo* [45, 58–60] показали, что:

- при введении декстранов с малой (3 кДа) и высокой (2000 кДа) молекулярной массой в большую цистерну мышей было выявлено, что проникновение декстрана 2000 кДа было ограничено ПВП проникающих артерий, в то время как декстран 3 кДа проникал непосредственно в паренхиму мозга. При этом флуоресценция декстрана 3 кДа обнаруживалась сначала в периваскулярных пространствах (ПВС) проникающих артерий и затем в ПВС крупных мозговых вен [45];

- в МРТ-исследовании был доказан периартериальный путь распространения контрастных веществ (GdDTPA, 1 кДа и гадоспин, 200 кДа) из большой цистерны в паренхиму мозга мышей [59];

- блокада аквапориновых каналов (AQP4) снижала распространение изучаемых маркеров по ПВП [45].

На основе этих новых данных была предложена объясняющая их глимфатическая гипотеза, согласно которой СМЖ попадает в ткани мозга через ПВП артериальных сосудов за счет их пульсаций, наподобие перистальтического насоса. Созданный этим насосом градиент давления продавливает СМЖ сквозь клеточные структуры паренхимы в направлении венул. Далее СМЖ движется через

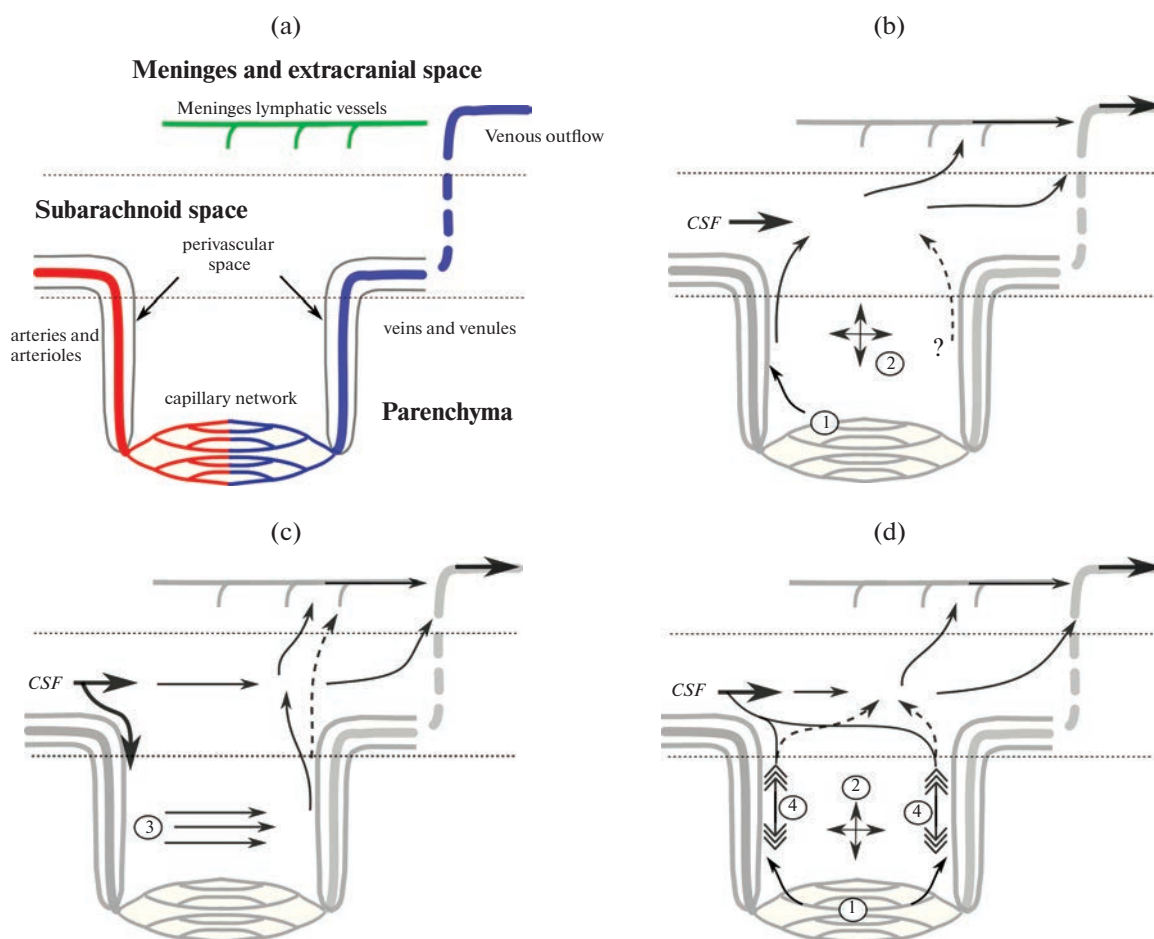


Рис. 2. Эволюция представлений о путях движения мозговых жидкостей (CSF): (a) – строение рассматриваемой области (схематично); (b) – “классическая” гипотеза Cserg and Bradbury [50]; (c) – лимфатическая гипотеза; (d) – современные представления по Hladky and Barrand [38]. Цифрами обозначены: 1 – приток жидкости через ГЭБ, 2 – диффузия веществ в межклеточной жидкости паренхимы с переносом по градиенту их концентраций, 3 – перенос веществ в паренхиме направленным потоком межклеточной жидкости, 4 – пульсирующий и меняющий свое направление поток жидкости в периваскулярных пространствах.

перивенозное пространство в направлении крупных вен и лимфатических сосудов оболочек мозга.

Предложенная в лимфатической теории [45] совокупность путей и механизмов дренажа тканей мозга образовали цельную картину, однако не все ее элементы имели на тот момент надежное экспериментальное подтверждение. В первые годы существования лимфатической гипотезы ожидалось, что вот-вот будут доказаны все ее существенные компоненты. Однако этого не произошло. С одной стороны, появились критические публикации по работоспособности предложенных физических механизмов [32, 36, 38, 47, 54]. С другой стороны, новые экспериментальные оценки характера движения жидкости в паренхиме оказались противоречивыми и только усилили сомнения.

В недавнем обзоре [38] проведен анализ текущей ситуации и сформулирован список проблемных пунктов. В частности, до сих пор не подтвер-

ждено, что отток жидкости из паренхимы мозга происходит через ПВС мозговых вен. Также оценки градиента давления, который способен создать артериальные пульсации, показывают, что он явно недостаточен для обеспечения направленного тока жидкости сквозь паренхиму. Неясной остается и роль водных каналов AQP4 на астроцитарных ножках, выстилающих периадериальные и перивенозные пути. Ниже кратко обсуждаются как подтвержденные, так и наиболее проблемные элементы лимфатической гипотезы с точки зрения их доказанности и реализуемости.

Периваскулярные пространства служат “каналами” для направленного тока СМЖ

Этот компонент лимфатической гипотезы на данный момент надежно подтвержден результатами экспериментов с микросферами, добавленными в цистерну magna.

В работе [61] показано, что микросферы перемещаются преимущественно в ПВП церебральных артерий, но не в ПВП церебральных вен. Периваскулярный поток был пульсирующим и в среднем — антеградным, т.е. однонаправленным. В работах [62, 63] также приведены видеозаписи потоков, из которых однозначно видно наличие пульсирующего и направленного движения микрочастиц, что интерпретируется авторами как доказательство наличия тока жидкости, переносящего растворенные в них соединения. Ранее аналогичные результаты были получены с использованием других маркеров, таких как тушь [27], контрастные вещества на основе гадолиния [64, 65] и флуоресцентные молекулы [45, 51]. Следует, однако, помнить, что эти результаты относятся к сосудам оболочек мозга и не доказывают, что такой же направленный ток имеется в его паренхиме. В частности, в работе [61] выдвинуто предположение, что направленный ток в ПВП оболочек имеет выход вовсе не в паренхиму, а в места выхода СМЖ из мозга, например, к решетчатой кости.

*Артериальные пульсации
как механизм продвижения жидкостей мозга*

Pliff и соавт. в своей работе [60] показали, что наличие артериальных пульсаций ускоряет распространение флуоресцентного маркера и на этой основе предположили, что они играют роль перистальтического насоса, накачивающего СМЖ из подпаутинного пространства вглубь паренхимы мозга. Такое представление позднее подверглось критике в работах других исследователей [54, 66, 67], так как расчеты показывают, что такой механизм не способен обеспечить нужного градиента давления. Нельзя отрицать, однако, что мозговые пульсации вовлечены во все обсуждаемые процессы и играют важную, хотя и не до конца понятную роль. Например, в работе [68] сообщалось, что поток СМЖ в Сильвиевом водопроводе может менять направление за сердечный цикл. В работе [69] изучались пульсации на микроуровне, где показано отставание по фазе в одиночной пульсовой волне в венозном сосуде по отношению к артериальному. В работе [70] методом спекл-флоуметрии построена карта относительных мощностей пульсаций в артериях, венах и паренхиме мозга мыши. В отличие от предыдущей работы не было обнаружено значительного фазового сдвига от артерий к венам. Кроме того, было показано, что пульсации в паренхиме мозга пространственно однородны. Этот результат в очередной раз заставляет критически отнестись к лимфатической гипотезе в части пульсаций как насоса.

Дыхательный ритм фиксируется по всему телу, причем его мощность сильно уступает мощности сердечного ритма. Однако для мозга ситуация иная. Так, в работе [71] показано, что спектральная

мощность дыхательного ритма в сигнале сверхбыстрого МРТ не уступает мощности сердечных пульсаций. В работе [72] дана оценка вклада сердечного и дыхательного ритмов в движение жидкостей мозга. Показано, что сердечный ритм создает градиент давления в Сильвиевом водопроводе, почти в 3 раза превышающий эффект дыхательного ритма, однако вызванный этим поток СМЖ слабее, чем вызванный дыхательным ритмом. Этот эффект можно объяснить на основе инерции, благодаря которой движение жидкости гораздо более чувствительно к медленным изменениям градиента давления. Иными словами, чем медленнее ритм, тем более слабая его амплитуда может вызывать измеримые пульсации потока СМЖ. Этот вывод был недавно подтвержден в работе [73], согласно которой дыхательный по сравнению с ультрамедленным сердечным ритмом оказывает эффекты примерно в 3 раза меньше на интенсивность потока СМЖ.

В работе [38] приводятся четыре основных аргумента в пользу того, что транспорт веществ в паренхиму мозга не может быть обусловлен избыточным давлением, созданным пульсациями:

1) имеет место не только приток в ПВП, но и отток растворенных веществ;

2) высокомолекулярные соединения способны проникать в ПВП церебральных артерий, но не могут проникать в паренхиму мозга. Это означает, что, если существует только однонаправленный поток в ПВП, эти соединения бы накапливались там, не имея выхода. Brierley [74] наблюдал движение крупных частиц туши из субархноидального пространства в течение как минимум 24 ч и не нашел такого накопления. Таким образом, транспорт растворенных веществ в ПВП имеет двунаправленный характер;

3) сообщалось, что отсутствие AQP4 способно примерно вдвое сократить перенос растворенных веществ из большой цистерны к паренхиме мозга [45]. В лимфатической гипотезе это сокращение транспорта интерпретируется как вызванное уменьшением скорости притока СМЖ в ПВП мозговых артерий. Однако в том же исследовании скорость переноса больших молекул в ПВП церебральных артерий существенно не снижается. Это означает, что либо отсутствие AQP4 не изменяет поток СМЖ в ПВП, как показано в работе Smith [75], либо направленный поток не является основным механизмом движения растворенных веществ внутри ПВП;

4) имеются теоретические работы, где изучалось, может ли малое изменение диаметра проникающих артерий обеспечить направленный периваскулярный поток жидкостей в мозг, достаточный для переноса веществ. В то время как ранние оценки дали положительный ответ [76], последующие исследования в целом пришли к противопо-

ложному выводу [66, 67]. В работе [77] утверждает, что пульсация артерий может быть движущей силой продвижения жидкостей в ПВП только в случае нереалистичного большого их размера, что, однако, возможно исключительно при патологии. Результаты ряда теоретических работ по этому вопросу [78–80] не дают согласованной картины. Валидацию различных модельных подходов сдерживает скудость экспериментальных данных по размерам ПВП и о том, как они изменяются при различных физиологических состояниях.

Альтернативные пути переноса веществ с потоком жидкостей мозга

Bradbury и соавт. [50] предположили, что расширение проникающих артерий во время систолы способно выталкивать из паренхимы мозга содержимое ПВП проникающих артериол. На сегодня наиболее непротиворечивым и вероятным представляется механизм, в рамках которого пульсации любой природы способствуют перемешиванию жидкости и, таким образом, существенно ускоряют транспорт веществ посредством диффузии. Такой взгляд предложен, обоснован и подкреплен расчетами во многих работах [32, 54, 67, 81]. Однако в других исследованиях [82, 83] утверждается, что такой механизм даст слишком малый поток растворенного вещества.

Еще одна альтернатива заключается в предположении, что пути притока и оттока растворенных веществ в ПВП различны, в частности, отток происходит через интрамуральные пространства (внутри сосудистой стенки) [39]. Однако в теоретическом исследовании [66] пришли к выводу, что артериальная пульсация не способна поддержать такой отток. В целом, механизм доставки веществ от оболочек мозга в его паренхиму окончательно не ясен и требует дальнейших исследований.

Роль аквапоринов в дренаже тканей мозга

Аквапорины (AQP4) — это белки, образующие проницаемые для воды поры на ножках астроцитов, выстилающих ПВП. Экспериментально было установлено, что у линии мышей с отсутствующими AQP4 движение флуоресцентных красителей в паренхиму мозга из цистерны magna существенно затруднено. В работе [45] на этом основании сделан вывод, что AQP4 обеспечивают прохождение существенной части жидкости по тканям мозга и, таким образом, являются частью дренажного пути. Это утверждение подверглось критике по целому ряду причин. Во-первых, имеющиеся просветы между конечными отростками астроцитов сами по себе достаточны, чтобы обеспечить протекание основной части жидкости [84]. Во-вторых, пропуск воды AQP4 привел бы к накоплению переносимых веществ в ПВП и, таким образом, замедлил бы их

транспорт, вместо того, чтобы ускорить [47], тогда как в экспериментах наблюдается противоположный эффект [45, 85]. Имеется существенное противоречие между экспериментальными результатами различных научных групп, часть из которых [75, 86, 87] отрицает эффект AQP4 в дренаже тканей мозга, в то время как другие этот факт подтверждают [45, 85].

Весьма вероятно, что экспериментально установленная связь между отсутствием AQP4 и замедлением дренажа паренхимы мозга имеет более сложную природу и вклад AQP4 в эти процессы остается недостаточно ясным.

По вопросу направленного тока жидкости сквозь паренхиму мозга прежде всего отметим, что на момент написания данного обзора не имеется экспериментальных доказательств его наличия в нормальных физиологических условиях [86].

Теоретические оценки показывают, что гидродинамическое сопротивление паренхимы мозга настолько велико, что потоки, создаваемые достижимыми перепадами гидростатического давления, будут незначительны по сравнению с эффектом диффузии [86, 87]. В целом ряде работ [54, 67, 86–88] поддерживается тезис о том, что диффузия является основным и достаточным механизмом доставки веществ в паренхиме.

Перивенозные пространства как основной путь оттока жидкости из паренхимы

Как утверждает авторами лимфатической гипотезы [45], основным путем выведения ненужных метаболитов из паренхимы мозга является их перенос потоком жидкости из ПВП мозговых артерий в ПВП мозговых вен. Однако нет экспериментальных свидетельств того, что перед этим маркеры прошли через ткани паренхимы мозга [38]. Имеется относительно немного работ, где оценивается возможность переноса веществ именно по перивенозным пространствам мозга [55, 59, 89]. Если принять как основную гипотезу возможность двустороннего потока веществ по ПВП, то однозначный вывод о роли перивенозных пространств как основного пути оттока жидкости из мозга сделать затруднительно.

В качестве итога данной части обзора приведем перевод фрагмента работы [38], которая, на взгляд авторов данного обзора, хорошо отражает текущее состояние вопроса:

“Лимфатическая гипотеза не может адекватно объяснить, каким образом осуществляются дренаж и очищение тканей мозга от ненужных соединений. Однако следует отметить, что научная дискуссия вокруг лимфатической гипотезы несомненно способствовала накоплению знаний и лучшему пониманию процессов транспорта веществ в паренхиме мозга”.

ЧАСТЬ 3. ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ СОСУДЫ: НЕДОСТАЮЩИЙ ПАЗЛ В НАУЧНОЙ КАРТИНЕ ДРЕНАЖА ТКАНЕЙ МОЗГА

Предположение существования лимфатических сосудов в тканях ЦНС возникло во многих работах как поиск недостающего пазла в общей научной картине дренажа и очищения тканей мозга от ненужных соединений. Oberstainer и Bruce и Dawson впервые высказали гипотезу о существовании лимфатических путей для дренажа, а также трафика иммунных клеток в ЦНС [90, 91]. Согласно данной гипотезе лимфатические пути находятся в ПВП паренхимы мозга и соединяются с подпаутинным пространством. В 1979 г. Prineas обнаружил лимфатические капилляры в ПВП спинного мозга 5 пациентов, умерших от различных заболеваний мозга [92]. Используя электронную микроскопию, он описал лимфоидные структуры, подобные по своему строению периферическим лимфатическим капиллярам и содержащие иммунные клетки. Однако поскольку результаты были получены без применения специфических антител к лимфатическому эндотелию, они не получили широкого признания. Prineas осторожно сделал выводы о том, что по его данным пока еще рано говорить существовании лимфатических сосудов в ЦНС, но, тем не менее, эти результаты свидетельствуют о том, что их дальнейшие поиски небезнадежны и нуждаются в детальном изучении.

Существует немало работ, где обнаружены лимфоидные структуры, образующиеся в мозге в виде третичных лимфоидных органов во время его воспаления [93, 94]. Эти органы представляют собой белковые образования из специфических для лимфатического эндотелия белков. Однако для третичных лимфоидных органов характерно наличие лимфатических сосудов, что не было описано ни в одной из указанных работ. Лимфатические элементы, но не сосуды, описаны также недавно в здоровом мозге человека [95].

Weller и соавт. построили гипотезу о существовании специальных структур вдоль базальной мембраны артерий, которые обеспечивают направленный поток ИСЖ, а также растворенных в ней соединений, в том числе бета-амилоида [39]. Позже Morris и соавт. подтвердили экспериментально идею вывода из тканей мозга бета-амилоида по структурам вдоль базальной мембраны [96]. Ма показал, что 80% ИСЖ поступает в лимфатическую систему [25]. Приводятся факты о разнонаправленных и независимых потоках для СМЖ и ИСЖ [39]. Существуют экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что крупные молекулы и клетки выводятся из мозга в периферическую лимфатическую систему очень быстро, минуя решетчатую кость или венозную систему [38, 39], это возможно только при наличии специальных структур,

которые могли бы обеспечить такой быстрый целенаправленный поток. Еще в 1998 г. в своем обзоре Chikly высказывал предположения на основе экспериментальных и клинических наблюдений о существовании лимфо-подобных структур в мозге человека, по которым должны выводиться белки, крупные молекулы и кровь в случае развития внутримозговых кровоизлияний, а также которые должны обеспечить быструю коммуникацию иммунных клеток в ПВС [97].

Таким образом, гипотеза “необходимости” присутствия лимфатических сосудов в тканях мозга возникла на основе целого ряда фактов, свидетельствующих о целенаправленных потоках жидкостей в тканях мозга, которые обеспечивают как его дренаж, так и очищение от ненужных молекул и клеток.

ЧАСТЬ 4. СОЗРЕВАНИЕ ДРЕНАЖНОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Рассмотрим созревание лимфатической системы в оболочках мозга и на периферии на примере мышей как наиболее изученном объекте. Периферическая лимфатическая система у мышей закладывается еще в эмбриогенезе, начиная с 9-го дня развития, когда группа клеток эндотелия кардинальных вен приобретает способность экспрессировать белок, являющийся гомеобоксным транскрипционным фактором, который участвует в развитии лимфатической системы (PROX-1 - *prospero homeobox protein 1*) [98, 99]. После 10-го дня эмбриогенеза васкулярный эндотелиальный фактор роста C (*the vascular endothelial growth factor, VEGF-C*) паракринным путем активирует прорастание лимфатических сосудов за счет влияния на рецептор III типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR3), формируя лимфатические сплетения по всему организму [100, 101]. В онтогенезе прорастание лимфатических сосудов в ткани происходит из лимфатического эндотелия и называется лимфангиогенез. Физиология лимфатической системы образована тремя типами сосудов, включающими лимфатические капилляры, преколлекторы и коллекторы (рис. 3).

Лимфатические капилляры не имеют базальной мембраны и организованы по типу дубового листа за счет особого неплотного соединения белков плотных контактов, что обеспечивает высокую проницаемость лимфатического эндотелия и дренажную функцию лимфатической системы (рис. 3а). Вода входит в лимфатические капилляры за счет градиента давления, в то время как клетки и крупные молекулы (метаболиты, ненужные соединения) делают это через активное взаимодействие с регуляторными белками на лимфатическом эндотелии [103]. Преколлекторы и коллекторы имеют клапаны и выполняют направляющую роль в движении лимфы из тканей в венозную

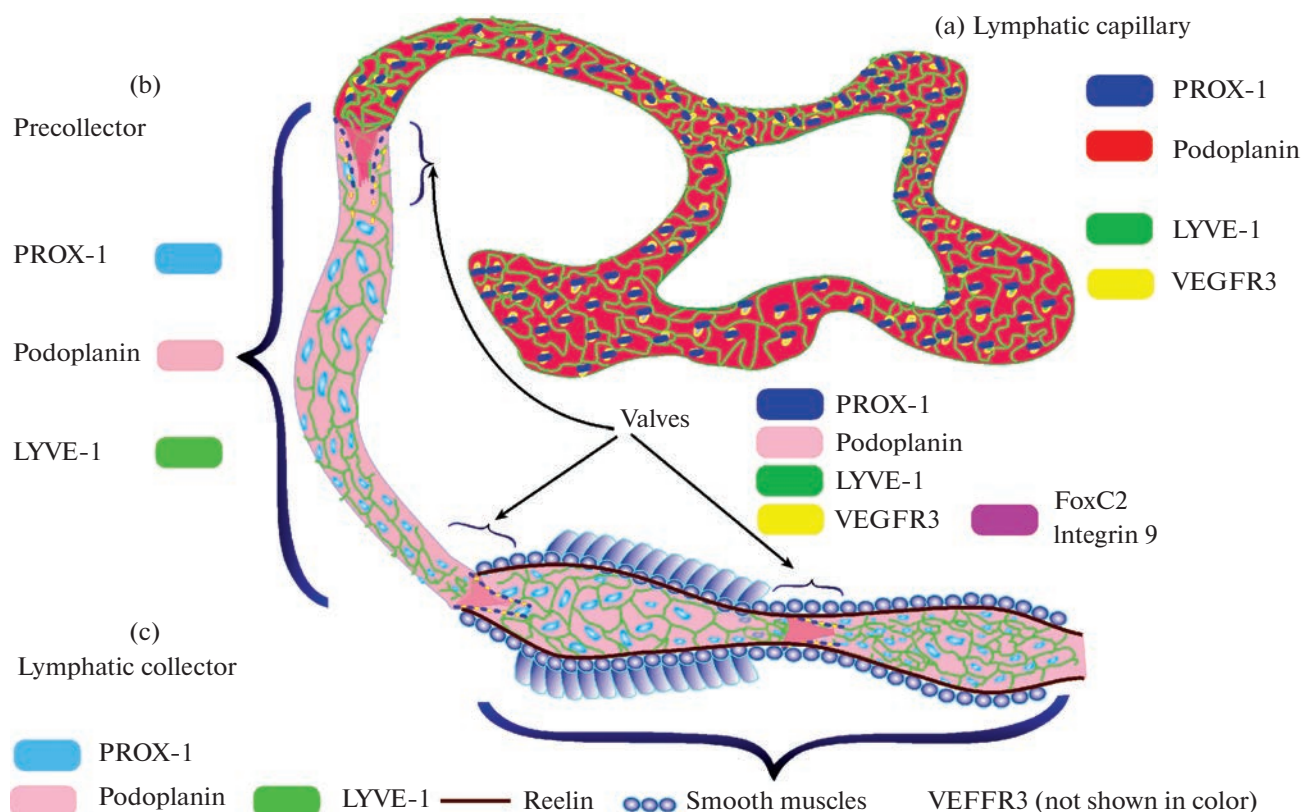


Рис. 3. Структурная организация лимфатических сосудов, включающих капилляры (а), преколлекторы (б) и коллекторы (с) с клапанами с указанием экспрессии маркеров лимфатического эндотелия в зависимости от типа лимфососудов. Рисунок адаптирован с [102], подробное описание маркеров лимфатического эндотелия представлено в [32]: LYVE-1 – Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (эндотелиальный рецептор гиалуронана 1 лимфатического сосуда. Функциональная роль LYVE-1 до сих пор является предметом споров, но есть свидетельства того, что LYVE-1 играет важную роль в транспорте гиалуроновой кислоты и миграции CD44+ лейкоцитов и опухолевых клеток по лимфатической системе); PROX-1 – Prospero homeobox protein 1 (белок, являющийся гомеобоксным транскрипционным фактором, который участвует в развитии лимфатической системы); CCL21-Chemokine (C-C motif ligand 21) – хемокин CCL-21 (экспрессируется в лимфатическом эндотелии и участвует в активации движения Т-лимфоцитов, миграции лимфоцитов в другие органы и дендритных клеток в лимфатические узлы), VEGFR3–Vascular endothelial growth factor receptor 3 (васкулярный эндотелиальный фактор роста 3, рецептор, запускающий лимфангиогенез, т.е. образование новых лимфатических сосудов); интегрин альфа-9 и FoxC2 – Forkhead box c2 (белки, экспрессирующиеся в клапанах лимфатических сосудов); подопланин – интегральный мембранный белок, отвечающий за нормальное развитие сети лимфатических сосудов, обеспечивающих отток межклеточной жидкости. Если нарушается его синтез, формируется лимфедема.

систему (рис. 3b и 3c). В коллекторах появляется гладкомышечный слой, обеспечивающий спонтанные сокращения этой части лимфососудов. Наиболее изученным механизмом, лежащим в основе сокращения лимфатических коллекторов и движения клапанов на “открытие–закрытие”, является пристеночный стресс за счет растяжения стенок лимфатических сосудов путем поступления жидкостей в их просвет с образованием оксида азота как фактора вазодилатации. При достижении критического уровня растяжения эндотелиальных клеток оксид азота через циклический гуанозинмонофосфат и образование протеинкиназы G запускает открытие Ca^{2+} -зависимых каналов, что стимулирует процесс сокращения лимфососудов [104, 105]. Существуют другие механизмы, с помощью которых оксид азота может контролировать

лимфатический тонус и сократимость: 1) активация железо-регуляторных белков в макрофагах [106] и в тканях, таких как рибонуклеотидредуктаза [107] и аконитаза [108]; 2) стимуляция АДФ-рибозилирования глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [109] и нитрозилирования протеин-сульфгидрильной группы [110]; гемоглобин как побочный продукт распада крови может стимулировать образование оксида азота [111].

Менингеальная лимфатическая система мышцей, как и периферическая лимфатическая система, начинает закладываться еще в эмбриогенезе и продолжает созревать до 28-го дня онтогенеза. Antila и соавт. представили первую основательную работу в этом направлении [98]. Рисунок 4 схематично отражает созревание менингеальной лимфа-

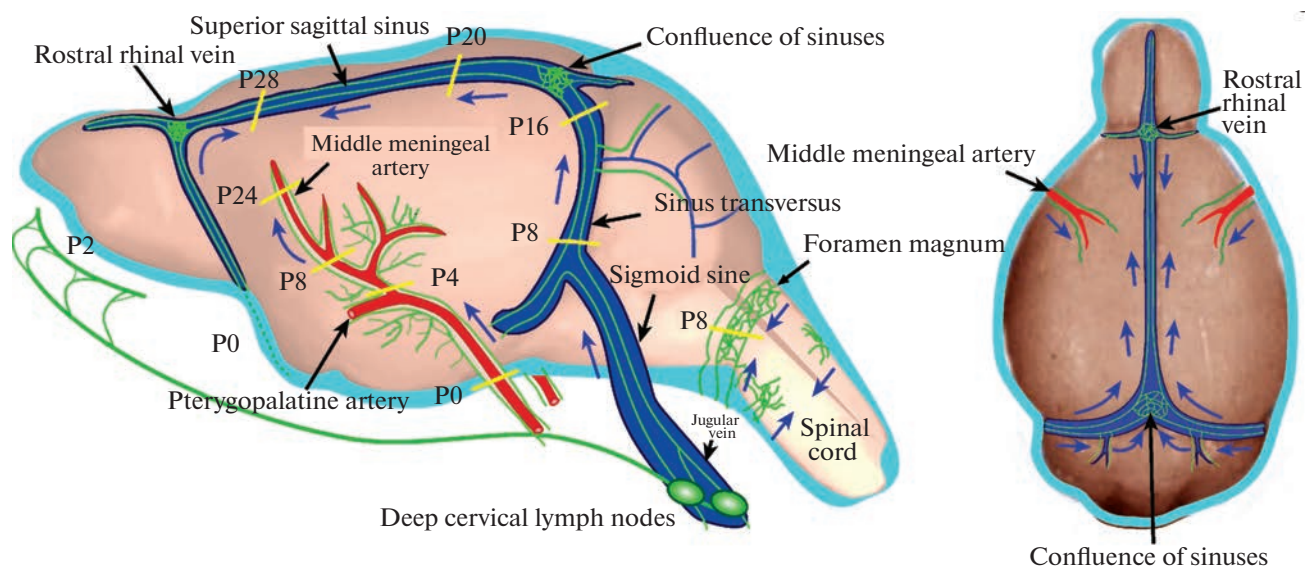


Рис. 4. Постнатальное созревание менингеальной лимфатической системы мышей: P — период онтогенеза, цифрами обозначены дни развития. Менингеальные лимфососуды обозначены зеленым цветом, артериальные и венозные сосуды — красным и синим цветами соответственно. Стрелками указано направление роста лимфососудов. Рисунок адаптирован с [98].

тической системы и направление роста лимфатических сосудов.

В этой работе показано, что МЛС закладываются с первого дня эмбриогенеза вокруг крыловидно-небной артерии и большого затылочного отверстия. Однако к моменту рождения лимфатическая система остается недоразвитой. К 2-му дню постнатального развития лимфатические сосуды обильно прорастают к решетчатой кости. С 4-го и по 24-й день онтогенеза лимфатические сосуды появляются вдоль средней менингеальной артерии, формируя клапаны. К 28-му дню лимфатическая сеть прорастает к главным венозным синусам в двух направлениях, от яремной вены и центральной вены сетчатки по направлению к верхнему сагиттальному синусу, захватывая районы поперечного (8-й день) и сигмовидного (16-й день) синусов. В этот же период часть лимфососудов от поперечного синуса прорастают в оболочки мозжечка.

По физиологической организации МЛС до сих пор не существует единого мнения. В первых работах из группы Kirnits и соавт. было показано, что МЛС являются примитивными в виде лимфатических капилляров без базальной мембраны и клапанов [40]. Позже в работе Ahn [112] было предложено выделять два типа МЛС: базальные, включающие лимфокапилляры и преколлекторы в области основания черепа, которые имеют клапаны и выполняют непосредственно дренажную функцию, и дорзальные, имеющие меньшие размеры, локализуемые вдоль верхнего сагиттального синуса и

играющие роль только в выведении лимфы на периферию.

Лимфатическая система также представлена в оболочках спинного мозга, где она начинает развиваться с 4-го дня после рождения вдоль выходов черепно-мозговых нервов, прорастая до большой цистерны к 16-му дню онтогенеза [98] (рис. 5).

Одним из широко применяемых объектов изучения развития МЛС стала рыбка Данио в силу ее быстрого развития и привлекательности с позиции оптического прижизненного мониторинга флуоресцентных лимфососудов [113].

В отношении человека пока не существует сведений об эмбриональном формировании и последующем развитии МЛС. Однако приводятся данные, где обсуждается, что венозный компонент дренажа тканей мозга в виде Пахионовых грануляций является неразвитым в первые дни после рождения и, возможно, в это время лимфатическая система выполняет основную функцию по выведению СМЖ из ЦНС [30, 32]. В двух исследованиях на 18-недельных человеческих эмбрионах [114] и 56-дневном ребенке [115] не было обнаружено Пахионовых грануляций. К моменту рождения они только начинают формироваться, но остаются недоразвитыми на протяжении нескольких месяцев [30, 116].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Признание научной общественностью присутствия лимфатических сосудов в оболочках мозга открыло новые научные и многообещающие

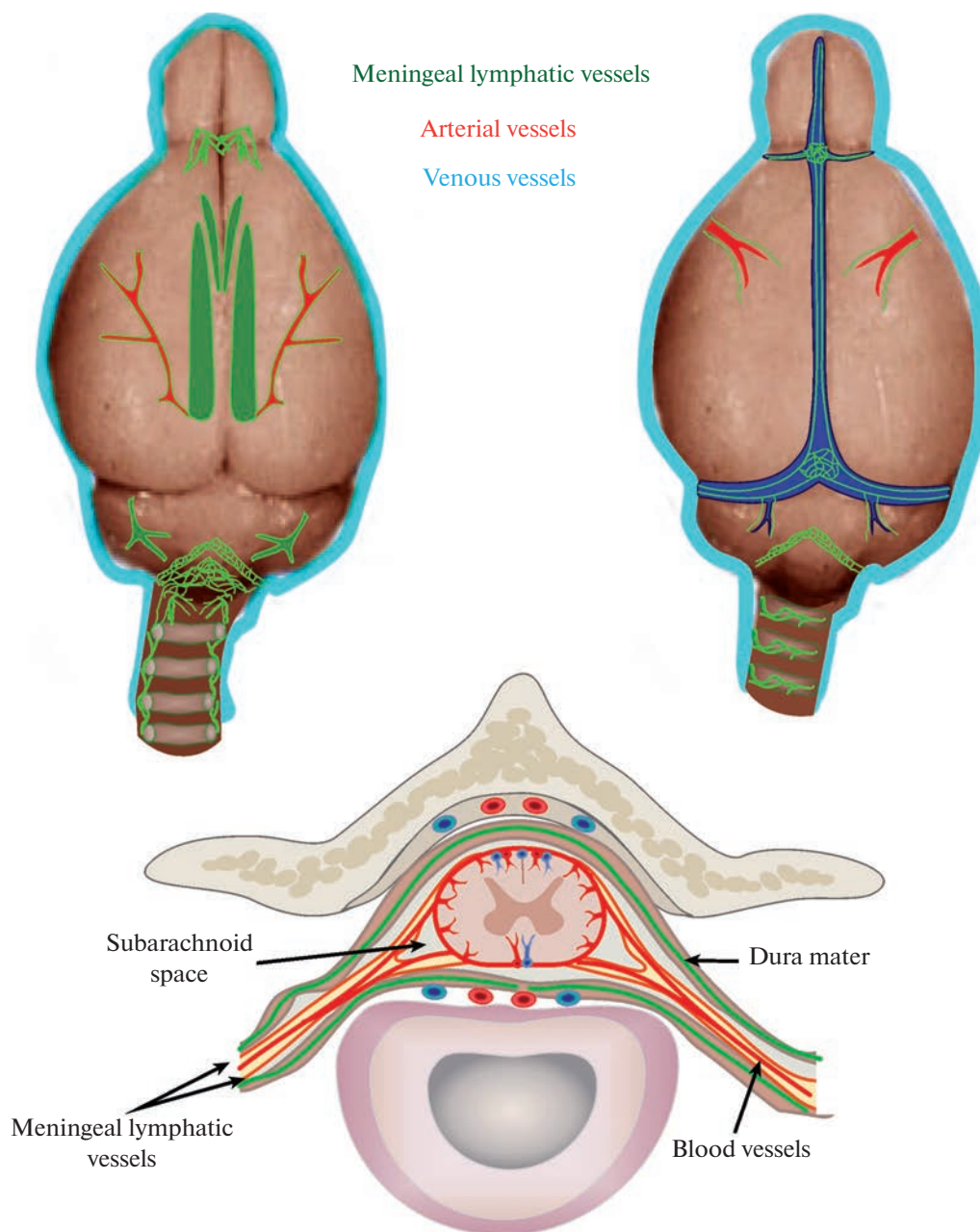


Рис. 5. Схематическое изображение менингеальной лимфатической системы спинного мозга мышей.

направления в нейробиологии как по изучению функций МЛС, так и методов управления лимфодренажными и лимфовыводящими процессами [38–44, 118–128]. Пересмотрены традиционные научные концепции, объясняющие механизмы дренажа и освобождения тканей мозга от метаболитов и ненужных соединений [38, 41–44, 118–123]. Лимфатическая система дренажа тканей мозга может явиться единственным путем вывода жидкостей и токсинов из тканей мозга новорожденных детей, у которых венозный компонент остается недоразвитым в течение нескольких меся-

цев после рождения [30, 31]. Интригующим направлением является дальнейший поиск лимфососудов непосредственно в тканях мозга человека и животных с целью восстановления цельной картины выведения жидкостей, метаболитов и токсинов из ЦНС, а также взаимодействия церебральной, менингеальной и периферической лимфатической систем [92, 117]. Перспективным вектором новых научных исследований является развитие методов стимуляции функций МЛС и управления лимфодренажными и лимфовыводящими процессами мозга для повышения его регенеративных свойств

[118, 129–131]. Дальнейшее изучение лимфатической системы как “окна” в ЦНС может явиться инновационным шагом в развитии новых методов доставки лекарственных препаратов в мозг, минуя ГЭБ [129, 130]. Важным шагом является развитие новых образовательных программ, освещающих революционные шаги в нейробиологии по изучению лимфатической системы мозга [132].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть 3 подготовлена при поддержке Правительственного мегагранта 075-15-2022-1094 (2022–2023 гг.); идея статьи, введение и заключение, а также часть 1 подготовлена в рамках выполнения гранта РФФИ (№ 20-15-00090, 2020–2022 гг.); часть 2 подготовлена при поддержке РФФИ проекта (№ 22-15-00143, 2022–2024 гг.), часть 4 подготовлена при выполнении гранта РФФИ (№ 21-75-10088, 2021–2023 гг.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в подготовку рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Davson D, Welch K, Segal MB* (1987) Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid. Churchill Livingstone. Edinburgh.
2. *Bergsteiner M* (2001) Evolving concepts of cerebrospinal fluid. *Neurosurg Clin N Am* 36: 631–638.
3. *Abbott NJ* (2004) Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 45: 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.006>
4. *Rapoport S* (1976) Blood–brain Barrier in Physiology and Medicine. Raven Press. New York.
5. *Schwalbe G* (1869) Der Arachnoidalraum ein Lymphraum und sein Zusammenhang mit dem Perichoroidalraum. *Zentralbl Med Wiss* 7: 465–467.
6. *Quincke H* (1872) Zur physiologie der cerebrospinal flussigkeit. *Arch Anat Physiol. Leipzig*.
7. *Key A, Retzius G* (1875) Studien In Der Anatomie Des Nervensystems Und Des Bindegewebes I and II. Stockholm. Samson & Wallin 1.
8. *Foldi M, Gellert A, Kozma M, Poberai M, Zoltan OT, Csanda E* (1966) New contributions to the anatomical connections of the brain and the lymphatic system. *Acta Anat (Basel)* 64: 498–505.
9. *Courtice FC, Simmonds WJ* (1951) The removal of protein from the subarachnoid space. *Aust J Exp Biol Med Sci* 29: 255–263. <https://doi.org/10.1038/icb.1951.30>
10. *Simmonds WJ* (1953) The Absorption of Labeled Erythrocytes from the Subarachnoid Space in Rabbits. *Austral J Exp Biol Med Sci* 31: 77. <https://doi.org/10.1038/icb.1953.10>
11. *Brinker T, Baer M, Foldi M* (1994) Manual Lymphatic Drainage of the Head and the Neck for Treatment of Increase Intracranial Pressure. *Progress In Lymphol XIV*, Witte MN, Witte CL (eds). *Lymphology* 27 (Suppl): 614–617.
12. *Caversaccio M, Peschel O, Arnold W* (1996) The Drainage of the Cerebrospinal Fluid into the Lymphatic System Neck in Humans. *ORL* 58: 164–166. <https://doi.org/10.1159/000276818>
13. *McComb GJ, Hyman S, Weiss MH* (1984) Lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in the cat. In: *Hydrocephalus*, New York. Raven Press. 83–97.
14. *Hasuo M, Asano Y, Teraoka M, Ikeyama A, Kageyama N* (1981) Cerebrospinal fluid absorption into lymphatic system in condition of increased intracranial pressure. *No To Shinkei* 33: 673–678.
15. *McComb JG, Davson H, Hyman S, Weiss MH* (1982) Cerebrospinal fluid drainage as influenced by ventricular pressure in the rabbit. *J Neurosurg* 56: 790–797. <https://doi.org/10.3171/jns.1982.56.6.0790>
16. *Naruse I, Ueta E* (2002) Hydrocephalus manifestation in the genetic polydactyly/ arhinencephaly mouse (Pdn/Pdn). *Congenit Anom (Kyoto)* 42: 27–31. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2002.tb00851.x>
17. *Smith DR, Hardman JM, Earle KM* (1969) Metastasizing Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System. *Neurosurgery* 31: 50–58.
18. *McComb JG* (1983) Recent Research into the Nature of Cerebrospinal Fluid Formation and Absorption. *J Neurosurg* 59: 369–383. <https://doi.org/10.3171/jns.1983.59.3.0369>
19. *Koh L, Zakharov A, Johnston M* (2005) Integration of the subarachnoid space and lymphatics: Is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal Fluid Res* 2: 6. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-2-6>
20. *Jackson RT, Tigges J, Arnold W* (1979) Subarachnoid Space of the CNS, Nasal Mucosa and Lymphatic System. *Arch Otolaryngol* 105: 180–184. <https://doi.org/10.1001/archotol.1979.00790160014003>
21. *Si J, Chen L, Xia Z* (2006) Effects of cervical-lymphatic blockade on brain edema and infarction volume in cerebral ischemic rats. *Chin J Physiol* 49: 258–265.
22. *Radjavi A, Smirnov I, Derecki N, Kipnis J* (2014) Dynamics of the meningeal CD4⁺ T-cell repertoire are defined by the cervical lymph nodes and facilitate cognitive task performance in mice. *Mol Psychiatry* 19: 531–532. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.79>
23. *Xing C, Lu X, Wei S, Wang J, Xiang D* (1994) The effect of blocking the cervical lymphatic drainage of rabbit on its cerebral structure and function in the acute lymphostasis stage. In: *Progress in Lymphology XIV*. Int Soc Lymphol. Zurich. Switzerland 742–746.
24. *Lohrberg M, Wilting J* (2016) The lymphatic vascular system of the mouse head. *Cell Tissue Res* 366: 667–677. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2493-8>
25. *Ma Q, Ineichen BV, Detmar M, Proulx ST* (2017) Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphat-

- ic vessels and is reduced in aged mice. *Nat Commun* 8 (1): 1434.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01484-6>
26. *Cserr HF* (1984) *Convection of Brain Interstitial Fluid Hydrocephalus*. NY. Raven Press.
 27. *Kida S, Pantazis A, Weller R* (1993) CSF drains directly from the subarachnoid space into lymphatics in the rat brain. *Anatomy, histology and immunological significance. Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 480–488.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1993.tb00476.x>
 28. *Butler A* (1984) *Correlated Physiologic and Structural Studies of CSF Absorption Hydrocephalus*. NY. Raven Press.
 29. *Brinker T, Ludemann W, Berens von Rautenfeld D, Samii M* (1997) Dynamic Properties of Lymphatic Pathways for the Absorption of Cerebrospinal Fluid. *Acta Neuropathol* 94: 493–498.
<https://doi.org/10.1007/s004010050738>
 30. *Johnson M, Papaiconomou C* (2002) Cerebrospinal fluid transport: a lymphatic perspective. *News Physiol Sci* 17: 227–230.
<https://doi.org/10.1152/nips.01400.2002>
 31. *Papaiconomou C, Bozanovic-Sosic R, Zakharov A, Johnson M* (2002) Does neonatal cerebrospinal fluid occur via arachnoid projections or extracranial lymphatics? *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 283: R869–R876.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00173.2002>
 32. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Postnov D, Kurths J* (2018) Blood–Brain Barrier, Lymphatic Clearance, and Recovery: Ariadne’s Thread in Labyrinths of Hypotheses. *Int J Mol Sci* 19 (12): 3818.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123818>
 33. *Sokołowski W, Barszcz K, Kupczyńska M, Czubaj N, Skibniewski M, Purzyc H* (2018) Lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in mammals – are arachnoid granulations the main route of cerebrospinal fluid outflow? *Biologia (Bratisl)* 73 (6): 563–568.
<https://doi.org/10.2478/s11756-018-0074-x>
 34. *Proulx ST* (2021) Cerebrospinal fluid outflow: a review of the historical and contemporary evidence for arachnoid villi, perineural routes, and dural lymphatics. *Cell Mol Life Sci* 78 (6): 2429–2457.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03706-5>
 35. *Bakker ENTP, Naessens DMP, VanBavel EB* (2019) Paravascular spaces: entry to or exit from the brain? *Exp Physiol* 104 (7): 1013–1017.
<https://doi.org/10.1113/EP087424>
 36. *Dupont G, Schmidt C, Yilmaz E, Oskouian RJ, Macchi V, de Caro R, Tubbs RS* (2019) Our current understanding of the lymphatics of the brain and spinal cord. *Clin Anat* 32 (1): 117–121.
<https://doi.org/10.1002/ca.23308>
 37. *Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J* (2018) The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron* 100 (2): 375–388.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.022>
 38. *Hladky SB, Barrand MA* (2022) The glymphatic hypothesis: the theory and the evidence. *Fluids Barriers CNS* 19: 9.
<https://doi.org/10.1186/s12987-021-00282-z>
 39. *Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A* (2010) Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* 17: 295–306.
<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.10.007>
 40. *Louveau A, Smirnov I, Keyes T, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J* (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523: 337–341.
<https://doi.org/10.1038/nature14432>
 41. *Da Mesquita S, Louveau, A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison CR, Kingsmore KM, Contarino C, Onengut-Gumuscu S, Farber E, Raper D, Viar KE, Powell RD, Baker W, Dabhi N, Bai R, Cao R, Hu S, Rich SS, Munson JM, Lopes MB, Overall CC, Acton ST, Kipnis J* (2018) Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer’s disease. *Nature* 560: 185–191.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8>
 42. *Hu X, Deng Q, Ma L, Li Q, Chen Y, Liao Y, Zhou F, Zhang C, Shao L, Feng J, He T, Ning W, Kong Y, Huo Y, He A, Liu B, Zhang J, Adams R, He Y, Tang F, Bian X, Luo J* (2020) Meningeal lymphatic vessels regulate brain tumor drainage and immunity. *Cell Res* 30 (3): 229–243.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0287-8>
 43. *Chen J, Wang L, Xu H, Xing L, Zhuang Z, Zheng Y, Li X, Wang C, Chen S, Guo Z, Liang Q, Wang Y* (2020) Meningeal lymphatics clear erythrocytes that arise from subarachnoid hemorrhage. *Nat Commun* 11: 3159.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16851-z>
 44. *Liu X, Gao C, Yuan, J, Xiang T, Gong Z, Luo H, Jiang W, Song Y, Huang J, Quan W, Wang D, Tian Y, Ge X, Lei P, Zhang J, Jiang R* (2020) Subdural haematomas drain into the extracranial lymphatic system through the meningeal lymphatic vessels. *Acta Neuropathol Commun* 8: 16.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-0888-y>
 45. *Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4 (147): 147ra111.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
 46. *Jessen NA, Munk AS, Lundgaard I, Nedergaard M* (2015) The Glymphatic System: A Beginner’s Guide. *Neurochem Res* 40 (12): 2583–2599.
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
 47. *Smith AJ, Jin BJ, Verkman AS* (2015) Muddying the water in brain edema? *Trends Neurosci* 38 (6): 331–332.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.006>
 48. *Nikolenko VN, Oganessian MV, Yakhno NN, Orlov EA, Porubaeva EE, Popova EYu* (2018) Glymphatic system of the brain: functional anatomy and clinical perspectives. *Neurol Neuropsych Psychosomat* 10 (4): 94–100.
 49. *Nikolenko VN, Nikitina AT, Sozonova EA, Pavliv MP, Oganessian MV, Rizaeva NA* (2021) Morphology, mechanisms of regulation and the role of the drainage systems of the CNS in the metabolism of brain tissues. In: *Lymphology: from basic research to medical technology. Proc XIV Int Sci Pract Confer. Novosibirsk* 20–25.
 50. *Bradbury MW, Cserr HF, Westrop RJ* (1981) Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol* 240: F329–F336.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1981.240.4.F329>

51. Ma Q, Ries M, Decker Y, Müller A, Riner C, Bückner A, Fassbender K, Detmar M, Proulx ST (2019) Rapid lymphatic efflux limits cerebrospinal fluid flow to the brain. *Acta Neuropathol* 137: 151–165.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1916-x>
52. Min Rivas F, Liu J, Martell BC, Du T, Mestre H, Nedergaard M, Tithof J, Thomas JH, Kelley DH (2020) Surface periaxonal spaces of the mouse brain are open, not porous. *J R Soc Interface* 17 (172): 20200593.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0593>
53. Cserr HF, Depasquale M, Patlak CS (1987) Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolality in rats. *Am J Physiol* 253: F522–F529.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1987.253.3.F522>
54. Abbott NJ, Pizzo ME, Preston JE, Janigro D, Thorne RG (2018) The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a “glymphatic” system? *Acta Neuropathol* 135 (3): 387–407.
<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>
55. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M (2021) Fluid transport in the brain. *Physiol Rev* 3: 66.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2020>
56. Schley D, Carare-Nnadi R, Please CP, Perry VH, Weller RO (2006) Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *J Theoret Biol* 238: 962–974.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.07.005>
57. Rennels ML, Blaumanis OR, Grady PA (1990) Rapid solute transport throughout the brain via paravascular fluid pathways. *Adv Neurol* 52:431–439.
58. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano A, Deane R, Nedergaard M (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342: 373–377.
<https://doi.org/10.1126/science.1241224>
59. Iliff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, Benveniste H (2013) Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest* 123 (3): 1299–1309.
<https://doi.org/10.1172/JCI67677>
60. Iliff JJ, Wang M, Zeppenfeld DM, Venkataraman A, Plog BA, Liao Y, Deane R, Nedergaard M (2013) Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J Neurosci* 33 (46): 18190–18199.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1592-13.2013>
61. Bedussi B, Almasian M, de Vos J, VanBavel E, Bakker ENTP (2018) Paravascular spaces at the brain surface: Low resistance pathways for cerebrospinal fluid flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 38: 719–726.
<https://doi.org/10.1177/0271678X17737984>
62. Mestre H, Tithof J, Du T, Song W, Peng W, Sweeney AM, Olveda G, Thomas JH, Nedergaard M, Kelley DH (2018) Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. *Nat Commun* 9: 4878.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07318-3>
63. Raghunandan A, Ladrón-de-Guevara A, Tithof J, Mestre H, Nedergaard M, Thomas JH, Kelley DH (2020) Bulk flow of cerebrospinal fluid observed in periaxonal spaces is not an artifact of injection. *Elife* 10: e65958.
<https://doi.org/10.7554/eLife.65958>
64. Koundal S, Elkin R, Nadeem S, Xue Y, Constantinou S, Sanggaard S, Liu X, Monte B, Xu F, Van Nostrand W, Nedergaard M, Lee H, Wardlaw J, Benveniste H, Tannenbaum A (2020) Optimal mass transport with Lagrangian workflow reveals advective and diffusion driven solute transport in the glymphatic system. *Sci Rep* 10 (1): 1–18.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59045-9>
65. Xue Y, Liu X, Koundal S, Constantinou S, Dai F, Santambrogio L, Lee H, Benveniste H (2020) In vivo T1 mapping for quantifying glymphatic system transport and cervical lymph node drainage. *Sci Rep* 10: 14592.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71582-x>
66. Diem AK, Sharp MM, Gatherer M, Bressloff NW, Carare RO, Richardson G (2017) Arterial pulsations cannot drive intramural periaxonal drainage: Significance for Aβ drainage. *Front Neurosci* 11: 475.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00475>
67. Asgari M, de Zélicourt DA, Kurtcuoglu V (2016) Glymphatic solute transport does not require bulk flow. *Sci Rep* 6: 38635.
<https://doi.org/10.1038/srep38635>
68. Wagshul ME, Eide PK, Madsen JR (2011) The pulsating brain: a review of experimental and clinical studies of intracranial pulsatility. *Fluids and Barriers CNS* 8 (1): 1–23.
<https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-5>
69. Butler WE (2017) Wavelet brain angiography suggests arteriovenous pulse wave phase locking. *PloS One* 12 (11): e0187014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187014>
70. Postnov D, Erdener SE, Kilic K, Boas DA (2018) Cardiac pulsatility mapping and vessel type identification using laser speckle contrast imaging. *Biomed Optics Express* 9 (12): 6388–6397.
<https://doi.org/10.1364/BOE.9.006388>
71. Kiviniemi V, Wang X, Korhonen V, Keinänen T, Tuovinen T, Autio J, LeVan P, Keilholz S, Zang Y-F, Hennig J, Nedergaard M (2016) Ultra-fast magnetic resonance encephalography of physiological brain activity – Glymphatic pulsation mechanisms? *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 1033–1045.
<https://doi.org/10.1177/0271678X15622047>
72. Vinje V, Ringstad G, Lindström EK, Valnes LM, Rognes ME, Eide PK, Mardal KA (2019) Respiratory influence on cerebrospinal fluid flow—a computational study based on long-term intracranial pressure measurements. *Scient Rep* 9 (1): 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46055-5>
73. Fultz NE, Bonmassar G, Setsompop K, Stickgold RA, Rosen BR, Polimeni JR, Lewis LD (2019) Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science* 366 (6465): 628–631.
<https://doi.org/10.1126/science.aax5440>
74. Brierley JB (1950) The penetration of particulate matter from the cerebrospinal fluid into the spinal ganglia, peripheral nerves, and perivascular spaces of the central nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 13: 203–215.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.13.3.203>
75. Smith A, Akdemir G, Wadhwa M, Song D, Verkman A (2021) Application of fluorescent dextrans to the brain surface under constant pressure reveals AQP4-indepen-

- dent solute uptake. *J Gen Physiol* 153: e202112898. <https://doi.org/10.1085/jgp.202112898>
76. Wang P, Olbricht WL (2011) Fluid mechanics in the perivascular space. *J Theoret Biol* 274: 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.01.014>
 77. Kedarasetti RT, Drew PJ, Costanzo F (2020) Arterial pulsations drive oscillatory flow of CSF but not directional pumping. *Sci Rep* 10: 10102. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66887-w>
 78. Thomas J (2019) Fluid dynamics of cerebrospinal fluid flow in perivascular spaces. *J R Soc Interface* 16: 20190572. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0572>
 79. Martinac AD, Bilston LE (2019) Computational modeling of fluid and solute transport in the brain. *Biomech Modeling Mechanobiol* 19: 781–800. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01253-y>
 80. Faghih MM, Keith SM (2021) Mechanisms of tracer transport in cerebral perivascular spaces. *J Biomech* 118: 110278. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2021.110278>
 81. Postnov DE, Postnikov EB, Karavaev AS, Glushkovskaya-Semyachkina OV (2018) On trans-parenchymal transport after blood brain barrier opening: pump-diffuse-pump hypothesis. *Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII. Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. Int Soc Optics and Photonics* 10717: 107171W. <https://doi.org/10.1117/12.2315196>
 82. Sharp MK, Carare RO, Martin BA (2019) Dispersion in porous media in oscillatory flow between flat plates: applications to intrathecal, periaxial and paraaxial solute transport in the central nervous system. *Fluids Barriers CNS* 16: 13. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0132-y>
 83. Troyetsky DE, Tithof J, Thomas JH, Kelley DH (2021) Dispersion as a waste-clearance mechanism in flow through penetrating perivascular spaces in the brain. *Sci Rep* 11: 4595. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83951-1>
 84. Wang MX, Ray L, Tanaka KF, Iliff JJ, Heys J (2021) Varying perivascular astroglial endfoot dimensions along the vascular tree maintain perivascular-interstitial flux through the cortical mantle. *Glia* 69: 715–728. <https://doi.org/10.1002/glia.23923>
 85. Mestre H, Hablitz LM, Xavier AL, Feng W, Zou W, Pu T, Monai H, Murlidharan G, Castellanos Rivera RM, Simon MJ, Pike MM, Plá V, Du T, Kress BT, Wang X, Plog BA, Thrane AS, Lundgaard I, Abe Y, Yasui M, Thomas JH, Xiao M, Hirase H, Asokan A, Iliff JJ, Nedergaard M (2018) Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *ELife* 7: e40070. <https://doi.org/10.7554/eLife.40070>
 86. Smith AJ, Yao X, Dix JA, Jin B-J, Verkman AS (2017) Test of the ‘glymphatic’ hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. *ELife* 6: e27679. <https://doi.org/10.7554/eLife.27679>
 87. Smith AJ, Verkman AS (2018) The “glymphatic” mechanism for solute clearance in Alzheimer’s disease: game changer or unproven speculation? *FASEB J* 32: 543–551. <https://doi.org/10.1096/fj.201700999>
 88. Smith AJ, Verkman AS (2019) Cross Talk opposing view: Going against the flow: interstitial solute transport in brain is diffusive and aquaporin-4 independent. *J Physiol (Lond)* 597: 4421–4424. <https://doi.org/10.1113/JP277636>
 89. Ray LA, Heys JJ (2019) Fluid flow and mass transport in brain tissue. *Fluids* 4: 196–233. <https://doi.org/10.3390/fluids4040196>
 90. Obersteiner H (1900) *The Anatomy of the Central Nervous Organs in Health and Disease*. 2nd Ed. London. Charles Griffin and Company Ltd. 174–175.
 91. Bruce A, Dawson JW (1911) On the relations of the lymphatics of the spinal cord. *J Pathol Bacteriol* 15: 169–178. <https://doi.org/10.1002/path.1700150204>
 92. Prineas JW (1979) Multiple sclerosis: Presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord. *Science* 203: 1123–1125. <https://doi.org/10.1126/science.424741>
 93. Chaitanya GV, Omura S, Sato F, Martinez NE, Minagar A, Ramanathan M, Guttman BW, Zivadnov R, Tsunoda I, Alexander JS (2013) Inflammation induces neuro-lymphatic protein expression in multiple sclerosis brain neurovasculature. *J Neuroinflammation* 14 (10): 125. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-125>
 94. Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS, Addicks K, Ruddle NH, Lehmann PV (2012) Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta Neuropathol* 124: 861–873. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1023-3>
 95. Mezey E, Szalayova I, Hogden CT, Brady A, Dosa A, Sotonui P, Palkovits M (2021) An immunohistochemical study of lymphatic elements in the human brain. *PNAS* 118 (3): 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002574118>
 96. Morris AW, Carare RO, Schreiber S, Hawkes CA (2014) The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Aging Neurosci* 19 (6): 251. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00251>
 97. Chikly B (1998) Is Human Cerebrospinal Fluid Reabsorbed by Lymph? LDT and Manual drainage of the CNS. *J Am Acad Osteopathy (JAAO)* 8 (2): 28–34.
 98. Antila S, Karaman S, Nurmi H, Airavaara M, Voutilainen MH, Mathivet T, Chilov D, Li Z, Koppinen T, Park JH, Fang S, Aspelund A, Saarma M, Eichmann A, Thomas JL, Alitalo K (2017) Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels. *J Exp Med* 214 (12): 3645–3667. <https://doi.org/10.1084/jem.20170391>
 99. Wigle JT, Oliver G (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98: 769–778. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81511-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81511-1)

100. Escobedo N, Oliver G (2016) Lymphangiogenesis: Origin, Specification, and Cell Fate Determination. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32: 677–691. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-124944>
101. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5: 74–80. <https://doi.org/10.1038/ni1013>
102. Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol* 9 (1): 207–299. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180015>
103. Hägerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, Alitalo K, Andresen V, Schulte-Merker S, Kiefer F (2013) A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J* 32: 629–644. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.340>
104. Kunert C, Baish JW, Liao S, Padera TP, Munn LL (2015) Mechanobiological oscillators control lymph flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (35): 10938–10943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508330112>
105. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ (2016) Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol* 594 (20): 5749–5768. PMID: <https://doi.org/10.1113/jp27208827219461>
106. Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin J, Kaldy P, Kühn LC (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 21: 3643–3649. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06038.x>
107. Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecav M (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 442–448. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91390-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91390-X)
108. Drapier JC, Hibbs Jr B (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol* 269: 26–36. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)69006-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)69006-5)
109. Dimmeler S, Lottspeich F, Brüne B (1992) Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 16771–16774. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41847-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41847-9)
110. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 444–448. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.444>
111. Helms C, Kim-Shapiro DB (2013) Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med* 61: 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.028>
112. Ahn JH, Cho H, Kim JH, Kim SH, Ham JS, Park I, Suh SH, Hong SP, Song JH, Hong YK, Jeong Y, Park SH, Koh GY (2019) Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature* 572: 62–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1419-5>
113. Lessen MV, Shibata-Germanos S, Impel AV, Hawkins TA, Rihel J, Schulte-Merker S (2017) Intracellular uptake of macromolecules by brain lymphatic endothelial cells during zebrafish embryonic development. *eLife* 6: e25932. <https://doi.org/10.7554/eLife.25932>
114. Fox RJ, Walji AH, Mielke B, Petruk KC, Aronyk KE (1996) Anatomic details of intradural channels in the parasagittal dura: a possible pathway for flow of cerebrospinal fluid. *Neurosurgery* 39: 84–91. <https://doi.org/10.1097/00006123-199607000-00017>
115. Osaka K, Handa H, Matsumoto S, Yasuda M (1980) Development of the cerebrospinal fluid pathway in the normal and abnormal human embryos. *Child's Brain* 6: 26–38. <https://doi.org/10.1159/000119881>
116. Jayatilaka ADP (1969) Arachnoid Granulations and Arachnoid Villi in Mammals. *C B Y I O N J Med Sci* 18:1.
117. Semyachkina-Glushkovskaya O, Fedosov I, Navolokin N, Shirokov A, Maslyakova G, Bucharskaya A, Blokhina I, Terskov A, Khorovodov A, Postnov D, Kurths J (2021) Pilot identification of the Live-1/Prox-1 expressing lymphatic vessels and lymphatic elements in the unaffected and affected human brain. *bioRxiv* 2021.09.05.458990. <https://doi.org/10.1101/2021.09.05.458990>
118. Semyachkina-Glushkovskaya O, Penzel T, Blokhina I, Khorovodov A, Fedosov I, Yu T, Karandin G, Evsukova A, Elovenco D, Adushkina V, Shirokov A, Dubrovskii A, Terskov A, Navolokin N, Tzoy M, Ageev V, Agranovich I, Telnova V, Tsven A, Kurths J (2021) Night Photostimulation of Clearance of Beta-Amyloid from Mouse Brain: New Strategies in Preventing Alzheimer's Disease. *Cells* 10: 3289. <https://doi.org/10.3390/cells10123289>
119. Aspelund A, Anttila S, Proulx ST, Karlén TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med* 212 (7): 991–999. <https://doi.org/10.1084/jem.20142290>
120. Bolte AC, Dutta AB, Hurt ME, Igor Smirnov I, Kovacs MA, McKee CA, Hannah Ennerfelt E, Shapiro D, Nguyen BH, Frost EL, Lammert CR, Kipnis J, Lukens JR (2020) Meningeal lymphatic dysfunction exacerbates traumatic brain injury pathogenesis. *Nat Commun* 11: 4524. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18113-4>
121. Semyachkina-Glushkovskaya O, Esmat A, Bragin D, Bragina O, Shirokov AA, Navolokin N, Yang Y, Abdurashitov A, Khorovodov A, Terskov A, Klimova M, Mamedova A, Fedosov I, Tuchin V, Kurths J (2020) Phenomenon of music-induced opening of the blood-brain barrier in healthy mice. *Proc R Soc B* 287: 20202337. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2337>
122. Song E, Mao T, Dong H, Boisserand LSB, Anttila S, Bosenberg M, Alitalo K, Thomas JL, Iwasaki A (2020) VEGF-C-driven lymphatic drainage enables immunosurveillance of brain tumours. *Nature* 577 (7792): 689–694. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1912-x>
123. Graham MS, Mellinshoff IK (2021) Meningeal lymphatics prime tumor immunity in glioblastoma. *Cancer Cell* 39 (3): 304–306. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.02.012>

124. *Mascagni P, Bellini GB* (1816) *Presso Euse bio Pacinie Figlio: Florence.*
125. *Mascagni P* (1787) *De lymphaticis profundis capitis et colli. Vasorum lymphaticorum corporis humani historia et ichnographia. Pars Prima Section VII, Art. VI. Siena: Pazzini Carli.*
126. *Lecco V* (1953) *Di una probabile modificazione delle fissure linfatiche della della parte dei seni venosi della dura madre. Arch Ital Otol Rinol Laringol* 64: 287–296.
127. *Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, Louveau A, Zaghoul KA, Pittaluga S, Kipnis J, Reich DS* (2017) Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife* 6: e29738. <https://doi.org/10.7554/eLife.29738>
128. *Mezey É, Palkovits M* (2015) Forgotten findings of brain lymphatics. *Nature* 524: 415. <https://doi.org/10.1038/524415b>
129. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Postnov D, Lavrova A, Fedosov I, Borisova E, Nikolenko V, Penzel T, Kurths J, Tuchin V* (2021) Biophotonic Strategies of Measurement and Stimulation of the Cranial and the Extracranial Lymphatic Drainage Function. *IEEE J Selected Topics in Quantum Electron* 27 (4): 1–13. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2020.3045834>
130. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Fedosov I, Shirokov A, Vodovozov E, Alekseev A, Khorovodov A, Blokhina I, Terskov A, Mamedova A, Klimova M, Dubrovsky A, Ageev V, Agranovich I, Vinnik V, Tsven A, Sokolovski S, Rafailov E, Penzel T, Jürgen Kurths J* (2021) Photomodulation of lymphatic delivery of liposomes to the brain bypassing the blood-brain barrier: new perspectives for glioma therapy. *Nanophotonics* 10 (12): 3215–3227. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0212>
131. *Salehpour F, Khademi M, Bragin DE, DiDuro JO* (2022) Photobiomodulation Therapy and the Glymphatic System: Promising Applications for Augmenting the Brain Lymphatic Drainage System. *Int J Mol Sci* 23 (6): 2975. <https://doi.org/10.3390/ijms23062975>
132. <https://lymphalelessons.com>

LYMPHATIC DRAINAGE SYSTEM OF THE BRAIN: A NEW PLAYER IN NEUROSCIENCE

**O. V. Semyachkina-Glushkovskaya^{a, #}, D. E. Postnov^a, A. P. Khorovodov^a,
N. A. Navolokin^a, and Yu. G. G. Kurthz^{a, b, c}**

^a *Saratov State University, Saratov, Russia*

^b *Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany*

^c *Potsdam Institute for the Study of Climate Change, Potsdam, Germany*

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

The lymphatic system not only plays an important role as a drainage eliminating metabolic wastes and toxins from tissues, but also represents an arena for the unfolding of immune response scenarios aimed at protecting the organism from bacteria and viruses. In the central nervous system (CNS), drainage processes proceed with the same intensity as in peripheral tissues. The brain actively exchanges nutrients with the blood and excretes metabolic waste products through the drainage paths closely related to the peripheral lymphatic system. The same routes allow the traffic of immune cells and antibodies to the CNS, thus providing a communication between the peripheral and central immune systems. Over the two-century history of brain drainage studies, a lot of facts have been accumulated to suggest indirectly the presence of lymphatic vessels in the CNS. However, even with the advent of high-tech imaging of brain structures and a rediscovery of the meningeal lymphatic vessels (MLVs), which was a watershed in neuroscience, scientists have not advanced beyond confirming the already existing dogma that the lymphatic network is present exclusively in the brain meninges, but not in brain tissues. In fact, however, the rediscovery of MLVs by American scientists was not a “true revelation”, as they were first described by the Italian anatomist Mascagni two centuries earlier, and his results were confirmed later on in many other studies performed on the meninges in humans, macaques, rodents, dogs, rabbits and zebrafish. As a result, the scientific community did not recognize the “forgotten” MLVs as a new discovery. This review highlights the turning points that occurred in neuroscience, when a new player has entered the game and set in order bicentennial efforts of scientists to explain how unnecessary molecules and toxins are removed from the brain, as well as how drainage and immunity are implemented in the CNS. This is an important informational and creative platform both for new fundamental knowledge about the lymphatic system in the brain, as well as for the development of innovative neurorehabilitation technologies based on the management of lymphatic drainage processes.

Keywords: Lymphatic system, meningeal lymphatic vessels, glymphatic hypothesis, mechanism of drainage of the brain, lymphatic excretion of metabolites and toxins

ИЗУЧЕНИЕ ЗАЩИТНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕПРИВАЦИИ ГЛЮКОЗЫ И КИСЛОРОДА *IN VITRO*

© 2023 г. И. О. Захарова¹, И. И. Зорина¹, Л. В. Баюнова¹, А. О. Шпаков¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

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

*e-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.

После доработки 17.11.2022 г.

Принята к публикации 18.11.2022 г.

Инсулин при интраназальном введении является одним из наиболее перспективных протекторов для лечения нейродегенеративных и других болезней, связанных с поражениями мозга. Интересно, что при этих болезнях уровень инсулина в мозге (в противоположность его уровню в крови), как правило, сильно снижается, что, наряду с развитием резистентности к нему, приводит к нарушению инсулинового сигналинга в нейронах. При изучении *in vitro* механизмов защитного эффекта нейропротекторов при ишемии и реперфузии мозга используются разные модели. Целью настоящей работы является изучение защитного эффекта инсулина на нейроны коры мозга в культуре и его механизма действия при депривации глюкозы и кислорода (ДГК) и последующем восстановлении снабжения нейронов этими соединениями. Показано, что воздействие на нейроны ДГК в течение 1 или 3 ч с последующей инкубацией в полной ростовой среде с глюкозой и кислородом приводит к снижению жизнеспособности нейронов и увеличению образования активных форм кислорода, а преинкубация нейронов с инсулином в микромолярных концентрациях оказывает нейропротекторный и антиоксидантный эффекты. Найдено, что воздействие на нейроны ДГК в течение 1 ч и затем инкубация в полной ростовой среде приводит к падению активности протеинкиназы B – Akt (снижению отношения pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt) и активации киназы гликогенсинтазы-3бета (GSK-3бета), одной из основных мишеней Akt, что выражается в снижении отношения pGSK-3бета (Ser⁹)/GSK-3бета. Преинкубация с инсулином, напротив, активирует Akt и инактивирует GSK-3бета. Эти эффекты инсулина, очевидно, вносят существенный вклад в его нейропротекторный эффект, т.к. активация GSK-3бета приводит к нарушению функций митохондрий и гибели нейронов. Показано также увеличение активности протеинкиназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK1/2), при действии инсулина на нейроны, которая снижалась при действии ДГК с последующей инкубацией в полной ростовой среде.

Ключевые слова: нейроны коры мозга, депривация глюкозы и кислорода, инсулин, нейропротекторный эффект, протеинкиназы

DOI: 10.31857/S0044452923010096, **EDN:** GXXUDU

Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов среди тех, которые могут быть использованы в будущем в клинике для лечения ряда болезней, связанных с поражениями мозга. Во многих экспериментах показано, что при интраназальном введении инсулина животным с нейродегенеративными или диабетическими поражениями мозга, он повышает жизнеспособность нейронов и улучшает когнитивные функции мозга [1–4]. Наряду с этим клинические испытания инсулина при болезни Альцгеймера были достаточно успешными [5–8]. Дело в том, что при интраназальном введении инсулина он попадает непосредственно в мозг, используя структуры обонятельного и тройничного нервов и минуя гематоэнцефалический барьер [9, 10]. Интересно, что при таких болезнях, как сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, болезни Альцгеймера и Пар-

кинсона, уровень инсулина заметно увеличен в крови, а в мозге он, напротив, сильно снижается. Уменьшение уровня инсулина и резистентность клеток к инсулину при этих болезнях приводят к нарушению инсулинового сигналинга в нейронах разных районов мозга [11, 12]. При интраназальном введении инсулина он способен нормализовать метаболические процессы в мозге, в том числе в гипоталамусе, и, как следствие, также и в периферических органах [12, 13]. При этом эффекты инсулина изучены пока недостаточно. В наибольшей мере это относится к ишемии и реперфузии мозга, при которой эффекты интраназального введения инсулина только начинают исследоваться. В отличие от нейродегенеративных и диабетических патологий, при исследовании процессов ишемии и реперфузии мозга ученые сосредоточились преимущественно на изучении эффектов инсулин-по-

добного фактора роста (IGF-1) [см., например, 14–16], а не инсулина. И это, несмотря на то, что инсулин, вводимый интраназально, является, очевидно, более перспективным нейропротектором, чем IGF-1 [17]. В литературе нам не встретилось работ, посвященных изучению эффектов интраназального введения инсулина животным с ишемией и реперфузией мозга. Исключение составляют лишь работы нашей лаборатории. Показано, что инсулин при его интраназальном введении крысам с глобальной ишемией и реперфузией переднего мозга обладает антиоксидантным и нейропротекторным эффектом, предотвращает накопление в коре мозга различных продуктов перекисного окисления липидов и окислительную инактивацию Na^+ , K^+ -АТФазы. Также были выявлены различия метаболизма у старых и молодых крыс при ишемии и реперфузии мозга [18, 19].

При изучении *in vitro* механизмов защитного эффекта инсулина и других протекторов при ишемии и реперфузии мозга используются разные модели. С одной стороны, это модели, объясняющие модуляцию активности каких сигнальных систем тем или иным протектором, включая инсулин, способна снижать образование активных форм кислорода (АФК) и нормализовать метаболизм в ткани мозга. С другой стороны, это модели, пытающиеся показать, каким образом нейропротекторы противостоят повреждающему действию ДГК и последующему нарушению метаболизма, связанному с прекращением депривации этих соединений. Экспериментальный подход с использованием депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в культурах нейронов *in vitro* представляет собой попытку смоделировать ограничение или прекращение кровоснабжения, которое наблюдается при ишемии нервной ткани, и приводит к резкому снижению уровня кислорода и глюкозы в мозге. Восстановление уровня глюкозы и оксигенации клеток соответствует восстановлению кровотока, что соотносится с реперфузионным повреждением. Следует отметить, что исследования механизма нейропротекторного действия инсулина на нейроны в культуре, подвергнутые депривации глюкозы и кислорода [20, 21], являются пока единичными и неполными.

Целью настоящей работы является изучение способности инсулина оказывать нейропротекторный и антиоксидантный эффекты, предотвращая гибель нейронов коры мозга и метаболические нарушения в них при депривации глюкозы и кислорода и последующем восстановлении снабжения клеток этими соединениями. Проведенное исследование направлено на выяснение механизма нейропротекторного эффекта инсулина при ишемии и реперфузии мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Использовали перекись водорода, бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ), додецилсульфат натрия, ди-

хлоридигидрофлуоресцеин-диацетат, NADH и инсулин, приобретенные у фирмы (Sigma, США). Среду инкубации Neurobasal medium и ростовые добавки В-27 и В-27 без инсулина закупали у фирмы Gibco (Великобритания). В работе использовались диметилформамид фирмы Вектон (Россия) и раствор Хенкса от фирмы Биолот (Россия).

Выделение и культивирование нейронов коры мозга. Выделение нервных клеток проводили из коры мозга эмбрионов крыс линии Wistar на 17–18-й день развития согласно модифицированному методу Дичтера [22], как это описано ранее [23]. Полученные клетки 2 раза промывали раствором Хенкса и осторожно ресуспендировали в 3 мл среды Neurobasal medium, содержащей 2% ростовой добавки В-27, 2 мМ глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (полная ростовая среда). Подсчет клеток для оценки плотности их посадки проводили в камере Фукса-Розенталя после окрашивания клеток трипановым синим. Первичную культуру нейронов выращивали в полной ростовой среде при 37°C, 5% CO_2 и влажности 100% в инкубаторе “Binder C-150” (Германия). Каждые 3 дня половину клеточной среды заменяли свежей средой.

Модель депривации глюкозы и кислорода *in vitro*. Опыты начинали на 11–12-й дни культивирования клеток в полной ростовой среде. До начала опытов проводили деаэрацию фосфатного буфера, используемого для промывки клеток, и депривационной среды, представляющей собой Neurobasal medium без глюкозы и пирувата, газовой смесью, содержащей 95% N_2 и 5% CO_2 в течение 30 мин. Затем нейроны промывали деаэрированным фосфатным буфером, переводили в деаэрированную депривационную среду и вносили инсулин в разных концентрациях. Контрольные клетки промывали фосфатным буфером и переводили в среду, аналогичную по составу депривационной, но с добавлением глюкозы до ее концентрации, присутствующей в полной ростовой среде. Клетки содержали в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 и влажности 100%. Для окончания депривации среду заменяли на полную ростовую среду. Через 24 ч оценивали жизнеспособность нейронов коры мозга с помощью МТТ-метода. Исследование антиоксидантного эффекта инсулина проводили через 40 мин после окончания депривации. Для анализа механизмов, лежащих в основе проявляемого инсулином нейропротекторного действия, проводили отбор проб сразу после окончания одночасовой ДГК и через 3 и 24 ч после последующего содержания нейронов в полной ростовой среде. Пробы затем анализировали с помощью иммуноблоттинга, определяя отношение фосфорилированных и исходных протеинкиназ, что позволяло судить об активности этих протеинкиназ на разных этапах проведения экспериментов.

Определение жизнеспособности нейронов коры мозга с помощью МТТ метода. Для определения жизнеспособности нейронов использовали колориметрический МТТ-метод. Он основан на восстановлении митохондриями жизнеспособных клеток МТТ в окрашенный МТТ-формазан [24]. Опыт начинали на 11-й день инкубации *in vitro*. Среда инкубации при проведении этих опытов описана в предыдущем разделе. Для проведения МТТ-теста 5×10^6 клеток на лунку высевали в предварительно покрытые поли-D-лизинем 24-луночные планшеты, МТТ-тест проводили, как это было описано ранее [25]. К пробам добавляли МТТ в конечной концентрации 0.05%, инкубировали в течение 2 ч, затем к пробам добавляли лизирующий раствор (в количестве 167 мкл на лунку) и проводили измерение экстинкций проб. Для приготовления лизирующего раствора использовали 36 г додецилсульфата натрия, 90 мл диметилформамида и 90 мл 0.1 N соляной кислоты. Экстинкцию контрольных проб принимали за 100%, экстинкции других проб выражали в процентах от контроля. При обобщении данных всех поставленных опытов вычисляли в каждом опыте процент клеток, гибель которых была предотвращена в результате преинкубации с инсулином в разных концентрациях ("rescue rates"). Для этого вычисляли разницу между экстинкциями проб при действии на нейроны перекиси водорода после преинкубации с инсулином и при действии одной перекиси водорода. Эту величину делили на разницу между экстинкциями контрольных проб и проб, подвергнутых действию перекиси водорода, и умножали на 100. При отсутствии защитного эффекта инсулина числитель равен 0, как и процент клеток, гибель которых была предотвращена преинкубацией с инсулином.

Для оценки влияния инсулина на жизнеспособность клеток нейроны инкубировали с разными концентрациями инсулина в диапазоне от 50 нМ до 10 мкМ (либо без него) на стадии ДГК и с теми же концентрациями инсулина на стадии "реперфузии" — при последующей инкубации в полной ростовой среде. К пробам добавляли МТТ в конечной концентрации 0.05% за 2 ч до окончания инкубации, а затем — лизирующий раствор (20%-ный раствор додецилсульфата натрия в 50%-ном диметилформамиде в 0.05 N соляной кислоте). Экстинкцию контрольных проб принимали за 100%, экстинкции других проб выражали в процентах от контроля [25].

При обобщении данных всех опытов вычисляли в каждом из них процент клеток, гибель которых была предотвращена в результате преинкубации с инсулином в разных концентрациях ("rescue rates"), как это описано ранее [26].

Определение образования активных форм кислорода в нейронах коры мозга крыс. При изучении антиоксидантного эффекта инсулина в условиях депривации глюкозы и кислорода использовали рас-

твор Рингера-Локка без глюкозы в качестве депривационной среды. Клетки промывали деаэрированным буфером Дальбекко и переводили в деаэрированный раствор Рингера-Локка (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3.6 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, pH 7.25), в который вносили инсулин до конечной концентрации 50, 500 нМ, 1, 5 и 10 мкМ. В раствор для контрольных клеток добавляли глюкозу до конечной концентрации 25 mM. После одночасовой ДГК к экспериментальным клеткам добавляли глюкозу до конечной концентрации 25 mM, а к контрольным клеткам — воду. Нейроны инкубировали с 10 мкМ дихлородигидрофлуоресцеин диацетатом в течение 40 мин. Затем клетки 2 раза промывали раствором Хенкса. После этого флуоресценцию продукта реакции АФК с дихлордигидрофлуоресцеином измеряли на планшетном флуориметре "Fluoroscan FL" ("Thermo Fisher Scientific", Финляндия) при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 538 нм. Содержание АФК выражали в условных единицах, отражающих интенсивность флуоресценции в клетках.

Определение влияния инсулина и ДГК с последующей инкубацией в полной ростовой среде на уровень фосфорилированных протеинкиназ и их экспрессию. Для анализа механизмов, лежащих в основе проявляемого инсулином защитного действия, проводили отбор проб сразу после окончания депривации и через 3 и 24 ч после их инкубации в полной ростовой среде, которые затем анализировали с помощью иммуноблоттинга. Для иммуноблоттинга нейроны коры мозга высевали в 35 мм чашки Петри в количестве 2×10^6 клеток на чашку. Клетки инкубировали в депривационной среде (или в соответствующей контрольной среде) с разными концентрациями инсулина или без него. Сразу же после окончания воздействия ДГК или через последующие 3 или 24 ч содержания нейронов в полной ростовой среде (с добавлением тех же концентраций инсулина, что и на стадии ДГК) нейроны промывали 2 раза охлажденным фосфатным буфером и лизировали в буфере, содержащем фосфатазные и протеазные ингибиторы: 50 mM трис pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 5 mM ЭДТА, 10 mM бета-глицерофосфата натрия, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM фенилметансульфонил фторида и протеазный ингибиторный коктейль (Roche, Швейцария). Концентрацию белка в пробах определяли по модифицированному методу Лоури [26]. Из каждой пробы брали аликвоту, содержащую 25 мкг белка и разделяли методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Затем белки переносили на нитроцеллюлезные мембраны (Amersham, GE, Healthcare, UK). Неспецифическое связывание мембран блокировали, как это было описано ранее [26]. Блоты затем в течение ночи подвергали действию моноклональных антител, специфичных для тех соединений, уровень которых подлежал определению. В опытах использова-

ли первичные антитела против pAkt (Ser⁴⁷³) (1:1000), Akt (1:1000), pGSK-3beta (Ser⁹) (1:1000), GSK-3beta (1:1000), ERK1/2 (1:1000) от Cell Signaling Technology (США). Антитела против pERK1 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), ERK2 (Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷) (1:2000), альфа-тубулина (1:2000) были произведены фирмой Sigma-Aldrich (США).

Блоты промывали три раза 0.1%-ным Tween 20 в солевом растворе Трис-буфера и инкубировали либо с HRP-IgG антимышиным, либо с HRP-IgG антикроличьим вторичным антителом (Cell Signaling Technology, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для определения изменения экспрессии общих ERK1/2, Akt и GSK-3beta мембраны после окраски на фосфорилированные формы этих протеинкиназ подвергались стриппингу и затем окрашивали, используя антитела для этих протеинкиназ. Процедура стриппинга проводилась так, как это было описано ранее [26]. Для того, чтобы нормализовать полученные данные, в качестве референсного белка использовался альфа-тубулин (1 : 2000 Sigma-Aldrich, США). Определяли отношение протеинкиназ к альфа-тубулину и принимали его за 1.0 в контрольных нейронах коры мозга. Определяли отношения pERK1/2/ERK1/2, pAkt (Ser⁴⁷³)/Akt, pAkt (Thr³⁰⁸)/Akt, pGSK-3beta (Ser⁹)/GSK-3beta, их значения в контрольных клетках принимая за 1.0.

Сигнал вторичных антител HRP-IgG (1 : 1000, Cell Signaling) усиливали с помощью реактива Novex ECL HRP Reagent Kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, США). Фотопленки сканировали на сканере Canon (CanoScan 8800F). Денситометрическую обработку данных проводили с помощью программы Bio 7.

Статистическая обработка данных. Статистическую достоверность различий определяли, применяя *t* критерий Стьюдента, используя преимущественно метод попарных сравнений. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Все данные представлены как среднее арифметическое значение $\pm$ стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный подход с использованием депривации глюкозы и кислорода нейронов коры мозга в культуре в опытах *in vitro* позволяет смоделировать ограничение кровоснабжения нервной ткани при ишемии мозга. Оно сопровождается резким снижением уровня глюкозы и кислорода в крови и вызывает нарушения обмена веществ в ткани мозга. При этом восстановление уровня глюкозы в среде инкубации нейронов коры мозга и их оксигенации в нашем случае соответствует восстановлению кровотока в ткани мозга, что соотносится с реперфузионным повреждением нервной ткани.

При изучении защитного действия инсулина при ДГК инсулин добавляли непосредственно перед ДГК, которую осуществляли путем переноса клеток в депривационную среду Neurobasal без глюкозы и пирувата, деаэрированную газовой смесью следующего состава — 95% N₂, 5% CO₂. Затем клетки инкубировали в течение 1 или 3 ч в вышеуказанной жидкой среде, соответственно пробы все это время находились в среде, не содержащей глюкозу и кислород.

Через 1 или 3 ч проводили замену депривационной среды на полную ростовую среду, содержащую не только Neurobasal, глюкозу и кислород, но и набор нейротрофических факторов, кроме инсулина, входящих в добавку B-27. При переводе в полную ростовую среду в пробы добавляли инсулин в исследуемых концентрациях. На этой стадии среда инкубации контрольных нейронов и нейронов в опыте не различалась между собой. Анализ жизнеспособности нейронов осуществляли через 24 ч после перевода нейронов в полную ростовую среду. Эта стадия соответствует стадии реперфузии при ишемическом воздействии *in vivo*. Исследовали также влияние на нейроны коры мозга ДГК, которое не сопровождалось инкубацией в полной ростовой среде в присутствии глюкозы и кислорода (0 ч).

Нами показано, что ДГК в течение 1 ч и 3 ч приводила к значительной гибели нейронов, если после этого воздействия нейроны инкубировали 24 ч в полной ростовой среде ($p < 0.01$ по сравнению с контрольными клетками) (рис. 1). Трехчасовая ДГК оказывала более выраженное воздействие на гибель нейронов по сравнению с одночасовой ДГК. При 1 ч ДГК жизнеспособными оставались примерно 70% нейронов, а при 3 ч ДГК — лишь около 50% нейронов (рис. 1).

Изучение нейропротекторных свойств инсулина было проведено в диапазоне его концентраций 500 нМ — 10 мкМ. Инкубация нейронов коры мозга крыс с инсулином в микромолярных концентрациях (1 и 10 мкМ), достоверно повышала жизнеспособность нейронов, которые были подвергнуты ДГК в течение 1 ч (рис. 2), тогда как не удалось показать достоверного эффекта наномолярных концентраций этого нейропротектора. При этом величина “rescue rates”, определяющая процент клеток, гибель которых была предотвращена инкубацией с инсулином, при добавлении в среду инкубации 1 мкМ инсулина составляли $26.2 \pm 7.4\%$, а при добавлении 10 мкМ инсулина — $45.2 \pm 13.5\%$ (эффект инсулина в обоих случаях достоверен, $p < 0.02$).

При воздействии ДГК в течение 3 ч защитное действие инсулина также наблюдалось в его концентрациях 1 и 10 мкМ, при этом процент нейронов, гибель которых была предотвращена преинкубацией с 1 и 10 мкМ инсулина, составлял 22.1 ± 8.9 и $32.3 \pm 10.1\%$ соответственно (рис. 3). Эффект инсулина в обеих концентрациях достоверен, $p < 0.05$. Как при одночасовой, так и при трехчасовой ДГК

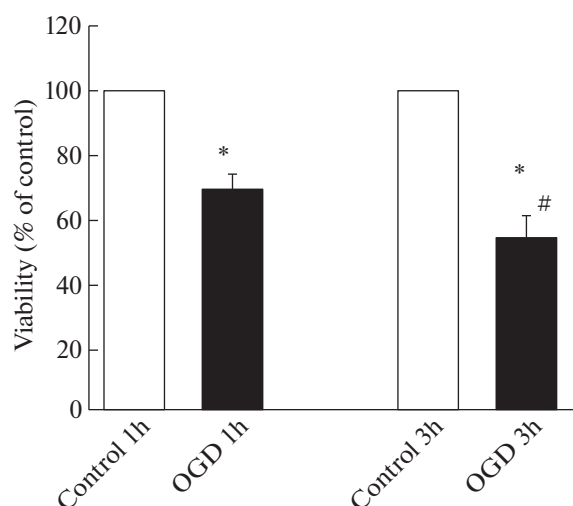


Рис. 1. Влияние депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 и 3 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на жизнеспособность нейронов коры мозга в культуре.

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 8 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента по сравнению: * — с контролем, $p < 0.001$, # — с воздействием ДГК в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

имела место тенденция к более выраженному эффекту 10 мкМ инсулина, чем 1 мкМ этого протектора ($p < 0.1$), но различия не достигали достоверности.

Изучение антиоксидантных свойств инсулина было проведено в диапазоне его концентраций 500 нМ–10 мкМ. Достоверное снижение образования АФК наблюдалось при добавлении к пробам инсулина в его микромолярных концентрациях — 1 и 10 мкМ (рис. 4). При инкубации инсулина с контрольными нейронами не обнаружено достоверных изменений в образовании АФК ни в одной из исследованных концентраций, на рисунке представлены данные о влиянии 10 мкМ инсулина на этот показатель в контрольных нейронах (рис. 4).

ДГК в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, приводила к значительному увеличению уровня АФК в нейронах ($p < 0.01$). Достоверное снижение накопления АФК в нейронах в условиях ДГК отмечалось только при инкубации с 5 и 10 мкМ инсулином, причем инсулин в обеих концентрациях действовал с примерно одинаковой эффективностью. При этом уровень АФК оставался сильно повышенным по сравнению с контролем (рис. 4).

Для выяснения механизмов защитного и антиоксидантного действия инсулина нами исследовалось его влияние на активность ряда протеинкиназ и сигнальных путей, от активности которых зави-

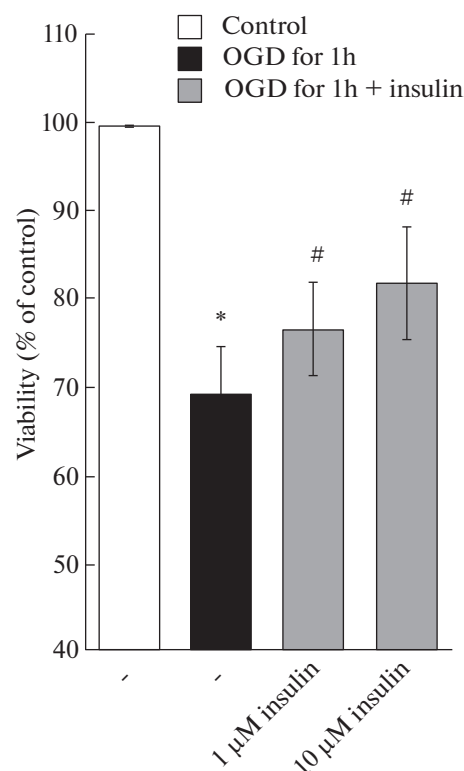


Рис. 2. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на жизнеспособность нейронов коры мозга в культуре.

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 7–8 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом попарных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.001$, # — с воздействием ДГК в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

сит жизнеспособность, либо, напротив, гибель нейронов. Для проведения этих исследований нами была выбрана концентрация инсулина, равная 10 мкМ, как наиболее эффективная. В этой серии опытов применялась ДГК продолжительностью 1 ч, как модель с более мягким воздействием на нейроны, чем модель с трехчасовой ДГК. Отбор проб осуществляли как сразу после воздействия ДГК, так и через 3 и 24 ч после инкубации нейронов в полной ростовой среде.

Показано, что ДГК приводила к достоверному снижению уровня фосфорилированной формы Akt в нейронах коры мозга, о чем судили по снижению отношения $[pAkt(Ser^{473})/Akt]$ (рис. 5с). Оно наблюдалось сразу же после воздействия ДГК и через 3 ч после последующей инкубации нейронов в полной ростовой среде (рис 5с). Если же инкубация в полной ростовой среде после воздействия ДГК происходила в течение 24 ч, то активность Akt ($pAkt(Ser^{473})/Akt$) сильно падала

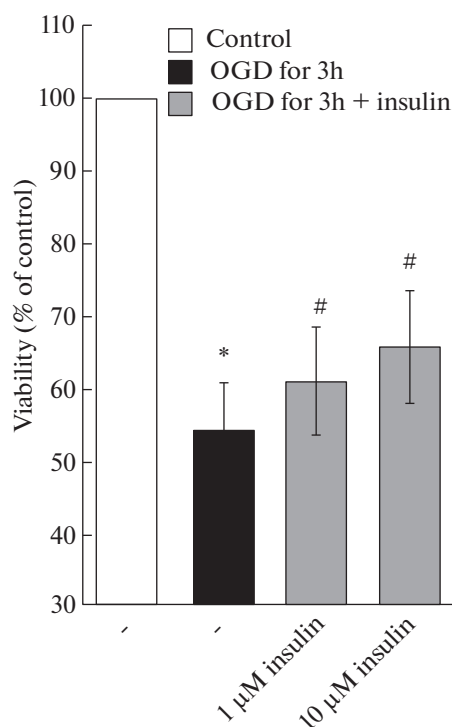


Рис. 3. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 3 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на жизнеспособность нейронов коры мозга в культуре.

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 7–8 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом попарных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.001$, # — с воздействием ДГК в течение 3 ч с последующей инкубацией в течение 24 ч в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

по сравнению с начальным контрольным значением, принятым за 1.0. Эти данные показывают, что ДГК приводит к достоверному снижению активности этой протеинкиназы. Инсулин достоверно увеличивал активность протеинкиназы Akt в нейронах после ДГК и инкубации нейронов в полной ростовой среде в течение 24 ч (рис. 5а, с), а также через 24 ч в контрольных нейронах (рис. 5б). Но при инкубации в течение 0 и 3 ч в полной ростовой среде инсулин не вызывал достоверного увеличения отношения $pAkt(Ser^{473})/Akt$ в опытных и контрольных нейронах, наблюдалась лишь тенденция к такому эффекту (рис. 5).

Следует отметить, что контрольные нейроны не испытывают недостатка в глюкозе и кислороде ни на одной из стадий опыта. Но они подвержены недостатку нейротрофических факторов при их содержании в солевой среде, тогда как в этот же период инкубации опытные нейроны страдают не только от недостатка в депривационной среде нейротрофических факторов, но и от недостатка глюкозы и кислорода.

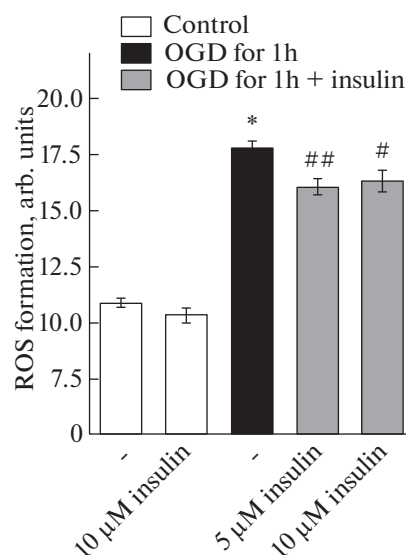


Рис. 4. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 40 мин в среде Neurobasal на образование активных форм кислорода (АФК) в нейронах коры мозга в культуре.

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из результатов поставленных опытов ($n = 8$ для контроля и воздействия ДГК, $n = 4$ для данных по эффектам разных концентраций инсулина на нейроны при ДГК). OGD — oxygen and glucose deprivation. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом попарных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.001$, # и ## — с воздействием депривации глюкозы и кислорода в течение 1 ч с последующей инкубацией в течение 40 мин в среде Neurobasal, # — $p < 0.05$, ## — $p < 0.02$.

Одной из основных мишеней протеинкиназы Akt является киназа гликогенсинтазы-3бета (GSK-3beta). Протеинкиназа B (Akt) усиливает фосфорилирование GSK-3beta по Ser⁹, что приводит к инактивации этой протеинкиназы. Этот эффект благоприятно сказывается на функциях митохондрий и приводит к увеличению жизнеспособности нервных клеток, в частности, в результате предотвращения их апоптотической гибели.

Под действием ДГК наблюдалось достоверное ($p < 0.02$) уменьшение уровня $pGSK-3beta(Ser^9)/GSK-3beta$ в нейронах коры мозга как сразу после этого воздействия, так и через 24 ч инкубирования в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород (рис. 6а, с). Эти данные показывают, что ДГК противодействует процессам инактивации GSK-3beta и способствует активации этой протеинкиназы и, как следствие, вызывает ухудшение функций митохондрий в нейронах коры мозга.

Инсулин же, напротив, способствовал инактивации GSK-beta. Так, как видно из данных (рис. 6), он достоверно увеличивал образование ее фосфорилированной по Ser⁹ формы в контрольных и подвергшихся воздействию ДГК нейронах через 24 ч

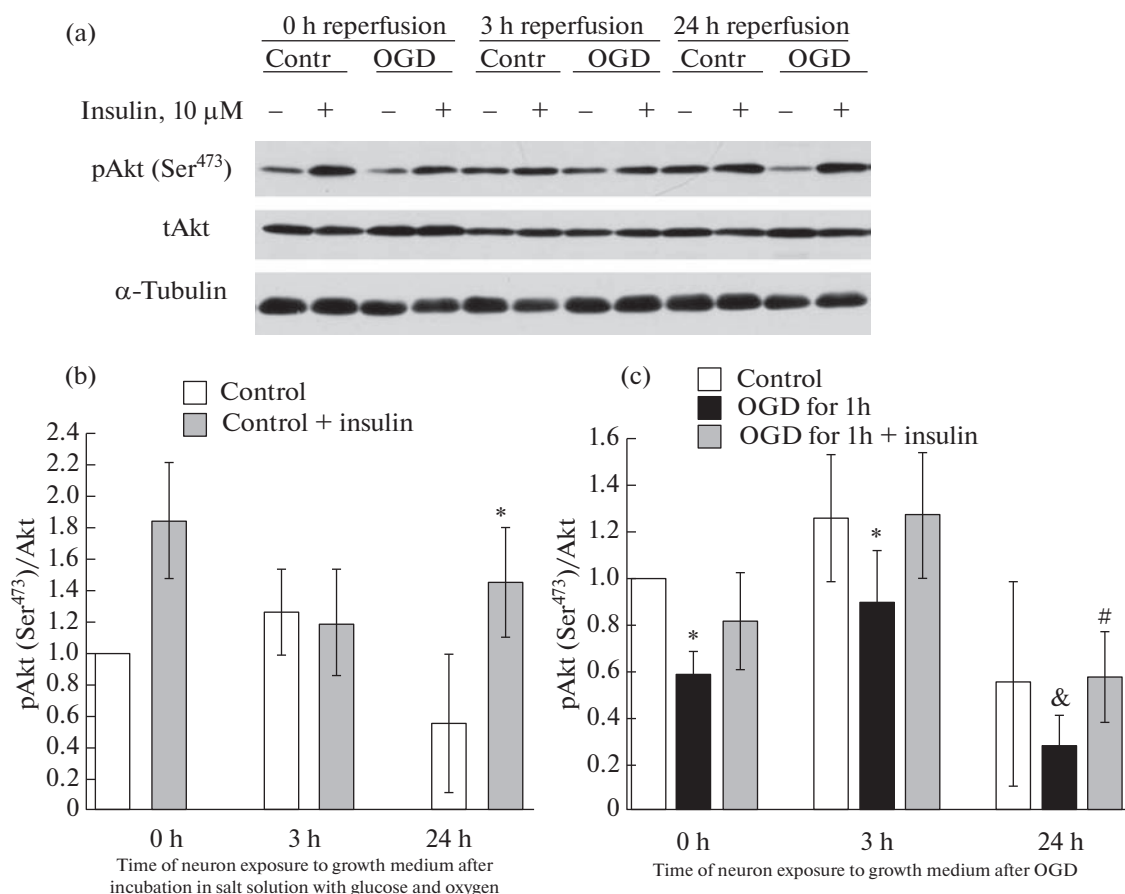


Рис. 5. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 ч с последующей инкубацией в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на активность протеинкиназы В (Akt) в нейронах коры мозга в культуре [pAkt(Ser⁴⁷³)/Akt].

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 4 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. (a) — иммуноблотты. (b) — влияние инсулина на активность Akt в контрольных нейронах. (c) — влияние ДГК и инсулина на активность Akt. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом попарных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.05$, & — с первоначальным контролем, принятым за 1.0, $p < 0.01$, # — с действием ДГК в течение 1 ч, с последующей инкубацией в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

после их инкубации в полной ростовой среде ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно). Кроме того, в его присутствии не наблюдалось достоверного снижения уровня pGSK-3 β (Ser⁹) при действии ДГК без последующей инкубации нейронов в полной ростовой среде, которое имело место в отсутствие инсулина в среде (рис. 6с).

Нами было также изучено влияние ДГК и инсулина на активность ERK1/2 в нейронах коры мозга. Не выявлено влияние инсулина на активность фермента в контрольных нейронах (рис. 7а,б), а также в нейронах, подвергнутых ДГК без последующей инкубации в полной ростовой среде.

Наиболее разительные изменения активности ERK1/2 в нейронах коры мозга выявлены через 24 ч инкубации контрольных нейронов и нейронов, подвергнутых ДГК, в полной ростовой среде. В этом случае активность ERK1/2 (о которой судили по отношению pERK1/2 / ERK1/2) в контроль-

ных нейронах и нейронах, подвергнутых ДГК, была снижена примерно в 3 раза. По-видимому, это снижение является результатом влияния инкубации нейронов в течение 1 ч в солевой среде, лишенной нейротрофических факторов. Наличие инсулина в пробах достоверно увеличивало активность ERK1/2 в нейронах коры мозга, подвергнутых ДГК в течение 1 ч, и затем 24 ч инкубации в полной ростовой среде, однако активность фермента продолжала оставаться сниженной по сравнению с исходным контролем (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы исследовали влияние депривации глюкозы и кислорода и влияние инсулина на жизнеспособность нейронов коры мозга в культуре. Основные нарушения обменных процессов и повреждение нейронов в опытах *in vivo* наступают, как правило,

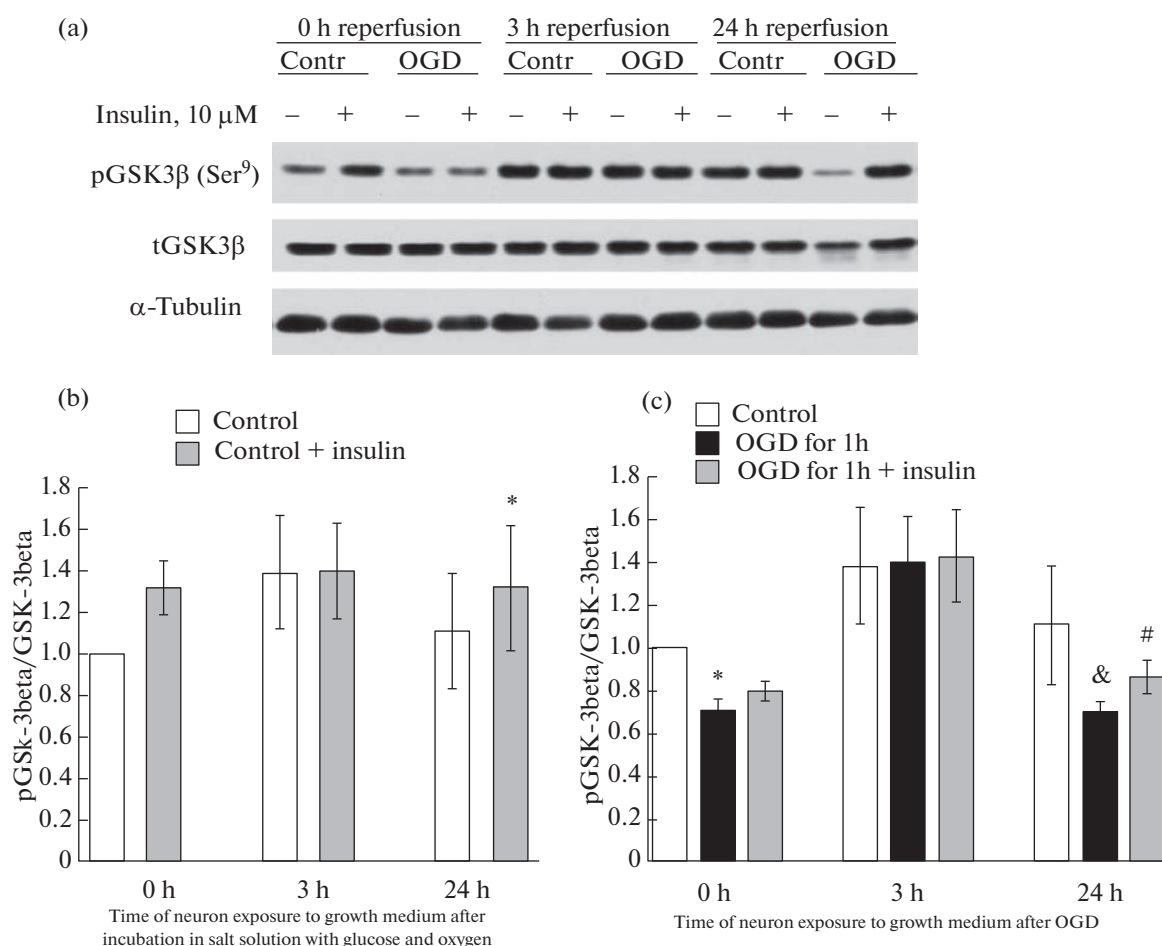


Рис. 6. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 ч с последующей инкубацией в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на инактивацию GSK-3beta в нейронах коры мозга в культуре [pGSK-3beta (Ser⁹)/GSK-3beta].

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 4 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. (a) — Иммуноблотты. (b) — Влияние инсулина на активность GSK-3beta в контрольных нейронах. (c) — Влияние ДГК и инсулина на активность GSK-3beta в нейронах. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом парных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.02$, & — с первоначальным контролем, принятым за 1.0, $p < 0.01$, # — с действием ДГК в течение 1 ч, с последующей инкубацией в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

после реперфузии. Поэтому мы определяли жизнеспособность нейронов после ДГК продолжительностью 1 и 3 ч и последующей “реперфузии”, т.е. восстановления воздействия глюкозы и кислорода на нейроны, инкубируя их в течение 24 ч в полной ростовой среде. Полученные данные показали гибель значительной части нейронов при таких воздействиях. Особенно ярко она была выражена при воздействии ДГК на нейроны в течение 3 ч. Добавление инсулина в микромолярных концентрациях в среду инкубации клеток оказывало нейропротекторный эффект и достоверно повышало жизнеспособность нейронов. Наши данные о токсическом эффекте ДГК на нейроны в культуре и защитном эффекте инсулина согласуются с литературными данными, полученными на нейронах гиппокампа и зубчатой извилины [20, 21]. Было найдено, что наибольшей чувствительностью к защитному действию против ДГК инсулина, использовавшегося,

как и в наших опытах, в микромолярных концентрациях, обладают органотипические нейроны срезов С2 района гиппокампа и зубчатой извилины, тогда как нейроны С1 и С3 районов гиппокампа менее чувствительны к действию этого гормона [21]. Как будет показано далее в тексте обсуждения, защитный эффект инсулина согласно данным этой работы (как и согласно нашим данным) определялся прежде всего его способностью активировать протеинкиназу В (Akt). Интересно, что в другой работе [20] было найдено, что, если подвергнуть нейроны гиппокампа ДГК и последующему восстановлению содержания глюкозы и кислорода в среде, то это приводит к значительному уменьшению количества GABA рецепторов на поверхности нейронов при практически неизменном количестве экспрессированных суммарных рецепторов. При действии же на нервные клетки инсулина он противодействовал уменьшению числа GABA рецеп-

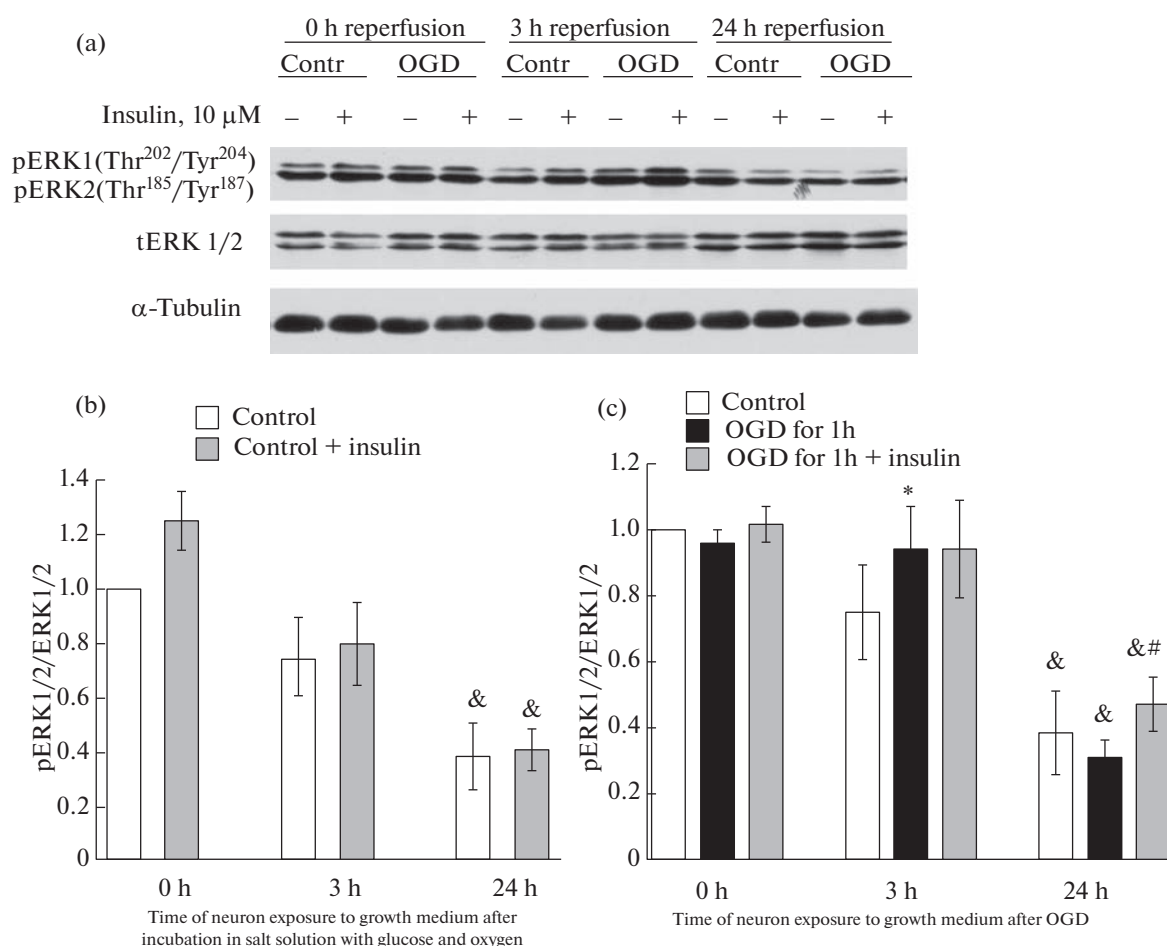


Рис. 7. Влияние инсулина и депривации глюкозы и кислорода (ДГК) в течение 1 ч с последующей инкубацией в полной ростовой среде, содержащей глюкозу и кислород, на активность киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK1/2) (отношение pERK1/2 / ERK1/2) в нейронах коры мозга в культуре.

Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из 4 поставленных опытов. OGD — oxygen and glucose deprivation. (a) — Иммуноблотты. (b) — Влияние инсулина на активность ERK1/2 в контрольных нейронах. (c) — Влияние ДГК и инсулина на активность ERK1/2 в нейронах. Различия достоверны по *t* критерию Стьюдента при оценке методом попарных сравнений по сравнению: * — с контролем, $p < 0.05$, & — с первоначальным контролем, принятым за 1.0, $p < 0.02$, # — с действием ДГК в течение 1 ч, с последующей инкубацией 24 ч в полной ростовой среде, $p < 0.05$.

торов, по-видимому, снижая их эндоцитоз, возможно благодаря модуляции протеинкиназы С [20]. Воздействие инсулина приводило к восстановлению баланса между возбуждающими и ингибирующими сигналами на нейроны [20]. В литературе есть и другие свидетельства того, что эксайтотоксичность может быть одной из причин гибели нейронов при воздействии на них ДГК [см., например, 27], так что эти данные об эффекте инсулина представляют интерес.

Но в более поздней публикации [21] и в нашей работе было показано, что защитный эффект инсулина связан с активацией протеинкиназы В (Akt) и последующих сигнальных путей, что характерно для механизма нейропротекторного эффекта инсулина при разных токсических воздействиях. Это не исключает возможности противодействия инсулина к эксайтотоксическим воздействиям при ДГК.

Одной из клеточных моделей, пригодных для изучения механизма защитного действия нейропротекторов при ряде патологических состояний мозга, включая его нейродегенеративные и ишемические поражения, являются нейроны в состоянии окислительного стресса, вызванного действием прооксиданта. Это объясняется тем, что одной из основных причин гибели нейронов при этих поражениях мозга является чрезмерная активация свободнорадикальных процессов. В роли такого природного прооксиданта нами ранее была использована перекись водорода. Были проведены исследования, посвященные механизму защитного действия инсулина, используя эту модель повреждения действия на клетки мозга [28–30]. Было показано, что инсулин повышает жизнеспособность нейронов в условиях окислительного стресса, обладает хорошо выраженным антиоксидантным действием.

При сравнении результатов, полученных ранее на модели окислительного стресса [28–30], для индукции которого в нейронах коры мозга применялось воздействие 100 мкМ перекиси водорода в течение 6 ч, и в настоящей работе, можно сделать ряд предположений и выводов. По-видимому, ДГК обладает более выраженным токсическим эффектом на нейроны, чем воздействие перекиси водорода. Так, для защиты нейронов от ДГК потребовались относительно высокие микромолярные концентрации инсулина – 1–10 мкМ (рис. 2–4). А при защите от перекиси водорода инсулин был эффективным уже в концентрации 10–100 нМ [28–30], при этом дальнейшее увеличение концентрации инсулина не приводило к достоверному увеличению его защитного эффекта по сравнению со 100 нМ инсулина. А на модели ДГК инсулин обладал защитным эффектом лишь в микромолярных концентрациях.

Нами найдено, что ДГК снижает активность протеинкиназы В (Akt) в нейронах коры мозга сразу после ДГК. Снижение имеет место и после последующей инкубации клеток в полной ростовой среде в течение 24 ч. Инсулин же активирует протеинкиназу Akt в нейронах коры мозга как непосредственно после ДГК, так и при последующей инкубации в полной ростовой среде в течение 24 ч (рис. 5). Эти результаты согласуются с данными, ранее полученными с использованием ингибиторов протеинкиназ [21], о том, что нейропротекторный эффект инсулина на модели ДГК определяется прежде всего его способностью активировать протеинкиназу В (Akt).

Как известно, активация протеинкиназы Akt инсулином может приводить к уменьшению апоптотической гибели нейронов благодаря увеличению фосфорилирования GSK-3 β по Ser⁹, что приводит к инактивации этой протеинкиназы (GSK-3 β является одной из основных мишеней Akt). Наряду с этим активация Akt способствует усилению синтеза антиапоптотического белка Bcl-2. При активации GSK-3 β имеет место нарушение функций митохондрий, падение мембранного потенциала митохондрий, открытие mitochondrial permeability transition pores и усиление апоптотической гибели нервных клеток. Ингибирование этой протеинкиназы, напротив, способствует увеличению жизнеспособности нервных клеток.

В настоящей работе нами показано, что ДГК приводит к активации GSK-3 β как непосредственно после этого воздействия, так и через 24 ч после последующей инкубации в полной ростовой среде (рис. 6). Инсулин способен достоверно уменьшать активность фермента в нейронах после действия ДГК и последующей их инкубации в полной ростовой среде в течение 24 ч (т.е. после “ишемии” и “реперфузии”), как и в контрольных нейронах (рис. 6). По-видимому, активация инсули-

ном Akt и последующая инактивация GSK-3 β играют важную роль в механизме его нейропротекторного эффекта при поражении мозга в результате ишемии и последующей его реперфузии.

Аналогичные данные о механизме защитного действия инсулина были получены нами на модели воздействия на нейроны коры мозга окислительного стресса, вызванного действием такого природного прооксиданта, как перекись водорода [28–30]. Было показано, что окислительный стресс приводит к инактивации Akt, активации GSK-3 β и увеличению отношения Bax/Bcl-2, тогда как инсулин, напротив, активирует Akt и инактивирует GSK-3 β , нормализуя активность этих протеинкиназ и отношение Bax/Bcl-2 в условиях окислительного стресса [28–30]. При этом найдено, что нейропротекторный эффект инсулина достоверно снижается в присутствии ингибиторов активации протеинкиназы В (Akt) и инактивации GSK-3 β [30]. Таким образом, используя обе модели ишемического поражения мозга (ДГК и окислительный стресс), выявлен сходный механизм защитного действия инсулина, заключающийся в активации протеинкиназы В (Akt) и инактивации GSK-3 β .

Сложнее объяснить данные, полученные при изучении влияния ДГК и последующего восстановления содержания глюкозы и кислорода в среде на активность ERK1/2 в нейронах коры мозга. Происходило очень значительное снижение активности фермента после воздействия ДГК (или солевого раствора в случае контрольных клеток) и последующей инкубации в течение 24 ч в полной ростовой среде. Инсулин достоверно повышал активность фермента, но она оставалась сильно сниженной по сравнению с исходными значениями. Аналогичного снижения активности ERK1/2 мы не наблюдали в динамике развития окислительного стресса в нейронах коры мозга, вызванного перекисью водорода ни на одной из его стадий. Можно высказать предположение о том, что активность этой протеинкиназы наиболее чувствительна к временной инкубации в солевой среде, лишенной нейротрофических факторов, что при последующей инкубации нейронов в полной ростовой среде проявляется на относительно поздних этапах после воздействия.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-0152-22-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Протокол этического комитета ИЭФБ РАН № 1-11/2022, от 27.01.2022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Вклад авторов: Концептуализация: Н.Ф.А., И.О.З., И.И.З. Методология: И.И.З. И.О.З., Валидация: Л.В.Б. Исследования: И.О.З., И.И.З., Л.В.Б., Написание: Н.Ф.А., А.О.Ш., И.О.З., Визуализация: Л.В.Б., И.И.З.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen Y, Guo Z, Mao YF, Zheng T, Zhang B (2018) Intranasal insulin ameliorates cerebral hypometabolism, neuronal loss, and astrogliosis in streptozotocin-induced Alzheimer's rat model. *Neurotox Res* 33: 716–724. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9809-7>
2. Song Y, Ding W, Bei Y, Xiao Y, Tong HD, Wang LB, Ai LY (2018) Insulin is a potential antioxidant for diabetes-associated cognitive decline via regulating Nrf2 dependent antioxidant enzymes. *Biomed Pharmacother* 104: 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.097>
3. Fine JM, Stroebel BM, Falteseck KA, Terai, K; Haase L, Knutzen K.E, Kosyakovsky J, Bowe TJ, Fuller A.K, Frey WH, Hanson LR (2020) Intranasal delivery of low-dose insulin ameliorates motor dysfunction and dopaminergic cell death in a 6-OHDA rat model of Parkinson's Disease. *Neurosci Lett* 714: 134567. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134567>
4. Milstein JL, Ferris HA (2021) The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Mol Metab*. 52: 101234. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101234>
5. Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Trittschuh EH, Collerton B, Morgan A, Callaghan M, Arbuckle M, Behl C, Craft S (2015) Long-acting insulin Detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia. *J Alzheimers Dis* 44: 897–906. <https://doi.org/10.3233/JAD-141791>
6. Craft S, Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Collerton B, Trittschuh EH, Dahl D, Caulder E, Neth B, Montine TJ, Jung Y, Maldjian J, Whitlow C, Friedman S (2017) Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: A pilot clinical trial. *J Alzheimers Dis* 57: 1325–1334. <https://doi.org/10.3233/JAD-161256>
7. Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA (2018) Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment. A systematic review. *J Neurol* 265: 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0>
8. Novak P, Maldonado DAP, Novak V (2019) Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 14: e0214364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
9. Lochhead JJ, Kellohen KL, Ronaldson PT, Davis TP (2019) Distribution of insulin in trigeminal nerve and brain after intranasal administration. *Sci Rep* 9: 2621. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39191-5>
10. Fan LW, Carter K, Beatt A, Pang Y (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
11. Hallschmid M (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol* 33: e12934. <https://doi.org/10.1111/jne.12934>
12. Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
13. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferré P, Birnbaum MJ (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569–574. <https://doi.org/10.1038/nature02440>
14. Rizk NN, Myatt-Jones J, Rafols J, Dunbar JC (2007) Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) decreases ischemia-reperfusion induced apoptosis and necrosis in diabetic rats. *Endocrine* 31: 66–71. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-0012-0>
15. Jiang LH, Yuan XL, Yang NY, Ren., Zhao. M, Luo BX, Bian YY, Xu JY, Lu DX, Zheng YY, Zhang CJ, Diao YM, Xia BM, Chen GJ (2015) Dacosterol protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-mediated injury by activating IGF1 signaling pathway. *Steroid Biochem Mol Biol* 152: 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.007>
16. Gong P, Zou Y, Zhang W, Tian Q, Han S, Xu Z, Chen Q, Wang X, Li M (2021) The neuroprotective effects of Insulin-like growth factor-1 via the Hippo/YAP signaling pathway are mediated by the PI3K/AKT cascade following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Brain Res Bull* 177: 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.10.017>
17. Lioutas VA, Alfaro-Martinez F, Bedoya F, Chung CC, Pimentel DA, Novak V (2015) Intranasal insulin and insulin-like growth factor-1 as neuroprotectants in acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 6: 264–275. <https://doi.org/10.1007/s12975-015-0409-7>
18. Zorina II, Galkina OV, Bayunova LV, Zakharova IO (2019) Effect of insulin on lipid peroxidation and glutathione levels in a two-vessel occlusion model of rat forebrain ischemia followed by reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 35: 333–335. <https://doi.org/10.1134/S0022093019040094>
19. Zorina II, Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2020) Characteristics of changes in lipid peroxidation and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the cortex of old rats in conditions of two-vessel cerebral ischemia/reperfusion. *Adv Geront* 10: 156–161. <https://doi.org/10.1134/s2079057020020162>
20. Mielke JG, Wang YT (2005) Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABA receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 92: 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02841.x>

21. Sun X, Yao H, Douglas RM, Gu XQ, Wang J, Haddad GG (2010) Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *J Neurochem* 112: 377–388.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06450.x>
22. Dichter MA (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res* 149: 279–293.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90476-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90476-6)
23. Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Methods* 163: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010>
24. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119: 203–210.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9)
25. Zorina II, Bayunova LV, Zakharova IO, Avrova NF (2018) The dependence of the protective effect of insulin on its concentration and modulation of ERK1/2 activity under the conditions of oxidative stress in cortical neurons. *Neurochem J* 10: 111–116.
<https://doi.org/10.1134/S1819712417040110>
26. Zakharova I, Sokolova T, Vlasova Y, Bayunova L, Rychkova M, Avrova N (2017) α -Tocopherol at nanomolar concentration protects cortical neurons against oxidative stress. *Int J Mol Sci* 18: 216.
<https://doi.org/10.3390/ijms18010216>
27. Bonde C, Norberg J, Noer H, Zimmer J (2005) Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 136: 779–794.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.020>
28. Zakharova IO, Sokolova TV, Zorina I, Bayunova LV, Rychkova MP, Avrova NF (2018) Protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on modulation of protein kinase B (Akt) activity. *J Evol Biochem Physiol* 54: 192–204.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018030043>
29. Bayunova LV, Zorina II, Zakharova IO, Avrova NF (2018) Insulin increases viability of neurons in rat cerebral cortex and normalizes Bax/Bcl-2 ratio under conditions of oxidative stress. *Bull Exp Bio Med* 165: 14–17.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4088-8>
30. Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO, Avrova NF (2019) The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3 β , ERK1/2, and AMPK activities. *Int J Mol Sci* 20 (15): E3702.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153702>

PROTECTIVE AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF INSULIN ON RAT BRAIN CORTICAL NEURONS IN A MODEL OF OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION IN VITRO

I. O. Zakharova^a, I. I. Zorina^a, L. V. Bayunova^a, A. O. Shpakov^a, and N. F. Avrova^{a, #}

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

[#]e-mail: avrova@iephb.ru

Intranasal insulin is one of the most promising protectors in the treatment of neurodegenerative and other diseases associated with brain injuries. In these diseases, insulin levels in the brain (in contrast to its blood levels) are as a rule heavily reduced, which, along with the development of insulin resistance, leads to impaired insulin signaling in neurons. The aim of this work was to study the protective effect of insulin on cultured rat cortical neurons using an in vitro oxygen–glucose deprivation (OGD) model of ischemia–reperfusion brain injury followed by a resumption of oxygen and glucose supply to neurons. OGD exposure for 1 or 3 h with subsequent incubation of cultured rat cortical neurons in complete (oxygen- and glucose-containing) growth medium decreased neuronal viability and increased the production of reactive oxygen species, while the preincubation of neurons with insulin at micromolar concentrations had protective and antioxidant effects. One-hour OGD followed by incubation in complete growth medium led to downregulation of protein kinase B/Akt (decreased pAkt(Ser⁴⁷³)/Akt ratio) and upregulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), one of the main Akt targets (decreased pGSK-3 β (Ser⁹)/GSK-3 β ratio). In contrast, preincubation with insulin activated Akt and inactivated GSK-3 β . Apparently, these effects of insulin significantly contribute to its neuroprotective action, because GSK-3 β activation leads to mitochondrial dysfunction and neuronal death. Insulin was shown to increase the neuronal activity of protein kinase regulated by extracellular signals (ERK1/2), which was diminished by OGD and subsequent exposure to growth medium containing glucose and oxygen.

Keywords: brain cortical neurons, oxygen and glucose deprivation, insulin, neuroprotective effect, protein kinases

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОРЕВНОВАНИЯ НА АМПЛИТУДЫ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПРИ ТВОРЧЕСКОЙ И НЕТВОРЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2023 г. Ж. В. Нагорнова^{1,*}, Н. В. Шемякина^{1,**}

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

*e-mail: nagornova_zh@mail.ru

**e-mail: shemyakina_n@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 24.11.2022 г.

Мозговая активность существенным образом меняется в различных условиях социального взаимодействия. Однако влияние контекста социальных взаимодействий на нейрофизиологические корреляты когнитивной и творческой деятельности как таковой рассмотрены недостаточно. Могут быть выделены два полярных типа взаимодействий при решении задач — сотрудничество или соревнование. Целью данного исследования была оценка влияния условий соревнования на амплитуды вызванных потенциалов (ВП) при решении творческих и нетворческих задач. Испытуемые (26 мужчин, 18 женщин) выполняли два типа заданий индивидуально и в условиях соревнования в парах (мужчина—мужчина, женщина—женщина): творческое — придумать необычное использование повседневного предмета, и нетворческое — перечислить предметы из предложенных категорий. Сравнивали ВП в каждом из заданий между условиями соревнования и индивидуального выполнения. Условия соревнования приводили к уменьшению амплитуд компонентов P_1 , P_2 и компонентов с латентностью N400, P600 как при творческой, так и при нетворческой деятельности, по всей видимости, свидетельствуя о затруднении процессов поиска ответа. Процент найденных ответов также был значимо ниже в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением задания. Вероятно, значительная часть ресурсов при выполнении задания в условиях социального взаимодействия направлена на оценку реакций и ответов партнера, что проявляется как в снижении амплитуды более ранних компонентов, связанных с вниманием (P_1 , P_2), так и поздних компонентов, связанных с семантической обработкой стимулов (N400, P600).

Ключевые слова: ЭЭГ, вызванные потенциалы (ВП), вербальная творческая деятельность, соревнование (конкуренция), социальные взаимодействия, тест альтернативного использования (AUT), P_1 , P_2 , N400, поздние позитивные потенциалы (P600)

DOI: 10.31857/S0044452923010060, **EDN:** GXNNMR

В условиях социального взаимодействия протекает большая часть когнитивной деятельности человека. Влияние социальных взаимодействий на нейрофизиологические показатели активности мозга при совместной деятельности, в том числе, творческой — стало предметом исследований с начала двадцатого века и развитием технологий гиперсканинга [см. 1]. Можно выделить два основных условия совместного решения задач — условия конкуренции (соревнования) или кооперации (сотрудничества). Кооперативное и конкурентное поведение исследуется при помощи различных моделей социальных игр, например: “Ястребы и голуби” [2, 3], “Диктатор” [4], “Ультиматум” [5], “Доверие” [6] и др., в которых участники должны принимать решение о действии в отношении партнера, исходя из социальных сиг-

налов. Стоит отметить, что исследований ВП в процессе когнитивной деятельности, как таковой, протекающей в условиях социального взаимодействия, крайне мало. Решение задач в группе или в паре, с одной стороны, может быть источником напряжения, например, в условиях отрицательной обратной связи [7], с другой стороны — может повысить мотивацию и вовлеченность в деятельность. Особенно это касается решения творческих задач, в которых одной из эффективных техник повышения количества и оригинальности решений является техника “мозгового штурма” [8, 9]. Немногочисленные нейробиологические исследования совместной творческой деятельности были посвящены анализу изменений кровотока методом спектроскопии в ближней инфракрасной области [7, 9–14] и не относились к прямым исследованиям

биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ или ВП). В этих исследованиях было продемонстрировано, что решение творческого задания (тест альтернативного использования, поиск путей решения затруднительной жизненной ситуации) приводит к более оригинальным ответам в паре, при этом наблюдается увеличение межсубъектной синхронизации с вовлечением лобных областей левого полушария и теменно-височных областей правого полушария [9], угловой извилины правого полушария [12]. Таким образом, социальные взаимодействия могут существенным образом влиять на нейробиологические механизмы творческой деятельности. Вместе с тем перечисленные работы связаны с оценкой относительно “медленного” метаболического ответа — изменений соотношения концентраций окси/дезоксигемоглобина. Более точную информацию о быстрых и стадийных изменениях биоэлектрической активности мозга в условиях индивидуального и совместного выполнения заданий дает метод анализа вызванных потенциалов. Целью данного исследования была оценка вызванных потенциалов мозга при решении творческого и нетворческого задания в условиях соревнования в сравнении с индивидуальным выполнением задания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники. В исследовании одновременной деятельности приняли участие 22 пары испытуемых (мужчина-мужчина, женщина-женщина) 18–23 лет (26 мужчин, 18 женщин), студенты вузов. В сформированных парах для исследования возраст участников различался не более, чем на год. Участники на момент проведения исследования были здоровы, без неврологических нарушений и соматических заболеваний, не проходили медикаментозную терапию.

Задания, процедура исследования. Исследование проводилось в тихом, освещенном помещении. Испытуемые располагались в креслах на равном (1.5 м) расстоянии от монитора предъявления стимулов. Стимулы предъявлялись в программе Psy-Task, в центре экрана черным шрифтом на белом фоне, шрифт Times New Roman, 48 кегль, все буквы строчные. Волонтеры выполняли два типа заданий: творческое — придумать необычное использование обычного предмета (тест альтернативного использования (AUT) [15] и контрольное — назвать/перечислить предметы из предложенной категории. В творческой задаче испытуемым предъявлялись обычные предметы, например: газета, скрепка, гвоздь и др., в контрольном задании — названия категорий объектов: мебель, посуда, транспорт и т.п. Задания выполнялись в парадигме вызванных потенциалов и были организованы в короткие блоки проб. В каждом блоке проб испытуемому предъявлялось 10 одинаковых стиму-

лов с одинаковой инструкцией (один и тот же предмет или название категории). В каждой пробе на трехсотой мс предъявлялся стимул: слово, обозначающее предмет или категорию (длительностью 400 мс). Стимул сменялся точкой в центре экрана для фиксации взгляда. Длительность предъявления точки составляла 4400 мс. В этот период времени испытуемые должны были придумать ответ, мысленно “проговорить” его и нажать на кнопку мыши, если ответ найден. На 5100 мс предъявлялся знак вопроса (“?”) с экспозицией 100 мс, после которого испытуемые озвучивали ответ. В случае отсутствия ответа — испытуемые на кнопку мыши не нажимали и после знака вопроса говорили слово “нет”. Длительность межпробного интервала была рандомизирована от 2500 до 3000 мс. Блоки творческого и контрольного заданий чередовались между собой. Всего предъявлялось более 70 проб в “творческих” блоках и более 80 проб в “контрольных” блоках. В творческом задании перед испытуемыми ставилась инструкция “быть оригинальным” — т.е. придумывать наиболее интересные и необычные способы использования предметов, в контрольном задании предполагалось перечисление объектов из предъявленной категории. Задачи быть оригинальным не ставилось, подчеркивалась необходимость следования инструкции и перечисления объектов по принципу принадлежности к указанной категории.

Задания выполнялись в условиях совместной деятельности и индивидуально. При совместной деятельности создавались условия конкуренции — оба участника в паре должны были нажать на кнопку мыши в случае нахождения ответа, но первым отвечал тот, кто первый нажал на кнопку. При индивидуальном выполнении второй участник из пары находился в этом же помещении, но не видел предъявления стимулов и не слышал ответы своей пары. Порядок индивидуального или совместного выполнения был рандомизирован между парами участников — 10 пар испытуемых начинали выполнять задания совместно, а затем — каждый выполнял такое же задание, но с другими стимулами индивидуально, 12 пар участников выполняли задание сначала индивидуально, а потом — совместно. Ответы испытуемых фиксировались для дальнейшей обработки.

После исследования испытуемые оценивали субъективную сложность заданий (по 10-балльной шкале, где 1 — очень легко, 10 — очень сложно, практически невыполнимо), силу и знак эмоций, возникавших во время выполнения задания (от –3 до 3), а также оригинальность своих идей и предложенных идей партнера (от 1 до 10).

Перед проведением психофизиологического исследования испытуемые проходили ряд психологических тестов, в том числе тест самооценки уровня тревожности по методике Спилберга-Ха-

нина [16]. Согласно методике оценивался уровень личностной тревожности, и по данному показателю группа участников была разделена на подгруппы с низкой, средней и высокой тревожностью — для оценки возможных поведенческих и физиологических эффектов тревожности при выполнении задания.

Регистрация и предобработка ЭЭГ (ВП). Регистрацию ЭЭГ при выполнении задания проводили с использованием 32-канального цифрового электроэнцефалографа “Мицар” (ООО “Мицар”, С.-Петербург). ЭЭГ регистрировали в программном пакете WinEEG (В.А. Пономарев, Ю.Д. Кропотов, № государственной регистрации 2001610516 от 08.05.2001) монополярно, от 15 хлорсеребряных электродов, расположенных на головах испытуемых по модифицированной системе 10–20 (Fp_z , F_7 , F_3 , F_z , F_4 , F_8 , C_3 , C_4 , T_5 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 , O_1 , O_2), в полосе пропускания от 0.53–70 Гц, с частотой оцифровки сигнала 500 Гц. Объединенный ушной электрод располагался на мочках обеих ушей, заземляющий электрод — в передне-центральной отведении на поверхности головы. Сопротивление электродов не превышало 5 КОМ.

Артефакты горизонтальных и вертикальных движений глаз корректировались методом пространственной фильтрации путем обнуления соответствующих независимых компонентов ЭЭГ [17–19]. Общая фильтрация ЭЭГ исключала фрагменты, содержащие волны с амплитудой больше 100 мкВ. Также исключали фрагменты ЭЭГ, содержащие медленные волны (0–2 Гц с амплитудой выше 50 мкВ) и быстрые волны (25–35 Гц с амплитудой выше 35 мкВ). Качество удаления артефактов контролировали визуально. Для расчета вызванных потенциалов анализировались только безартефактные пробы, в которых испытуемые нашли ответ и нажали на кнопку. ВП рассчитывали в интервале от 300 мс до предъявления стимула и 2000 мс после. Усреднение ВП проводилось для каждого испытуемого, каждого электрода и каждого типа проб отдельно.

Статистический анализ. Интервалы и топографии различий амплитуд ВП определялись по максимуму разностной волны между ВП в условиях соревнования и индивидуального выполнения. Различия амплитуд в выделенных временных интервалах рассматривались как независимые. Для каждого выделенного компонента вызванных потенциалов сравнивали амплитуды ВП между условиями индивидуального и совместного выполнения заданий с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений (RM-ANOVA) для факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ (совместно/индивидуально) и ЗОНА (15 отведений ЭЭГ) и их взаимодействий с учетом коррекции Гринхауза-Гейсера [20] в творческом и контрольном задании отдельно. Дополнительно оценива-

Таблица 1. Процент ответов в творческом и контрольном заданиях

Задание	Количество ответов (%), медиана (25–75 квартили)	
	Индивидуальное выполнение	Совместное выполнение
Творческое	56 (49–74)	45 (31–55)
Контрольное	87 (82–93)	66 (60–76)

Таблица 2. Показатели самооценки трудности задания

Задание	Субъективная трудность задания, медиана (25–75 квартили)	
	Индивидуальное выполнение	Совместное выполнение
Творческое	7 (6–8)	6.5 (5.5–7.5)
Контрольное	5 (4–6)	4 (4–6.5)

лось влияние независимого межсубъектного фактора — ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАДАНИЙ (сначала совместное или индивидуальное выполнение заданий). Для оценки влияния уровня тревожности на амплитуды ВП в качестве межгруппового рассматривали фактор УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ.

Поведенческие данные между состояниями сравнивались при помощи непараметрического критерия Вилкоксона. Сравнение количества ответов между группами с разным уровнем тревожности проводилось при помощи критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка поведенческих данных и самоотчетов

Количество (медиана и квартили) ответов в творческом и контрольном задании при индивидуальном и совместном выполнении заданий приведено в табл. 1.

В условиях соревнования участники давали значительно меньше ответов как в творческом ($Z = -3.9$, $p < 0.001$), так и в контрольном задании ($Z = -3.9$, $p < 0.001$). При этом не было значимых различий в оценке субъективной трудности задания при индивидуальном и совместном выполнении (см. табл. 2).

Эмоции при совместном выполнении творческого задания были более положительными по сравнению с индивидуальным выполнением

($Z = 2.7$, $p < 0.01$). В контрольном задании различий не наблюдалось.

По результатам оценки личностной тревожности (проведена у 40 человек из 44) выявлено: у двоих участников уровень тревожности низкий (до 30 баллов), у 22 — средний (31–45 баллов) и у 16 — высокий (46 и выше баллов) [16]. При этом различий в количестве ответов на творческое и контрольное задание между группами “низкий, средний уровень тревожности” (24 человека) и группой с высоким уровнем тревожности (16 человек) не наблюдалось — как при индивидуальном, так и при совместном выполнении заданий.

Различия ВП при выполнении творческого задания в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением задания

Различия амплитуд ВП при выполнении творческого задания в зависимости от условий выполнения выявлены в нескольких временных интервалах. Амплитуда компонента P_1 (рис. 1) была значительно ниже при выполнении творческого задания в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением на интервале 56–104 мс после предъявления стимула (в зоне интереса (C_3-O_2): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 4.6$, $p < 0.05$) во всех отведениях зоны интереса.

Различия в интервалах 136–240 и 240–320 мс с разными топографиями соотносятся с компонентом P_2 (рис. 1). Амплитуда данного компонента ВП была меньше при выполнении задания в условиях соревнования в отведениях Fp_z , F_3 , F_z , F_4 , C_3 , C_4 , P_3 , P_z , P_4 , O_1 , O_2 (эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 11.25$, $p < 0.01$, взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(14,602)} = 5.4$, $e(G-G) = 0.17$, $p < 0.01$). В данном интервале наблюдается значимое влияние фактора УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ: $F_{(1,38)} = 4.8$, $p < 0.05$ — и при совместном, и при индивидуальном выполнении амплитуда ВП в среднем выше в группе с высокой тревожностью по сравнению с группой с низкой тревожностью, однако топографические особенности данной реакции не специфичны (взаимодействие факторов УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ $\times$ ЗОНА не значимо). Во всех других рассматриваемых временных интервалах (как более ранних, так и более поздних) влияние фактора УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ не было значимо.

В интервале 240–320 мс амплитуда положительного компонента была ниже в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением задания в отведениях F_3 , F_4 , C_3 , C_4 , T_5 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 , O_1 , O_2 (эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 14.3$, $p < 0.001$, взаимодействие

факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(14,602)} = 5.4$, $e(G-G) = 0.18$, $p < 0.001$).

На интервале 456–552 мс наблюдаются различия амплитуды лобного компонента $N400$, амплитуда которого менее негативна при совместном выполнении задания по сравнению с индивидуальным (в зоне интереса (Fp_z-F_8): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 5.7$, $p < 0.05$, взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(5,215)} = 4.9$, $e(G-G) = 0.7$, $p < 0.01$), различия наблюдаются в отведениях Fp_z , F_7 , F_3 , F_z , F_4 .

В теменных областях амплитуда позднего положительного компонента, который может быть соотнесен с компонентом $P600$, на интервале 524–728 мс также была ниже в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением (в зоне интереса (C_3-O_2): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 6.9$, $p < 0.05$, взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(8,344)} = 5.5$, $e(G-G) = 0.5$, $p < 0.001$) во всех отведениях зоны интереса (C_3 , C_4 , T_5 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 , O_1 , O_2). В данном интервале амплитуда ВП при совместном выполнении задания отрицательная, а при индивидуальном выполнении — положительная в большинстве отведений зоны интереса.

Порядок выполнения заданий не влиял на эффекты факторов ни в одном из выделенных временных интервалов.

Различия ВП при выполнении контрольного задания в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением задания

Различия амплитуд ВП при выполнении контрольного задания в зависимости от условий выполнения относятся к тем же компонентам ВП, что и в творческом задании, однако имеют свою специфику (рис. 2). Амплитуда компонента P_1 значительно ниже при выполнении контрольного задания в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением на интервале 76–112 мс после предъявления стимула (в зоне интереса (C_3-O_2): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 8.8$, $p < 0.01$) во всех отведениях зоны интереса. При оценке влияния уровня тревожности на амплитуды ВП в интервале 76–112 мс в зоне интереса наблюдается значимое взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ: $F_{(1,38)} = 5.3$, $p < 0.03$. При анализе апостериорных эффектов выяснено, что в группе с низким и средним уровнем тревожности нет различий амплитуды между индивидуальным выполнением задания и в условиях соревнования, в то время как в группе участников с высоким уровнем тревожности амплитуда ВП в данном компоненте значимо выше при индивидуальном выполнении по сравнению с выполнением в условиях со-

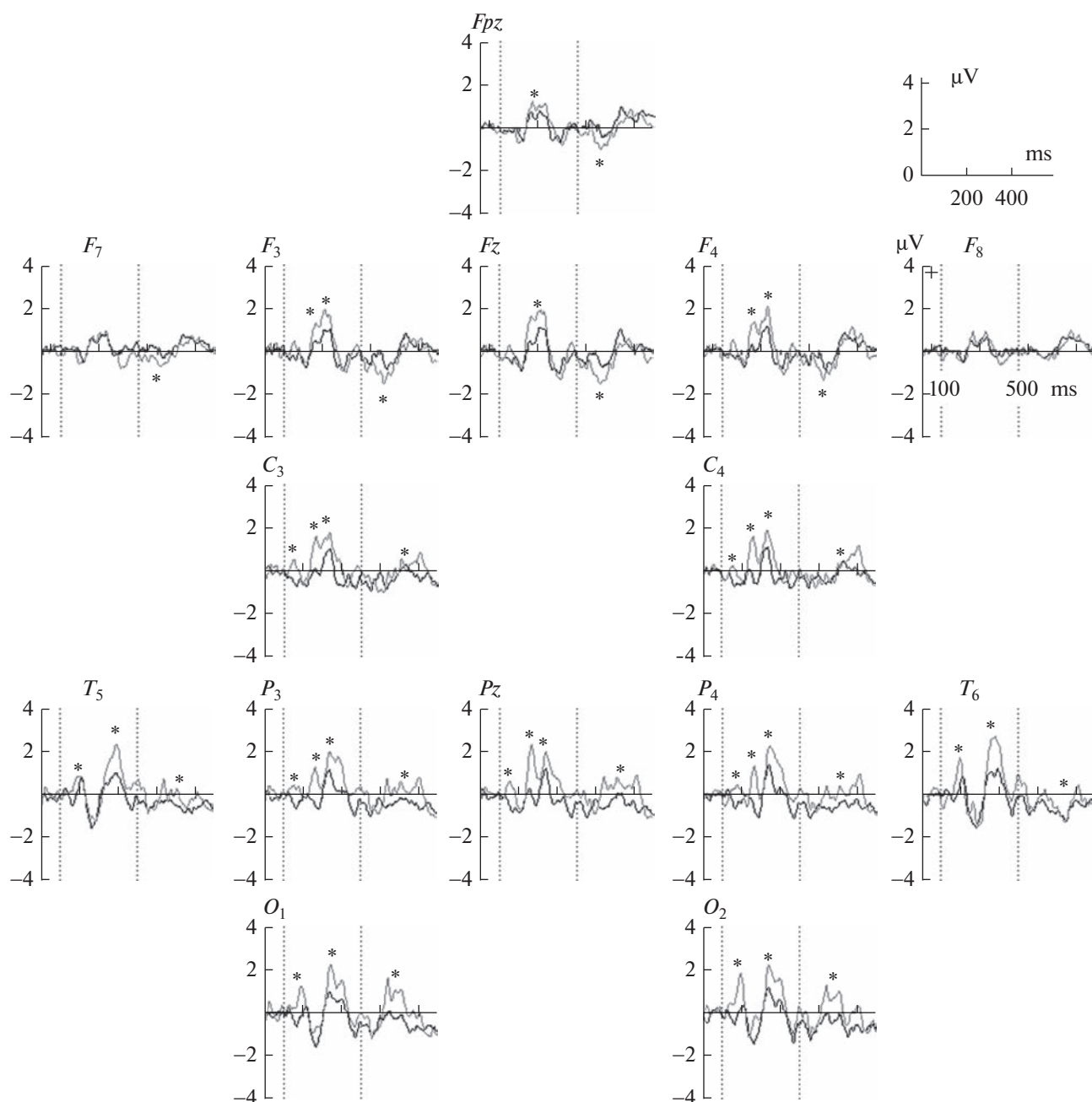


Рис. 1. ВП при нахождении ответа в творческом задании в условиях соревнования (черная линия) и индивидуального выполнения (серая линия).

Обозначения: *Fpz-O₂*: положение электродов. Для каждого электрода по оси *x* — время после предъявления стимула (мс); по оси *y* — амплитуда ВП (мкВ), размерность шкал обозначена на графике *F₈*. Вертикальные пунктирные линии обозначают начало и конец предъявления стимула (длительность стимула 400 мс). Положительная полярность (плюс) — вверх. * — электроды и компоненты ВП, амплитуда которых значимо различалась между условиями.

реования. Таким образом, эффект, описанный в общей группе (большая амплитуда ВП при индивидуальном выполнении в сравнении с соревнованием) более характерен для участников с высоким уровнем личностной тревожности. Во всех других рассматриваемых временных интервалах влияние фактора **УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ** не значимо

и рассматриваются эффекты в общей группе испытуемых.

Различия в амплитуде компонента P2 наблюдаются во временном интервале 196–264 мс (эффект фактора **УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ**: $F_{(1,43)} = 28.3$, $p < 0.001$) — во всех зонах коры амплитуда в этом интервале ниже в условиях соревнования.

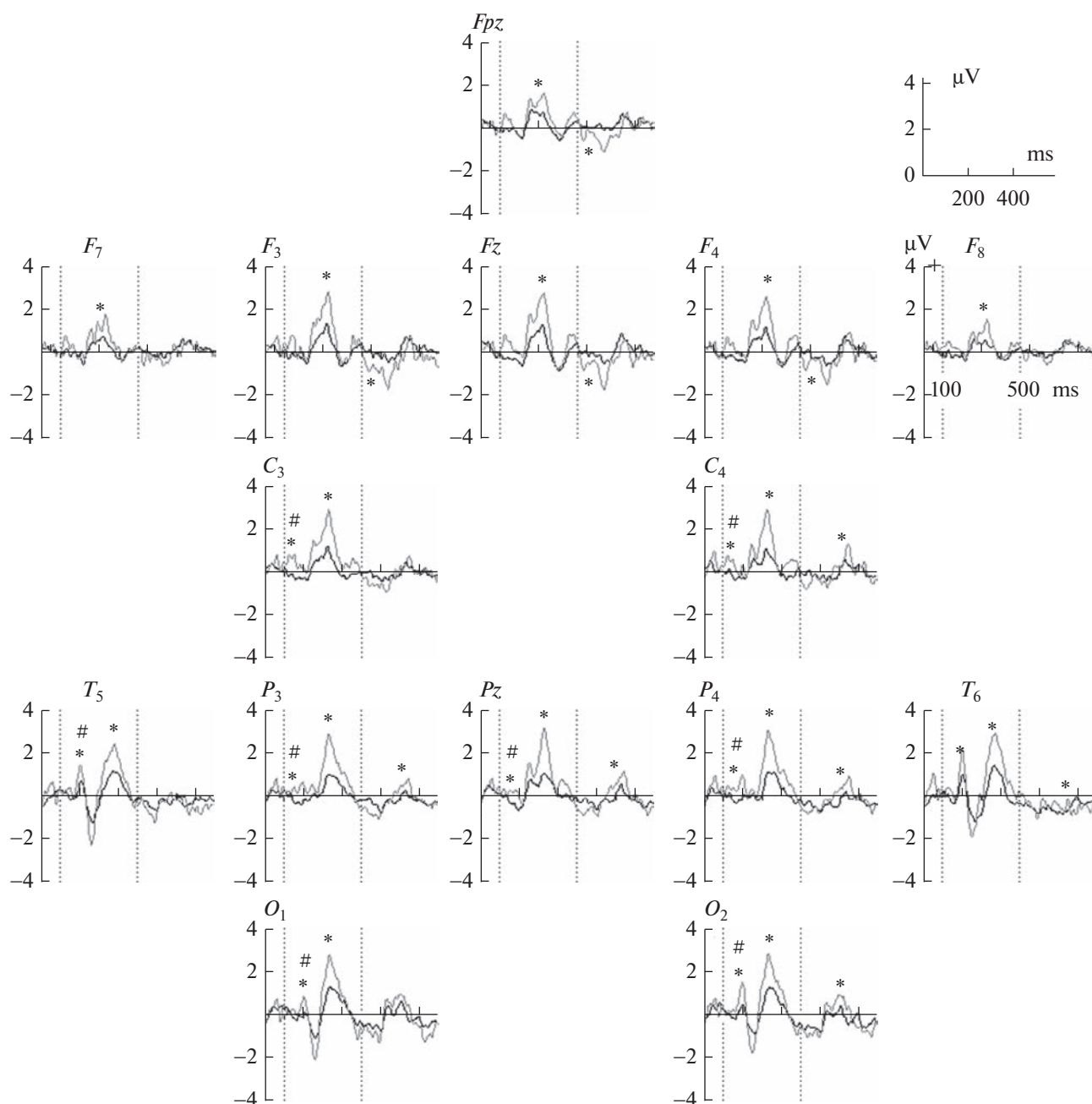


Рис. 2. ВП при нахождении ответа в контрольном задании в условиях соревнования (черная линия) и индивидуального выполнения (серая линия).

Обозначения: $Fpz-O_2$: положение электродов. Для каждого электрода по оси x — время после предъявления первого стимула (мс); по оси y — амплитуда ВП (мкВ), размерность шкал обозначена на графике F_8 . Вертикальные пунктирные линии обозначают начало и конец предъявления стимула (длительность стимула 400 мс). Положительная полярность (плюс) — вверх. * — электроды и компоненты ВП, амплитуда которых значимо различалась между условиями. # — компонент ВП, в котором наблюдается значимый эффект фактора УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ.

Амплитуда во временном интервале 456–552 мс в лобных отделах менее негативная в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением (в зоне интереса ($Fpz-F_8$): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,43)} = 5.1$, $p < 0.05$, взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫ-

ПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(5,215)} = 6.9$, $e(G-G) = 0.5$, $p < 0.001$), различия наблюдаются в отведениях Fpz , F_3 , Fz , F_4 .

Амплитуда позднего положительного компонента на интервале 524–728 мс ниже при выполнении контрольного задания в условиях соревнова-

ния (в зоне интереса (C_3-O_2): эффект фактора УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ: $F_{(1,143)} = 6.9, p < 0.05$, взаимодействие факторов УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ $\times$ ЗОНА: $F_{(8,344)} = 5.5, e(G-G) = 0.5, p < 0.001$) в отведениях C_4, P_3, P_z, P_4, O_2 .

Порядок выполнения заданий не влиял на эффекты факторов ни в одном из выделенных временных интервалов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполнение заданий в условиях социального взаимодействия, а в частности, в условиях соревнования продемонстрировало отличия от индивидуального выполнения как при анализе поведенческих данных, так и при оценке физиологических показателей. Примечательно, что с субъективной точки зрения выполнение заданий в паре — в условиях соревнования — увеличивало положительные эмоции при выполнении творческого задания и не приводило к увеличению трудности заданий, хотя объективно — процент ответов значимо снижался как для творческого, так и для контрольного задания. Объективно — условия соревнования снижали эффективность деятельности, оцениваемой по проценту найденных ответов, соответственно увеличивали трудность задания. Тем не менее оценка эмоционального фона задания была выше, чем при индивидуальном выполнении. Вероятно, есть несколько причин для этого. В нашем исследовании условия соревнования задавались относительно мягко и определялись только присутствием другого человека, который может либо ответить раньше, либо дать большее количество ответов. Обратной связи о полученном результате или поощрения по результатам не предполагалось, условия соревнования формировались автоматически, исходя из процессуального противопоставления результатов двух участников. В этих условиях участники могли воспринимать процесс больше как игру, а не как соревнование. Кроме того, если в условиях индивидуального выполнения у участника есть обратная связь только о количестве и качестве найденных самостоятельно ответов, то в условиях соревнования — он также слышит ответы партнера и может ориентироваться по количеству и качеству этих ответов. В исследованиях [8, 21] восприятие чужих идей при выполнении теста необычного использования способствовало увеличению оригинальности создаваемых участником идей.

Выполнение задания в условиях совместной деятельности (в условиях соревнования) существенно влияло на амплитуды вызванных потенциалов. При этом не наблюдалось эффектов “обучения” или утомления — то есть нет значимого эффекта последовательности выполнения задания в паре или индивидуально на амплитуды ВП. Необходимо отметить, что выполнение и творческого и контрольного

(нетворческого) заданий в условиях соревнования относительно индивидуального выполнения — характеризовалось принципиально одинаковыми коррелятами, с некоторыми особенностями, которые будут отмечены отдельно в ходе обсуждения.

Выполнение творческого задания в паре по сравнению с индивидуальным выполнением приводит к уменьшению амплитуды компонента P_1 в затылочных и теменных областях коры. В затылочных отведениях O_1 и O_2 также заметна разница латентности пика компонента P_1 — 84 мс при индивидуальном и 112 мс при совместном выполнении задания. Компонент P_1 связан с механизмами зрительного внимания и сознательного восприятия [22, 23], амплитуда P_1 модулируется внешними стимулами (для зрительных стимулов — это интенсивность освещения, контрастность, цвет) [24]. Помимо внешней модуляции свойствами стимулов, амплитуда и латентность P_1 зависят от “тренированности” зрительного восприятия слов и имеющих концептуальных знаний [25, 26]. Предъявление стимулов в условиях индивидуального и совместного выполнения заданий было одинаковым, поэтому на амплитуду и латентность P_1 влияли, по-видимому, внутренние факторы. Например, обдумывание предыдущего ответа “соперника” или внимание, направленное на поведение и действия “соперника”, вероятно, снижали амплитуду P_1 в ответ на зрительные стимулы. Ранее в работе [27] было показано, что направленное внимание к звуковым вербальным стимулам снижало амплитуду компонентов P_1 и $P_2/P300$ в ответ на одновременно предъявляемые зрительные вербальные стимулы (существительные). Можно отметить, что при выполнении творческого задания в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением различалась также латентность P_1 усредненных ВП, в то время как при выполнении контрольного задания таких различий нет. Это может свидетельствовать о дополнительной когнитивной нагрузке при выполнении творческого задания, возможно, связанной с тем, что участники могли быть вовлечены в обдумывание предыдущих ответов партнера, которые являются менее предсказуемыми, чем в контрольном задании. Амплитуда компонента P_2 также в большой степени отражает вовлечение механизмов произвольного внимания в выполнение задания. В исследовании [28] при оценке выигрыша в азартной игре условия социального контекста влияли сильнее на амплитуду компонента P_2 , чем собственный выигрыш и проигрыш. В данном исследовании как при простом сравнении своего выигрыша и выигрыша партнера, так и при “соревновании” за определенную сумму — амплитуда P_2 была ниже, чем при индивидуальной “игре”. Кроме того, в социальном контексте нивелировались различия амплитуды P_2 между выигрышами и проигрышами, тогда как при

индивидуальном выполнении наблюдалась большая амплитуда в случае выигрыша. В нашем исследовании амплитуда P_2 также значимо ниже при выполнении заданий — как творческого, так и контрольного — в условиях социального взаимодействия. На амплитуды ранних компонентов $P100$ при выполнении нетворческого задания и $P200$ при выполнении творческого задания влиял показатель уровня тревожности. Амплитуда этих компонентов была выше в группе с высоким уровнем личностной тревожности по сравнению с группой со средней и низкой тревожностью. При выполнении контрольного задания различия проявлялись только при индивидуальном выполнении, при творческом задании — и при индивидуальном и при совместном выполнении. При рассмотрении влияния уровня тревожности на параметры вызванных потенциалов отмечается увеличение амплитуды $P100$ при восприятии специфических пугающих изображений у людей с соответствующей фобией [29] или лиц у участников с повышенным уровнем личностной и социальной тревожности [30]. Повышенная амплитуда ранних компонентов ВП у лиц с высоким уровнем тревожности связывается авторами с выделением большего количества ресурсов внимания к тревожащей стимуляции [29–31]. В нашем исследовании также наблюдается некоторый эффект увеличения амплитуды ранних компонентов ВП в группе с высоким уровнем тревожности, хотя на показателях деятельности (количестве найденных ответов) это не сказывается. Более того, только при выполнении задания индивидуально в контрольном задании наблюдалась большая амплитуда компонента $P100$ в группе “высокотревожных” участников, что может указывать на большую тревогу именно в данных условиях, когда нет возможности соотносить эффективность своего выполнения с “референтным” показателем деятельности другого человека.

Амплитуды лобного компонента $N400$ и позднего позитивного компонента (соотносимого с $R600$) в теменных и затылочных областях — были также ниже в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением задания. При этом различия $N400$ выражены больше в лобных областях левого полушария. Амплитуда негативности $N400$ чувствительна к знакомости запомненного слова (old/new effect), частотности слова и конгруэнтности слова и контекста [32], компонент $N400$ с распределением в лобных областях (как в нашем исследовании), авторами связывается не только с процессами рабочей памяти [33, 34], но и с автоматической категоризацией предъявленных стимулов [35]. Кроме того, амплитуда $N400$ может модулироваться уровнем внимания [22]. Так как предъявление стимулов для совместного и индивидуального выполнения было рандомизировано между испытуемыми, предъявленные стимулы по группе можно считать одинаковыми, и различия амплитуд

$N400$ связано не с различиями семантического значения стимулов. Таким образом, впервые нами продемонстрировано уменьшение амплитуды семантического компонента вызванных потенциалов при творческой и нетворческой когнитивной деятельности в условиях соревнования по сравнению с индивидуальным выполнением.

Подобное наблюдение характерно и для позднего позитивного компонента, который может быть соотношен с компонентом $R600$ (в нашем исследовании — на временном интервале 524–728 мс). Данный компонент в различных исследованиях обозначается как “поздний позитивный потенциал (комплекс)” (late positive complex) [36, 37]. Амплитуда поздней позитивности увеличивается при восприятии отдаленного по сравнению с близким по контексту завершением предложения и при восприятии “аномальных” предложений по сравнению с метафорическими. Также было показано, что восприятие “необычного использования предмета” при предъявлении ответов на тест альтернативного использования — приводит к увеличению амплитуды позднего компонента (500–900 мс) по сравнению с “обычным” использованием, при этом амплитуда при “неподходящем, нереалистичном использовании” (бессмысленная фраза) наиболее высока [38, 39]. В нашем исследовании компонент $R600$ выделяется только как положительное отклонение потенциала после $N400$, и в условиях совместной деятельности амплитуда данного компонента не достигает положительных значений, в противоположность — при индивидуальном выполнении компонент может быть определен и в лобных и в теменных отведениях. Более низкая амплитуда данного компонента в условиях соревнования может быть сопоставлена с влиянием затрудняющих факторов на творческую (и нетворческую) деятельность. В исследовании [40], где в качестве творческих заданий использовались задачи по “расшифровке” иероглифов — более сложные иероглифы вызывали увеличение амплитуды $N2$, $N400$ и уменьшение амплитуды поздней позитивности по сравнению с простыми иероглифами. В нашем исследовании участие другого человека в качестве соперника объективно затрудняло деятельность, так как количество найденных ответов было значимо меньше, чем при выполнении задания индивидуально.

Таким образом, совместное выполнение как творческого, так и нетворческого вербального задания в условиях соревнования приводило к уменьшению амплитуды вызванных потенциалов, как ранних компонентов (P_1 , P_2), так и поздних, семантических компонентов ВП. Социальные взаимодействия, даже задаваемые простым контекстом выполнения задачи, существенно влияют на нейрофизиологические корреляты деятельности, вероятно, в связи с тем, что социальные стимулы ввиду своего биологического значения, привлека-

ют значительные ресурсы мозга на всех этапах деятельности. В дальнейшем мы планируем изменить условия социального взаимодействия на сотрудничество (в сравнении с соперничеством), однако возможно, что и в условиях сотрудничества значительная часть ресурсов мозга будет также отведена на оценку действий партнера и отличия ВП от индивидуальной деятельности будут принципиально такими же. Объективно затрудняя когнитивную деятельность, совместное выполнение задания приводило к более позитивным эмоциям именно при творческой деятельности, субъективно делая эту деятельность не менее сложной, но более интересной и приятной.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-28-02012).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствовали этическим Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. Участие в исследовании было добровольным, после ознакомления с процедурой исследования участники давали информированное согласие (Протокол № 1-02 от 02 февраля 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Вклад авторов: идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Ш.), участие в проведении, обработка и анализ данных (Н.В.Ш., Ж.В.Н.), написание и редактирование рукописи (Н.В.Ш., Ж.В.Н.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории: В.А. Галкину, В.А. Васенькиной, А.Н. Грохотовой — за участие в сборе данных, предобработке самоотчетов и файлов ЭЭГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shemyakina NV, Nagornova ZV (2021) Neurophysiological characteristics of competition in skills and cooperation in creativity task performance: a review of hyperscanning research. *Human Physiology* 47: 87. <https://doi.org/10.1134/S0362119721010126>

2. Astolfi L, Cincotti F, Mattia D, De Vico Fallani F, Salinari S, Vecchiato G, Toppi J, Wilke C, Doud A, Yuan H, He B, Babiloni F (2010) Imaging the social brain: multi-subjects EEG recordings during the “Chicken’s game”. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2010: 1734. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5626708>
3. Peng M, Wang X, Chen W, Chen T, Cai M, Sun X, Wang Y (2021) Cooperate or aggress? An opponent’s tendency to cooperate modulates the neural dynamics of interpersonal cooperation. *Neuropsychologia* 162: 108025. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2021.108025>
4. Cui F, Wang C, Cao Q, Jiao C (2019) Social hierarchies in third-party punishment: A behavioral and ERP study. *Biol Psychol* 146: 107722. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2019.107722>
5. Moore M, Katsumi Y, Dolcos S, Dolcos F (2021) Electrophysiological Correlates of Social Decision-making: An EEG Investigation of a Modified Ultimatum Game. *J Cogn Neurosci* 34: 54–78. https://doi.org/10.1162/jocn_a_01782
6. Tortosa MI, Lupiáñez J, Ruz M (2013) Race, emotion and trust: an ERP study. *Brain Res* 1494: 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.037>
7. Lu K, Qiao X, Hao N (2019) Praising or keeping silent on partner’s ideas: Leading brainstorming in particular ways. *Neuropsychologia* 124: 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2019.01.004>
8. Fink A, Grabner RH, Gebauer D, Reishofer G, Koschutnig K, Ebner F (2010) Enhancing creativity by means of cognitive stimulation: evidence from an fMRI study. *Neuroimage* 52: 1687–1695. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.072>
9. Xue H, Lu K, Hao N (2018) Cooperation makes two less-creative individuals turn into a highly-creative pair. *Neuroimage* 172: 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.02.007>
10. Lu K, Xue H, Nozawa T, Hao N (2019) Cooperation Makes a Group be More Creative. *Cereb Cortex* 29: 3457–3470. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy215>
11. Lu K, Teng J, Hao N (2020) Gender of partner affects the interaction pattern during group creative idea generation. *Exp Brain Res* 238: 1157–1168. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05799-7>
12. Lu K, Yu T, Hao N (2020) Creating while taking turns, the choice to unlocking group creative potential. *Neuroimage* 219: 117025. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117025>
13. Lu K, Qiao X, Yun Q, Hao N (2021) Educational diversity and group creativity: Evidence from fNIRS hyperscanning. *Neuroimage* 243: 118564. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118564>
14. Mayseless N, Hawthorne G, Reiss AL (2019) Real-life creative problem solving in teams: fNIRS based hyperscanning study. *Neuroimage* 203: 116161. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116161>
15. Guilford JP (1967) *The Nature of Human Intelligence*. New York. McGraw-Hill.

16. Райгородский ДЯ (редактор-составитель) (2001) Практическая психодиагностика. Методики и тесты. Учебное пособие. Самара. Издательский Дом "БАХРАХ-М". [Raigorodsky DY (ed) (2001) Practical psychodiagnostics. Techniques and tests. Tutorial. Samara: BAKHRAKH-M Publishing House. (In Russ)].
17. Vigário RN (1997) Extraction of ocular artifacts from EEG using independent component analysis. *EEG and Clin Neurophysiol* 103: 395–404.
[https://doi.org/10.1016/s0013-4694\(97\)00042-8](https://doi.org/10.1016/s0013-4694(97)00042-8)
18. Jung TP, Makeig S, Humphries C, Lee TW, McKeown MJ, Iragui V, Sejnowski TJ (2000) Removing electroencephalographic artifacts by blind source separation. *Psychophysiology* 37: 163–178.
<https://doi.org/10.1111/1469-8986.3720163>
19. Tereshchenko EP, Ponomarev VA, Kropotov YuD, Müller A (2009) Comparative efficiencies of different methods for removing blink artifacts in analyzing quantitative electroencephalogram and event-related potentials. *Hum Physiol* 35: 241–247.
<https://doi.org/10.1134/S0362119709020157>
20. Greenhouse SW, Geisser S (1959) On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika* 24: 95–112.
21. Fink A, Koschutnig K, Benedek M, Reishofer G, Ischebeck A, Weiss EM, Ebner F (2012) Stimulating creativity via the exposure to other people's ideas. *Hum Brain Mapp* 33: 2603–2610.
<https://doi.org/10.1002/hbm.21387>
22. Coull JT (1998) Neural correlates of attention and arousal: insights from electrophysiology, functional neuroimaging and psychopharmacology. *Prog Neurobiol* 55: 343–361.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00011-2)
23. Chica AB, Lasaponara S, Lupiáñez J, Doricchi F, Bartolomeo P (2010) Exogenous attention can capture perceptual consciousness: ERP and behavioural evidence. *Neuroimage* 51: 1205–1212.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.002>
24. Schindler S, Bruchmann M, Gathmann B, Moeck R, Straube T (2021) Effects of low-level visual information and perceptual load on P1 and N170 responses to emotional expressions. *Cortex* 136: 14–27.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.12.011>
25. Cao F, Rickles B, Vu M, Zhu Z, Chan DH, Harris LN, Stafura J, Xu Y, Perfetti CA (2013) Early stage visual-orthographic processes predict long-term retention of word form and meaning: a visual encoding training study. *J Neurolinguistics* 26: 440–461.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroling.2013.01.003>
26. Rabovsky M, Sommer W, Abdel Rahman R (2012) Depth of conceptual knowledge modulates visual processes during word reading. *J Cogn Neurosci* 24: 990–1005.
https://doi.org/10.1162/jocn_a_00117
27. Medvedev SV, Rudas MS, Pakhomov SV, Ivanitskii AM, Il'yuchenok IR, Ivanitskii GA (2003) Mechanisms of Selective Attention during Competitive Discrimination of Visual and Auditory Verbal Information: Positron Emission Tomography and Cortical Evoked Potential Studies. *Hum Physiol* 29: 694–702.
<https://doi.org/10.1023/B:HUMP.0000008840.16235.c8>
28. Rigoni D, Polezzi D, Rumiati R, Guarino R, Sartori G (2010) When people matter more than money: an ERPs study. *Brain Res Bull* 81: 445–452.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.12.003>
29. Kolassa IT, Musial F, Kolassa S, Miltner WH (2006) Event-related potentials when identifying or color-naming threatening schematic stimuli in spider phobic and non-phobic individuals. *BMC Psychiatry* 6: 38.
<https://doi.org/10.1186/1471-244X-6-38>
30. Wieser MJ, Moscovitch DA (2015) The Effect of Affective Context on Visuocortical Processing of Neutral Faces in Social Anxiety. *Front Psychol* 6: 1824.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01824>
31. Mercado F, Carretié L, Hinojosa JA, Peñacoba C (2009) Two successive phases in the threat-related attentional response of anxious subjects: neural correlates. *Depress Anxiety* 26: 1141–1150.
<https://doi.org/10.1002/da.20608>
32. Thornhill DE, Van Petten C (2012) Lexical versus conceptual anticipation during sentence processing: frontal positivity and N400 ERP components. *Int J Psychophysiol* 83: 382–392.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2011.12.007>
33. Bridger EK, Bader R, Kriukova O, Unger K, Mecklinger A (2012) The FN400 is functionally distinct from the N400. *Neuroimage* 63: 1334–1342.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.047>
34. Stróżak P, Abedzadeh D, Curran T (2016) Separating the FN400 and N400 potentials across recognition memory experiments. *Brain Res* 1635: 41–60.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.01.015>
35. Wang X, Ma Q, Wang C (2012) N400 as an index of uncontrolled categorization processing in brand extension. *Neurosci Lett* 525: 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.07.043>
36. Davenport T, Coulson S (2011) Predictability and novelty in literal language comprehension: an ERP study. *Brain Res* 1418: 70–82.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.039>
37. Rataj K, Przekoracka-Krawczyk A, van der Lubbe RHJ (2018) On understanding creative language: The late positive complex and novel metaphor comprehension. *Brain Res* 1678: 231–244.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.030>
38. Kröger S, Rutter B, Hill H, Windmann S, Hermann C, Abraham A (2013) An ERP study of passive creative conceptual expansion using a modified alternate uses task. *Brain Res* 1527: 189–198.
39. Abraham A, Rutter B, Hermann C (2021) Conceptual expansion via novel metaphor processing: an ERP replication and extension study examining individual differences in creativity. *Brain Lang* 221: 105007.
<https://doi.org/10.1016/j.bandl.2021.105007>
40. Zhang Z, Luo Y, Wang C, Warren CM, Xia Q, Xing Q, Cao B, Lei Y, Li H (2019) Identification and transformation difficulty in problem solving: Electrophysiological evidence from chunk decomposition. *Biol Psychol* 143: 10–21.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2019.02.004>

THE IMPACT OF COMPETITIVE CONDITIONS ON AMPLITUDES OF EVENT-RELATED POTENTIALS DURING VERBAL CREATIVE AND NON-CREATIVE TASK PERFORMANCE

Zh. V. Nagornova^{a,#} and N. V. Shemyakina^{a,##}

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

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

^{##}*e-mail: shemyakina_n@mail.ru*

Brain activity changes significantly under various social interaction conditions. However, the impact of the context of social interactions on neurophysiological correlates of cognitive and creative activity per se has not been sufficiently addressed. Two polar types of interactions can be distinguished when solving tasks, cooperation or competition. This study was aimed to assess the impact of competitive conditions on amplitudes of event-related potentials (ERPs) when solving creative and non-creative tasks. The subjects (26 male, 18 female) performed two types of tasks as individuals and dyads (male–male, female–female): a creative task to think up an unusual use of an ordinary item and a non-creative task to enumerate items from the proposed categories. In each of the tasks, ERPs were compared during its competitive and individual performance. Competitive conditions led to a decrease in amplitudes of the components P_1 and P_2 , as well as N400 and P600, during both creative and non-creative activity, suggesting the difficulty of finding an answer. The percentage of answers found was also significantly lower under conditions of competitive versus individual task performance. Apparently, a significant portion of resources when performing a task under social interaction conditions is directed toward the assessment of partner's responses and answers, as manifested in a decrease in the amplitude both of the earlier attention-related ERP components (P_1 , P_2) and the later components related to semantic stimulus processing (N400, P600).

Keywords: EEG, event-related potentials (ERP), verbal creative activity, competition, social interactions, alternative uses task (AUT), P_1 , P_2 , N400, late positivity (P600)

УМЕНЬШЕНИЕ АУТОФАГИЧЕСКОЙ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ В СА1 РАЙОНЕ ГИППОКАМПА И ЛОБНОЙ КОРЕ МОЗГА КРЫС ВВЕДЕННЫМ ИНТРАНАЗАЛЬНО ИНСУЛИНОМ ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА

© 2023 г. Е. А. Фокина¹, И. О. Захарова¹, Л. В. Баюнова¹,
Д. К. Аврова¹, И. О. Илясов¹, Н. Ф. Аврова^{1,*}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия
*e-mail: avrova@iephb.ru

Поступила в редакцию 14.10.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Для разработки подходов к лечению ишемических поражений мозга важно понимание механизмов регуляции апоптотической и аутофагической гибели нейронов. При сильно выраженном ишемическом (или другом патологическом) воздействии нейроны могут гибнуть от активации и апоптоза, и аутофагии. Целью работы является оценка вклада активации аутофагии и апоптоза в гибель нейронов СА1 района гиппокампа и лобной коры мозга крыс при двухсосудистой ишемии переднего мозга и гипотензии и последующей длительной реперфузии, а также изучение способности инсулина, введенного интраназально, предотвращать аутофагическую и апоптотическую гибель нейронов. Ингибитор аутофагии 3-метиладенин или ингибитор апоптоза Ас-DEVD-СНО или фосфатный буфер вводили крысам интрацеребровентрикулярно до ишемии и реперфузии. Для подсчета количества живых нейронов срезы мозга окрашивали по Нисслю. При ишемии и реперфузии число живых нейронов в СА1 районе гиппокампа снижалось до $58.3 \pm 1.5\%$ от их содержания у ложнооперированных крыс (контроль, принятый за 100%). Введение крысам ингибитора аутофагии или апоптоза увеличивало число живых нейронов в районе СА1 гиппокампа с $58.3 \pm 1.5\%$ до $90.4 \pm 2.2\%$ ($p < 0.001$) и $71.6 \pm 1.8\%$ ($p < 0.001$) от контроля соответственно. Введение крысам 0.5 МЕ инсулина (до ишемии и ежедневно в течение 7 дней при реперфузии) нормализовало число живых нейронов в СА1 районе гиппокампа до $100.2 \pm 1.9\%$ от контроля. В лобной коре мозга также наблюдалось снижение жизнеспособности нейронов при ишемии и реперфузии и ее повышение при введении ингибиторов аутофагии и апоптоза и в большей степени при введении инсулина. Отличие заключалось в меньшей чувствительности нейронов коры мозга, чем нейронов гиппокампа, к ишемии и реперфузии. Полученные данные свидетельствуют о способности инсулина, введенного интраназально, уменьшать гибель нейронов мозга, вызванную активацией аутофагии и апоптоза, при ишемии мозга и реперфузии.

Ключевые слова: ишемия мозга, аутофагия, апоптоз, жизнеспособность нейронов, введенный интраназально инсулин

DOI: 10.31857/S0044452923010047, **EDN:** GXGJDY

В последние годы появились убедительные свидетельства того, что без понимания механизмов аутофагической гибели нейронов и их взаимосвязи с механизмами апоптотической гибели этих клеток невозможно достичь серьезных успехов в разработке подходов к лечению ишемических поражений мозга, в том числе инсультов. Основными причинами гибели нейронов при ишемическом поражении мозга являются апоптоз, аутофагия и некроз. При этом аутофагия принадлежит ключевая роль в поддержании клеточного гомеостаза. Но в настоящее время представления об исключительно защитной роли аутофагии пересмотрены. Четко про-

слеживается участие аутофагических процессов в гибели нейронов, прежде всего нейронов гиппокампа, что продемонстрировано, в частности, при ишемии и реперфузии мозга. Так, показана способность многих нейротрофических факторов повышать жизнеспособность нейронов и других клеток мозга благодаря ингибированию аутофагии при ишемии мозга и его реперфузии. К ним относятся флавоноиды, ганглиозид GM1, финголимод (аналог сфингозин-1-фосфата), N-ацетил-серотонин (предшественник мелатонина), ресвератрол и другие соединения [1–7].

При этом в научной литературе можно встретить и работы, в которых найдено, что активация аутофагии в мозге при некоторых видах ишемического воздействия на него может носить защитный характер. Так, активация аутофагии до ишемического поражения мозга может обладать эффектом preconditionирования [8]. Активатор аутофагии рапамицин способен уменьшать размер поражения мозга и улучшать неврологические показатели у животных при фокальной ишемии [9, 10]. Есть и другие примеры благоприятного эффекта активации аутофагии на состояние животных при ишемии и реперфузии мозга [11, 12].

Но создается впечатление, что при достаточной силе ишемического воздействия на мозг в его острую фазу активация аутофагии приводит к гибели нейронов мозга. В этой связи актуальным является исследование способности перспективных нейропротекторов, которые могут найти себе применение в клинической практике при лечении инсультов и других патологических состояний, связанных с ишемией мозга, предотвращать аутофагическую гибель нейронов и других клеток мозга при этих патологиях, что будет способствовать более глубокому пониманию механизма их защитного действия.

По данным Всемирной организации здравоохранения от cerebrovasкулярных заболеваний в мире ежегодно умирает около 5 млн человек. Из общего числа этих болезней 80–85% приходится на инсульт мозга [13]. Инсульт мозга является одной из главных причин смерти людей в мире. Он уносит больше жизней в развивающихся странах, чем в развитых государствах [14]. При этом в развитых странах, например в США, инсульт относится к основным причинам длительной и тяжелой инвалидности людей [15].

Долгое время считали, что для понимания действия нейропротекторов достаточно расшифровать механизмы их антиапоптотического и антинекротического действия. Но сейчас стало совершенно ясно, что невозможно достичь понимания нарушений в мозге при ишемии и реперфузии и оценить действие на них нейропротекторов без исследования аутофагической гибели нейронов. Повидимому, сигнальные молекулы и внутриклеточные каскады, ответственные за регуляцию аутофагии, могут стать одной из важнейших терапевтических мишеней при лечении инсульта головного мозга и других форм его ишемического поражения [5, 16, 17].

Инсулин является одним из наиболее перспективных нейропротекторов. Это в значительной мере обусловлено возможностью его интраназального введения, при котором он попадает непосредственно в мозг, минуя гематоэнцефалический барьер [18, 19]. Проведены многочисленные и в целом успешные клинические испытания инсулина

при болезни Альцгеймера [20, 21], начаты испытания при болезни Паркинсона [22], им предшествовали исследования нейропротекторной роли инсулина, введенного животным с нейродегенеративными заболеваниями. Но, как ни странно, работы по изучению способности инсулина, введенного интраназально, предотвращать гибель нейронов мозга при его ишемическом поражении и последующей реперфузии практически отсутствуют, за исключением нескольких работ нашей лаборатории, посвященных его способности нормализовать уровень продуктов перекисного окисления липидов и другие метаболические нарушения в мозгу молодых и старых крыс [23, 24]. Эффект инсулина на аутофагическую гибель нейронов мозга при ишемических воздействиях остается пока неизученным. И это, несмотря на большой интерес в современных научных исследованиях к той роли, которую играет аутофагия в гибели нейронов при различных патологических процессах.

Целью настоящей работы является оценка вклада аутофагии и апоптоза в гибель нейронов СА1 района гиппокампа и лобной коры мозга крыс при двухсудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и последующей реперфузией, а также изучение способности инсулина, введенного интраназально, предотвращать гибель нейронов, вызванную активацией этих процессов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Для интраназальных введений использовался бычий инсулин (I5500, Sigma, США), для интрацеребровентрикулярных введений – ингибитор аутофагии 3-метиладеннин (M9281, Sigma, США), ингибитор каспаз Ac-DEVD-CHO (BD Pharmingen, BD Biosciences, США). Животных наркотизировали хлоралгидратом (#15307, Sigma-Aldrich, США). Для катетеризации бедренной артерии применялся катетер (1.0 × 0.6 × 210 мм, 23G) от компании SciCat (Россия). Материал шовный хирургический стерильный (нерассасывающиеся лавсановые нити MP1,5 USP4-0, ООО “Линтекс”, Россия) накладывался для скрепления мягких тканей в области бедра и шеи. Кожа сшивалась с помощью одноразового стерильного степлера (Appose ULC auto suture, Covidien, США).

Интраназальное введение инсулина. Опыты проводили на самцах крыс линии Вистар массой 270–330 г. Инсулин (Sigma, США) в дозе 0.5 МЕ на крысу вводили интраназально за 1 ч до окклюзии каротидных артерий и гипотензии, а затем ежедневно в течение 7 дней на стадии реперфузии. Для этого в каждую ноздрю животного вводили по 10 мкл раствора, содержащего 1 мг инсулина в 1 мл цитратного буфера, что соответствует 0.5 МЕ инсулина. Цитратный буфер готовили как смесь равных объемов растворов 100 мМ лимонной кислоты и 100 мМ цитрата натрия, pH 4.4.

Операция по введению ингибиторов апоптоза и аутофагии в боковой (I) желудочек мозга крыс. Для того, чтобы определить, как влияет активация процессов аутофагии и апоптоза на жизнеспособность нейронов при двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией и последующей реперфузией крысам интрацеребровентрикулярно вводили ингибиторы аутофагии и апоптоза. Для того, чтобы уравнивать возможные последствия такого введения, всем остальным группам животных вводили интрацеребровентрикулярно стерильный фосфатный буфер, использовавшийся для растворения ингибиторов.

После наркотизации крыс хлоралгидратом, вводимым внутримышечно в дозе 400 мг/кг веса крыс, животных помещали в стереотаксис. Для трепанации черепа использовался стоматологический бор в области, расположенной над I желудочком мозга (координаты: AP = -0.92 мм, L = 1.5 мм, V = 3.5 мм относительно брегмы) в соответствии со стереотаксическим атласом [25]. Крысам вводили интрацеребровентрикулярно 20 мкг 3-метиладенина (3-MA) или 10 мкг Ас-DEVD-CHO, в виде растворов в фосфатном буфере объемом 4.5 мкл или аналогичный объем фосфатного буфера за 30 мин до ишемического воздействия с помощью шприца (Hamilton, США).

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией. Двухсосудистую ишемию переднего мозга вызывали у наркотизированных хлоралгидратом крыс путем пережатия на 10 мин каротидных артерий в сочетании с гипотензией — снижением артериального давления до 40 мм ртутного столба путем отбора крови в шприц с гепарином, как это описано ранее [26]. Реперфузию переднего мозга проводили, разжимая каротидные артерии и возвращая в кровяное русло кровь с гепарином, отобранную шприцом на стадии ишемии [26]. В качестве контрольных животных использовали ложнопериоперированных крыс. Животным после завершения ишемии обрабатывали раны стрептоцидом и накладывали швы. Послеоперационный уход за животными осуществлялся в течение 7 дней при содержании на стандартном рационе.

Определение числа живых нейронов в СА1 районе гиппокампа и лобной коре мозга. Через 7 сут после начала реперфузии проводили определение числа живых нейронов в СА1 районе гиппокампа и лобной коре мозга крыс. Наркотизированных хлоралгидратом животных декапитировали, извлекали мозг, промывали охлажденным физиологическим раствором и помещали на 7 дней в раствор 4%-ного параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (+4°C). Для криопротекции мозг выдерживали в растворе 30%-ной сахарозы 7 дней при +4°C, после этого его замораживали в изопентане и далее хранили при -80°C. Из области лобной коры мозга и

СА1 района и гиппокампа получали чередующиеся серии фронтальных срезов (10 мкм) с помощью криостата (Leika, Германия). Каждый 10-й срез монтировали на покрытые желатином стекла (Био-Витрум, Россия). Для оценки количества живых нейронов проводили окрашивание толуидиновым синим по модифицированному методу Ниссля [27]. Каждая группа животных включала по 3 крысы. Снимки ($n = 15-20$ с каждого среза) получали с помощью микроскопа “Carl Zeiss Axio A1” (“Zeiss”, Германия) со встроенной телевизионной камерой “AxioCam 712 color” (“Zeiss”, Германия) и программы ZEN 3.4 (Zen pro). С помощью программы Image J (США) оценивали количество живых клеток в СА1 области гиппокампа на участке длиной 300 мкм, а в коре — в квадрате со стороной 300 мкм.

Статистическая обработка данных. Данные приведены как среднее $\pm$ SEM. Статистическую достоверность различий в связи с тем, что речь идет о более чем трех группах данных, определяли методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением Tukey’s теста для множественных сравнений, используя Prism. Достоверными различия считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одной из основных задач исследования было определение общей жизнеспособности нейронов в СА1 районе гиппокампа и в лобной коре мозга и вклада аутофагии и апоптоза в их гибель при двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей его реперфузией. Окрашивание толуидиновым синим по модифицированному методу Ниссля выявило значительное (почти в два раза) снижение числа живых нейронов в районе СА1 гиппокампа при этом воздействии на мозг (рис. 1а). При этом введение ингибиторов аутофагии и апоптоза и в еще большей мере инсулина крысам с ишемией и реперфузией мозга, увеличивало число живых нейронов в СА1 районе гиппокампа (рис. 1а).

Количество живых нейронов у ложнопериоперированных крыс принимали за 100%, это контрольные значения. При глобальной ишемии переднего мозга и последующей реперфузии их число в СА1 районе гиппокампа снижалось в наших опытах до $58.3 \pm 1.5\%$ от контроля (рис. 1б). Чтобы избежать гибели подопытных животных, мы применяли ишемическое воздействие в течение 10 мин. При более жестком пятнадцатиминутном воздействии, как правило, наблюдается гибель большей части нейронов в СА1 районе гиппокампа — до 90% от их числа у ложнопериоперированных животных [см., например 28]. Наши результаты согласуются с данными других авторов, также применявших 10-минутную двухсосудистую ишемию с гипотензией и последующей реперфузией и также показавших,

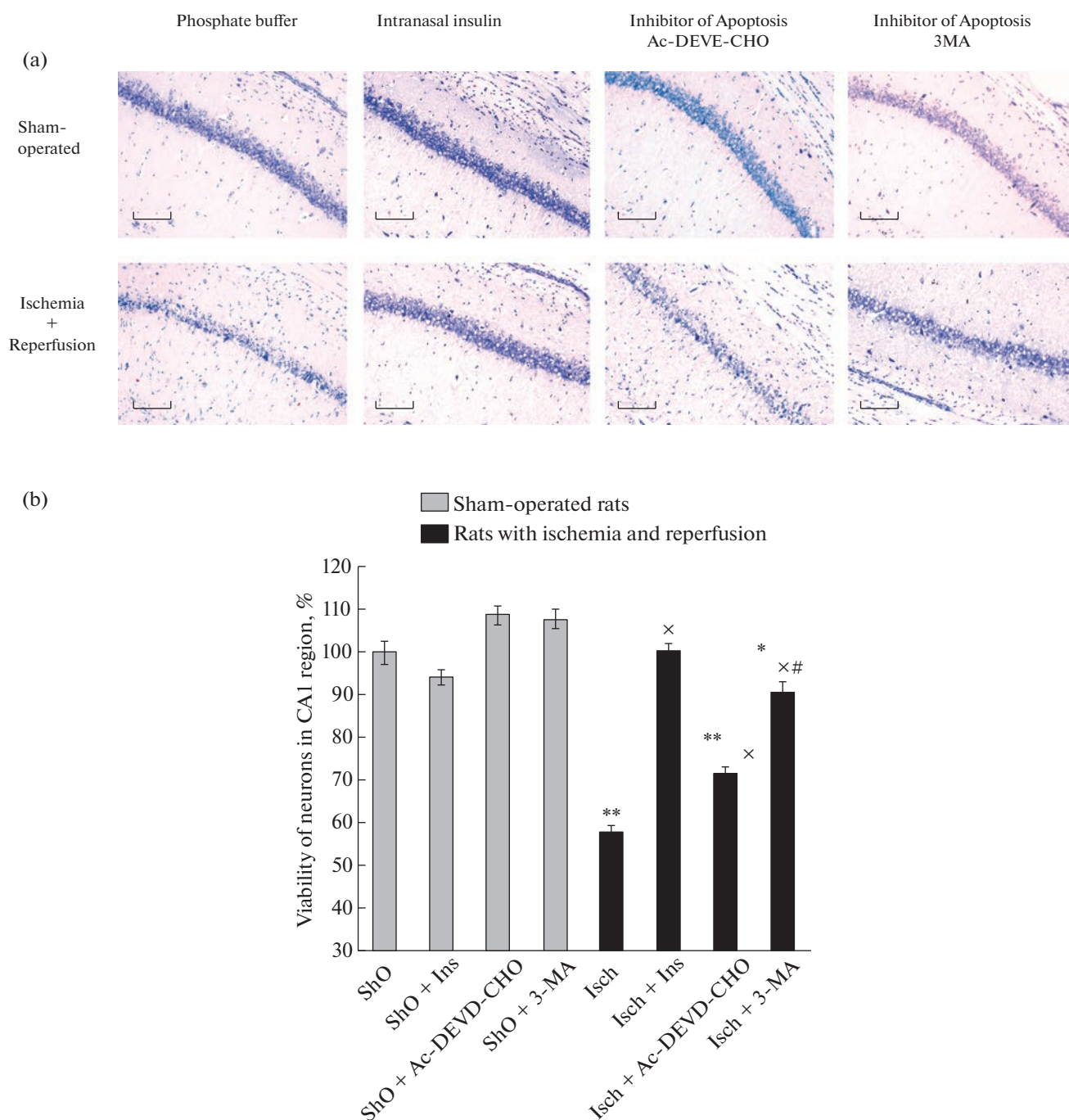


Рис. 1. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (Ac-DEVD-CHO) на жизнеспособность нейронов в районе CA1 гиппокампа при двухсосудистой ишемии и гипотензии переднего мозга крыс и последующей реперфузии.

(a) — Фотографии срезов района CA1 гиппокампа крыс, окрашенных по модифицированному методу Ниссля для выявления числа живых нейронов. Масштаб 200 мкм. (b) — Результаты приведены как среднее $\pm$ SEM из данных, полученных при определении числа живых нейронов в районе CA1 гиппокампа крыс (число определений не менее 150 в каждой группе животных). Сокращения на рисунке: ShO — ложнооперированные крысы, Isch — крысы, подвергнутые двухсосудистой ишемии в сочетании с гипотензией в течение 10 мин, а затем реперфузии в течение 7 сут, Ins — инсулин, 3-MA — 3-метиладенин. Введение инсулина (0.5 ME/крысу, интраназально) проводили за 1 ч до ишемического воздействия и затем ежедневно в течение 7 дней реперфузионного периода. 20 мкг 3-метиладенина или 10 мкг Ac-DEVD-CHO или фосфатный буфер вводили интрацеребровентрикулярно за 30 мин до ишемии. Различия достоверны согласно методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием Tukey's теста для множественных сравнений по сравнению: * и ** — с ложнооперированными крысами, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.001$, x — с крысами с ишемией и реперфузией, $p < 0.001$, # — с крысами с ишемией и реперфузией, получавшими Ac-DEVD-CHO, $p < 0.001$.

что при этом живыми остается значительно большая часть нейронов в СА1 районе гиппокампа, чем при пятнадцатиминутной ишемии [29].

Для того, чтобы определить, какой вклад в гибель нейронов гиппокампа вносят аутофагические и апоптотические процессы, мы использовали интрацеребровентрикулярное введение ингибитора аутофагии 3-МА и ингибитора апоптотических процессов Ас-DEVД-СНО, подавляющего активность различных каспаз, прежде всего каспазы-3 и каспазы-7.

Как видно из данных на рис. 1b, введение инсулина ложнооперированным крысам не оказывало достоверного воздействия на число выживших нейронов, как и введение ингибиторов аутофагии и апоптоза (3-МА и Ас-DEVД-СНО соответственно). В то же время влияние введения ингибиторов аутофагии и апоптоза крысам, подвергнутым воздействию глобальной ишемии и реперфузии переднего мозга, было хорошо выражено. Так, интрацеребровентрикулярное введение крысам ингибитора аутофагии 3-МА увеличивает число живых нейронов в районе СА1 гиппокампа с $58.3 \pm 1.5\%$ до $90.4 \pm 2.2\%$ ($p < 0.001$) от их уровня в этом районе мозга у ложнооперированных крыс (рис. 1b). На основании этих данных нетрудно рассчитать, что при введении крысам с ишемией и реперфузией мозга 3-МА гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа уменьшается более, чем на 70%. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация аутофагии является, по-видимому, основной причиной гибели нейронов в СА1 районе гиппокампа при использовании нашей модели глобальной ишемии переднего мозга. Наши данные в этом отношении согласуются с данными Сui и соавт. [28], которые применяли сходную модель двухсосудистой ишемии переднего мозга. Аутофагия является одной из основных причин гибели нейронов в СА1 районе гиппокампа мозга и при использовании других моделей ишемического и реперфузионного воздействия [см., например, 30].

Полученные нами данные свидетельствуют также о существенном вкладе апоптотических процессов в общую гибель нейронов при ишемии и последующей реперфузии. Так, интрацеребровентрикулярное введение крысам ингибитора апоптотических процессов Ас-DEVД-СНО увеличивает число выживших при ишемии и реперфузии нейронов в СА1 районе гиппокампа с $58.3 \pm 1.5\%$ до $71.6 \pm 1.8\%$ ($p < 0.001$) от числа живых нейронов в контроле (рис. 1b). Расчеты показывают, что при введении крысам ингибитора апоптоза число нейронов, погибших в СА1 районе гиппокампа от воздействия ишемии и реперфузии, уменьшается примерно на 30%, что примерно соответствует доле нейронов, погибших при этом воздействии от апоптоза. Интересно отметить, что количество нейронов, выживших при ишемии и реперфузии в при-

сутствии ингибитора аутофагии 3-МА ($90.4 \pm 2.2\%$) достоверно выше ($p < 0.001$), чем их число, выжившее в присутствии ингибитора апоптоза ($71.6 \pm 1.8\%$). Это подтверждает важную роль активации аутофагии в гибели нейронов гиппокампа при ишемии и реперфузии. При этом апоптоз, наряду с аутофагией, относится к основным причинам гибели нейронов в СА1 районе гиппокампа при двухсосудистой ишемии с гипотензией и последующей реперфузией переднего мозга.

В наших опытах инсулин полностью нормализовал жизнеспособность нейронов в СА1 района гиппокампа при его интраназальном введении крысам в дозе 0.5 МЕ за час до ишемического воздействия, а затем ежедневно в течение 7 дней в период реперфузии. Число живых нейронов в этом районе мозга у крыс с ишемией и реперфузией, получавших инсулин, составляло $100.2 \pm 1.9\%$ от их количества у ложнооперированных крыс (рис. 1b). Эти данные показывают, что инсулин способен предотвращать как аутофагическую, так и апоптотическую гибель нейронов в СА1 районе гиппокампа при двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией.

Мы проводили также определение влияния ишемии переднего мозга и последующей реперфузии на жизнеспособность нейронов лобной коры мозга (рис. 2). Согласно нашим данным, нейроны коры мозга являются менее чувствительными к такому воздействию, чем нейроны СА1 района гиппокампа (рис. 1 и 2). Так, в лобной коре мозга в тех же условиях ишемии и реперфузии живыми оставались $74.2 \pm 1.4\%$ нейронов от их числа у ложнооперированных крыс (рис. 2b), а не $58.3 \pm 1.5\%$, как в СА1 районе гиппокампа, различия обладают высокой степенью достоверности ($p < 0.001$).

При введении ингибиторов аутофагии 3-МА и апоптоза Ас-DEVД-СНО число выживших нейронов в лобной коре мозга крыс, подвергнутых ишемии и реперфузии, повышалось с 74.2 ± 1.4 до 89.2 ± 1.2 и до $83.8 \pm 1.1\%$ соответственно (рис. 2b). Большее повышение жизнеспособности нейронов под влиянием ингибитора аутофагии, чем апоптоза ($p < 0.05$), говорит, очевидно, о том, что аутофагия является основной причиной гибели нейронов при ишемии и реперфузии и в коре мозга, а не только в гиппокампе, хотя и апоптоз вносит свой вклад в обоих случаях. Эти данные позволяют предполагать, что при этом воздействии гибель нейронов мозга от аутофагии превышает их гибель от апоптоза в разных районах мозга.

В обеих структурах интраназальное введение инсулина крысам значительно повышало число выживших при ишемии и реперфузии нейронов. В лобной коре мозга живыми оставались $92.5 \pm 1.3\%$ нейронов от их числа в контроле, причем различия с данными по мозгу ложнооперированных живот-

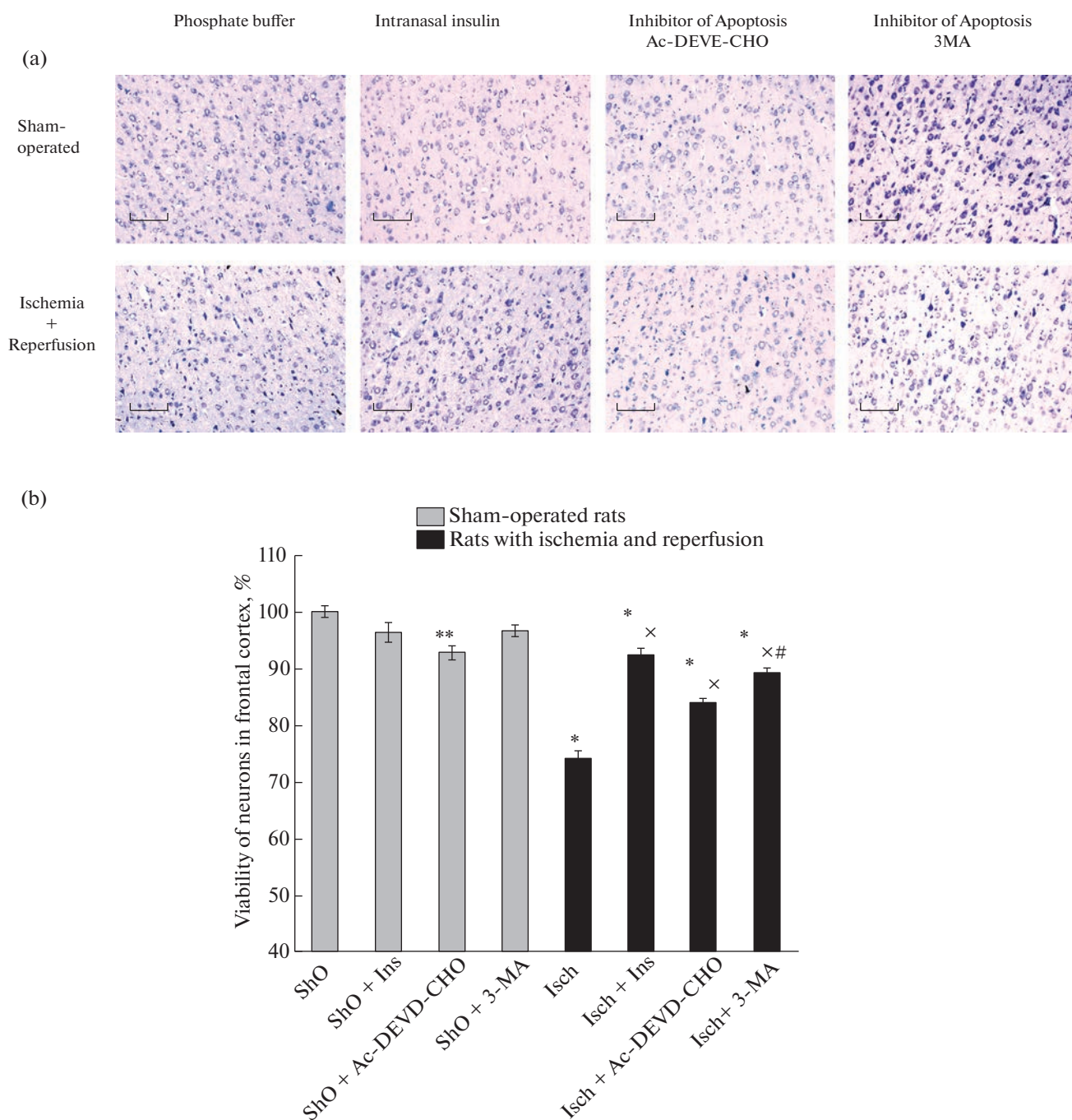


Рис. 2. Эффект инсулина и ингибиторов аутофагии (3-метиладенина) и апоптоза (Ac-DEVD-CHO) на жизнеспособность нейронов в лобной коре мозга при двухсосудистой ишемии и гипотензии переднего мозга и последующей реперфузии.

(a) – Фотографии срезов лобной коры мозга, окрашенных по модифицированному методу Ниссля для выявления числа живых нейронов. Масштаб 200 мкм. (b) – Результаты приведены как среднее $\pm$ SEM из данных, полученных при определении числа живых нейронов в лобной коре мозга крыс (число определений не менее 150 в каждой группе животных). Расшифровка сокращений и описание условий опытов, как на рис. 1. Различия достоверны согласно методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием Tukey's теста для множественных сравнений по сравнению: * и ** – с ложнооперированными крысами, * – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, x – с крысами с ишемией и реперфузией, $p < 0.001$, # – с крысами, с ишемией и реперфузией, получавшими Ac-DEVD-CHO, $p < 0.05$.

ных были достоверными ($p < 0.01$). Введение крысам инсулина существенно превышает способность каждого из ингибиторов уменьшать гибель

нейронов при ишемии и реперфузии мозга (рис. 2). Так, несложно рассчитать, что введение инсулина крысам предотвращает гибель 70.9% нейронов,

а введение ингибиторов апоптоза и аутофагии гибель 37.3% и 58.4% нейронов при ишемии и реперфузии мозга соответственно. Эти данные показывают, что инсулин снижает гибель нейронов в лобной коре мозга как от аутофагии, так и апоптоза, хотя и не предотвращает ее, как в СА1 районе гиппокампа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутофагии принадлежит важная роль в поддержании клеточного гомеостаза, основанном на тонкой регуляции баланса между биосинтезом и деградацией белков и других макромолекул. Аутофагия представляет собой катаболический путь, с помощью которого долгоживущие белки, не вовлеченные в выполнение важных функций, поврежденные клеточные органеллы и неправильно свернутые белки подвергаются деградации и вновь используются для поддержания гомеостаза клеток и их нормального функционирования. Однако многие ранее сформировавшиеся представления требуют значительного пересмотра. Так, по данным последних лет четко прослеживается участие аутофагических процессов в гибели нервных клеток, прежде всего нейронов гиппокампа и коры мозга при разных патологических процессах, это показано, в частности, при ишемии и реперфузии головного мозга. Защитные свойства многих нейротрофических факторов при этой патологии зависят от ингибирования ими аутофагических процессов [1–7]. При этом активация аутофагии в мозге при некоторых видах ишемического воздействия на него может носить защитный характер [8–12]. Но при достаточной силе ишемического и последующего реперфузионного воздействия на мозг активация аутофагии в острую фазу воздействия, очевидно, приводит к гибели нейронов мозга. Это не исключает возможности того, что на поздних сроках после ишемического воздействия аутофагия может способствовать сохранению жизнеспособности нейронов.

В настоящее время считается, что без понимания роли не только апоптоза, но и аутофагии в гибели нервных клеток мозга и регуляции этих процессов нельзя достичь серьезных успехов в разработке подходов к лечению ишемических поражений мозга, в том числе инсультов [5, 16, 17].

Инсулин при его интраназальном введении является одним из наиболее перспективных нейротрофических факторов, однако в литературе нам не встретилось данных о его влиянии на аутофагическую гибель нейронов мозга при каких-либо формах ишемии и реперфузии. В нашей работе впервые показано, что интраназальное введение инсулина крысам в дозе 0.5 МЕ перед ишемическим воздействием и затем ежедневно в течение 7 дней реперфузии практически полностью предотвращает как аутофагическую, так и апоптотическую гибель

нейронов в СА1 районе гиппокампа при глобальной ишемии переднего мозга и его последующей реперфузии. В лобной коре мозга нами отмечено снижение аутофагической и апоптотической гибели нейронов под влиянием интраназального введения 0.5 МЕ инсулина.

По нашим данным нейроны СА1 района гиппокампа значительно более чувствительны к воздействию ишемии и реперфузии, чем нейроны лобной коры мозга. Так, в настоящей работе найдено, что при 10-минутной двухсосудистой ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией и последующей реперфузией в течение 7 сут в СА1 районе гиппокампа выживает $58.3 \pm 1.5\%$ нейронов, а в лобной коре мозга — $74.2 \pm 1.4\%$, различия достоверны, $p < 0.001$. Полученные нами данные согласуются с литературными. Большая чувствительность к ишемическому и реперфузионному воздействию нейронов СА1 района гиппокампа, чем коры мозга была показана ранее в ряде работ (см., например, [31, 32]).

Как уже упоминалось в начале статьи, наиболее адекватным и перспективным способом введения инсулина является его интраназальное введение, при котором инсулин попадает непосредственно в мозг и практически только в мозг [18, 19]. При этом, как ни странно, нам не встретилось в литературе публикаций, кроме работ нашей лаборатории [23, 24], в которых бы исследовали эффекты интраназального введения инсулина животным, подвергнутым ишемии мозга и последующей реперфузии. Но есть немало работ, в которых животным с ишемией и реперфузией вводили интраназально инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) (см., например, [33–36]). В одной из этих работ [36] показана способность IGF-1 ингибировать активацию аутофагии при ишемии и реперфузии мозга. В этой работе [36] исследовалось действие активатора плазминогена (PLAT/tPA), вызывающего тромболизис при тромбоэмболическом инсульте у мышей. Было показано, что PLAT/tPA обладает способностью отщеплять связывающий IGF-1 белок-3 и таким образом высвобождать IGF-1, обладающий нейротрофическим эффектом благодаря способности взаимодействовать со своими рецепторами и ингибировать чрезмерную активацию аутофагии при экспериментальном ишемическом поражении мозга мышей.

В силу каких-то причин [37] нейротрофические эффекты интраназального введения инсулина интенсивно изучают при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных болезнях, наряду с опытами на животных проводятся многочисленные клинические испытания [20–22]. Но при ишемии и реперфузии мозга изучают преимущественно защитные эффекты IGF-1. При этом инсулин может оказаться более перспективным нейротрофическим фактором для его возможного применения в кли-

нической практике при ишемическом поражении мозга, чем IGF-1 [37].

Наша работа впервые показала, что инсулин способен уменьшать или даже предотвращать, если речь идет о нейронах CA1 района гиппокампа, не только апоптотическую, но и аутофагическую гибель нейронов при ишемии и реперфузии мозга. Это согласуется с данными о том, что инсулин способен ингибировать процессы аутофагии в экстра-невральных органах и тканях — в скелетных мышцах здоровых людей [38], в хондроцитах [39], в сердце мышей с экспериментальным диабетом [40].

Наши данные об уменьшении инсулином апоптотической гибели нейронов мозга при ишемии и реперфузии согласуются с результатами Russo и соавт. [41]. Эти авторы, изучая воздействие интрацеребровентрикулярного введения инсулина крысам, показали, что этот протектор увеличивает общую жизнеспособность нейронов мозга, особенно в районе CA3 гиппокампа и предотвращает их апоптотическую гибель.

Большой интерес представляет выяснение вопроса о механизме предотвращения или уменьшения инсулином при его интраназальном введении аутофагической гибели нейронов мозга при ишемии и реперфузии этого органа. По-видимому, его эффект связан прежде всего с его способностью ингибировать АМФ-активируемую протеинкиназу (АМРК) и активировать протеинкиназу В (Акт) и mTOR. Так, нами было найдено, что инсулин ингибирует активность АМРК в культуре нейронов коры мозга [42]. А активация этой протеинкиназы, как известно, является триггером процессов аутофагии [43]. Наши результаты об ингибировании инсулином активности АМРК в нейронах коры мозга [42] согласуются с данными об ингибировании инсулином АМРК в гипоталамусе крыс [44] и в экстра-невральных клетках и тканях (см., например, [45]). Кроме того, инсулин активирует протеинкиназы Akt1 и mTOR [42, 46]. А эти протеинкиназы ингибируют процессы аутофагии [7, 43]. По-видимому, модуляция инсулином активности протеинкиназ АМРК, Akt и mTOR играет важную роль в его способности предотвращать аутофагическую гибель нейронов при ишемии и реперфузии мозга.

Настоящая работа является начальным этапом изучения влияния инсулина на аутофагические процессы в ткани мозга при ишемии и реперфузии. Она показала, что такого рода исследования перспективны и актуальны, что способность инсулина при его интраназальном введении снижать или даже предотвращать аутофагическую гибель нейронов при этой патологии вносит большой вклад в его нейропротекторный эффект.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-25-00415.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол этического комитета ИЭФБ РАН № 1-11/2022, от 27.01.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.Ф.А., И.О.З.), сбор данных (Е.А.Ф., И.О.З., Л.В.Б., Д.К.А., И.О.И.), обработка данных (И.О.З., Л.В.Б., И.О.И., Н.Ф.А.), написание и редактирование манускрипта (Н.Ф.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X (2014) N-acetylserotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J Neurosci* 34: 2967–2978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1948-13.2014>
2. Wang M, Li Y.-J, Ding Y, Zhang H-N, Sun T, Zhang K, Yang L, Guo Y-Y, Liu S-B, Zhao M-G, Qu Y-M (2016) Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 53: 932–943. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>
3. Li L, Tian J, Long MK-W, Chen Y, Lu J, Zhou C, Wang T (2016) Protection against experimental stroke by ganglioside GM1 is associated with the inhibition of autophagy. *PLoS One* 11: e0144219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144219>
4. Li X, Wang M, Qin C, Fan W-H, Tian D-S, Liu J-L (2017) Fingolimod suppresses neuronal autophagy through the mTOR/p70S6K pathway and alleviates ischemic brain damage in mice. *PloS One* 12: e0188748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188748>
5. Nabavi, SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima DK, Ahmed T, Shahid M (2019) Novel therapeutic strategies for stroke: the role of autophagy. *Critical Rev Clin Lab Sci* 56 (3): 182–199. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1575333>

6. Hu Y, Zhou H, Zhang H, Sui Y, Zhang Z, Zou Y, Li K, Zhao Y, Xie J, Zhang L (2022) The neuroprotective effect of dexmedetomidine and its mechanism. *Front Pharmacol* 13: 965661. eCollection 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.965661>
7. Zhang H, Wang X, Chen W, Yang Y, Wang Y, Wan H, Zhu Z (2023) Danhong injection alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy through miRNA-132-3p/ATG12 signal axis. *J Ethnopharmacol* 300:115724. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115724>
8. Carloni S, Balduini W (2020) Simvastatin preconditioning confers neuroprotection against hypoxia-ischemia induced brain damage in neonatal rats via autophagy and silent information regulator 1 (SIRT1) activation. *Exp Neurol* 324: 113117. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113117>
9. Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Yu Zhai Y, Sun X (2014) Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 4 (2): 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.032>
10. Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, John R, Barrett JR, Kirks R, Grace H, Kondrikova G, Johnson MH, Hess DC, Schoenlein PV, Hoda MN, Hill WD (2014) Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med* 6: 8. eCollection. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-8>
11. Liu X, Tian F, Wang S, Wang F, Xiong L (2018) Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation Res* 215: 405–415. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1999>
12. Pineda-Ramírez N, Alquisiras-Burgos I, Ortiz-Plata A, Ruiz-Tachiquín M-E, Espinoza-Rojo M, Aguilera P (2020) Resveratrol activates neuronal autophagy through AMPK in the ischemic brain. *Mol Neurobiol* 57 (2): 1055–1069. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01803-6>
13. Луговая АВ, Эмануэль ВС, Артемова АВ, Митрейкин ВФ (2020) Современные подходы к оценке биологических маркеров аутофагии и апоптоза при остром ишемическом инсульте. *Соврем пробл науки и обр* 4: 159–174. [Lugovaya AV, Emanuel VS, Artemova AV, Mitreikin VF (2020) Modern approaches to the assessment of biological markers of autophagy and apoptosis in acute ischemic stroke. *Sovrem probl nauki i obr* 4: 159–174. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17513/spno.30017>
14. Kuriakose D, Xiao Z (2020) Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives. *Int J Mol Sci* 21 (20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
15. Barthels D, Das H (2020) Current advances in ischemic stroke research and therapies. *Biochim Biophys Acta. Mol Basis Dis* 1866 (4): 165260. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.012>
16. Campbell BCV, Khatri P (2020) Stroke. *Lancet* 396 (10244): 149–142. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
17. He C, Xu Y, Sun J, Li L, Zhang JH, Wang Y (2022) Autophagy and apoptosis in acute brain injuries: From mechanism to treatment. *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0094>
18. Fan LW, Carter K, Beatt A, Pang Y (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
19. Tashima T (2020) Shortcut approaches to substance delivery into the brain based on intranasal administration using nanodelivery strategies for insulin. *Molecules* 25 (21): 5188. <https://doi.org/10.3390/molecules25215188>
20. Craft S, Claxton A, Baker LD, Hanson AJ, Collerton B, Trittschuh EH, Dahl D, Caulder E, Neth B, Montine TJ, Jung Y, Maldjian J, Whitlow C, Friedman S (2017) Effects of regular and long-acting insulin on cognition and Alzheimer's disease biomarkers: A pilot clinical trial. *J Alzheimers Dis* 57: 1325–1334. <https://doi.org/10.3233/JAD-161256>
21. Avgerinos KI, Kalaitzidis G, Malli A, Kalaitzoglou D, Myserlis PG, Lioutas VA (2018) Intranasal insulin in Alzheimer's dementia or mild cognitive impairment. A systematic review. *J Neurol* 265: 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8768-0>
22. Novak P, Maldonado DAP, Novak V (2019) Safety and preliminary efficacy of intranasal insulin for cognitive impairment in Parkinson disease and multiple system atrophy: A double-blinded placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 14: e0214364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214364>
23. Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF (2018) Insulin Administration Prevents Accumulation of Conjugated Dienes and Trienes and Inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Rat Cerebral Cortex during Two-Vessel Forebrain Ischemia and Reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 54:246–249. <https://doi.org/10.1134/S0022093018030109>
24. Зорина ИИ, Фокина ЕА, Захарова ИО, Баюнова ЛВ, Шпаков АО (2019) Особенности изменений перекисного окисления липидов и активности Na⁺, K⁺-АТФазы у старых крыс в условиях двухсосудистой церебральной ишемии/реперфузии. *Успехи геронтологии* 32 (6): 941–947. [Zorina II, Fokina EA, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2019) Features of the changes in lipid peroxidation and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the brain of the aged rats in the conditions of two-vessel cerebral ischemia/reperfusion *Adv Gerontol* 32 (6):941–947. (In Russ)].
25. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. Acad. Press. San Diego, Calif. USA.

26. *Molchanova SM, Moskvina AN, Zakharova IYu, Yurlova LA, Nosova IYu, Avrova NF* (2005) effects of two-vessel fore-brain ischemia and of administration of indomethacin and quinacrine on Na^+ , K^+ -ATPase activity in various rat brain areas. *J Evol Biochem Physiol* 41 (1): 39–46.
27. *Sanderson TH, Wider JM* (2013) 2-Vessel occlusion/hypotension: A rat model of global brain ischemia. *J Vis Exp* 76: e50173.
<https://doi.org/10.3791/50173>
28. *Luo T, Liu G, Ma H, Lu B, Xu H, Wang Y, Wu J, Ge P, Liang J* (2014) Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt pathway contributes to the protection of ginsenoside Rb1 against neuronal death caused by ischemic insults. *Int J Mol Sci* 15 (9): 15426–15442.
<https://doi.org/10.3390/ijms150915426>
29. *Cui D, Wang L, Qi A, Zhou Q, Zhang X, Jiang W*. Propofol prevents autophagic cell death following oxygen and glucose deprivation in PC12 cells and cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One*. 2012. 7 (4): e35324.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035324>
30. *Wen Y-D, Sheng R, Zhang L-S, Han R, Zhang X, Zhang X-D, Han F, Fukunaga K, Qin Z-H* (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways *Autophagy* 4 (6): 762–769.
<https://doi.org/10.4161/auto.6412>
31. *Pylova SI, Majkowska J, Hilgier W, Kapuściński A* (1989) Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA1 region following short-term global cerebral ischemia in rat. *Albrecht J Brain Res* 490 (1): 170–173.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90446-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90446-0)
32. *Zhu H, Yoshimoto T, Imajo-Ohmi S, Dazortsava M, Mathivanan A, Yamashima T* (2012) Why are hippocampal CA1 neurons vulnerable but motor cortex neurons resistant to transient ischemia? *J Neurochem* 120 (4): 574–585.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07550.x>
33. *Gong P, Zou Y, Zhang W, Tian Q, Han S, Xu Z, Chen Q, Wang X, Li M* (2021) The neuroprotective effects of insulin-like growth factor 1 via the Hippo/YAP signaling pathway are mediated by the PI3K/AKT cascade following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Brain Res Bull* 177: 373–387.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.10.017>
34. *Shen H, Gu X, Wei ZZ, Wu A, Liu X, Wei L* (2021) Combinatorial intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-1 improves neurovascularization and functional outcomes following focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 337: 113542.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113542>
35. *Zhang D, Yuan Y, Zhu J, Zhu D, Li C, Cui W, Wang L, Ma S, Duan S, Liu B* (2021) Insulin-like growth factor 1 promotes neurological functional recovery after spinal cord injury through inhibition of autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med* 22 (5): 1265.
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10700>
36. *Thiebaut AM, Buendia I, Ginet V, Lemarchand E, Boudjadja MB, Hommet Y, Lebouvier L, Lechevallier C, Maillason M, Hedou E, Déglon N, Oury F, Rubio M, Montaner J, Puyal J, Vivien D, Roussel BD* (2022) Thrombolysis by PLAT/tPA increases serum free IGF1 leading to a decrease of deleterious autophagy following brain ischemia. *Autophagy* 18 (6): 1297–1317.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1973339>
37. *Lioutas VA, Alfaro-Martinez F, Bedoya F, Chung CC, Pimentel DA, Novak V* (2015) Intranasal insulin and insulin-like growth factor 1 as neuroprotectants in acute ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 6 (4): 264–275.
<https://doi.org/10.1007/s12975-015-0409-7>
38. *Moller AB, Voss TS, Vendelbo MH, Pedersen SB, Moller N, Jessen N* (2018) Insulin inhibits autophagy signaling independent of counter-regulatory hormone levels, but does not affect the effects of exercise. *J Appl Physiol* 125: 1204–1209.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00490.2018>
39. *Ribeiro M, López de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Caramés B* (2016) Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24: 731–739.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.017>
40. *Pires KM, Torres NS, Buffolo M, Gunville R, Schaaf C, Davis K, Selzman CH, Gottlieb RA, Boudina S* (2019) Suppression of cardiac autophagy by hyperinsulinemia in insulin receptor-deficient hearts is mediated by insulin-like growth factor receptor signaling. *Antioxid Redox Signal* 31 (6): 444–457.
<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7640>
41. *Russo V, Candeloro P, Malara N, Perozziello G, Iannone M, Scicchitano M, Mollace R, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C* (2019) Key role of cytochrome C for apoptosis detection using Raman microimaging in an animal model of brain ischemia with insulin treatment. *Appl Spectrosc* 73 (10): 1208–1217.
<https://doi.org/10.1177/0003702819858671>
42. *Zakharova IO, Sokolova TV, Bayunova LV, Zorina II, Rychkova MP, Shpakov AO, Avrova NF* (2019) The protective effect of insulin on rat cortical neurons in oxidative stress and its dependence on the modulation of Akt, GSK-3 β , ERK1/2, and AMPK activities. *Int J Mol Sci* 20 (15): E3702.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153702>
43. *Saikia R, Joseph J* (2021) AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy. *J Mol Med (Berl)* 99 (11): 1539–1551.
<https://doi.org/10.1007/s00109-021-02125-8>
44. *Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu., Foulfelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn. B.* 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428 (6982): 569–574.
<https://doi.org/10.1038/nature02440>
45. *Valentine RT, Coughlan KA, Ruderman NB, Saha AK* (2014) Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser^{485/491} through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 562: 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.013>
46. *Han J, Wang B, Xiao Z, Gao Y, Zhao Y, Zhang J, Chen B, Wang X, Dai J* (2008) Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Mol Cell Neurosci* 39 (1): 118–124.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.003>

INTRANASAL INSULIN DECREASES AUTOPHAGIC AND APOPTOTIC DEATH OF NEURONS IN THE RAT HIPPOCAMPAL CA1 REGION AND FRONTAL CORTEX UNDER FOREBRAIN ISCHEMIA–REPERFUSION

E. A. Fokina^a, I. O. Zakharova^a, L. V. Bayunova^a,
D. K. Avrova^a, I. O. Ilyasov^a and , and N. F. Avrova^{a, #}

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

[#] *e-mail: avrova@iephb.ru*

The development of approaches to therapy of ischemic brain injuries requires a better insight into the mechanisms that regulate both apoptotic and autophagic death of neurons. Under a strong ischemic (or other pathological) exposure, neurons can die from the activation of both apoptosis and autophagy. This work was aimed to assess the contribution of autophagy and apoptosis activation to neuronal cell death in the hippocampal CA1 region and frontal cortex using the rat two-vessel occlusion/hypotension model of global forebrain ischemia with subsequent long-term reperfusion, as well as to study the ability of intranasal insulin to prevent autophagic and apoptotic death of neurons. The inhibitors of autophagy (3-methyladenine), apoptosis (Ac-DEVD-CHO), or phosphate buffer (for control) were administered to rats intracerebroventricularly before ischemia and reperfusion. To count viable neurons, brain sections were stained with a Nissl stain. During ischemia–reperfusion, the number of viable neurons in the hippocampal CA1 region decreased by $58.3 \pm 1.5\%$ of their count in sham-operated rats (control taken as 100%). The administration of autophagy or apoptosis inhibitors increased the number of viable neurons in the hippocampal CA1 region from $58.3 \pm 1.5\%$ to $90.4 \pm 2.2\%$ ($p < 0.001$) and $71.6 \pm 1.8\%$ ($p < 0.001$) vs. control, respectively. Intranasal insulin administration at a dose of 0.5 IU (before ischemia and at a daily basis for 7 days during reperfusion) normalized the number of viable neurons in the hippocampal CA1 region up to $100.2 \pm 1.95\%$ vs. control. In the frontal cortex, the viability of neurons also decreased under ischemia–reperfusion, while the number of viable neurons increased after the administration of autophagy or apoptosis inhibitors, and even to a greater extent after intranasal insulin administration. The main difference was a lower sensitivity of cortical vs. hippocampal neurons to ischemia–reperfusion. These data indicate that intranasal insulin is able to decrease the death of brain neurons caused by the activation of autophagy and apoptosis due to ischemia–reperfusion.

Keywords: brain ischemia, autophagy, apoptosis, neuronal viability, intranasal insulin

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА СТЕРОИДОГЕНЕЗ В ЯИЧНИКАХ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК КРЫС

© 2023 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, Е. А. Фокина¹, И. А. Лебедев¹,
В. Н. Сорокоумов², Л. В. Баюнова¹, А. О. Шпак^{1,*}

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

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

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 30.11.2022 г.

Для стимуляции овариального стероидогенеза и контролируемой индукции овуляции в клинике применяют препараты гонадотропинов — хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), которые, однако, имеют ряд побочных эффектов, таких как снижение чувствительности яичников к эндогенному ЛГ и синдром гиперстимуляции яичников. Альтернативой ХГЧ и ЛГ могут стать аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, в том числе разработанное нами тиено-[2,3-d]-пиримидиновое производное ТР03. Целью работы было изучить влияние ТР03 (40 мг/кг, в/б) и взятого для сравнения ХГЧ (30 МЕ/крысу, п/к) на овариальный стероидогенез у половозрелых самок крыс, находящихся в фазе позднего проэструса, в том числе обработанных антагонистом гонадолиберина Оргалутраном (100 мкг/кг, п/к, за 3 ч до введения ТР03 или ХГЧ). В крови крыс оценивали уровни эстрадиола, прогестерона и ЛГ, в яичниках — экспрессию генов стероидогенеза (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, *Cyp17a1*, *Hsd17b*, *Cyp19a1*) и рецептора ЛГ/ХГЧ (*Lhcgr*). Через 3 ч после введения ТР03 и ХГЧ повышали уровень прогестерона в крови, стимулировали экспрессию генов холестерин-транспортирующего белка StAR, цитохрома P450c17 и ароматазы (цитохрома P450c19), и этот эффект выявлялся как у контрольных крыс с нормальным уровнем ЛГ, так и у Оргалутран-обработанных крыс с пониженным уровнем ЛГ. Эффекты ТР03 были сопоставимы с таковыми ХГЧ, но в отличие от ХГЧ аллостерический агонист не снижал функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, на что указывает отсутствие его влияния на уровень ЛГ в крови и экспрессию рецепторов ЛГ/ХГЧ. Полученные данные свидетельствуют о способности ТР03 эффективно стимулировать овариальный стероидогенез и указывают на перспективность разработки на его основе лекарственных форм для контролируемой индукции овуляции.

Ключевые слова: аллостерический агонист, овариальный стероидогенез, рецептор лютеинизирующего гормона, хорионический гонадотропин человека, половозрелые крысы, прогестерон, цитохром P450c17

DOI: 10.31857/S0044452923010035, **EDN:** GXGBYN

Разработка эффективных подходов для коррекции нарушений овариального стероидогенеза при различных репродуктивных расстройствах, а также для осуществления контролируемой индукции овуляции при вспомогательных репродуктивных технологиях представляет собой одну из актуальных проблем современной репродуктивной эндокринологии. Используемые для этого гонадотропины — лютеинизирующий гормон (ЛГ) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), имеют ряд существенных недостатков [1]. Во многом это обусловлено использованием ХГЧ и ЛГ в дозах, которые приводят к значительному превышению физиологических концентраций гонадотропинов в

крови. В случае индукции овуляции при вспомогательных репродуктивных технологиях это может приводить к тяжелому осложнению — синдрому гиперстимуляции яичников [2]. Применение других фармакологических стратегий, в которых гонадотропины заменяют на агонисты гонадолиберина (GnRH) или используют протокол комбинированного применения GnRH и низких доз ХГЧ, снижает риск развития синдрома гиперстимуляции яичников, но при этом в значительном числе случаев снижает частоту наступления беременности [3]. Еще одной причиной могут быть значимые отличия паттерна N-гликозилирования препаратов ЛГ и ХГЧ, как правило их рекомбинантных форм, от

такового эндогенных гонадотропинов, что влияет на их фармакокинетику и специфичность активации внутриклеточных эффекторных белков и транскрипционных факторов [4, 5]. Известно, что активация рецептора ЛГ/ХГЧ приводит к стимуляции сразу нескольких типов гетеротримерных G-белков и адаптерных белков β -аррестинов: через G_s -белок и сопряженный с ним фермент аденилатциклазу активируются цАМФ-зависимые сигнальные пути, через $G_{q/11}$ -белок и фосфолипазу $C\beta$ — кальций-зависимые пути, через β -аррестины осуществляются эндоцитоз лиганд-рецепторного комплекса с последующей деградацией или рециклизацией рецептора и происходит стимуляция каскада митоген-активируемых протеинкиназ [5, 6]. Изменение паттерна N-гликозилирования гонадотропинов может существенно изменить профиль активации ими G-белков и β -аррестинов, одним из следствий чего может стать даун-регуляция рецепторов ЛГ/ХГЧ. Так, длительная активация фолликулярных клеток с помощью ЛГ или ХГЧ вызывает в значительной степени выраженное снижение экспрессии гена рецептора ЛГ/ХГЧ и уменьшает число активных рецепторов на поверхности клеток, что является причиной развития резистентности к ЛГ [7–9]. Снижение чувствительности к эндогенному ЛГ было продемонстрировано у мужчин, которых длительное время лечили ХГЧ [10], а также у самцов крыс, которых многократно обрабатывали ХГЧ в дозах, превышающих физиологические, причем ключевым фактором развития резистентности к ЛГ в этом случае было значимое снижение числа рецепторов ЛГ/ХГЧ [11, 12].

Все вышесказанное указывает на необходимость разработки альтернативных путей специфичной активации рецептора ЛГ/ХГЧ, которые позволят стимулировать овариальный стероидогенез и индуцировать овуляцию, не вызывая синдром гиперстимуляции яичников, развитие резистентности к ЛГ и другие нежелательные последствия гонадотропиновой терапии. Основные ожидания здесь связывают с низкомолекулярными гетероциклическими соединениями со свойствами агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, в первую очередь, с производными тиено[2,3-d]-пиримидина [13–15]. Нами ранее были разработаны тиено[2,3-d]-пиримидиновые производные TR01, TR03 и TR04 с активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ, которые при внутрибрюшинном и пероральном способах введения самцам крыс повышали уровень тестостерона в семенниках и крови, стимулировали стероидогенез в семенниках, восстанавливали уровни тестостерона и сперматогенез при диабетической патологии и старении [11, 16, 17]. Однако данные о влиянии низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на овариальный стероидогенез у половозрелых самок грызунов отсутствуют.

Целью работы было изучить влияние соединения TR03 и взятого для сравнения ХГЧ на овариальный стероидогенез у половозрелых самок крыс, находящихся в стадии позднего проэструса, в том числе предварительно обработанных Оргалутраном, антагонистом GnRH с пролонгированным действием. В крови крыс оценивали динамику изменений уровней эстрадиола, прогестерона и ЛГ, в яичниках — экспрессию генов стероидогенеза и рецептора ЛГ/ХГЧ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовали четырех-пятимесячных самок крыс, которых содержали в стандартных условиях вивария, по пять животных в клетке, со свободным доступом к воде и сухому корму.

Перед началом эксперимента определяли фазу эстрального цикла у половозрелых самок крыс и отбирали тех животных, которые находились в фазе проэструса. Определение фазы эстрального цикла крыс производили путем микроскопического изучения вагинального мазка, в соответствии со стандартными методиками [18, 19]. Мазки забирали ежедневно в 11:00 по следующей схеме. Переднюю часть тела крысы фиксировали, и с помощью поднятия животного за хвост визуализировали преддверие влагалища. Смоченный в физиологическом растворе ватный тампон вводили во влагалище и несколько раз проворачивали, после чего мазок переносили с тампона на сухое предметное стекло. Препарат высушивали на воздухе и окрашивали метиленовым синим для проведения микроскопии. Стадии эстрального цикла определяли исходя из соотношения трех типов клеток в мазке: ядросодержащих эпителиоцитов, безъядерных ороговевающих эпителиоцитов и лейкоцитов. В фазе проэструса в мазке присутствовали только ядросодержащие эпителиоциты.

У животных с верифицированной фазой проэструса из хвостовой вены забирали образцы крови для оценки базовых уровней гормонов (12.00), после чего их сразу обрабатывали Оргалутраном (Organon N.V., Нидерланды), антагонистом GnRH, который вводили подкожно в разовой дозе 100 мкг/кг массы тела. Крысам без обработки Оргалутраном (контроль) вводили физиологический раствор в том же объеме и в те же сроки. Спустя 3 ч после обработки Оргалутраном (15.00) у животных забирали образцы крови для оценки ранних эффектов антагониста GnRH, после чего им однократно вводили агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ — TR03 и ХГЧ, используя дозы, подобранные на основании предварительных экспериментов и вызывающие максимальный стероидогенный эффект. В случае TR03 доза составила 40 мг/кг (внутрибрюшинно), в случае ХГЧ — 30 МЕ/крысу (подкожно). Контрольным животным (без обработки Оргалутраном) также вводили эти препараты в тех же

дозах. Части контрольных крыс и животным с обработкой Оргалутраном вместо агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ вводили ДМСО (внутрибрюшинно) в том же объеме (200 мкл), что и ТР03. Ранее нами было показано, что ДМСО при внутрибрюшинном введении в указанном объеме не влияет на показатели стероидогенеза и на метаболические, гормональные и функциональные показатели [11]. Через 3 ч после введения агонистов (через 6 ч после обработки Оргалутраном) животных подвергали анестезии (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б), повторно забирали у них кровь для оценки уровней гормонов и затем декапитировали. После декапитации забирали и взвешивали яичники и с помощью ПЦР в реальном времени измеряли в них экспрессию целевых генов.

В общей сложности были сформированы и изучены следующие 6 групп (в каждой по 5 крыс): контрольные крысы, без обработки Оргалутраном и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ (группа С), крысы с обработкой Оргалутраном, но без введения агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ (группа Org), крысы без обработки Оргалутраном, но с введением ТР03 (группа С+ТР) или ХГЧ (группа С + hCG), крысы с обработкой Оргалутраном и с последующим введением ТР03 (группа Org+ТР) или ХГЧ (группа Org + hCG).

5-амино-*N*-*mpem*-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТР03) синтезировали с использованием реакции 1.0 эквивалента 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-*mpem*-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид с 1.1 эквивалентом никотиновой кислоты в присутствии 1.1 эквивалента 1-[бис(диметиламино)метил]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксид гексафторфосфата (НАТУ) и 1.2 эквивалента *N,N*-диизопропилэтиламина в сухом *N,N*-диметилформамиде, как описано ранее [17]. Реакцию осуществляли в течение 5 ч ($t = 22^\circ\text{C}$), целевой продукт очищали перекристаллизацией из этанола, на заключительном этапе использовали колоночную хроматографию. Соединение ТР03 представляло собой желтый негигроскопичный порошок с температурой плавления, равной $157\text{--}159^\circ\text{C}$. Структура соединения ТР03 была подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты ^1H -ЯМР-спектроскопии (ДМСО- d_6), δ , ppm (J , Hz): 1.37 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.62 (3H, s, SCH_3); 6.14 (2H, s, NH_2); 6.98 (1H, s, $\text{NH-}t\text{-Bu}$); 7.42 (1H, d, $J = 7.8$, 4'-H); 7.57–7.64 (2H, m, 5'-H и 5''-H); 8.04 (1H, d, $J = 8.2$, 2'-H); 8.08 (1H, s, 6'-H); 8.33 (1H, d, $J = 7.7$, 4''-H); 8.78 (1H, d, $J = 4.8$, 6''-H); 9.14 (1H, s, 2''-H), 10.72 (1H, s, 3'-NH). Результаты ^{13}C -ЯМР-спектроскопии (ДМСО- d_6), δ , ppm: (14.3 (SCH_3); 29.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 51.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 97.7; 117.8; 120.9; 122.5; 124.0; 124.9; 129.8; 130.8; 136.0; 137.1; 139.6; 144.7; 149.2; 152.8;

162.5; 164.9; 165.2; 167.8; 168.8). По данным масс-спектрометрии высокого разрешения (electrospray ionization – time of flight, ESI-TOF) масса молекулярного иона соединения ТР03 ($\text{M} + \text{Na}^+$) составила 515.1304, что практически совпадало с рассчитанной массой молекулярного иона для этого соединения (515.1294). Для регистрации масс-спектров использовали спектрометр “Bruker micrOTOF” (“Bruker”, Германия), для регистрации ЯМР-спектров – спектрометр “Bruker Avance III 400” (400.13 МГц для ^1H -ЯМР и 100.61 МГц для ^{13}C -ЯМР) (“Bruker”, Германия).

Уровни эстрадиола и прогестерона в крови крыс определяли с помощью иммуноферментного анализа, используя наборы “Эстрадиол-ИФА” и “Прогестерон-ИФА” (“ХЕМА”, Россия). Уровень ЛГ определяли с помощью набора “ELISA for LH, Rat” (“Cloud-Clone Corp.”, США).

Тотальную РНК из яичников выделяли с помощью реагента “ExtractRNA” (“Евроген”, Россия), затем проводили обратную транскрипцию для получения кДНК с помощью набора “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе “Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System” (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) в смеси, содержащей 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, используя реагент “qPCR-HS SYBR+Low ROX” (“Евроген”, Россия). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Для количественного анализа данных по генной экспрессии использовали метод delta-delta C_t [20]. Для расчетов использовали программное обеспечение 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ для генной экспрессии рассчитывали по отношению к контролю, который был принят за единицу. Экспрессия гена *Actb*, кодирующего актин В, была использована в качестве эндогенного контроля.

Для статистического анализа полученных данных использовали программу “Microsoft Office Excel 2007”. Нормальность распределения оценивали в соответствии с критерием Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представляли как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса яичников, которая в контрольной группе самок крыс составила 0.114 ± 0.010 г, при обработке ТР03 и ХГЧ значимо не менялась и составила 0.132 ± 0.007 и 0.138 ± 0.007 г соответственно ($p > 0.05$ в сравнении с контролем). При обработке Оргалутраном масса яичников также не менялась

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых для оценки экспрессии генов в яичниках крыс

Ген	Прямой и обратный праймеры	GenBank
<i>Lhcgr</i>	(For) CTGCGCTGTCCTGGCC; (Rev) CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA	NM_012978.1
<i>Star</i>	(For) AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC; (Rev) CACCTGGCACCACCTTACTT	NM_031558.3
<i>Cyp11a1</i>	(For) TATTCCGCTTTGCCTTTGAG; (Rev) CACGATCTCCTCCAACATCC	NM_017286.3
<i>Hsd3b</i>	(For) AGGCCTGTGTCCAAGCTAGTGT; (Rev) CTCGGCCATCTTTTGCTGTAT	XM_017591325.1
<i>Cyp17a1</i>	(For) CATCCCCACAAGGCTAAC; (Rev) TGTGTCCTTGGGGACAGTAAA	XM_006231435.3
<i>Hsd17b</i>	(For) CCTTTGGCTTTGCCATGAGA; (Rev) CAATCCATCTGCTCCAACCT	NM_024392.2
<i>Cyp19a1</i>	(For) GGTATCAGCCTGTCGTGGAC; (Rev) AGCCTGTGCATTCTTCCGAT	NM_017085.2
<i>Actb</i>	(For) CTGGCACCAACACCTTCTACA; (Rev) AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	NM_031144.3

(0.104 ± 0.011 г, $p > 0.05$ в сравнении с группой “С”). Отмечали тенденцию к повышению массы яичников в группах “Org+TP” (0.136 ± 0.010 г) и “Org + hCG” (0.140 ± 0.011 г), но различия с группой “Org” не были значимыми ($p > 0.05$).

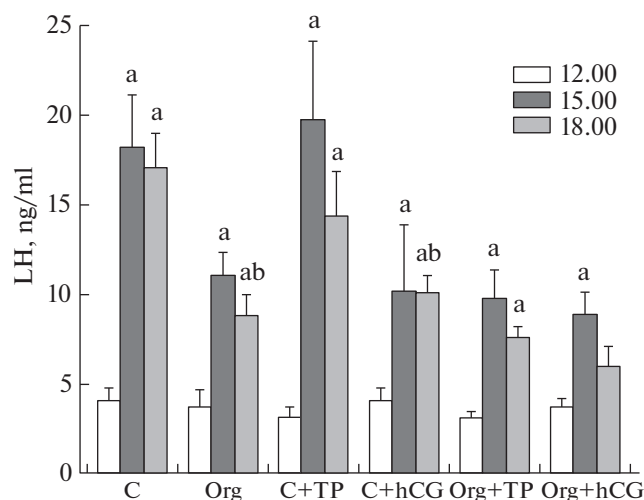


Рис. 1. Уровни лютеинизирующего гормона в крови самок крыс в фазе проэструса и влияние на них обработки антагонистом GnRH Оргалутраном (однократно, подкожно, 100 мкг/кг) и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ – TP03 (однократно, внутривенно, 40 мкг/кг) и ХГЧ (однократно, подкожно, 30 МЕ/крысу).

^a – различия внутри каждой группы во временных точках 15.00 и 18.00 по сравнению с начальной точкой (12.00) и ^b – различия между контролем и группами “Org”, “С + TP”, “С + hCG” в сходных временных точках статистически значимы при $p < 0.05$. Во всех группах $n = 5$, значения представлены как $M \pm SEM$.

Уровень ЛГ в крови контрольных крыс менялся в ходе эксперимента, в значительной степени повышаясь к 15.00 в сравнении с исходной точкой (12.00), и сохранялся на высоком уровне до 18.00 (рис. 1). Обработка Оргалутраном, антагонистом GnRH подавляла продукцию ЛГ, что выражалось в значительном снижении уровня гормона, который через 6 ч после введения Оргалутрана был почти в два раза ниже, чем в контрольной группе. На это указывают значения $AUC_{12.00-18.00}$, интегрированной площади под кривой “концентрация ЛГ (нг/мл)–время (ч)”, для исследуемых групп (табл. 2). Обработка TP03 спустя 3 ч после его введения (18.00) слабо влияла на уровень ЛГ в группах с обработкой Оргалутраном и без таковой, в то время как обработка ХГЧ через 3 ч значительно снижала уровень ЛГ у контрольных крыс (“С + hCG” vs. “С”, $p = 0.016$), но не влияла на уровень гормона в группе “Org + hCG” (рис. 1). При этом, однако, значения $AUC_{12.00-18.00}$ в группах “С” и “С + hCG” не различались (табл. 2).

Уровень прогестерона в крови контрольных крыс, находившихся в фазе проэструса, на протяжении эксперимента существенно не менялся, в то время как через 3 ч после обработки крыс с помощью TP03 и ХГЧ он значительно повышался, причем эффективность препаратов в выбранных для исследования дозах была сходной (рис. 2, табл. 2). После обработки Оргалутраном отмечали значимое снижение уровня прогестерона – через 6 ч после обработки его концентрация в крови крыс группы “Org” была в 4.3 раза ниже, чем у контрольных животных (рис. 2). На ослабление продукции прогестерона указывают значения $AUC_{12.00-18.00}$ интегрированной площади под кривой “концентра-

ция прогестерона (нМ)–время (ч)”, которые в группе “Org” были на 54% ниже, чем в контроле (табл. 2). Оба агониста рецептора ЛГ/ХГЧ повышали уровень прогестерона у крыс, обработанных Оргалутраном, но их эффекты были менее выражены, чем в контрольных группах (рис. 2). Уровень эстрадиола на протяжении эксперимента слабо менялся в контрольной группе, и обработка Оргалутраном и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ на него влияла лишь в небольшой степени (рис. 2).

Исследование в яичниках крыс экспрессии генов овариального стероидогенеза и гена, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, привело к следующим результатам. Экспрессия гена *Star*, кодирующего холестерин-транспортирующий белок StAR, снижалась в группе с обработкой Оргалутраном и повышалась при обработке обоими агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ контрольных и обработанных Оргалутраном животных (табл. 3). Экспрессия гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450_{ssc} (side chain cleavage enzyme, CYP11A1), превращающий холестерин в прегненолон, имела тенденцию к снижению в группе “Org”, но различия с контролем не были статистически значимыми ($p = 0.069$). При этом TP03 и ХГЧ слабо влияли на экспрессию гена *Cyp11a1* в контрольных группах, но значимо повышали ее в группах с обработкой Оргалутраном (табл. 3).

Обработка антагонистом GnRH приводила к снижению в 7 раз экспрессии гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450_{c17} (CYP17A1), который катализирует двухстадийное превращение прегненолона в дегидроэпиандростерон (ДГЭА) или прогестерона в андростендион. При этом обработка TP03 и ХГЧ эффективно стимулировала экспрессию этого гена как у контрольных, так и у обработанных Оргалутраном животных (табл. 3). Следует, однако, отметить, что стимулирующий эффект ХГЧ в обоих случаях превышал таковой TP03. Экспрессия генов *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих соответственно 3 β - (3 β -HSD) и 17 β -гидроксистероид-дегидрогеназы (17 β -HSD), существенно не менялась как при обработке Оргалутраном, так и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ, за исключением группы “C + hCG”, в которой отмечали понижение экспрессии гена *Hsd17b* как по сравнению с контролем, так и группой “Org” (табл. 3). Фермент 3 β -HSD осуществляет превращение прегненолона в прогестерон, в то время как 17 β -HSD в зависимости от подтипа фермента катализирует широкий спектр реакций на заключительных стадиях овариального стероидогенеза, включая синтез эстрогенов.

Таблица 2. Значения AUC (интегрированной площади под кривыми “концентрация гормона – время”) для прогестерона, эстрадиола и ЛГ у контрольных крыс и у животных, обработанных Оргалутраном и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ

Группа	ЛГ	Прогестерон	Эстрадиол
C	85.9 $\pm$ 7.8	271 $\pm$ 38	3.09 $\pm$ 0.22
Org	52.6 $\pm$ 6.1 ^a	125 $\pm$ 14 ^a	2.27 $\pm$ 0.20 ^a
C+TP	85.9 $\pm$ 16.0	407 $\pm$ 29 ^a	3.80 $\pm$ 0.32
C + hCG	79.2 $\pm$ 11.3	381 $\pm$ 52	3.47 $\pm$ 0.44
Org+TP	46.0 $\pm$ 4.7	249 $\pm$ 32 ^b	2.66 $\pm$ 0.33
Org + hCG	41.7 $\pm$ 4.4	262 $\pm$ 24 ^b	2.84 $\pm$ 0.26

Примечание. Значения AUC включают шестичасовой временной промежуток (с 12.00 до 18.00) и выражены в относительных единицах. ^a – различия между контролем и группами “Org”, “C+TP”, “C + hCG” и ^b – различия между группой “Org” и группами “Org+TP”, “Org + hCG” статистически значимы при $p < 0.05$. Во всех группах $n = 5$, значения представлены как $M \pm SEM$.

Экспрессия генов *Hsd3b* и *Hsd17b*, кодирующих соответственно 3 β - (3 β -HSD) и 17 β -гидроксистероид-дегидрогеназы (17 β -HSD), существенно не менялась как при обработке Оргалутраном, так и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ, за исключением группы “C + hCG”, в которой отмечали понижение экспрессии гена *Hsd17b* как по сравнению с контролем, так и группой “Org” (табл. 3). Фермент 3 β -HSD осуществляет превращение прегненолона в прогестерон, в то время как 17 β -HSD в зависимости от подтипа фермента катализирует широкий спектр реакций на заключительных стадиях овариального стероидогенеза, включая синтез эстрогенов.

Экспрессия гена *Cyp19a1*, кодирующего фермент ароматазу, превращающего андрогены в эстрогены, слабо менялась при обработке самок крыс

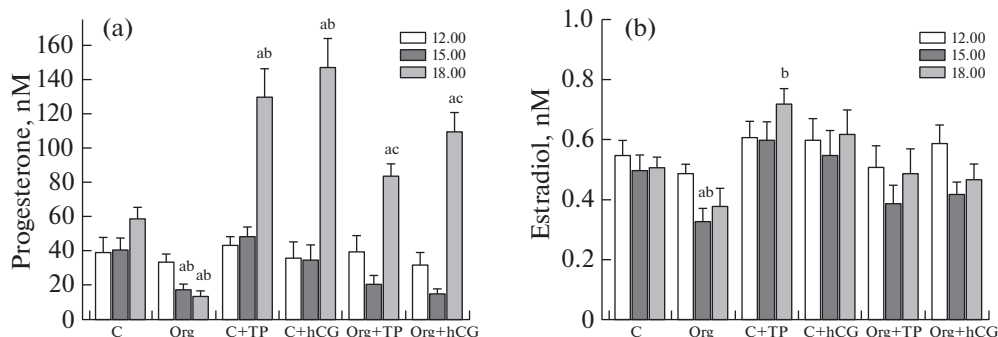


Рис. 2. Уровни прогестерона (а) и эстрадиола (б) в крови самок крыс в фазе проэструса и влияние на них обработки Оргалутраном и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ – TP03 и ХГЧ.

^a – различия внутри каждой группы во временных точках 15.00 и 18.00 по сравнению с начальной точкой (12.00), ^b – различия между контролем и группами “Org”, “C+TP”, “C + hCG” и ^c – различия между группой “Org” и группами “Org+TP”, “Org + hCG” в сходных временных точках статистически значимы при $p < 0.05$. Во всех группах $n = 5$, значения представлены как $M \pm SEM$.

Таблица 3. Экспрессия стероидогенных генов в яичниках крыс и влияние на нее обработки Оргалутраном (100 мкг/кг) и агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ – TR03 (40 мкг/кг) и ХГЧ (30 МЕ/крысу)

Группа	<i>Star</i>	<i>Cyp11a1</i>	<i>Hsd3b</i>	<i>Cyp17a1</i>	<i>Hsd17b</i>
	RQ, отн. ед.				
C	1.03 ± 0.13	1.03 ± 0.16	1.01 ± 0.13	1.05 ± 0.13	1.01 ± 0.09
Org	0.57 ± 0.11 ^a	0.65 ± 0.08	0.80 ± 0.10	0.15 ± 0.03 ^a	1.11 ± 0.04
C+TP	1.51 ± 0.10 ^{a,b}	1.37 ± 0.03 ^b	0.96 ± 0.06	2.44 ± 0.33 ^{a,b}	1.29 ± 0.15
C + hCG	1.62 ± 0.13 ^{a,b}	1.24 ± 0.18 ^b	0.76 ± 0.08	3.42 ± 0.55 ^{a,b}	0.72 ± 0.06 ^{a,b}
Org+TP	1.52 ± 0.19 ^b	1.41 ± 0.16 ^b	1.08 ± 0.16	1.75 ± 0.20 ^{a,b}	1.52 ± 0.19
Org + hCG	1.56 ± 0.15 ^b	1.25 ± 0.12 ^b	1.07 ± 0.09	2.98 ± 0.53 ^{a,b}	1.15 ± 0.10

Примечание. ^a – различия с группой “C” и ^b – различия с группой “Org” статистически значимы при $p < 0.05$. Во всех группах $n = 5$, значения представлены как $M \pm SEM$.

Оргалутраном, но значимо повышалась при обработке TR03 и ХГЧ как в контрольных, так и в обработанных антагонистом GnRH группах животных (рис. 3). Экспрессия гена *Lhcgr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ, при обработке Оргалутраном имела тенденцию к повышению ($p = 0.05$), что ассоциировано со снижением уровня эндогенного ЛГ в крови животных (рис. 3). Обработка ХГЧ значимо снижала ее по отношению к группе “Org”, но не по сравнению с контролем. Во всех группах с обработкой TR03 экспрессия гена *Lhcgr* была сходной с ее значением в контроле (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У препаратов мочевой формы ХГЧ и рекомбинантного ЛГ, широко применяемых для лечения

репродуктивных дисфункций у женщин и во вспомогательных репродуктивных технологиях, имеются существенные недостатки, обусловленные гиперактивацией овариального стероидогенеза, снижением чувствительности яичников к эндогенным гонадотропинам, развитием синдрома гиперстимуляции яичников. В качестве возможной альтернативы рассматривают низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, взаимодействующие с его аллостерическим сайтом, расположенным внутри трансмембранного домена. Ранее нами были получены производные тиено[2,3-*d*]-пиримидина – соединения TR01, TR03 и TR04, способные активировать рецептор ЛГ/ХГЧ по аллостерическому механизму, которые при внутрибрюшинном и пероральном введении самцам крыс стимулировали у них тестикулярный стероидогенез [11, 16, 17], а в условиях диабета и при физиологическом старении восстанавливали андрогенный дефицит и сперматогенез [11, 17]. Другими авторами производные тиено[2,3-*d*]-пиримидина, в том числе соединение Org43553, были использованы для стимуляции стероидогенеза в овариальных клетках *in vitro* и для индукции овуляции у самок крыс в условиях *in vivo* [14, 21, 22], а также для контролируемой индукции овуляции у женщин-добровольцев [23]. Следует отметить, что наряду с агонистами, в настоящее время нами и другими авторами разработаны низкомолекулярные антагонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, которые взаимодействуют с тем же трансмембранным аллостерическим сайтом, но при этом стабилизируют неактивную конформацию рецептора [24, 25].

В настоящем исследовании было впервые изучено влияние TR03, наиболее активного из разработанных нами производных тиено[2,3-*d*]-пиримидинов [17], на уровни стероидных гормонов в крови и на экспрессию ключевых генов овариального стероидогенеза у половозрелых самок крыс, в том числе обработанных Оргалутраном. При внутрибрюшинном введении TR03 вызывал значимое

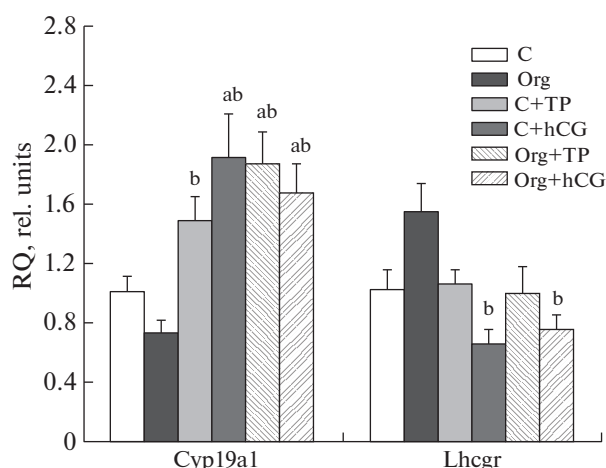


Рис. 3. Экспрессия генов ароматазы (*Cyp19a1*) и рецептора ЛГ/ХГЧ в яичниках крыс и влияние на нее обработки Оргалутраном (100 мкг/кг), TR03 (40 мкг/кг) и ХГЧ (30 МЕ/крысу).

^a – различия с группой “C” и ^b – различия с группой “Org” статистически значимы при $p < 0.05$. Во всех группах $n = 5$, значения представлены как $M \pm SEM$.

повышение уровня прогестерона как у контрольных крыс, так и у животных, обработанных Оргалутраном (действующее вещество Ганиреликс). По величине стимулирующего эффекта в обеих группах животных TP03 был сопоставим с ХГЧ (рис. 2). Выявленная нами способность TP03 эффективно стимулировать продукцию прогестерона согласуется с результатами экспериментов *in vitro*, полученными другими авторами при обработке фолликулярных клеток другим тиено[2,3-*d*]-пиримидиновым производным — Org43553 [14, 21]. Необходимо отметить, что антагонисты GnRH с пролонгированным действием, включая Ганиреликс, в условиях *in vitro* и *in vivo* быстро и эффективно снижают секрецию ЛГ и, как следствие, ингибируют продукцию прогестерона яичниками [26, 27]. В нашем случае Оргалутран значимо снижал уровень циркулирующего в крови ЛГ через 6 ч после обработки, хотя уже через 3 ч отмечалась тенденция к снижению уровня гормона (рис. 1). Вследствие этого прирост уровня прогестерона, который вызывали TP03 и ХГЧ у крыс, обработанных Оргалутраном, был обусловлен почти исключительно стимулирующим воздействием вводимых препаратов на овариальный стероидогенез.

Стимулирующие продукцию прогестерона эффекты TP03 и ХГЧ, оцениваемые по вызываемому ими приросту концентрации гормона над его уровнем в соответствующей необработанной агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ группе, были сходными, что указывает на отсутствие значимых изменений чувствительности к ним рецепторов ЛГ/ХГЧ и системы овариального стероидогенеза в условиях подавления секреции ЛГ Оргалутраном. В этой связи нужно отметить, что через 6 ч после обработки антагонистом GnRH в яичниках отмечалась тенденция к повышению экспрессии гена рецептора ЛГ/ХГЧ, как компенсаторная реакция на снижение уровня ЛГ в крови и недостаточную в связи с этим активацию ЛГ-зависимых сигнальных путей в фолликулярных клетках. В пользу этого свидетельствует тот факт, что применение ХГЧ вызывало двукратное снижение экспрессии гена *Lhcgr* (рис. 3). Необходимо отметить, что ХГЧ-индуцированное снижение экспрессии гена рецептора ЛГ/ХГЧ было показано другими авторами в фолликулярных клетках яичников [7–9], а нами ранее в клетках Лейдига семенников крыс [11, 25]. Наряду с этим обработка контрольных крыс с помощью ХГЧ приводила к значимому снижению уровня ЛГ в крови, что указывает на ХГЧ-индуцированное подавление продукции эндогенных гонадотропинов.

Нами установлено, что TP03 и ХГЧ практически не влияли на продукцию эстрадиола. Это обусловлено тем, что пик эстрадиола в ходе эстрального цикла приходится на заключительную стадию диэструса и первую половину фазы проэструса, а исследование включало вторую половину фазы про-

эструса с характерным для него повышением продукции прогестерона, вызываемого агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ, в том числе эндогенным ЛГ [28, 29].

Исследование экспрессии стероидогенных генов показало, что введение TP03 и ХГЧ контрольным и обработанным Оргалутраном крысам существенно повышает в яичниках экспрессию генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих ключевые для протекания овариального стероидогенеза белки — холестерин-транспортирующий белок StAR и цитохром P450c17 (CYP17A1). Белок StAR является одной из основных мишеней при стимуляции клеток теки и гранулезы яичников ЛГ и ХГЧ, поскольку промотор гена *Star* содержит сайты связывания с цАМФ-зависимыми транскрипционными факторами, в первую очередь CREB, которые активируются через посредство сигнального пути рецептор ЛГ/ХГЧ—G_s-белок—аденилатциклаза—протеинкиназа A [30]. Согласно ранее полученным нами в условиях *in vitro* данным, TP03 и его структурные аналоги через посредство рецептора ЛГ/ХГЧ селективно стимулируют аденилатциклазу и повышают внутриклеточный уровень цАМФ, действуя подобно ХГЧ, но более селективно в отношении G_s-белок-зависимых путей [31, 32]. Вследствие этого способность TP03 активировать цАМФ-зависимые сигнальные каскады является причиной повышения экспрессии гена *Star*, сопоставимого с таковым при использовании ХГЧ. Тот факт, что стимулирующий эффект в яичниках не столь значителен, как в случае воздействия TP03 на экспрессию гена *Star* в тестикулярных клетках [17], может быть обусловлен сравнительно высоким базовым уровнем экспрессии этого гена на стадии позднего проэструса [33].

Цитохром P450c17 совмещает в себе активности 17-гидроксилазы и 17,20-лиазы и катализирует различные стероидогенные реакции, в зависимости от фазы цикла, типа клеток и видовой принадлежности организма. Основными реакциями, которые катализируются цитохромом P450c17, являются превращение прегненолона в 17ОН-прегненолон и далее в дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и превращение прогестерона в 17ОН-прогестерон и далее в андростендион [34]. Необходимо отметить, что в фазе проэструса экспрессия и активность цитохрома P450c17 существенно повышаются, что обусловлено повышением синтеза андрогенов клетками теки [34]. Регуляция экспрессии гена *Cyp17a1* в клетках теки осуществляется в основном через цАМФ-зависимые сигнальные пути как результат активации рецепторов ЛГ/ХГЧ гонадотропинами, но в этот процесс могут быть вовлечены и другие сигнальные пути, в том числе реализуемые через стимуляцию форбол-чувствительных изоформ протеинкиназы C. При этом активация цАМФ-зависимых путей и протеинкиназы A приводит к по-

вышению экспрессии гена *Cyp17a1*, в то время активация протеинкиназы С вызывает снижение стимулированной цАМФ экспрессии этого гена [34, 35]. Следует отметить, что в клетках гранулезы экспрессия гена *Cyp17a1* существенно ниже и менее подвержена влиянию цАМФ-зависимого сигналинга [34]. В наших экспериментах стимулирующие эффекты ТР03 и ХГЧ на экспрессию гена *Cyp17a1* были отчетливо выражены не только у контрольных животных, но и у самок крыс, предварительно обработанных Оргалутраном, которые в отсутствие стимуляции агонистами рецептора ЛГ/ХГЧ имели крайне низкий уровень генной экспрессии цитохрома P450c17 (табл. 3). С учетом вызываемой ТР03 избирательной стимуляции цАМФ-сигналинга, можно сделать заключение, что именно активация цАМФ-зависимых путей в яичниках крыс с дефицитом эндогенного ЛГ является основной причиной повышения экспрессии гена *Cyp17a1*. Однако следует учитывать временную динамику этого эффекта, поскольку с использованием вестерн-блоттинга показано, что через 7 ч после введения ХГЧ содержание белка цитохрома P450c17 в фолликулярных клетках крысы существенно снижалось, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию, следующую за всплеском стероидогенной активности [36].

Достаточно неожиданным было отсутствие в контрольной группе значимого стимулирующего эффекта ТР03 и ХГЧ на экспрессию гена *Cyp11a1*, кодирующего цитохром P450ssc (CYP11A1), катализирующий превращение холестерина в прегненолон. С другой стороны, у крыс с обработкой Оргалутраном, у которых отмечали незначительное снижение экспрессии гена *Cyp11a1*, стимулирующие эффекты обоих исследуемых агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ были статистически значимы (табл. 3). Основываясь на данных литературы, имеются основания считать, что причинами этого являются сравнительно высокий уровень экспрессии гена *Cyp11a1* и количества белка цитохрома P450ssc в фазе позднего проэструса [37, 38], а также более медленное в сравнении с генами *Star* и *Cyp17a1* стимулирующее влияние агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на экспрессию гена *Cyp11a1* [39]. Так, у контрольных крыс повышенный в проэструсе уровень экспрессии гена *Cyp11a1* маскирует стимулирующие эффекты ТР03 и ХГЧ, но при небольшом снижении этого уровня в условиях дефицита эндогенного ЛГ эти эффекты начинают выявляться.

Ароматаза (цитохром P450c19) является одним из ключевых ферментов овариального стероидогенеза, катализируя превращение андрогенов в эстрогены. В ходе эстрального цикла экспрессия и активность ароматазы сильно меняются, причем изменение активности фермента “отстает” от экспрессии гена *Cyp19a1*. Так, экспрессия гена *Cyp19a1* максимальна в диэструсе, немного снижается в первой половине проэструса и резко снижа-

ется, становясь почти неопределяемой, в фазе эструса, в то время как пик активности фермента приходится на проэструс и далее постепенно снижается до наступления фазы диэструса следующего цикла [40], и это положительно коррелирует с количеством белка ароматазы и с количеством эстрадиола в крови в эти периоды развития фолликула [41]. Эти изменения активности также ассоциированы с подъемом уровня ЛГ и активацией ЛГ-зависимых сигнальных путей в клетках гранулезы и, в меньшей степени, в клетках теки [41]. Нами показано сопоставимое по величине стимулирующее влияние ХГЧ и ТР03 на экспрессию гена *Cyp19a1*, как у контрольных самок крыс, так и у животных с обработкой Оргалутраном, и это повышение положительно коррелировало со стероидогенной активностью обоих агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ (рис. 3). Интересно отметить, что стимулирующий эффект ХГЧ на экспрессию гена ароматазы, в отличие от такового на экспрессию гена *Cyp17a1*, слабо отличался от такового ТР03. Так, соотношение экспрессий гена *Cyp17a1* в группах “Org + hCG” и “Org + TR” составило 1.70, а гена ароматазы — 0.89.

Таким образом, нами впервые показано, что введение половозрелым самкам крыс ТР03, низкомолекулярного аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ, вызывает у них повышение уровня прогестерона, в различной степени усиливает экспрессию ряда стероидогенных генов — холестерин-транспортирующего белка StAR, цитохрома P450c17 и ароматазы, и этот эффект проявлялся как у контрольных крыс, в присутствии нормального эндогенного ЛГ, так и у крыс, обработанных антагонистом GnRH, с пониженным уровнем эндогенного ЛГ. Эффекты ТР03 были сопоставимы с таковыми ХГЧ, широко используемого в клинике активатора овариального стероидогенеза и индуктора овуляции. При этом, в отличие от ХГЧ, ТР03 не вызывал ослабления функционирования компонентов гонадной оси, на что указывает отсутствие его влияния на уровень ЛГ в крови и на экспрессию рецепторов ЛГ/ХГЧ в яичниках. Имеются основания считать, что более мягкая стимуляция стероидогенеза под действием ТР03 может снижать риски развития гиперстимуляции яичников, что требует дальнейшего исследования. Полученные данные свидетельствуют о способности ТР03 стимулировать овариальный стероидогенез у половозрелых крыс и о перспективности разработки на основе этого соединения лекарственных форм для контролируемой индукции овуляции.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными осуществляли, следуя требованиям Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 2-5/2021, 20.04.2021), “Руководство по уходу и использованию лабораторных животных” и рекомендации Совета Европейских сообществ по уходу и использованию лабораторных животных (2010/63/EU).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

ЯМР исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, масс-спектры высокого разрешения получены на оборудовании ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martinez F, Racca A, Rodríguez I, Polyzos NP (2021) Ovarian stimulation for oocyte donation: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 27 (4): 673–696. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab008>
- Namavar Jahromi B, Parsanezhad ME, Shomali Z, Bakhshai P, Alborzi M, Moin Vaziri N, Anvar Z (2018) Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Narrative Review of Its Pathophysiology, Risk Factors, Prevention, Classification, and Management. *Iran J Med Sci* 43 (3): 248–260. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993897>
- Engmann LL, Maslow BS, Kaye LA, Griffin DW, DiLuigi AJ, Schmidt DW, Grow DR, Nulsen JC, Benadiva CA (2019) Low dose human chorionic gonadotropin administration at the time of gonadotropin releasing-hormone agonist trigger versus 35h later in women at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome - a prospective randomized double-blind clinical trial. *J Ovarian Res* 12 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0483-7>
- Jiang X, Dias JA, He X (2014) Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol Cell Endocrinol* 382 (1): 424–451. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.021>
- Casarini L, Simoni M (2021) Recent advances in understanding gonadotropin signaling. *Fac Rev* 10: 41. <https://doi.org/10.12703/r/10-41>
- Ricetti L, Yvinec R, Klett D, Gally N, Combarnous Y, Reiter E, Simoni M, Casarini L, Ayoub MA (2017) Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin Display Biased Agonism at the LH and LH/CG Receptors. *Sci Rep* 7 (1): 940. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01078-8>
- Segaloff DL, Wang HY, Richards JS (1990) Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4 (12): 1856–1865. <https://doi.org/10.1210/mend-4-12-1856>
- Menon B, Sinden J, Franco-Romain M, Botta RB, Menon KM (2013) Regulation of LH receptor mRNA binding protein by miR-122 in rat ovaries. *Endocrinology* 154 (12): 4826–4834. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1619>
- Menon B, Gulappa T, Menon KM (2015) miR-122 Regulates LH Receptor Expression by Activating Sterol Response Element Binding Protein in Rat Ovaries. *Endocrinology* 156 (9): 3370–3380. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1121>
- Veldhuis JD, Liu PY, Takahashi PY, Keenan DM (2012) Dynamic testosterone responses to near-physiological LH pulses are determined by the time pattern of prior intravenous LH infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303 (6): E720–728. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00200.2012>
- Bakhtuykov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IY, Stepanchikina AM, Shpakov AO (2020) Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno[2,3-D]pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats. *Int J Mol Sci* 21 (20): 7493. <https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
- Bakhtuykov AA, Derkach KV, Romanova IV, Sorokoumov VN, Sokolova TV, Govdi AI, Morina IYu, Perminova AA, Shpakov AO (2021) Effect of low-molecular-weight allosteric agonists of the luteinizing hormone receptor on its expression and distribution in rat testes. *J Evol Biochem Physiol* 57 (2): 208–220. <https://doi.org/10.1134/S0022093021020034>
- Heitman LH, Oosterom J, Bongers KM, Timmers CM, Wiegand PH, Ijzerman AP (2008) [³H]Org 43553, the first low-molecular-weight agonistic and allosteric radioligand for the human luteinizing hormone receptor. *Mol Pharmacol* 73 (2): 518–524. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039875>
- van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 378 (5): 503–514. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
- Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS (2015) Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors. *Front Endocrinol*

- (Lausanne) 6: 142.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
16. *Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO* (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
 17. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepanochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2021) The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23 (1): 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
 18. *Cora MC, Kooistra L, Travlos G* (2015) Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol* 43 (6): 776–793.
<https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
 19. *Ajayi AF, Akhigbe RE* (2020) Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract* 6: 5.
<https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
 20. *Schmittgen TD, Livak KJ* (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3 (6): 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
 21. *van de Lagemaat R, Timmers CM, Kelder J, van Koppen C, Mosselman S, Hanssen RG* (2009) Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum Reprod* 24 (3): 640–648.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
 22. *van de Lagemaat R, Raafs BC, van Koppen C, Timmers CM, Mulders SM, Hanssen RG* (2011) Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology* 152 (11): 4350–4357.
<https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
 23. *Gerrits M, Mannaerts B, Kramer H, Addo S, Hanssen R* (2013) First evidence of ovulation induced by oral LH agonists in healthy female volunteers of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (4): 1558–1566.
<https://doi.org/10.1210/jc.2012-3404>
 24. *Wortmann L, Lindenthal B, Muhn P, Walter A, Nubbenmeyer R, Heldmann D, Sobek L, Morandi F, Schrey AK, Moosmayer D, Günther J, Kuhnke J, Koppitz M, Lücking U, Röhn U, Schäfer M, Nowak-Reppel K, Kühne R, Weinmann H, Langer G* (2019) Discovery of BAY-298 and BAY-899: Tetrahydro-1,6-naphthyridine-Based, Potent, and Selective Antagonists of the Luteinizing Hormone Receptor Which Reduce Sex Hormone Levels in Vivo. *J Med Chem* 62 (22): 10321–10341.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01382>
 25. *Derkach KV, Dar'in DV, Shpakov AO* (2020) Low-Molecular-Weight Ligands of Luteinizing Hormone with the Activity of Antagonists. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology* 14 (3): 223–231.
<https://doi.org/10.1134/S1990747820030034>
 26. *Broqua P, Riviere PJ, Conn PM, Rivier JE, Aubert ML, Junien JL* (2002) Pharmacological profile of a new, potent, and long-acting gonadotropin-releasing hormone antagonist: degarelix. *J Pharmacol Exp Ther* 301 (1): 95–102.
<https://doi.org/10.1124/jpet.301.1.95>
 27. *Weiss JM, König SJ, Polack S, Emons G, Schulz KD, Diedrich K, Ortmann O* (2006) Actions of gonadotropin-releasing hormone analogues in pituitary gonadotrophs and their modulation by ovarian steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 101 (2–3): 118–126.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.06.009>
 28. *Smith MS, Freeman ME, Neill JD* (1975) The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96 (1): 219–226.
<https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
 29. *Donner NC, Lowry CA* (2013) Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch* 465 (5): 601–626.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>
 30. *Manna PR, Dyson MT, Stocco DM* (2009) Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15 (6): 321–333.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap025>
 31. *Shpakov AO, Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS* (2014) Activation of adenylyl cyclase by thienopyrimidine derivatives in rat testes and ovaries. *Cell Tissue Biol* 8 (5): 400–406.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X14050071>
 32. *Derkach KV, Dar'in DV, Bakhtyukov AA, Lobanov PS, Shpakov AO* (2016) In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology* 10 (4): 294–300.
<https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
 33. *Manna PR, Stetson CL, Slominski AT, Pruitt K* (2016) Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine* 51 (1): 7–21.
<https://doi.org/10.1007/s12020-015-0715-6>
 34. *Patel SS, Beshay VE, Escobar JC, Carr BR* (2010) 17 α -Hydroxylase (CYP17) expression and subsequent androstenedione production in the human ovary. *Reprod Sci* 17 (11): 978–986.
<https://doi.org/10.1177/1933719110379055>
 35. *Beshay VE, Havelock JC, Sirianni R, Ye P, Suzuki T, Rainey WE, Carr BR* (2007) The mechanism for protein kinase C inhibition of androgen production and 17 α -hydroxylase expression in a theca cell tumor model. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (12): 4802–4809.
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-1394>
 36. *Hedin L, Rodgers RJ, Simpson ER, Richards JS* (1987) Changes in content of cytochrome P450(17) α , cytochrome P450_{scc}, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 37 (1): 211–223.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod37.1.211>
 37. *Conley AJ, Howard HJ, Slanger WD, Ford JJ* (1994) Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol*

- Reprod 51 (4): 655–661.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.4.655>
38. Peña-Rico M, Guadalupe Ortiz-López M, Camacho-Castillo L, Cárdenas M, Pedraza-Chaverri J, Menjívar M (2006) Steroidogenic impairment due to reduced ovarian transcription of cytochrome P450 side-chain-cleavage (P450scc) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during experimental nephrotic syndrome. *Life Sci* 79 (7): 702–708.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.02.023>
 39. Lavoie HA, King SR (2009) Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med* (Maywood) 234 (8): 880–907.
<https://doi.org/10.3181/0903-MR-97>
 40. Lephart ED, Doody KJ, McPhaul MJ, Simpson ER (1992) Inverse relationship between ovarian aromatase cytochrome P450 and 5 alpha-reductase enzyme activities and mRNA levels during the estrous cycle in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42 (5): 439–447.
[https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90255-h](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90255-h)
 41. Zurvarra FM, Salvetti NR, Mason JJ, Velazquez MM, Alfaro NS, Ortega HH (2009) Disruption in the expression and immunolocalisation of steroid receptors and steroidogenic enzymes in letrozole-induced polycystic ovaries in rat. *Reprod Fertil Dev* 21 (7): 827–839.
<https://doi.org/10.1071/RD09026>

EFFECT OF DIFFERENT LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR AGONISTS ON OVARIAN STEROIDOGENESIS IN MATURE FEMALE RATS

A. A. Bakhtyukov^a, K. V. Derkach^a, E. A. Fokina^a, I. A. Lebedev^a,
 V. N. Sorokoumov^b, L. V. Bayunova^a, and A. O. Shpakov^{a,*}

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

^b Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^{*}e-mail: alex_shpakov@list.ru

In clinical practice, ovarian steroidogenesis is stimulated and ovulation is induced using such gonadotropin preparations as human chorionic gonadotropin (hCG) and luteinizing hormone (LH) which, however, have a number of side effects, including a reduction in ovarian sensitivity to endogenous LH and ovarian hyperstimulation syndrome. An alternative to hCG and LH could be allosteric LH/hCG receptor agonists, including the thieno-[2,3-d]-pyrimidine derivative TP03 developed in our laboratory. This work was aimed to study the effect of TP03 (40 µg/kg, i.p.) versus hCG (30 IU/rat, s.c.) on ovarian steroidogenesis in mature female rats in the late proestrus phase, including those treated with the gonadotropin releasing hormone (GnRH) antagonist Orgalutran (100 µg/kg, s.c., 3 h before TP03 or hCG administration). Estradiol, progesterone and LH levels were measured in the blood, while expression levels of the steroidogenesis-related genes *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, *Cyp17a1*, *Hsd17b*, *Cyp19a1* and LH/hCG receptor gene *Lhcgr* were assessed in the ovaries. Three hours after administration, TP03 and hCG increased blood progesterone levels and stimulated the expression of genes encoding the cholesterol-transporting protein StAR, cytochrome P450c17 and aromatase (cytochrome P450c19), with this effects detected both in control rats with normal LH levels and in Orgalutran-treated rats with reduced LH levels. The effects of TP03 were comparable to those of hCG, but in contrast to hCG, TP03 did not reduce the activity of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, as indicated by the lack of its influence on blood LH levels and ovarian expression of LH/hCG receptors. Our data indicate the ability of TP03 to effectively stimulate ovarian steroidogenesis, as well as good prospects for the development of TP03-based drugs for controlled ovulation induction.

Keywords: allosteric agonist, ovarian steroidogenesis, luteinizing hormone receptor, human chorionic gonadotropin, mature rats, progesterone, cytochrome P450c17

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ИМПЕДАНС МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА И ЛЕГКОГО КРЫС ПОСЛЕ ТРЕНИРОВОК ПРИНУДИТЕЛЬНЫМ ПЛАВАНИЕМ И ПОСЛЕДУЮЩИМ ДЕТРЕНИНГОМ

© 2023 г. Н. Л. Коломеец^{1,*}, А. Г. Ивонин¹, Е. А. Пешкин¹, И. М. Рощевская¹

¹ Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: kolomeec@frc.komisc.ru

Поступила в редакцию 07.08.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Многочастотные биоимпедансные исследования проведены у крыс, подвергнутых восьминедельному курсу плавания и последующему восьминедельному периоду отсутствия физических нагрузок, и у контрольных животных. Выявлено значимо меньшее отношение фазовых углов биоэлектрического импеданса легочной ткани при двух частотах электрического тока у крыс после длительных физических нагрузок в сравнении с контрольными животными, которое может свидетельствовать о структурно-функциональных изменениях легочной ткани. Не обнаружено значимых различий биоимпеданса миокарда левого желудочка сердца у крыс двух групп после восьми недель плавания. После восьминедельного периода отсутствия физических нагрузок наблюдали у детренированных грызунов в сравнении с контрольными значимо меньшее активное сопротивление биоэлектрического импеданса миокардиальной ткани и значимо большее отношение сопротивлений биоэлектрического импеданса легочной ткани при двух частотах электрического тока, которые могут указывать на отеки, а также сохранение образовавшихся при физической нагрузке новых микрососудов.

Ключевые слова: плавание, принудительные тренировки, детренинг, биоимпеданс легочной и миокардиальной ткани

DOI: 10.31857/S0044452923010059, **EDN:** GXHETO

Умеренные физические нагрузки приводят к адаптационным изменениям сердечно-сосудистой и респираторной систем, которые повышают функциональные возможности организма. Регулярные тренировки плаванием способствуют ремоделированию желудочков сердца, легочного кровообращения [1], увеличению размеров легких [2], улучшению перфузии скелетных мышц [3]. Прекращение физических тренировок вызывает (в зависимости от длительности детренирования) частичную или полную реверсию адаптаций к нагрузкам [4].

Компоненты биоэлектрического импеданса тела, являясь косвенными показателями распределения внутриклеточной и внеклеточной жидкости, мышечной массы, используются для оценки эффективности режима тренировок и производительности спортсменов [5]. Взаимосвязь между уровнем результативности и фазовым углом биоэлектрического импеданса тела, увеличение которого свидетельствует о положительном влиянии физических упражнений на состояние организма, может различаться в разных видах спорта [6]. Фазовый угол биоэлектрического импеданса как харак-

теристика мышечной массы тела может использоваться при сравнении детренированных групп спортсменов с хорошо подготовленными [7].

В изменения биоэлектрического импеданса тела человека комплексно вносят вклад дыхательная активность, мышечные сокращения, объем циркулирующей крови, перераспределение жидкости организма [8]. Прямое измерение электрического импеданса у животных позволит оценить влияние физических тренировок и их прекращения на структурно-функциональные изменения сердца и легкого.

Плавание грызунов используется для изучения адаптации сердечно-сосудистой системы и скелетных мышц к физическим упражнениям [9]. Отмечено развитие физиологической гипертрофии миокарда крыс при воздействии длительных физических тренировок [10] и восстановление функциональных изменений сердца после периода детренинга [11].

Цель работы — исследовать показатели биоэлектрического импеданса миокарда, легкого, тела крыс после курса принудительного плавания и периода отсутствия физических тренировок.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на самцах крыс линии Вистар (22 особи, 3 мес, масса тела 281.0 ± 25.4 г), полученных из питомника лабораторных животных (ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия). Животных содержали в условиях свободного доступа к водопроводной питьевой воде и корму в помещении с естественно-искусственным освещением. Крысы находились в клетках группами по 2–3 особи при температуре 20–22°C на подстилке из древесных стружек.

Крысы были разделены на контрольную группу ($n = 11$), животных из которой погружали в воду на 10 мин по два раза в неделю, чтобы уменьшить возможные различия, вызванные стрессом от контакта с водой, и опытную группу ($n = 11$), животные из которой прошли восьминедельный курс плавания. Тренировки по плаванию проводили путем помещения крыс в резервуар ($50 \times 60 \times 65$ см), наполненный водопроводной водой на глубину 45 см. Температуру воды поддерживали на уровне 30–32°C. Резервуар был разделен пластиковыми перегородками на шесть ячеек. Чтобы избежать взаимодействия, каждую крысу помещали в отдельную ячейку. Животные опытной группы плавали по пять дней в неделю в течение восьми недель. Для развития гипертрофии миокарда, вызванной долговременной тренировкой плаванием использовали протокол, модифицированный [12] на основе работы [13]. Для адаптации животных продолжительность плавания увеличивали на 10 мин каждый тренировочный день с исходных 10 мин в первый день до достижения максимальной – 90 мин по два раза в день. Для проверки обратимости изменений, вызванных физическими упражнениями, часть крыс обеих групп после прекращения восьминедельной программы тренировок была оставлена на восемь недель без проведения физических тренировок.

У всех животных проводили эхокардиографическую (ЭхоКГ) оценку ремоделирования миокарда и биоимпедансный анализ состава тела до тренировок (исходное состояние), после восьминедельного курса тренировок и после восьминедельного периода без физических нагрузок. Для наркоза при ЭхоКГ исследовании и измерении биоэлектрического импеданса тела использовали золетил (Zoletil, Франция, 2.5 мг/100 г веса тела, внутримышечно).

Для измерения ЭхоКГ использовали ультразвуковую систему Logiq Pro (General Electric, США) с линейным датчиком 10 МГц. В М-режиме регистрировали конечный диастолический и систолический размеры левого желудочка сердца (LVIdD и LVIdS, см); в В-режиме определяли толщину межжелудочковой перегородки и задней стенки левого желудочка сердца вблизи папиллярных мышц. Показатель сократимости левого желудочка

сердца – фракцию выброса – рассчитывали по формуле Teichholz [14]. Массу левого желудочка сердца крыс вычисляли как Ватсон и соавт. [15]. Определяли процентное изменение ЭхоКГ-показателей левого желудочка сердца относительно исходного значения.

Биоимпедансное исследование проводили при помощи анализатора физических свойств материалов и веществ 126094W (Solartron Analytical, Великобритания). Биоэлектрический импеданс тела измеряли при помощи игольчатых электродов из нержавеющей стали, которые размещали согласно рекомендациям [16], предложенным для оценки состава тела у крысы.

Измеряли длину тела крыс без хвоста (L) в сантиметрах. Индекс массы тела вычисляли как отношение массы тела (г) к квадрату длины тела L (см²). Массу тела и сердца определяли с помощью лабораторных электронных весов EK 2000i (AND, Япония, точность 0.1 г). Относительную массу сердца рассчитывали как отношение массы сердца (г) к массе тела (кг).

Измерения биоимпеданса сердца и легкого были проведены у 13 крыс (7 из опытной и 6 из контрольной групп) после курса физических тренировок, у 9 животных (4 из опытной и 5 из контрольной групп) после периода отсутствия физических тренировок, под наркозом: уретан (650 мг/кг массы тела, внутривенно) в сочетании с золетилом. У крыс перед вскрытием грудной клетки проводили трахеотомию и переводили животных на искусственное дыхание с использованием аппарата SAR-830/AP (CWE Inc., США). Частота дыхания составляла 60 дыханий в мин, дыхательный объем подбирали в зависимости от массы тела.

Измерение электрического импеданса проводили, располагая электроды: на эпикарде медиальной части вентральной поверхности свободной стенки левого желудочка сердца; на поверхности правой медиальной доли легкого. Использовали датчик с медными электродами (диаметр 0.1 мм, длина контакта ~1 мм), расстояние между измеряющими электродами 1.5 мм, токовыми – 5 мм. Вычисляли постоянную ячейки $c \approx 77.7 \text{ м}^{-1}$ на основе измерений датчиком электрического сопротивления R_{NaCl} физиологического раствора (NaCl, 0.9%) при температуре 24.9°C с использованием формулы $c = R_{\text{NaCl}}/\rho_{\text{NaCl}}$, где $\rho_{\text{NaCl}} = 0.7 \text{ Ом*м}$.

По окончании эксперимента сердце вырезали.

У крыс опытной и контрольной групп сравнивали изменения фазового угла (ϕ) биоэлектрического импеданса тела при девяти частотах тока в диапазоне от 10 до 200 кГц и значения компонентов (активное (R) и реактивное сопротивление, фазовый угол) биоэлектрического импеданса миокарда и легкого при пяти частотах тока в диапазоне от 10 до 150 кГц. Вычисляли отношение компонентов био-

импеданса миокарда и легкого, измеренных при двух частотах: $R_{50/100}$, Φ_{10}/Φ_{100} , Φ_{10}/Φ_{120} .

При значительном расстоянии между (токовыми) электродами электрический ток охватывает существенную долю толщины стенки левого желудочка сердца, уменьшается влияние анизотропии ткани на измерения сопротивления мышечной ткани [17, 18].

Выбранный частотный диапазон характеризуется резким частотным градиентом, свойственным живым тканям [19]. Изменения импеданса тканей на низких частотах могут быть обусловлены изменениями кровотока и лимфотока, а на высоких частотах изменения импеданса свидетельствуют об изменениях внутриклеточных процессов. [20]. Отношение сопротивлений тканей, измеренных при двух частотах, отражает изменения объемов жидкости и электролитный баланс в организме. Фазовый угол биоэлектрического импеданса тела человека связан с соотношением объемов внутри- и внеклеточной жидкости, количества клеточных мембран на единицу объема жидкости [21], зависит от степени развитости сосудистого русла в исследуемом участке [22]; изменения в частотном спектре фазового угла биоимпеданса мышечной ткани могут быть обусловлены замещением ее жировой и соединительной тканью [23].

Используя алгоритм аппроксимации данных (годографа) дугой окружности [24], вычисляли параметры модели Коула, внеклеточное (R_e , Ом) и внутриклеточное сопротивление (R_i , Ом). Определяли показатель суммарного объема воды (ОВ, см²/Ом) тела крыс согласно рекомендациям [25]. Оценка безжировой массы тела крыс пропорциональна суммарному объему воды [26]. Вычисляли соотношение объемов внеклеточной жидкости и внутриклеточной жидкости (ВКЖ/КЖ) тела крыс как R_i/R_e .

Отмечено увеличение объема внеклеточной жидкости, уменьшение объема внутриклеточной жидкости и абсолютного значения фазового угла у людей с признаками хронического стресса [27]. Увеличение мышечной массы отражается увеличением объема внутриклеточной жидкости и абсолютного значения фазового угла биоэлектрического импеданса тела спортсмена [28].

Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ статистического анализа Statistica 10.0. Для проверки нормальности распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий распределений признаков в группах проверяли по критерию Левена. Нормально распределенные количественные признаки представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение. При распределении, не соответствующем нормальному, величины описаны при помощи медианы Me и межквартильного размаха ($Q1 - Q3$). Уровень зна-

чимости различий принимали равным 0.05. Сравнения двух групп из совокупностей, отличающихся от нормального распределения, проводили по критерию Манна–Уитни или Вилкоксона. Для выявления различия биоэлектрического импеданса сердца и легкого на множестве частот тока использовали критерий Манна–Уитни с корректировкой уровня статистической значимости при множественных сравнениях по формуле $p = 1 - 0.95^{1/n}$. Для анализа воздействия долговременных физических тренировок на изменение массы тела крыс проводили дисперсионный анализ для повторных измерений. Для анализа временных функциональных изменений левого желудочка сердца крыс применяли дисперсионный анализ Фридмана. Корреляционный анализ (для всей выборки крыс) проводили по критерию Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и относительная масса сердца

За восемь недель тренировок масса тела крыс двух групп увеличилась ($F_{1,20} = 86.8$, $p < 0.001$), наблюдали значимый ($F_{1,20} = 9.9$, $p = 0.005$) прирост массы тела у животных опытной (от 279.5 ± 28.8 г до 313.5 ± 38.8 г, $p = 0.002$) и контрольной (от 282.5 ± 22.9 г до 351.1 ± 29.2 г, $p < 0.001$) групп. В течение курса плавания масса тела крыс опытной группы увеличилась значимо меньше ($p = 0.043$), чем у контрольных животных. После отдыха масса тела крыс двух групп значимо не различалась (406.8 ± 32.3 г — пловцов и 401.2 ± 41.6 г — контрольных животных).

Отметили значимое увеличение индекса массы тела у крыс ($Fr = 6.5$, $ss = 2$, $p < 0.039$ у крыс-пловцов и $Fr = 10$, $ss = 2$, $p < 0.007$ у контрольных животных) в период эксперимента. При парном сравнении выявлено значимое увеличение индекса массы тела у крыс контрольной группы после курса физических нагрузок от 0.55 ($0.53, 0.57$) г/см² до 0.6 ($0.57, 0.61$) г/см² ($T = 6$, $Z = 2.4$, $p = 0.016$). Значимых межгрупповых различий индекса массы тела у крыс двух групп не обнаружили.

Относительная масса сердца у крыс двух групп значимо не различалась после курса тренировок (3.8 ($3.4, 4.1$) г/кг у пловцов и 3.4 ($3, 3.7$) г/кг в контроле) и после отдыха (3.1 ($3.1, 3.3$) г/кг у пловцов и 3.5 ($3.3, 3.5$) г/кг в контроле).

Биоимпедансное исследование тела крыс

У крыс отметили значимое увеличение оценки суммарного объема воды тела ($Fr = 6$, $ss = 2$, $p < 0.05$ у крыс-пловцов и $Fr = 7.6$, $ss = 2$, $p < 0.002$ у контрольных животных) в период эксперимента. При парном сравнении с учетом поправки Бонферрони значимых различий ОВ в разные моменты времени у крыс двух групп не выявлено. После кур-

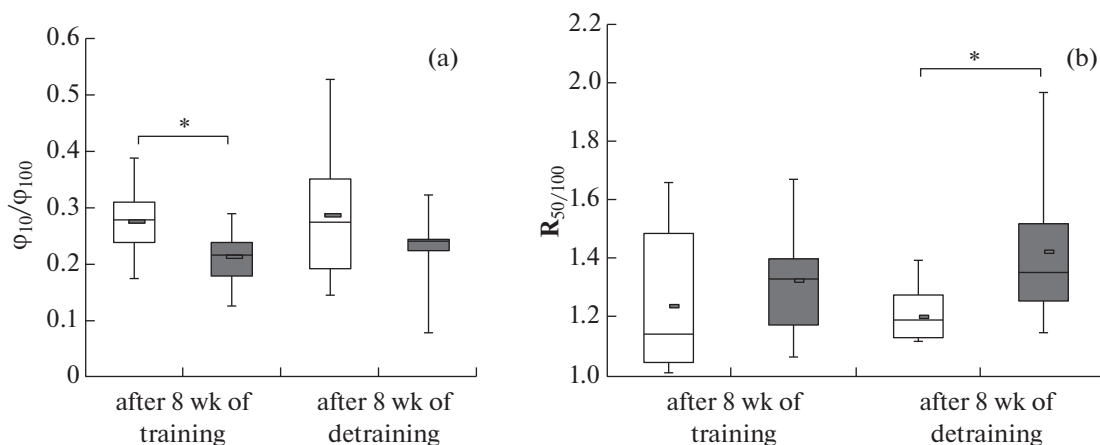


Рис. 1. Отношение фазовых углов (а) и активных сопротивлений (б) биоэлектрического импеданса легкого при двух частотах тока у крыс опытной (темные столбики) и контрольной (белые столбики) групп после курса физических нагрузок и после периода отсутствия тренировок. * — $p = 0.006$ (слева), $p = 0.019$ (справа). На графике отображены распределение данных от первого до третьего квартиля, медиана и среднее значение.

са физических нагрузок наблюдали прирост ОВ на 19 (13, 29) и на 31 (9, 49)% соответственно у животных опытной и контрольной групп). В период отдыха ОВ увеличился только у тренированных крыс (на 15 (12, 53)%). В конце эксперимента изменение ОВ составило 60 (44, 63) и 48 (40, 68)% соответственно у животных опытной и контрольной групп относительно исходного уровня.

Не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий в изменении отношения ВКЖ/КЖ, фазового угла биоэлектрического импеданса тела крыс.

Биоимпедансное исследование легкого

После курса тренировок выявлены значимо меньшие отношения фазовых углов биоэлектрического импеданса легкого ϕ_{10}/ϕ_{100} (0.21 (0.18, 0.24) и 0.28 (0.24, 0.31), $U = 23$, $Z = 2.7$, $p = 0.006$) и ϕ_{10}/ϕ_{120} (0.24 (0.22, 0.28) и 0.31 (0.25, 0.35), $U = 23$, $Z = 2.7$, $p = 0.006$) у крыс опытной группы в сравнении с контрольными животными (рис. 1). Наблюдалась тенденция к более высоким абсолютным значениям фазового угла биоэлектрического импеданса легкого у пловцов в сравнении с контрольными животными (ϕ_{120} : 42.3° (34.6°, 47.8°) и 29.6° (24.3°, 40.7°), $U = 35$, $Z = 2$, $p = 0.043$).

После отдыха стали недостоверными различия в коэффициентах ϕ_{10}/ϕ_{100} (0.24 (0.22, 0.24) и 0.27 (0.19, 0.35)) и ϕ_{10}/ϕ_{120} (0.27 (0.26, 0.29) и 0.31 (0.26, 0.38)) у крыс-пловцов и контрольных животных.

Отмечены показатели биоимпеданса легкого крыс, различия которых не были достоверными между группами животных после курса плавания, но стали значимыми после периода детренирования. После курса тренировок коэффициент $R_{50/100}$

(1.33 (1.17, 1.4) и 1.14 (1.04, 1.48)) биоэлектрического импеданса легкого у крыс двух групп значимо не различались. После отдыха отношение сопротивлений биоэлектрического импеданса легкого $R_{50/100}$ (1.35 (1.26, 1.52) и 1.19 (1.13, 1.27), $U = 18$, $Z = -2.4$, $p = 0.019$) стало значимо выше у животных опытной группы в сравнении с контрольными. При этом медиана сопротивления биоэлектрического импеданса легкого у крыс опытной группы после отдыха была незначимо ниже при всех частотах в сравнении с контрольными животными, при низкой частоте тока различие было меньше между двумя группами.

Установлена значимая корреляционная связь между размерами левого желудочка сердца крыс и отношением сопротивлений $R_{50/100}$ (с LVIDs: $r_s = 0.6$, $p = 0.006$; с LVIDd: $r_s = 0.5$, $p = 0.016$) биоэлектрического импеданса легкого после отдыха.

Биоимпедансное исследование миокарда

Значимых различий биоэлектрического импеданса миокарда у крыс двух групп после восьми недель физических нагрузок не было выявлено.

После отдыха у крыс-пловцов в сравнении с контрольными животными обнаружено значимо меньшее сопротивление R биоэлектрического импеданса миокарда (рис. 2b) при 70 кГц (365.7 (340.6, 383.6) Ом и 659.1 (452.3, 939.7) Ом, $U = 2$, $Z = 3$, $p = 0.003$) электрического тока, внутриклеточное сопротивление (101.6 (14.7, 452.4) Ом и 385.7 (307.7, 574.5) Ом, $U = 11$, $Z = 2.1$, $p = 0.034$), оценка ВКЖ/КЖ (0.15 (0.02, 0.29) и 0.42 (0.31, 0.45), $U = 12$, $Z = 2$, $p = 0.044$). Внеклеточное сопротивление было незначимо ниже у тренированных животных по сравнению со значением у контрольных крыс.

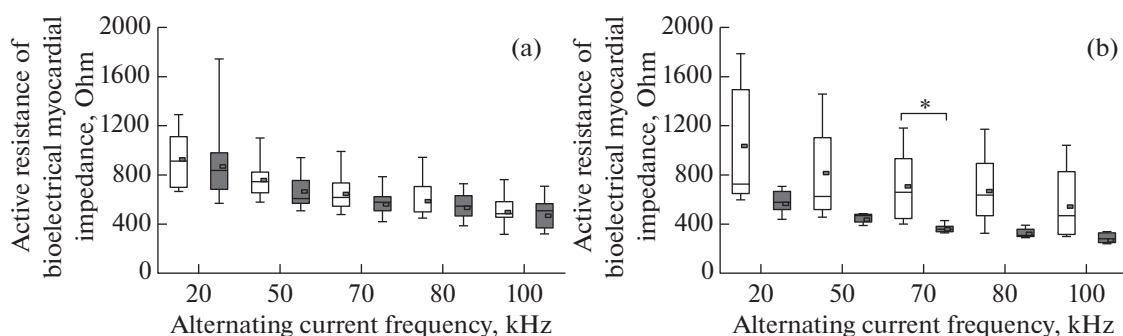


Рис. 2. Сопротивление миокарда у крыс опытной (темные столбики) и контрольной (белые столбики) групп после курса физических нагрузок (а) и после периода отсутствия тренировок (б). * – $p_{70} = 0.003$. На графике отображены распределение данных от первого до третьего квартиля, медиана и среднее значение.

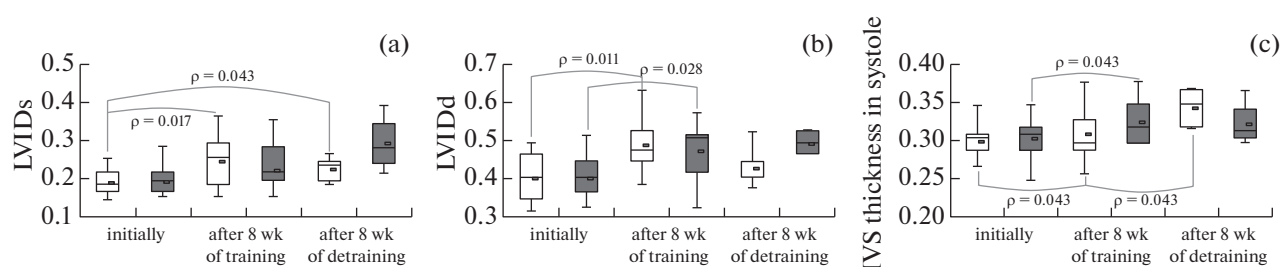


Рис. 3. Изменение конечного систолического размера левого желудочка сердца (а), конечного диастолического размера левого желудочка сердца (б) и толщины межжелудочковой перегородки (IVS) в систолу (с) у крыс опытной (темные столбики) и контрольной (белые столбики) групп. На графике отображены распределение данных от первого до третьего квартиля, медиана и среднее значение.

Установлена значимая отрицательная корреляционная связь между конечно диастолическим ($r_s = -0.51$, $p = 0.037$) и конечно систолическим ($r_s = -0.49$, $p = 0.045$) размерами левого желудочка сердца крыс и активным сопротивлением биоэлектрического импеданса миокардиальной ткани левого желудочка сердца при частоте электрического тока 70 кГц после отдыха.

ЭХО-КГ показатели левого желудочка сердца

Не выявлено значимых различий в изменении фракции выброса, массы левого желудочка сердца крыс после курса плавания и периода детренинга.

Отмечены значимые изменения конечного систолического размера левого желудочка сердца у контрольных животных (LVIDs: $Fr = 7.6$, $ss = 2$, $p < 0.022$) и конечного диастолического размера левого желудочка сердца двух групп крыс (LVIDd; $Fr = 6.5$, $ss = 2$, $p < 0.039$ у крыс-пловцов и $Fr = 6.4$, $ss = 2$, $p < 0.041$ у контрольных животных) в период эксперимента. При парном сравнении значений LVIDs и LVIDd в разные моменты времени с учетом поправки Бонферрони значимых различий не выявлено (рис. 3). В период физических нагрузок у контрольных и тренированных животных увеличиваются конечно-диастолический и конечно-систо-

лический размеры левого желудочка сердца (табл. 1). В период отдыха LVIDd уменьшился у контрольных животных (на 15 (9, 28)%) относительно значений после курса плавания. Конечно-систолический размер левого желудочка сердца при детренинге уменьшился у крыс контрольной группы (на 25 (–4, 29)%), а у крыс опытной группы продолжил увеличиваться (на 11 (2, 21)%) относительно значений после прекращения плавания, и в конце эксперимента отмечен существенный прирост относительно исходного значения (табл. 1).

Обнаружена значимая связь изменения LVIDs с приростом массы тела и биоимпедансной оценки суммарного объема жидкости тела крыс в периоды физических нагрузок ($r_s = 0.5$, $p = 0.015$ и $r_s = 0.7$, $p = 0.002$ соответственно) и отдыха ($r_s = 0.8$, $p = 0.016$ и $r_s = 0.8$, $p = 0.021$ соответственно).

По критерию Фридмана выявлены значимые различия в трех измерениях в период эксперимента толщины межжелудочковой перегородки у крыс контрольной группы ($Fr = 9.3$, $ss = 2$, $p < 0.009$) в систолу, у крыс опытной группы ($Fr = 6$, $ss = 2$, $p < 0.05$) в диастолу. При парном сравнении с учетом поправки Бонферрони значимых различий значений толщин межжелудочковой перегородки в разные моменты эксперимента не выявлено (рис. 3).

Таблица 1. Изменение ЭХО-КГ размеров левого желудочка сердца после физических нагрузок и в конце эксперимента относительно исходных значений

Наименование показателя	Группа	Изменение показателя после курса плавания	Изменение показателя в конце эксперимента
LVIDs	Опытная	15 (0, 61)%	59 (30, 75)%
	Контрольная	24 (0, 61)%	27 (26, 29)%
LVIDd	Опытная	17 (0, 38)%	22 (15, 34)%
	Контрольная	18 (0, 37)%	21 (10, 28)%

После курса тренировок у животных опытной группы увеличилась толщина межжелудочковой перегородки в конце диастолы на 14 (0, 21)% относительно исходного уровня (до 0.23 (0.19, 0.24) см), у крыс контрольной группы за этот же период времени толщина межжелудочковой перегородки заметно не изменилась (–4 (–14, 6)%, 0.2 (0.19, 0.22) см). Наблюдали значимое межгрупповое различие ($U = 27.5$, $Z = -2.1$, $p = 0.033$) в изменении толщины межжелудочковой перегородки (в конце диастолы) в период физических нагрузок.

Выявлена значимая отрицательная корреляционная связь между изменениями в период физических нагрузок биоимпедансной оценки суммарного объема жидкости тела и толщины межжелудочковой перегородки сердца крыс в систолу ($r_s = -0.5$, $p = 0.024$) и диастолу ($r_s = -0.6$, $p = 0.018$).

Через 8 нед отдыха толщина межжелудочковой перегородки в систолу у контрольных животных увеличилась на 23 (7, 28)% по сравнению с состоянием после адаптивных погружений в воду в течение 8 нед. У крыс опытной группы толщина межжелудочковой перегородки в систолу уменьшилась на 7 (0, 15)% по сравнению с состоянием после тренировок. Выявлено значимое межгрупповое различие ($U = 0$, $Z = -2.3$, $p = 0.02$) в изменении толщины межжелудочковой перегородки (в конце систолы) в период отдыха после прекращения курса плавания.

Соотношение толщины межжелудочковой перегородки сердца к ОВ в период эксперимента значимо изменилось только у крыс контрольной группы ($Fg = 8.4$, $ss = 2$, $p < 0.015$), но значимых межгрупповых различий мы не выявили.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Восьминедельный курс плавания привел к значимым различиям в массе тела крыс двух групп, но не отмечены существенные межгрупповые различия в относительной массе сердца. После отдыха масса тела тренированных и нетренированных крыс не отличалась.

Значимо меньший прирост массы тела тренированных крыс после курса плавания в сравнении с

крысами, ведущими малоподвижный образ жизни, предполагает повышенную скорость метаболизма и расход энергии у тренированных животных. Эти изменения согласуются с ранее опубликованными данными и отражают физиологическую адаптацию организма к регулярным физическим упражнениям [29].

Соотношение объемов внеклеточной и внутриклеточной жидкости, изменяющееся при стрессе, определяемое по биоэлектрическому импедансу тела, значимо не различалось у крыс двух групп в период эксперимента.

Длительные физические нагрузки связаны с характерными морфологическими и функциональными адаптациями миокарда. При восьминедельном протоколе плавания у тренированных крыс в сравнении с контрольными животными отмечена значимо большая относительная масса сердца [30, 12]. Есть работы, указывающие на отсутствие различий в массе сердца у крыс, подверженных умеренным тренировкам плаванию, в сравнении с контрольными животными [31].

После восьминедельного курса плавания ранее была выявлена значимо более высокая фракция выброса у тренированных крыс в сравнении с контрольными животными [30]. Отмечено значимое увеличение толщин передней и задней стенки левого желудочка сердца и конечно-систолического размера левого желудочка сердца, тенденция к увеличению толщины межжелудочковой перегородки у крыс при 12-недельном периоде плавания. Показана обратимость вызванных тренировками функциональных изменений сердца крыс, выявленных по эхокардиографическим параметрам, после восьминедельного периода отсутствия тренировок [32].

В нашем исследовании не удалось выявить значимых межгрупповых различий фракции выброса левого желудочка сердца крыс. Отмечена взаимосвязь изменений конечного систолического размера левого желудочка сердца и массы тела крыс. В согласии с работой [32], нами выявлено увеличение толщины межжелудочковой перегородки у тренированных крыс после физических нагрузок, отсутствие значимых межгрупповых различий в конце эксперимента.

Влияние физических тренировок на ремоделирование миокарда сердца человека оценивают совместно с изменениями состава (безжировой массы) тела [33]. Индексация эхокардиографической характеристики гипертрофии миокарда к безжировой массе тела помогает различать физиологическую адаптацию сердца от изменений при ожирении или гипертензии [34].

Нами обнаружено значимое различие в адаптационных изменениях толщины межжелудочковой перегородки сердца тренированных крыс в сравнении с контрольными животными, но не выявлено межгрупповых различий в соотношении толщины межжелудочковой перегородки сердца к показателю общей воды или безжировой массы тела.

При биоимпедансном исследовании легкого нами отмечены значимые различия отношений фазового угла (после курса плавания) и сопротивления (после отдыха) при двух частотах электрического тока между плавающими и контрольными животными.

Отношение сопротивлений торакального биоэлектрического импеданса человека растет при увеличении объема воды в легких [35]. Снижение амплитуды и сдвиг (увеличение) частотного спектра биоимпеданса наблюдали при обнаружении узлов в легочной ткани с опухолью [36]. При интерстициальной пневмонии, характеризующейся утолщением альвеолярной стенки и уменьшением содержания воздуха в легочной ткани, и при отеке растет электрическая проводимость легочной ткани [37].

У крыс (НИСАГ) со стресс-чувствительной формой артериальной гипертензии отмечены значимое снижение сопротивления легкого и тенденции к снижению отношения сопротивлений при двух частотах [38].

У крыс, подвергнутых плаванию, отмечали эмфизему и воспаление легких [39]. Ранее нами было отмечено значимое увеличение сопротивления легочной ткани у крыс с монокроталиновой моделью легочной гипертензии в сравнении с контрольными животными, связанное при низких частотах тока с эмфизематозными изменениями, а при более высоких частотах — с воспалительным процессом и сужением просвета кровеносных сосудов в легких [40].

При плавании задержки дыхания на длительное время приводят к прерывистой гипоксии, которая вызывает альвеолярную гиперплазию; пловцы имеют больший объем легких, чем другие спортсмены. Плавание на выносливость способствует ремоделированию легочной сосудистой сети с увеличением размера легочной артерии [1].

После длительной физической нагрузки обнаруженное нами значимое межгрупповое различие соотношения фазового угла биоэлектрического импеданса при двух частотах может быть связано

со структурно-функциональными перестройками в легочной ткани тренированных крыс. Тенденция к более высокому абсолютному значению фазового угла легочной ткани у тренированных крыс может указывать на относительно большее количество клеточных мембран в сравнении контрольными животными.

Меньшие значения сопротивления легочной ткани и значимо большие отношения сопротивлений биоэлектрического импеданса легкого при двух частотах тока у крыс пловцов в сравнении с контрольными животными после периода отдыха можно объяснить большим объемом крови или избыточным количеством жидкости в легком. После курса плавания отношение сопротивлений биоэлектрического импеданса легкого при двух частотах тока у тренированных крыс было также выше, но не значимо, в сравнении с контрольными животными.

При биоимпедансном исследовании миокарда нами отмечены значимые межгрупповые различия только после периода отсутствия тренировок: меньшие значения активного сопротивления у тренированных крыс в сравнении с контрольными животными.

У животных при длительных тренировках плаванием вызванный физическими упражнениями капиллярный ангиогенез соизмерим с увеличением массы левого желудочка, у молодых крыс наблюдали увеличение относительной плотности капилляров (больше ангиогенез, чем гипертрофия) [41]. Физиологический рост сердца (гипертрофия и пролиферация кардиомиоцитов), индуцированный плаванием, сопровождается значимое увеличение плотности лимфатических сосудов [42].

Отмечено снижение вызванного тренировками ремоделирования, усиления сократимости сердца в период отдыха [43]; частичное сохранение индуцированного физической нагрузкой ангиогенеза миокарда после четырехнедельного detraining у крыс [44].

Отмечена зависимость биоимпеданса миокарда, измеряемого с эпикарда левого желудочка сердца, от толщины стенки [45]. Уменьшение биоэлектрического импеданса миокарда при низких частотах может указывать на снижение количества кардиомиоцитов в ткани [46]. Уменьшение внутриклеточного и внеклеточного сопротивления ткани может быть вызвано увеличением объема крови (соответственно в относительно малых и больших сосудах) [47]. Увеличение межтканевой жидкости снижает импеданс ткани, большая плотность клеточных элементов соответствует более высоким значениям импеданса [48].

Возрастные изменения мышечной ткани отражаются в значимом увеличении внутриклеточного сопротивления, не выявлено отклонения внеклеточного сопротивления [49]. Меньшее зна-

чение R_i мышечной ткани может указывать на более низкую анаболическую активность [50].

Отмечено, что детренинг способствует большему увеличению индекса окислительного стресса легочной и сердечной ткани тренированных WKY крыс в сравнении с возрастными изменениями показателя у нетренированных животных [51]. Окислительный стресс ведет к ухудшению емкостных свойств мембраны, к уменьшению ее сопротивления [52].

Нами не выявлено значимых различий реактивного сопротивления биоимпеданса легкого и миокарда у крыс двух групп ни после периода физических нагрузок, ни после восьми недель отдыха.

Таким образом, значимые межгрупповые различия у крыс после курса физических нагрузок нами были отмечены в отношении фазовых углов биоэлектрического импеданса легочной ткани при двух частотах электрического тока, которые можно объяснить структурно-функциональными перестройками в легочной ткани в ответ на плавательные тренировки (альвеолярной гиперплазией, remodelированием легочной сосудистой сети). После отдыха у крыс двух групп были выявлены значимые межгрупповые различия в активном сопротивлении биоэлектрического импеданса миокардиальной ткани, которые могут суммарно свидетельствовать о наличии отека, сохранении индуцированного физической нагрузкой ангиогенеза миокарда, снижении количества кардиомиоцитов у ранее тренированных крыс. Значимо большие отношения сопротивлений биоэлектрического импеданса легочной ткани при двух частотах тока у детренированных грызунов в сравнении с контрольными можно объяснить большим объемом крови или жидкости в легком. Отмеченные нами значимые межгрупповые различия в изменении толщины межжелудочковой перегородки сердца наряду с отсутствием существенных отклонений в биоимпедансных показателях тела (в период эксперимента) и миокарда (после курса физических нагрузок) могут характеризовать скорее физиологическую адаптацию сердца тренированных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленное нами значимое уменьшение отношения фазовых углов биоэлектрического импеданса легочной ткани при двух частотах электрического тока у крыс после длительных физических нагрузок плаванием может быть связано со структурно-функциональными изменениями легочной ткани.

Отмеченные нами значимые различия в активном сопротивлении биоэлектрического импеданса миокардиальной ткани, отношении сопротивлений биоэлектрического импеданса легочной ткани

при двух частотах электрического тока после отдыха у крыс двух групп могут свидетельствовать о локальном отеке в сердце и легком у ранее тренированных крыс в сравнении с контрольными животными.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по плану НИР № ГР 122040600069-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Отдела сравнительной кардиологии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” (протокол № 1, от 06.04.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование исследований (А.Г.И., Н.Л.К.), проведение экспериментов (А.Г.И., Е.А.П., Н.Л.К.), получение экспериментальных данных (Е.А.П. — эхокардиография; Н.Л.К. — многочастотный биоимпедансный анализ), статистическая обработка и написание статьи (Н.Л.К.), редактирование статьи (И.М.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martínez V, Sanz-de la Garza M, Domenech-Ximenes B, Fernández C, García-Alvarez A, Prat-González S, Yanguas C, Sitges M* (2021) Cardiac and Pulmonary Vascular Remodeling in Endurance Open Water Swimmers Assessed by Cardiac Magnetic Resonance: Impact of Sex and Sport Discipline. *Front Cardiovascul Med* 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.719113>
2. *Armour J, Donnelly PM, Bye PT* (1993) The large lungs of elite swimmers: an increased alveolar number? *Eur Respir J* 6 (2): 237–247.
3. *Walther G, Nottin S, Karpoff L, Pérez-Martin A, Dauzat M, Obert P* (2008) Flow-mediated dilation and exercise-induced hyperaemia in highly trained athletes: comparison of the upper and lower limb vasculature. *Acta Physiol (Oxf)* 193 (2): 139–150. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01834.x>
4. *Mujika I, Padilla S* (2000) Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. *Sports Med* 30 (2): 79–87. <https://doi.org/10.2165/00007256-200030020-00002>

5. Lukaski H, Raymond-Pope CJ (2021) New Frontiers of Body Composition in Sport. *Int J Sports Med* 42 (7): 588–601.
<https://doi.org/10.1055/a-1373-5881>
6. Francisco R, Matias CN, Santos DA, Campa F, Minderico CS, Rocha P, Heymsfield SB, Lukaski H, Sardinha LB, Silva AM. (2020) The Predictive Role of Raw Bioelectrical Impedance Parameters in Water Compartments and Fluid Distribution Assessed by Dilution Techniques in Athletes. *Int J Environ Res Public Health* 17 (3): 759.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17030759>
7. Campa F, Bongiovanni T, Trecroci A, Rossi A, Greco G, Pasta G, Coratella G (2021) Effects of the COVID-19 Lockdown on Body Composition and Bioelectrical Phase Angle in Serie A Soccer Players: A Comparison of Two Consecutive Seasons. *Biology (Basel)* 10 (11): 1175.
<https://doi.org/10.3390/biology10111175>
8. Sel K, Osman D, Jafari R (2021) Non-Invasive Cardiac and Respiratory Activity Assessment From Various Human Body Locations Using Bioimpedance. *IEEE Open J Eng Med Biol* 2: 210–217.
<https://doi.org/10.1109/ojemb.2021.3085482>
9. Bei Y, Wang L, Ding R, Che L, Fan Z, Gao W, Liang Q, Lin S, Liu S, Lu X, Shen Y, Wu G, Yang J, Zhang G, Zhao W, Guo L, Xiao J (2021) Animal exercise studies in cardiovascular research: Current knowledge and optimal design – A position paper of the Committee on Cardiac Rehabilitation, Chinese Medical Doctors' Association. *J Sport Health Sci* 10 (6): 660–674.
<https://doi.org/10.1016/j.jshs.2021.08.002>
10. Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ (2010) Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Res* 59 (5): 633–644.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.931928>
11. Oláh A, Kellermayer D, Mátyás C, Németh BT, Lux Á, Szabó L, Török M, Ruppert M, Meltzer A, Sayour AA, Benke K, Hartyánszky I, Merkely B, Radovits T (2017) Complete Reversion of Cardiac Functional Adaptation Induced by Exercise Training. *Med Sci Sports Exerc* 49 (3): 420–429.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001127>
12. Ramasamy S, Velmurugan G, Shanmugha Rajan K, Ramprasath T, Kalpana K (2015) MiRNAs with apoptosis regulating potential are differentially expressed in chronic exercise-induced physiologically hypertrophied hearts. *PLoS One* 10 (3): e0121401.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121401>
13. Balakumar P, Singh M (2006) The possible role of caspase-3 in pathological and physiological cardiac hypertrophy in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99: 418–424.
https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_569.x
14. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R (1976) Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol* 37 (1): 7–11.
[https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90491-4)
15. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. (2004) Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr* 17 (2): 161–167.
<https://doi.org/10.1016/j.echo.2003.10.010>
16. Hu L, Maslanik T, Zerebeckyj M, Plato CF (2012) Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *J Pharmacol Toxicol Meth* 65: 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.02.001>
17. Raghavan K, Porterfield JE, Kottam ATG, Feldman MD, Escobedo D, Valvano JW, Pearce JA (2009) Electrical conductivity and permittivity of murine myocardium. *IEEE Transaction Biomed Eng* 56 (8): 2044–2052.
<https://doi.org/10.1109/TBME.2009.2012401>
18. Cebrián-Ponce Á, Irurtia A, Carrasco-Marginet M, Saco-Ledo G, Girabent-Farrés M, Castizo-Olier J (2021) Electrical Impedance Myography in Health and Physical Exercise: A Systematic Review and Future Perspectives. *Front Physiol* 12: 740877.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.740877>
19. Торнуев ЮВ, Непомнящих ДЛ, Никитюк ДБ, Лапий ГА, Молодых ОП, Непомнящих РД, Колдышева ЕВ, Криницына ЮМ, Балахнин СМ, Манвелидзе РА, Семенов ДЕ, Чурин БВ (2014) Диагностические возможности неинвазивной биоимпедансометрии. *Фунд исслед* (10-4): 782–788. [Tornuev YuV, Nepomnyashchikh DL, Nikityuk DB, Lapii GA, Molodykh OP, Nepomnyashchikh RD, Koldysheva EV, Krinitsyna YuM, Balakhnin SM, Manvelidze RA, Semenov DE, Churin BV (2014) Diagnostic capability of noninvasive bioimpedance. *Fundamental Res* (10): 782–788. (In Russ)].
20. Торнуев ЮВ, Балахнин СМ, Преображенская ВК, Манвелидзе РА, Ивлева ЕК (2016) Биоимпедансометрия миокарда при очаговых и диффузных повреждениях различного генеза. *Совр пробл науки образ* 4. [Tornuev YuV, Balakhnin SM, Preobrazhenskaya VK, Manvelidze RA, Ivleva EK Bioimpedance measuring myocardium in focal and diffuse injuries of various genesis. *Modern Probl Sci Ed* 4. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17513/spno.25001>
21. Dittmar M (2003) Reliability and variability of bioimpedance measures in normal adults: effects of age, gender, and body mass. *Am J Phys Anthropol* 122 (4): 361–370.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.10301>
22. Николаев ДВ, Смирнов АВ, Бобринская ИГ, Руднев СИ (2009) Биоимпедансный анализ состава человека. М. Наука [Nikolaev DV, Smirnov AV, Bobrinskaya IG, Rudnev SG (2009) Bioelectric impedance analysis of human body composition. М. Nauka (In Russ)].
23. Rutkove SB, Shefner JM, Gregas M, Butler H, Caracciolo J, Lin C, Fogerson PM, Mongiovi P, Darras BT. (2010) Characterizing spinal muscular atrophy with electrical impedance myography. *Muscle Nerve* 42 (6): 915–921.
<https://doi.org/10.1002/mus.21784>
24. Kun S, Ristic B, Peura RA, Dunn RM (1999) Real-time extraction of tissue impedance model parameters for electrical impedance spectrometer. *Med Biol Eng Comput* 37 (4): 428–432.
<https://doi.org/10.1007/BF02513325>
25. Cornish BH, Thomas BJ, Ward LC (1993) Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis. *Phys Med Biol* 38 (3): 337–346.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/38/3/001>
26. Rutter K, Hennoste L, Ward LC, Cornish BH, Thomas BJ (1998) Bioelectrical impedance analysis for the estima-

- tion of body composition in rats. *Lab Anim* 32 (1):65–71. <https://doi.org/10.1258/002367798780559356>
27. Tsigos C, Stefanaki C, Lambrou GI, Boschiero D, Chrousos GP (2015) Stress and inflammatory biomarkers and symptoms are associated with bioimpedance measures. *Eur J Clin Invest* 45 (2): 126–134. <https://doi.org/10.1111/eci.12388>
 28. Campa F, Thomas DM, Watts K, Clark N, Baller D, Morin T, Toselli S, Koury JC, Melchiorri G, Andreoli A, Mascherini G, Petri C, Sardinha LB, Silva AM (2022) Reference Percentiles for Bioelectrical Phase Angle in Athletes. *Biology (Basel)* 11 (2): 264. <https://doi.org/10.3390/biology11020264>
 29. Tatchum-Talom R, Schulz R, McNeill JR, Khadour FH (2000) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (4): H1757–1766. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000>
 30. Schaible TF, Scheuer J (1981) Cardiac function in hypertrophied hearts from chronically exercised female rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50 (6): 1140–1145. <https://doi.org/10.1152/jappl.1981.50.6.1140>
 31. Penpargkul S, Scheuer J (1970) The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J Clin Invest* 49 (10): 1859–1868. <https://doi.org/10.1172/JCI106404>
 32. Radovits T, Oláh A, Lux Á, Németh BT, Hidi L, Birtalan E, Kellermayer D, Mátyás C, Szabó G, Merkely B (2013) Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305 (1): H124–134. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00108.2013>
 33. D'Ascenzi F, Pelliccia A, Cameli M, Lisi M, Natali BM, Focardi M, Giorgi A, D'Urbano G, Causarano A, Bonifazi M, Mondillo S. (2015) Dynamic changes in left ventricular mass and in fat-free mass in top-level athletes during the competitive season. *Eur J Prev Cardiol* 22 (1): 127–134. <https://doi.org/10.1177/2047487313505820>
 34. Hense HW, Gneiting B, Muscholl M, Broeckel U, Kuch B, Doering A, Riegger GA, Schunkert H. (1998) The associations of body size and body composition with left ventricular mass: impacts for indexation in adults. *J Am Coll Cardiol* 32 (2): 451–457. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(98\)00240-x](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(98)00240-x)
 35. Raaijmakers E, Faes TJ, Kunst PW, Bakker J, Rommes JH, Goovaerts HG, Heethaar RM (1998) The influence of extravascular lung water on cardiac output measurements using thoracic impedance cardiography. *Physiol Meas* 19 (4): 491–499. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/19/4/004>
 36. Baghbani R, Moradi MH, Shadmehr MB (2019) Identification of Pulmonary Nodules by Sweeping the Surface of the Lung with an Electrical Bioimpedance Probe: A Feasibility Study. *J Invest Surg* 32 (7): 614–623. <https://doi.org/10.1080/08941939.2018.1446106>
 37. Nopp P, Rapp E, Pfutzner H, Nakesch H, Ruhsam C (1993) Dielectric properties of lung tissue as a function of air content. *Phys Med Biol* 38: 699–716. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/38/6/005>
 38. Kolomeets NL, Smirnova SL, Roshchevskaya IM (2016) The electrical resistance of the lungs, intercostal muscles, and kidneys in hypertensive ISIAH rats. *Biophysics* 61 (3): 498–504. <https://doi.org/10.1134/S0006350916030076>
 39. Зайцева МС, Иванов ДГ, Александровская НВ (2015) Работоспособность крыс в тесте “Вынужденное плавание с грузом” и причины ее вариабельности. *Биомедицина* (4): 30–42. [Zaytseva MS, Ivanov DG, Alexandrovskaya NV (2015) The rat work capacity in forced swimming test with load and causes it variability. *Biomedicine* (4): 30–42. (In Russ)].
 40. Коломеец НЛ, Суслонова ОВ, Смирнова СЛ, Рощевская ИМ (2019) Биоэлектрический импеданс тела крыс при монокроталиновой модели легочной гипертензии. *Биомедицина* 15 (1): 95–101. [Kolomeyets NL, Suslonova OV, Smirnova SL, Roshchevskaya IM (2019) Bioelectrical impedance of the body in rats with monokrotaline-induced pulmonary hypertension. *Biomedicine* 15 (1): 95–101. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-95-101>
 41. Duncker DJ, Bache RJ (2008) Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 88 (3): 1009–1086. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2006>
 42. Bei Y, Huang Z, Feng X, Li L, Wei M, Zhu Y, Liu S, Chen C, Yin M, Jiang H, Xiao J (2022) Lymphangiogenesis contributes to exercise-induced physiological cardiac growth. *J Sport Health Sci* 11 (4): 466–478. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2022.02.005>
 43. Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ (2010) Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol* 109 (5): 909–914. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1406-x>
 44. Marini M, Falcieri E, Margonato V, Treré D, Lapalombella R, di Tullio S, Marchionni C, Burattini S, Samaja M, Esposito F, Veicsteinas A (2008) Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. *Histochem Cell Biol* 129: 479–487. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0373-8>
 45. Tsai J-Z, Cao H, Tungjitkusolmun S, Woo EJ, Vorperian VR, Webster JG (2000) Dependence of apparent resistance of four-electrode probes on insertion depth. *IEEE Transact Biomed Engineer* 47 (1): 41–48. <https://doi.org/10.1109/10.817618>
 46. Schwartzman D, Chang I, Michele JJ, Mirotznik MS, Foster KR (1999) Electrical Impedance Properties of Normal and Chronically Infarcted Left Ventricular Myocardium. *J Intervent Cardiac Electrophysiol* 3: 213–224. <https://doi.org/10.1023/a:1009887306055>
 47. Zhao TX, Brown BH, Nopp P, Wang W, Leathard AD, Lu LQ (1996) Modelling of cardiac-related changes in lung resistivity measured with EITS. *Physiol Meas* 17 (Suppl 4A): 227–234. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/17/4a/027>
 48. Белик ДВ (2000) Импедансная электрохирургия. Новосибирск: Наука. 237 с. [Belik DV (2000) Impedance electrosurgery. Novosibirsk. Nauka (In Russ)].
 49. Yamada Y (2018) Muscle Mass, Quality, and Composition Changes During Atrophy and Sarcopenia. In: Xiao J (ed) *Muscle Atrophy. Advances in Experimental Medi-*

- cine and Biology. 1088. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_3
50. Bartels EM, Sørensen ER, Harrison AP (2015) Multi-frequency bioimpedance in human muscle assessment. *Physiol Rep* 3 (4): e12354.
<https://doi.org/10.14814/phy2.12354>
 51. Kilic-Erkek O, Kilic-Toprak E, Caliskan S, Ekbic Y, Akbudak IH, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M (2016) Detraining reverses exercise-induced improvement in blood pressure associated with decrements of oxidative stress in various tissues in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 412 (1–2): 209–219.
<https://doi.org/10.1007/s11010-015-2627-4>
 52. Торнүев ЮВ, Хачатрян РГ, Хачатрян АП, Махнев ВП, Осенний АС (1990) Электрический импеданс биологических тканей. М.: Изд-во ВЗПИ. 155с. [Tornuev YuV, Hachatryan RG, Hachatryan AP, Mahnev VP, Osenniy AS (1990) Electrical impedance of biological tissues. Izdvo VZPI, Moscow. 155 p. (In Russ)].

BIOELECTRICAL IMPEDANCE OF THE LEFT VENTRICULAR MYOCARDIUM, LUNG IN RATS AFTER FORCED SWIMMING TRAINING AND SUBSEQUENT DETRAINING

N. L. Kolomeyets^{a, #}, A. G. Ivonin^a, E. A. Peshkin^a, and I. M. Roshchevskaya^a

^a Department of Comparative Cardiology, Federal Research Centre “Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences”, Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation

[#]e-mail: kolomeec@frc.komisc.ru

Multifrequency bioimpedance studies were performed in rats subjected to an eight-week swimming course followed by an eight-week no-exercise period and control animals. A significantly lower ratio of the phase angles of the bioelectrical impedance of the lung tissue at two frequencies of electric current in rats after prolonged physical activity in comparison with control animals was revealed, which may indicate structural and functional changes in the lung tissue. No significant differences were found in the bioimpedance of the myocardium of the left ventricle of the heart in rats of the two groups after eight weeks of swimming. A significantly lower active resistance of the bioelectrical impedance of the myocardial tissue and a significantly higher ratio of the bioelectrical impedance resistance of the lung tissue at two frequencies of electric current in detrained rodents were observed in comparison with the control, which may indicate an excess of intercellular fluid, partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis after an eight-week of detraining.

Key words: swimming, forced training, detraining, bioimpedance of lung and myocardial tissue

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0044452923010072, EDN: GXROWQ

К статье *А.Ю. Ротов, М.Л. Фирсов* “Оптопротезирование биполярных клеток сетчатки”, опубликованной в № 6 2022 г. Т. 58, С. 457–467. DOI: 10.31857/S0044452922060092

На стр. 463 в ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ вместо “Грант в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ Павловский центр “Интегративная физиология —

персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”” должно быть “Грант в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития НЦМУ Павловский центр “Интегративная физиология — персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости” (075-15-2022-296)”.