

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

---

# РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 9  
сентябрь  
2023



## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзорные и проблемные статьи

Методы адаптивной нейростимуляции с обратной связью: особенности, достижения и перспективы развития <i>А. И. Федотчев</i>	1151
Маркеры нейроонтогенеза в гипочувствительный к стрессу период: сравнение у лабораторных грызунов и человека <i>А. О. Манолова, Н. В. Гуляева</i>	1167

### Экспериментальные статьи

Механизмы антипролиферативного действия стрептококковой аргининдеиминазы в отношении клеток лимфобластной лейкемии линии Jurkat <i>Э. А. Старикова, Дж. Т. Маммедова, А. Ожиганова, Л. А. Бурова, И. В. Кудрявцев</i>	1185
Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Pnnp-SNCA* <sup>A53T</sup> )23Mkle/J-модели болезни Паркинсона <i>И. Н. Рожкова, С. В. Окотруб, Е. Ю. Брусенцев, Т. А. Рахманова, Д. А. Лебедева, В. С. Козенева, Н. В. Хоцкин, С. Я. Амстиславский</i>	1199
Функциональное состояние брыжеечных артерий и сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс с экспериментальной дисфункцией почек <i>Г. Т. Иванова, О. Н. Береснева</i>	1217
Электрическое поле сердца на поверхности грудной клетки высококвалифицированных спортсменов в период начальной желудочковой активности <i>Н. И. Ивонина, И. М. Рощевская</i>	1233
Ингибитор $Na^+/K^+$ -АТФазы убаин по-разному влияет на электрофизиологические характеристики возбуждающих и тормозных нейронов энторинальной коры <i>Е. Ю. Проскураина, Д. С. Синяк, А. В. Зайцев</i>	1247
Влияние гормонов нейрогипофиза на экскрецию белков почками <i>Т. А. Каравашкина, Е. В. Балботкина, Т. В. Ковалева, А. В. Кутина</i>	1261
Оценка зависимости "доза-ответ" при генотоксическом воздействии митомицина С на примере AroE-нокаутных мышей <i>М. А. Асанов, Д. К. Шишкова, А. О. Поддубняк, М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, М. В. Хуторная, А. В. Понасенко</i>	1273
Влияние ингибиторов синтазы NO на выброс серотонина в медиальной префронтальной коре в ходе формирования и генерализации условной реакции страха у крыс <i>Н. Б. Саульская, М. А. Сусорова, Н. А. Трофимова</i>	1282

# CONTENTS

---

## Reviews

- Methods of Closed-Loop Adaptive Neurostimulation: Features, Achievements and Prospects for Development  
*A. I. Fedotchev* 1151
- Markers of Neuroontogenesis in the Stress-Hyporesponsive Period: Comparison of Laboratory Rodents and Humans  
*A. O. Manolova and N. V. Gulyaeva* 1167
- 

## Experimental Articles

- Mechanisms of Antiproliferative Action of Streptococcal Arginine Deiminase Against Jurkat Lymphoblastic Leukemia Cells  
*E. A. Starikova, J. T. Mammedova, A. Ozhiganova, L. A. Burova, and I. V. Kudryavtsev* 1185
- Analysis of Behavior and Brain Neuronal Density in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCAA53T)23Mkle/J Mice Modeling Parkinson's Disease  
*I. N. Rozhkova, S. V. Okotrub, E. Yu. Brusentsev, T. A. Rakhmanova, D. A. Lebedeva, V. S. Kozeneva, N. V. Khotskin, and S. Ya. Amstislavsky* 1199
- Functional State of the Mesenteric Arteries and Vessels of the Skin Microcirculation Bed in Rats with Experimental Kidney Dysfunction  
*G. T. Ivanova and O. N. Beresneva* 1217
- Electric Field of the Heart on the Thorax Surface in Highly Trained Athletes during Initial Ventricular Activity  
*N. I. Ivonina and I. M. Roshchevskaya* 1233
- The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Inhibitor Ouabain Has Different Effects on the Electrophysiological Properties of Excitatory and Inhibitory Neurons in the Entorhinal Cortex E  
*E. Yu. Proskurina, D. S. Sinyak, and A. V. Zaitsev* 1247
- Effect of Neurohypophyseal Hormones on Excretion of Proteins by the Kidneys  
*T. A. Karavashkina, E. V. Balbotkina, T. V. Kovaleva, and A. V. Kutina* 1261
- Dose-Response of the Mitomycin C Genotoxic Effect on the ApoE Knockout Mice  
*M. A. Asanov, D. K. Shishkova, A. O. Poddubnyak, M. Y. Sinitsky, A. V. Sinitskaya, M. V. Khutornaya, and A. V. Ponasenko* 1273
- Influence of NO Synthase Inhibitors on Serotonin Release in the Medial Prefrontal Cortex during the Formation and Generalization of the Conditioned Fear Response in Rats  
*N. B. Saulskaya, M. A. Susorova, and N. A. Trofimova* 1282
- 
-

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

МЕТОДЫ АДАПТИВНОЙ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ С ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ:  
ОСОБЕННОСТИ, ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

© 2023 г. А. И. Федотчев\*

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область, Россия*

*\*E-mail: fedotchev@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Анализируется интенсивно развивающийся в последние годы инновационный подход к организации стимуляционных процедур – адаптивная нейростимуляция, при которой параметры сенсорной стимуляции автоматически управляются сигналами обратной связи от собственных физиологических характеристик человека. Рассмотрены эффекты применения инвазивных и неинвазивных магнитных и электрических воздействий, а также акустической и аудиовизуальной стимуляции с обратной связью от ритмических процессов человека. На многочисленных примерах продемонстрированы особенности и достижения нового подхода при лечении различных психосоматических расстройств и когнитивной реабилитации человека, намечены перспективы развития данных технологий. Представлены результаты собственных исследований автора в этом направлении.

*Ключевые слова:* сенсорная стимуляция, обратная связь, коррекция состояний, автоматическая модуляция, электроэнцефалограмма, ритм сердцебиений, ритм дыхания

DOI: 10.31857/S0869813923090030, EDN: OSEDRJ

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка и клиническая апробация новых методов стимуляции мозга – захватывающая и быстро развивающаяся область нейрофизиологии. К настоящему времени разнообразные методы нейростимуляции широко используются в психиатрии и неврологии в качестве терапевтического инструмента для восстановления нарушенных функций [1, 2] и когнитивной реабилитации пациентов неврологической клиники [3–5], для лечения пациентов с различными заболеваниями центральной нервной системы, которые не поддаются консервативной терапии [6, 7], для активации процессов нейропластичности путем реорганизации корковых сетей под влиянием афферентной стимуляции [8–10], при устранении когнитивных и стресс-индуцированных расстройств [11–14], а также при оптимизации когнитивных функций у здоровых людей [15–17]. Однако многие авторы отмечают такие недостатки существующих методов, как низкая эффективность, высокая вариабельность и слабая воспроизводимость получаемых результатов [18–20]. Причиной указанных недостатков является тот факт, что при организации этих лечебных воздействий, как правило, применяются эмпирически заданные параметры, которые остаются постоянными по ходу стимуляции и не зависят от изменений в состоянии пациента. При этом не учитывается динамическая природа физиологиче-

ских функций, и стимулы предъявляются во время разных физиологических микросостояний мозга, приводя к высокой вариабельности эффекта отдельных стимулов и к слабому суммарному эффекту стимуляции [21, 22]. В результате несвоевременно примененная нейростимуляция может быть неэффективной [23] или даже вызывать нежелательные побочные эффекты [24].

С целью преодоления указанных недостатков рядом авторов было предложено использовать обратную связь от текущих физиологических параметров человека, которые модулируют или адаптируют терапию в ответ на физиологические изменения и таким образом обеспечивают более эффективную и действенную терапию [25, 26]. В результате начал формироваться инновационный подход к организации стимуляционных процедур, который получил название адаптивная нейростимуляция или нейростимуляция с замкнутым контуром (closed-loop adaptive neurostimulation) обратной связи [27, 28].

В последнее время число публикаций, посвященных эффектам применения адаптивной нейростимуляции с обратной связью, стремительно возрастает. Цель представленного обзора заключается в обобщении современных данных о разработанных подходах к клиническому использованию разных видов адаптивной нейростимуляции. При этом основными задачами обзора является анализ особенностей, достижений и ограничений разработанных к настоящему времени методов, а также перспектив дальнейшего развития этого направления стимуляции мозга. Рассмотрены эффекты применения инвазивных и неинвазивных магнитных и электрических воздействий, а также акустической и аудиовизуальной стимуляции. Проанализированы возможности и перспективы использования этих технологий в клинической медицине, представлены результаты собственных исследований автора в этом направлении.

## 1. ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТОДОВ АДАПТИВНОЙ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ

В методах адаптивной нейростимуляции используются сенсорные воздействия, которые адаптируются к специфическим для данного пациента текущим параметрам динамических процессов с помощью управляющих сигналов обратной связи от различных физиологических параметров организма [29, 30].

Следует отметить, что замыкание контура обратной связи от индивидуальных характеристик пациента предусмотрено также в современных методах адаптивного биоуправления (neurofeedback). В этих методах человеку предъявляются сенсорные стимулы (зрительные, слуховые, тактильные, электрические), отражающие текущую активность определенных нервных структур, которые лежат в основе его поведения или патологии [31]. Позволяя выявлять причинные взаимоотношения между мозговой активностью и поведением, такая обратная связь обеспечивает человеку возможность обучения осознанной регуляции собственных функций, при которой сенсорные стимулы несут не лечебную, а лишь информационную нагрузку [32, 33]. Однако существенный недостаток технологий нейробиоуправления заключается в том, что значительное число (до 30%) пациентов не могут обучиться навыку осознанной модификации собственных функций для достижения требуемых лечебных эффектов, а остальные нуждаются в очень длительном обучении [34]. Данная “проблема необучаемости” обусловлена зависимостью успешности обучения от мотивации и настроения человека [35], а также трудностью корректного декодирования мысленных команд и использованием неэффективных стратегий обучения [36].

Таким образом, ключевая особенность методов адаптивной нейростимуляции заключается в том, что регулировка параметров лечебного воздействия, управляет-

мого сигналами обратной связи от текущих физиологических показателей пациента, осуществляется автоматически, без участия его сознания [37]. Адаптивность нейростимуляции достигается за счет того, что воздействие, сформированное в каждый данный момент на основе зарегистрированных физиологических параметров, приводит под влиянием стимуляции к их адаптивным изменениям, которые, в свою очередь, модулируют параметры следующего цикла стимуляции. Благодаря принципу автоматического замыкания обратной связи методы адаптивной нейростимуляции могут достигать высокой эффективности и персонализации воздействий [38]. Кроме того, они приобретают характер зависимой от состояния мозга стимуляции [39], которая учитывает текущую динамику микросостояний нервной системы. По сравнению с традиционными методами нейростимуляции, адаптивная нейростимуляция с обратной связью может повысить эффективность терапии, исключить длительный начальный период для программирования и регулировки стимулятора, обеспечить индивидуальное лечение и автоматически поддерживать адаптивные параметры воздействия [40, 41].

## 2. ДОСТИЖЕНИЯ МЕТОДОВ АДАПТИВНОЙ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ С ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ

Анализ литературы показывает, что наиболее широкое распространение и признание получили адаптивные методы глубинной электростимуляции мозга (closed-loop deep brain stimulation) [42–44]. В этих методах параметры лечебной электростимуляции динамически контролируются обратной связью от биомаркеров патологической активности мозга [45]. Стимулом к развитию данной линии исследований послужил тот факт, что патологическая нейронная активность может быть зарегистрирована непосредственно от целевой области мозга с помощью стимулирующих электродов и использоваться для адаптации параметров стимуляции в соответствии с персонализированной терапевтической потребностью [46]. В настоящее время адаптивные методы глубинной электростимуляции мозга успешно используются для лечения хронической боли [47, 48], синдрома Туретта [49], тремора [50], паркинсонизма [51–53] и других двигательных расстройств, а поиск биомаркеров и алгоритмов стимуляции активно продолжается [54, 55]. Получают также признание методы адаптивной оптогенетической стимуляции, обеспечивающие автоматическую подстройку параметров оптической стимуляции на основании данных нейронального ответа [56, 57].

Описанные методы являются инвазивными, так как предполагают необходимость имплантации стимулирующих электродов в определенные структуры мозга. В то же время в литературе отмечается особая актуальность и перспективность методов адаптивной нейростимуляции, способных неинвазивно осуществлять мониторинг физиологического состояния [58] и персонализированную терапию выявленных расстройств [59].

Современные технические средства позволяют неинвазивно регистрировать параметры функционирования практически любой системы организма и использовать их в качестве сигналов, управляющих стимуляцией. Так, например, продемонстрировано успешное применение глубинной стимуляции мозга, управляемой сигналами обратной связи от кожного сопротивления [60]. Показано также, что эффективность функциональной электрической стимуляции может быть повышена при использовании управляющих сигналов от электромиограммы (ЭМГ) [61].

Наибольший интерес представляют лечебные сенсорные воздействия, автоматически модулируемые текущими ритмическими процессами пациента – ритмами сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а также ритмами электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Действительно, эти ритмические процессы являются источником

жизненно важных для человека interoцептивных сигналов, которые обеспечивают восприятие внутренних телесных ощущений [62–64]. Нарушения interoцепции в настоящее время рассматривают в качестве патогенетического механизма психосоматических заболеваний и потенциальной мишени терапевтического воздействия [65–67].

Концепция использования эндогенных ритмических процессов человека в качестве фактора модуляции параметров стимуляции была сформулирована еще в 1996 г. [68]. В работе было показано, что даже при однократном применении электростимуляции, автоматически управляемой ритмом дыхания пациента, достигается быстрое снятие болевых синдромов и сохранение эффектов обезболивания на длительный срок. Впоследствии управляемая дыханием пациента электростимуляция была успешно использована рядом авторов при лечении хронических нейропатических болей [69–71]. Успешными для достижения состояния релаксации оказались также комплексные акустические воздействия, автоматически управляемые текущими значениями variability сердечного ритма пациента [72].

Особенно активное развитие получили методы адаптивной нейростимуляции, использующие обратную связь от ЭЭГ пациента. Это обусловлено такими преимуществами ЭЭГ, как неинвазивность, высокое временное разрешение, простота применения и возможности извлечения данных в режиме реального времени [73, 74].

Наглядной иллюстрацией актуальности данной линии исследований являются многочисленные работы, в которых показано, что с помощью неинвазивных сенсорных воздействий, синхронизированных с определенными текущими параметрами ЭЭГ, оказывается возможным улучшать качество сна, усиливать когнитивные функции и процессы консолидации памяти. Подобные эффекты в последние годы продемонстрированы в экспериментах с использованием транскраниальной электрической стимуляции, управляемой медленноволновыми (0.5–1.2 Гц) компонентами лобной ЭЭГ [75] или фазой тета (4–8 Гц) ЭЭГ ритма в лобных отведениях [76]. Авторы данной работы указывают, что разработанный метод может привести к повышению эффективности лечения в домашних условиях, но только после совершенствования силовых и временных параметров воздействий.

Возможность существенного улучшения качества сна и процессов консолидации памяти показана также при использовании акустических воздействий (розовый шум и чистые тона разной частоты), управляемых сигналами обратной связи от различных параметров ЭЭГ – “сонных ЭЭГ веретен” [77], медленноволновых (0.25–4.0 Гц) осцилляций в лобной ЭЭГ [78] и усредненной мощности низкочастотных (<2 Гц) компонентов многоканальной ЭЭГ, вычисляемой в реальном времени с помощью специального алгоритма [79].

При лечении депрессивных расстройств очень успешными оказались процедуры транскраниальной магнитной стимуляции, управляемой в реальном времени компонентами альфа-ритма ЭЭГ в префронтальных отведениях [80, 81]. Авторы подчеркивают, что лечебные эффекты накапливаются в течение дней/недель благодаря прогрессивному вовлечению механизмов нейропластичности. Успешное устранение состояний тревожности и депрессии достигалось при аудиовизуальной стимуляции, автоматически управляемой сигналами обратной связи от узкочастотных спектральных компонентов ЭЭГ в центральном лобном отведении [82].

В ряде работ обратная связь от ЭЭГ используется путем компьютерных преобразований текущих параметров биоэлектрической активности мозга в акустические сигналы. Так, разработан метод биоакустической коррекции [83, 84], который позволяет “услышать” работу мозга в реальном времени благодаря преобразованию параметров ЭЭГ в музыкаподобный звукоряд. При преобразовании используется

операция согласования значений периодов колебаний ЭЭГ с множеством звуковых образцов, где каждому периоду колебания ЭЭГ в диапазоне от 1 до 30 Гц соответствует образец звука с определенной частотой основного тона. Метод успешно использован для коррекции неблагоприятных функциональных состояний при нарушениях когнитивной и эмоционально-волевой сферы [85, 86].

Акустические воздействия, автоматически генерируемые путем трансформации доминирующих ЭЭГ ритмов в музыкальные тоны, продемонстрировали высокую эффективность при лечении посттравматического стрессового расстройства [87, 88], а также при оптимизации автономных функций и улучшении качества сна [89, 90]. Авторы процитированных работ считают, что обновление в реальном времени собственных ЭЭГ паттернов и резонанс между слышимыми акустическими сигналами и осцилляторными мозговыми сетями дают организму возможность автокалибровки, релаксации и преодоления устойчивых патологических состояний [88].

В наших исследованиях мы исходили из того, что повышенной эффективностью могут обладать музыкально-терапевтические воздействия при условии их модуляции собственными параметрами ЭЭГ человека [91]. В разработанном музыкальном нейроинтерфейсе текущие значения доминирующих у субъекта спектральных ЭЭГ компонентов (ЭЭГ осцилляторов) преобразуются в музыкалоподобные сигналы, по тембру напоминающие звуки флейты, плавно варьирующие по высоте тона и интенсивности. Данный нейроинтерфейс был успешно использован при коррекции стресс-индуцированных расстройств [92]. Впоследствии описанный метод ЭЭГ-управляемой музыкальной стимуляции был усовершенствован путем добавления второго контура обратной связи, в котором одновременно с музыкалоподобной стимуляцией предъявляются световые ритмические воздействия, формируемые на основе нативной ЭЭГ пациента [93, 94]. Созданный метод свето-музыкальной стимуляции с двойной обратной связью от ЭЭГ был успешно применен для когнитивной реабилитации пациентов с инсультом [95], при лечении посттравматического стресса и профессионального выгорания [96], при коррекции негативных функциональных состояний [35], при лечении постковидного синдрома [97], а также при когнитивной реабилитации специалистов высокотехнологичного профиля [98].

При расположении рассмотренных публикаций в хронологическом порядке можно проследить динамику развития неинвазивных методов адаптивной нейро-стимуляции с обратной связью от ритмических процессов человека (табл. 1).

Данные таблицы показывают, что количество публикаций, использующих неинвазивные методы адаптивной нейростимуляции с обратной связью от эндогенных ритмических процессов организма, демонстрирует интенсивный рост, особенно в последние 5 лет. При этом значительно расширяется как набор используемых видов стимуляции, так и спектр биомедицинских приложений данного вида воздействий.

### 3. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ АДАПТИВНОЙ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ С ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ

Анализ литературы показывает, что большое внимание исследователей привлекают перспективы развития такого инвазивного метода адаптивной нейростимуляции с обратной связью, как глубинная электростимуляция мозга. Данный метод предполагает использование имплантируемых внутрочерепных электродов, батарей питания и генераторов импульсов с обратной связью, что позволяет целенаправленно осуществлять основанную на нейронных сетях нейромодуляцию. Поэтому в качестве ближайших перспектив рассматриваются достижения в области инженерии, такие как создание надежных электродов и более совершенных конструкций батарей, а также разработка эффективных методов стимуляции с замкну-



**Таблица 1.** Динамика развития неинвазивных методов адаптивной нейростимуляции с обратной связью от эндогенных ритмических процессов организма

Цель/эффект воздействия	Вид воздействия	Параметр обратной связи	Ссылка [№]
Устранение болевых синдромов	Электростимуляция	Ритм дыхания	Fedotchev, 1996 [68]
Биоакустическая коррекция состояния	Акустическая стимуляция	Компоненты (1–30 Гц) лобной и затылочной ЭЭГ	Константинов и др., 2014 [83]
Лечение хронической боли	Электростимуляция	Ритм дыхания	Li et al., 2016 [69]
Устранение последствий стресса	Музыкаподобная стимуляция	Узкочастотные ЭЭГ осцилляторы в диапазоне альфа (8–13 Гц)	Fedotchev et al., 2017 [92]
Лечение посттравматического стресса	Акустические стимулы	Доминирующие ЭЭГ компоненты в отведениях F, C, T, P, O	Tegeler et al., 2017 [87]
Лечение хронической боли	Электростимуляция	Ритм дыхания	Karri et al., 2018 [70]
Улучшение качества сна и консолидации памяти	Транскраниальная электрическая стимуляция	Мощность лобной ЭЭГ в диапазоне 0.5–1.2 Гц	Ketz et al., 2018 [75]
Оптимизация автономных функций, улучшение качества сна	Акустические стимулы	Доминирующие ЭЭГ компоненты в отведениях F, C, T, P, O	Shaltout et al., 2018 [89]
Индукция состояния релаксации	Музыкаподобная стимуляция	Ритм сердцебиений	Yu et al., 2018 [72]
Улучшение качества сна и консолидации памяти	Акустические стимулы	“Сонные ЭЭГ веретена”	Ngo et al., 2019 [77]
Коррекция последствий стресса	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Fedotchev et al., 2019 [93]
Улучшение качества сна и когнитивного контроля	Транскраниальная электрическая стимуляция	Мощность и фаза лобной ЭЭГ в диапазоне 4–8 Гц	Mansouri et al., 2019 [76]
Лечение посттравматического стресса	Акустические стимулы	Доминирующие ЭЭГ компоненты в отведениях F, C, T, P, O	Tegeler et al., 2020 [88]
Лечение депрессивных расстройств	Транскраниальная магнитная стимуляция	Мощность и фаза альфа (8–12 Гц) в отведении F5	Zrenner et al., 2020 [80]
Когнитивная реабилитация при инсульте	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Mukhina et al., 2021 [95]
Лечение хронической боли	Электростимуляция	Ритм дыхания	Karri et al., 2021 [71]
Лечение посттравматического стресса и выгорания	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Fedotchev et al., 2021 [96]
Биоакустическая коррекция состояния	Акустическая стимуляция	Компоненты (1–30 Гц) лобной и затылочной ЭЭГ	Иванова, Кормушкина, 2021 [85]
Коррекция негативных функциональных состояний	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Fedotchev et al., 2021 [38]
Коррекция состояний тревоги и депрессии	Аудиовизуальная стимуляция	Узкочастотные спектральные компоненты ЭЭГ в отведении Fz	Pino, 2021 [82]
Лечение депрессивных расстройств	Транскраниальная магнитная стимуляция	Мощность и фаза альфа (6–13 Гц) в отведении F3	Faller et al., 2022 [81]
Улучшение качества сна и консолидации памяти	Акустические стимулы	Медленноволновые (0.25–4.0 Гц) ЭЭГ компоненты	Debellemanière et al., 2022 [78]

Таблица 1. Окончание

Цель/эффект воздействия	Вид воздействия	Параметр обратной связи	Ссылка [№]
Лечение постковидного синдрома	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Polevaya et al., 2022 [97]
Биоакустическая коррекция состояния	Акустическая стимуляция	Компоненты (1–30 Гц) лобной и затылочной ЭЭГ	Щегольков и др., 2022 [86]
Коррекция стресс-вызванных расстройств	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы (звук) + нативная ЭЭГ (свет)	Fedotchev et al., 2022 [94]
Улучшение качества сна и его восстановительных функций	Акустические стимуляция	Усредненная мощность низкочастотных (< 2 Гц) компонентов многоканальной ЭЭГ	Ruch et al., 2022 [79]
Когнитивная реабилитация специалиста	Свето-музыкальная стимуляция	Альфа ЭЭГ осцилляторы + нативная ЭЭГ	Fedotchev, 2022 [98]
Оптимизация автономных функций, улучшение качества сна	Акустические стимулы	Доминирующие ЭЭГ компоненты в отведениях F, C, T, P, O	Tegeler et al., 2023 [90]

тым циклом и дистанционного программирования [99, 100]. Предполагается, что в течение 5 лет на рынок выйдут сложные имплантируемые системы нейромодуляции, способные к стимуляции с обратной связью и применению новых, более эффективных видов воздействия, а через 5 лет ожидается интеграция адаптивной сетевой нейромодуляции с предиктивным искусственным интеллектом, которая обеспечит автоматическую настройку мозгом и внешними датчиками и будет контролироваться через облачные приложения [101].

При рассмотрении перспектив развития адаптивной глубинной электростимуляции мозга важная роль отводится двунаправленным имплантируемым интерфейсам мозг–компьютер, которые могут обнаруживать и выборочно модулировать патофизиологическую активность мозговых цепей. Указывается, что терапевтический успех будет достигаться за счет комплексной разработки стратегий по идентификации сигналов обратной связи, подавления артефактов, обработки сигналов и режимов управления для точной локализации стимуляции с учетом индивидуальных особенностей пациента [102]. Для оптимизации устройств глубинной электростимуляции мозга предлагается в будущем использовать модели машинного обучения, которые способны предсказывать/идентифицировать наличие симптомов заболевания на основе на нейронной активности и могут адаптивно модулировать стимуляцию [103].

Что касается перспектив неинвазивной адаптивной нейростимуляции с обратной связью, заслуживает внимания активно развивающаяся линия исследований, связанная с понятиями “осциллопатии” и “осциллолтерпия” [104]. Концептуальной основой данной линии являются следующие положения. Осцилляторная активность мозга отражает и поддерживает многие физиологические функции, от моторного контроля до познания и эмоций. При неврологических и психических расстройствах, таких как эпилепсия, паркинсонизм, болезнь Альцгеймера, шизофрения, тревожные, депрессивные и другие расстройства, обычно наблюдаются нарушения нормальной осцилляторной деятельности мозга. Такие расстройства можно рассматривать как общие дефекты колебаний, или “осциллопатии”, являющиеся биомаркером соответствующих симптомов. Внешние ритмические воздействия могут направленно модулировать эндогенные осцилляции через резонансные механизмы или механизмы усвоения ритма. Поэтому многие авторы указывают на перспективность использования колебаний нейронной сети в качестве терапев-

тических мишеней при организации процедур “осциллотерапии” путем применения активно развивающихся методов адаптивной нейростимуляции с обратной связью [105, 106].

В этой связи перспективным представляется недавно предложенный метод “трансплантации” состояний мозга через сенсорную или транскраниальную стимуляцию, сформированную на основе ЭЭГ характеристик “донора” [107]. Автор исходит из того, что сенсорная и транскраниальная стимуляции, вовлекающие мозг в определенные мозговые ритмы, могут эффективно вызывать желаемые состояния мозга (например, состояние сна или состояние внимания), коррелирующие с такими корковыми ритмами. Поэтому представляется возможным вызывать желаемое состояние мозга, воспроизводя эти нейронные корреляты через стимуляцию. Для этого предлагается осуществлять запись ЭЭГ характеристик “донора”, находящегося в определенном функциональном состоянии, и использовать их в качестве управляющих сигналов обратной связи при сенсорной или транскраниальной стимуляции “реципиента”. Автор считает, что предложенный метод открывает новый эффективный нейромодуляционный подход к неинвазивному немедикаментозному лечению различных психических и неврологических расстройств, для которых современные методы лечения в основном ограничиваются фармако-терапевтическими вмешательствами [107].

В наших экспериментальных работах также наметились некоторые перспективные направления дальнейших исследований. Одно из них связано с введением в ЭЭГ-управляемый музыкальный нейроинтерфейс дополнительного контура управления от сердечного ритма [108]. В строго контролируемых исследованиях было показано, что комплексная обратная связь от биопотенциалов мозга и сердца позволяет существенно повысить эффективность лечебных процедур при коррекции стресс-индуцированных состояний [109] и приводит к максимальному приросту мощности  $\alpha$ -ритма ЭЭГ относительно фона, сопровождаемому положительными эмоциональными реакциями и сдвигами функционального состояния организма за счет вовлечения интероцептивных сигналов в механизмы мультисенсорной интеграции, нейропластичности и резонансные механизмы мозга [110].

Еще одно перспективное направление исследований связано с применением резонансного сканирования, или светодиодной ритмической фотостимуляции с постепенно возрастающей частотой в диапазоне основных ритмов ЭЭГ [111]. В недавней работе показано, что резонансное сканирование может служить своеобразной предварительной настройкой мозга, вызывая активацию потенциальных резонаторов в спектре ЭЭГ и увеличивая реакции мозга на последующую ЭЭГ-управляемую адаптивную нейростимуляцию [112]. В результате такой комбинации экзогенных и эндогенных ритмических воздействий значимые позитивные эффекты при коррекции стресс-индуцированных состояний и когнитивной реабилитации человека регистрируются уже после однократной лечебной процедуры и усиливаются при повторении обследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что методы адаптивной нейростимуляции с обратной связью представляют собой активно развивающееся и перспективное направление нейрофизиологии. Судя по рассмотренным публикациям, наибольшее развитие и эффективность демонстрируют методы, использующие мультимодальную сенсорную стимуляцию, автоматически модулируемую сигналами обратной связи от собственных ритмических процессов человека – ритма дыхания, ритма сердцебиений и ритмов ЭЭГ. Комплексная обратная связь от этих ритмов способствует участию значимых для человека интероцептивных сигналов в меха-

низмах мультисенсорной интеграции, нейропластичности и резонансных механизмов мозга. Благодаря использованию управляющих сигналов от эндогенных ритмов, такая неинвазивная стимуляция за счет учета динамики микросостояний мозга достигает высокой персонализации и эффективности лечебных воздействий.

Особенно перспективной линией исследований представляется автоматическая модуляция сенсорных воздействий текущими параметрами ЭЭГ человека. Автоматическое управление лечебными сенсорными воздействиями дает возможность использовать ЭЭГ-управляемую адаптивную нейростимуляцию в условиях, не требующих осознанных усилий испытуемых, что особенно важно при проведении лечебных сеансов с детьми и с пациентами, для которых характерны измененные психические состояния или противопоказана медикаментозная терапия.

Перечисленные достоинства методов адаптивной нейростимуляции с обратной связью открывают перспективы для их применения в реабилитационных мероприятиях широкого профиля, в образовательных учреждениях для активизации познавательной деятельности человека и процессов его обучения, в военной и спортивной медицине, медицине катастроф, научных исследованиях.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант РНФ № 22-18-20075.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРА

Идея работы и планирование экспериментов, руководство работой, сбор и обработка данных, написание и редактирование манускрипта (А.И.Ф).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулин ИС, Пойдашева АГ, Павлов НА, Супонева НА, Пирадов МА, Афтанас ЛИ (2019) Транскраниальная электрическая стимуляция в улучшении функции руки при инсульте. Успехи физиол наук 50(1): 90–104. [Bakulin IS, Poidasheva AG, Pavlov NA, Suponova NA, Piradov MA, Aftanas LI (2019) Transcranial electrical stimulation in improving hand function in stroke. Usp Fiziol Nauk 50(1): 90–104. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S030117981901003X>
2. Белопасова АВ, Добрынина ЛА, Кадыков АС, Бердникович ЕС, Бергельсон ГМ, Цыпуштанова ММ (2020) Неинвазивная стимуляция мозга в реабилитации пациентов с постинсультной афазией. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 120(3-2): 23–28. [Belopasova AV, Dobryнина LA, Kadykov AS, Berdnikovich ES, Bergelson GM, Tsyushtanova MM (2020) Non-invasive brain stimulation in the rehabilitation of patients with post-stroke aphasia. Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 120(3-2): 23–28. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012003223>
3. Draaisma LR, Wessel MJ, Hummel FC (2020) Non-invasive brain stimulation to enhance cognitive rehabilitation after stroke. Neurosci Lett 719: 133678. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.047>
4. De Luca R, Pollicino P, Rifici C, de Cola C, Billeri L, Marino S, Trifirò S, Fiumara E, Randazzo M, Bramanti P, Torrisi M (2021) Improving motor and cognitive recovery following severe traumatic brain injury using advanced emotional audio-video stimulation: Lessons from a case report. Medicine (Baltimore) 100(31): e26685. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026685>
5. Hyde J, Carr H, Kelley N, Seneviratne R, Reed C, Parlatini V, Solmi M, Rosson S, Cortese S, Brandt V (2022) Efficacy of neurostimulation across mental disorders: systematic review and meta-analysis of 208 randomized controlled trials. Mol Psychiatry 27(6): 2709–2719. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01524-8>

6. Калинин АА, Винокуров АГ, Калинин ОН, Ильиных АС, Бочаров АА, Дуров АВ, Исаев ЕН, Чупаленков СМ (2019) Глубинная стимуляция в хирургии. Клиническая практика 10(1): 63–71. [Kalinkin AA, Vinokurov AG, Kalinkina ON, Il'yanykh AS, Bocharov AA, Durov AV, Isaev EN, Chupalankov SM (2019) Deep stimulation in surgery. Klin Praktika 10(1): 63–71. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/clinpract10163-71>
7. Figuee M, Riva-Posse P, Choi KS, Bederson L, Mayberg HS, Kopell BH (2022). Deep Brain Stimulation for Depression. Neurotherapeutics 19(4): 1229–1245. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01270-3>
8. Гречко АВ, Шевцова ЕЕ, Ковалева ГА, Родионова АД (2018) Вариативность применения методов сенсорной стимуляции в реабилитации пациентов с минимальными проявлениями сознания. Вестник восстановител. мед 2(84): 129–135. [Grechko AV, Shevtsova EE, Kovaleva GA, Rodionova AD (2018) Variability of application of sensory stimulation methods in the rehabilitation of patients with minimal manifestations of consciousness. Vestnik Voststanovitel Med 2(84): 129–135. (In Russ)].
9. Naryshkin AG, Egorov AY, Galanin IV (2020) Controlled Neuroplasticity. Human Physiology 46: 216–223. <https://doi.org/10.1134/S0362119720020103>
10. Zhang X, Huai Y, Wei Z, Yang W, Xie Q, Yi L (2022) Non-invasive brain stimulation therapy on neurological symptoms in patients with multiple sclerosis: A network meta-analysis. Front Neurol 13:1007702. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1007702>
11. Can YS, Iles-Smith H, Chalabianloo N, Ekiz D, Fernández-Álvarez J, Repetto C, Riva G, Ersoy C (2020) How to Relax in Stressful Situations: A Smart Stress Reduction System. Healthcare (Basel) 8(2): E100. <https://doi.org/10.3390/healthcare8020100>
12. Kan RLD, Zhang BBB, Zhang JJQ, Kranz GS (2020) Non-invasive brain stimulation for post-traumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis. Transl Psychiatry 10(1): 168. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0851-5>
13. Лагода ДЮ, Добрынина ЛА, Супонева НА, Бакулин ИС, Пойдашева АГ, Цыпуштанова ММ, Кадьков АС, Пирадов МА (2021) Ритмическая транскраниальная магнитная стимуляция в терапии умеренных когнитивных расстройств при церебральной микроангиопатии. Анналы клин эксперимент неврол 15(4): 5–14. [Lagoda DYU, Dobrynina LA, Suponeva NA, Bakulin IS, Poidasheva AG, Tsyushtanova MM, Kadykov AS, Piradov MA (2021) Rhythmic transcranial magnetic stimulation in the treatment of moderate cognitive impairment in cerebral microangiopathy. Annaly Klin I Eksperiment Nevrol 15(4): 5–14. (In Russ)]. <https://doi.org/10.54101/ACEN.2021.4.1>
14. Wang Y, Xu N, Wang R, Zai W (2022) Systematic review and network meta-analysis of effects of noninvasive brain stimulation on post-stroke cognitive impairment. Front Neurosci 16: 1082383. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1082383>
15. Бакулин ИС, Пойдашева АГ, Медынцев АА, Супонева НА, Пирадов МА (2020) Транскраниальная магнитная стимуляция в когнитивной нейронауке: методологические основы и безопасность. Рос журн когнитив науки 7(3): 25–44. [Bakulin IS, Poidasheva AG, Medyntsev AA, Suponeva NA, Piradov MA (2020) Transcranial magnetic stimulation in cognitive neuroscience: methodological foundations and safety. Ross Zhurn Kognitiv Nauki 7(3): 25–44. (In Russ)]. <https://doi.org/10.47010/20.3.2>
16. Fiscaro F, Lanza G, Bella R, Pennisi M (2020) “Self-Neuroenhancement”: The Last Frontier of Noninvasive Brain Stimulation? J Clin Neurol 16(1): 158–159. <https://doi.org/10.3988/jcn.2020.16.1.158>
17. Qu X, Wang Z, Cheng Y, Xue Q, Li Z, Li L, Feng L, Hartwigsen G, Chen L (2022) Neuromodulatory effects of transcranial magnetic stimulation on language performance in healthy participants: Systematic review and meta-analysis. Front Hum Neurosci 16: 1027446. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.1027446>
18. Janssens SEW, Sack AT (2021) Spontaneous Fluctuations in Oscillatory Brain State Cause Differences in Transcranial Magnetic Stimulation Effects Within and Between Individuals. Front Hum Neurosci 15:802244. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.802244>
19. Antal A, Luber B, Brem AK (2022) Non-invasive brain stimulation and neuroenhancement. Clin Neurophysiol Pract 7: 146–165. <https://doi.org/10.1016/j.cnp.2022.05.002>
20. Schutter DJLG, Smits F, Klaus J (2023) Mind matters: A narrative review on affective state-dependency in non-invasive brain stimulation. Int J Clin Health Psychol 23(3): 100378. <https://doi.org/10.1016/j.ijchp.2023.100378>
21. Бакулин ИС, Пойдашева АГ, Лагода ДЮ, Супонева НА, Пирадов МА (2021) Перспективы развития терапевтической транскраниальной магнитной стимуляции. Нервные болез-

- ни 4: 3–10. [*Bakulin IS, Poidasheva AG, Lagoda DYu, Suponeva NA, Piradov MA* (2021) Prospects for the development of therapeutic transcranial magnetic stimulation. *Nervnye Bolezni* 4: 3–10. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.24412/2226-0757-2021-12371>
22. *Kasten FH, Herrmann CS* (2022) The hidden brain-state dynamics of tACS aftereffects. *Neuroimage* 264: 119713.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119713>
  23. *Zanos S* (2019) Closed-Loop Neuromodulation in Physiological and Translational Research. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9(11): a034314.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034314>
  24. *Provenza NR, Matteson ER, Allawala AB* (2019) The Case for Adaptive Neuromodulation to Treat Severe Intractable Mental Disorders. *Front Neurosci* 13: 152.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00152>
  25. *Sun FT, Morrell MJ* (2014) Closed-loop neurostimulation: the clinical experience. *Neurotherapeutics* 11(3): 553–563.  
<https://doi.org/10.1007/s13311-014-0280-3>
  26. *Potter SM, El Hady A, Fetz EE* (2014) Closed-loop neuroscience and neuroengineering. *Front Neural Circuits* 8: 115.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00115>
  27. *Hebb AO, Zhang JJ, Mahoor MH, Tsiokos C, Matlack C, Chizeck HJ, Pouratian N* (2014) Creating the feedback loop: closed-loop neurostimulation. *Neurosurg Clin N Am* 25(1): 187–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.nec.2013.08.006>
  28. *Arlotti M, Rosa M, Marceglia S, Barbieri S, Priori A* (2016) The adaptive deep brain stimulation challenge. *Parkinsonism Relat Disord* 28: 12–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.03.020>
  29. *Lo MC, Widge AS* (2017) Closed-loop neuromodulation systems: next-generation treatments for psychiatric illness. *Int Rev Psychiat* 29(2): 191–204.  
<https://doi.org/10.1080/09540261.2017.1282438>
  30. *Oxley T, Opie N* (2019) Closed-Loop Neuromodulation: Listen to the Body. *World Neurosurg* 122: 415–416.  
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.132>
  31. *Sitaram R, Ros T, Stoeckel L, Haller S, Scharnowski F, Lewis-Peacock J, Weiskopf N, Blefari ML, Rana M, Oblak E, Birbaumer N, Sulzer J* (2017) Closed-loop brain training: the science of neurofeedback. *Nat Rev Neurosci* 18(2): 86–100.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.164>
  32. *Papo D* (2019) Neurofeedback: Principles, appraisal, and outstanding issues. *Eur J Neurosci* 49(11): 1454–1469.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.14312>
  33. *Dessy E, Mairesse O, van Puyvelde M, Cortoos A, Neyt X, Pattyn N* (2020) Train Your Brain? Can We Really Selectively Train Specific EEG Frequencies With Neurofeedback Training. *Front Hum Neurosci* 10(14): 22.  
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00022>
  34. *Alkoby O, Abu-Rmileh A, Shriki O, Todder D* (2018) Can we predict who will respond to neurofeedback? A review of the inefficacy problem and existing predictors for successful EEG neurofeedback learning. *Neuroscience* 378: 155–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.050>
  35. *Kadosh KC, Staunton G* (2019) A systematic review of the psychological factors that influence neurofeedback learning outcomes. *Neuroimage* 185: 545–555.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.10.021>
  36. *De Vico Fallani F, Bassett DS* (2019) Network neuroscience for optimizing brain-computer interfaces. *Phys Life Rev* 31: 304–309.  
<https://doi.org/10.1016/j.plrev.2018.10.001>
  37. *Zhou X, Miller JP* (2019) Commentary: The Emerging Role of Biomarkers in Adaptive Modulation of Clinical Brain Stimulation. *Neurosurgery* 85(3): E440–E441.  
<https://doi.org/10.1093/neuros/nyz097>
  38. *Fedotchev AI, Parin SB, Poleyeva SA* (2021) The Principle of a Closed Feedback Loop of Human Endogenous Rhythms in Modern Neurofeedback and Adaptive Neurostimulation Technologies. *Biophysics* 66(2): 359–361.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350921020056>
  39. *Bergmann TO* (2018) Brain State-Dependent Brain Stimulation. *Front Psychol* 9: 2108.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02108>
  40. *Hosain MK, Kouzani A, Tye S* (2014) Closed loop deep brain stimulation: an evolving technology. *Australas Phys Eng Sci Med* 37(4): 619–634.  
<https://doi.org/10.1007/s13246-014-0297-2>

41. *Prosky J, Cagle J, Sellers KK, Gilron R, de Hemptinne C, Schmitgen A, Starr PA, Chang EF, Shirvalkar P* (2021) Practical Closed-Loop Strategies for Deep Brain Stimulation: Lessons From Chronic Pain. *Front Neurosci* 15: 762097. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.762097>
42. *Edwards CA, Kouzani A, Lee KH, Ross EK* (2017) Neurostimulation Devices for the Treatment of Neurologic Disorders. *Mayo Clin Proc* 92(9): 1427–1444. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.05.005>
43. *Kuo CH, White-Dzuro GA, Ko AL* (2018) Approaches to closed-loop deep brain stimulation for movement disorders. *Neurosurg Focus* 45(2): E2. <https://doi.org/10.3171/2018.5.FOCUS18173>
44. *Gonzalez-Escamilla G, Muthuraman M, Ciolac D, Coenen VA, Schnitzler A, Groppa S* (2020) Neuroimaging and electrophysiology meet invasive neurostimulation for causal interrogations and modulations of brain states. *Neuroimage* 220: 117144. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117144>
45. *Meidahl AC, Tinkhauser G, Herz DM, Cagnan H, Debarros J, Brown P* (2017) Adaptive Deep Brain Stimulation for Movement Disorders: The Long Road to Clinical Therapy. *Mov Disord* 32(6): 810–819. <https://doi.org/10.1002/mds.27022>
46. *Neumann WJ, Turner RS, Blankertz B, Mitchell T, Kühn AA, Richardson RM* (2019) Toward Electrophysiology-Based Intelligent Adaptive Deep Brain Stimulation for Movement Disorders. *Neurotherapeutics* 16(1): 105–118. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00705-0>
47. *Shirvalkar P, Veuthey TL, Dawes HE, Chang EF* (2018) Closed-Loop Deep Brain Stimulation for Refractory Chronic Pain. *Front Comput Neurosci* 12: 18. <https://doi.org/10.3389/fncom.2018.00018>
48. *Provenzano DA, Heller JA, Hanes MC* (2021) Current Perspectives on Neurostimulation for the Management of Chronic Low Back Pain: A Narrative Review. *J Pain Res* 14: 463–479. <https://doi.org/10.2147/JPR.S249580>
49. *Marceglia S, Rosa M, Servello D, Porta M, Barbieri S, Moro E, Priori A* (2017) Adaptive Deep Brain Stimulation (aDBS) for Tourette Syndrome. *Brain Sci* 8(1). <https://doi.org/10.3390/brainsci8010004>
50. *Haddock A, Mitchell KT, Miller A, Ostrem JL, Chizeck HJ, Miocinovic S* (2018) Automated Deep Brain Stimulation Programming for Tremor. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 26(8): 1618–1625. <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2018.2852222>
51. *Habets JGV, Heijmans M, Kuijff ML, Janssen MLF, Temel Y, Kubben PL* (2018) An update on adaptive deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 33(12): 1834–1843. <https://doi.org/10.1002/mds.115>
52. *Weiss D, Massano J* (2018) Approaching adaptive control in neurostimulation for Parkinson disease: Autopilot on. *Neurology* 90(11): 497–498. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005111>
53. *An Q, Yin Z, Ma R, Fan H, Xu Y, Gan Y, Gao Y, Meng F, Yang A, Jiang Y, Zhu G, Zhang J* (2023) Adaptive deep brain stimulation for Parkinson's disease: looking back at the past decade on motor outcomes. *J Neurol* 270(3): 1371–1387. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11495-z>
54. *Hoang KB, Cassar IR, Grill WM, Turner DA* (2017) Biomarkers and Stimulation Algorithms for Adaptive Brain Stimulation. *Front Neurosci* 11: 564. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00564>
55. *Hell F, Palleis C, Mehrkens JH, Koeglsperger T, Bötzel K* (2019) Deep Brain Stimulation Programming 2.0: Future Perspectives for Target Identification and Adaptive Closed Loop Stimulation. *Front Neurol* 10: 314. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00314>
56. *Смирнова ЕЮ, Зайцев АВ* (2018) Применение оптогенетических методов для изучения и подавления эпилептической активности (обзор). *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104(6): 620–629. [*Smirnova EY, Zaitsev AV* (2018) Application of optogenetic methods for studying and suppressing epileptic activity (review). *Russ J Physiol* 104(6): 620–629. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0869813918060011>
57. *Mickle AD, Won SM, Noh KN, Yoon J, Meacham KW, Xue Y, McIlvried LA, Copits BA, Samineni VK, Crawford KE, Kim DH, Srivastava P, Kim BH, Min S, Shiuian Y, Yun Y, Payne MA, Zhang J, Jang H, Li Y, Lai HH, Huang Y, Park SI, Gereau RW 4th, Rogers JA* (2019) A wireless closed-loop system for optogenetic peripheral neuromodulation. *Nature* 565(7739): 361–365. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0823-6>
58. *Tan EKW, Au YZ, Moghaddam GK, Occhipinti LG, Lowe CR* (2019) Towards Closed-Loop Integration of Point-of-Care Technologies. *Trends Biotechnol* 37(7): 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.004>

59. *Ganzer PD, Sharma G* (2019) Opportunities and challenges for developing closed-loop bioelectronic medicines. *Neural Regen Res* 14(1): 46–50.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.243697>
60. *Wickramasuriya DS, Amin MR, Faghiih RT* (2019) Skin Conductance as a Viable Alternative for Closing the Deep Brain Stimulation Loop in Neuropsychiatric Disorders. *Front Neurosci* 13: 780.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00780>
61. *Jung J, Lee DW, Son YK, Kim BS, Shin HC* (2021) Volitional EMG Estimation Method during Functional Electrical Stimulation by Dual-Channel Surface EMGs. *Sensors (Basel)* 21(23): 8015.  
<https://doi.org/10.3390/s21238015>
62. *Quadt L, Critchley HD, Garfinkel SN* (2018) The neurobiology of interoception in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1428(1): 112–128.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.13915>
63. *Gentsch A, Sel A, Marshall AC, Schütz-Bosbach S* (2019) Affective interoceptive inference: Evidence from heart-beat evoked brain potentials. *Hum Brain Mapp* 40(1): 20–33.  
<https://doi.org/10.1002/hbm.24352>
64. *Gibson J* (2019) Mindfulness, Interoception, and the Body: A Contemporary Perspective. *Front Psychol* 10: 2012.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02012>
65. *Khalsa SS, Adolphs R, Cameron OG, Critchley HD, Davenport PW, Feinstein JS, Feusner JD, Garfinkel SN, Lane RD, Mehling WE, Meuret AE, Nemeroff CB, Oppenheimer S, Petzschner FH, Pollatos O, Rhudy JL, Schramm LP, Simmons WK, Stein MB, Stephan KE, Van den Bergh O, Van Diest I, von Leupoldt A, Paulus MP* (2018) Interoception and Mental Health: A Roadmap. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* 3(6): 501–513.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2017.12.004>
66. *Добрушина ОР, Добрынина ЛА, Арина ГА, Кремнева ЕИ, Суслина АД, Губанова МВ, Белопасова АВ, Солодчик ПО, Уразильдеева ГР, Кротенкова МВ* (2020) Взаимосвязь interoceptивного восприятия и эмоционального интеллекта: функциональное нейровизуализационное исследование. *Журн высш нервн деят им ИП Павлова* 70(2): 206–216. [*Dobrushina OR, Dobrynina LA, Arina GA, Kremneva EI, Suslina AD, Gubanova MV, Belopasova AV, Solodchik PO, Urazildeeva GR, Krotenkova MV* (2020) Relationship between interoceptive perception and emotional intelligence: a functional neuroimaging study. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 70(2): 206–216. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0044467720020069>
67. *Fedotchev AI, Parin SB, Polevaya SA, Zemlyanaya AA* (2021) Human body rhythms in the development of non-invasive methods of closed-loop adaptive neurostimulation. *J Pers Med* 11: 437.  
<https://doi.org/10.3390/jpm11050437>
68. *Fedotchev AI* (1996) Endogenous body rhythms as a modulating factor for parameters of stimulation. *Biophysics* 41(3): 718–722.
69. *Li S, Davis M, Frontera JE, Li S* (2016) A novel nonpharmacological intervention - breathing-controlled electrical stimulation for neuropathic pain management after spinal cord injury - a preliminary study. *J Pain Res* 9: 933–940.  
<https://doi.org/10.2147/JPR.S115901>
70. *Karri J, Li S, Zhang L, Chen YT, Stampas A, Li S* (2018) Neuropathic pain modulation after spinal cord injury by breathing-controlled electrical stimulation (BreEstim) is associated with restoration of autonomic dysfunction. *J Pain Res* 11: 2331–2341.  
<https://doi.org/10.2147/JPR.S174475>
71. *Karri J, Li S, Chen YT, Stampas A, Li S* (2021) Observations of Autonomic Variability Following Central Neuromodulation for Chronic Neuropathic Pain in Spinal Cord Injury. *Neuromodulation* 24(3): 427–433.  
<https://doi.org/10.1111/ner.12979>
72. *Yu B, Funk M, Hu J, Feijs L* (2018) Unwind: A musical biofeedback for relaxation assistance. *Behav Inf Technol* 37: 800–814.  
<https://doi.org/10.1080/0144929X.2018.1484515>
73. *Koenig T, Smailovic U, Jelic V* (2020) Past, present and future EEG in the clinical workup of dementias. *Psychiatry Res Neuroimaging* 306: 111182.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.111182>
74. *Jangwan NS, Ashraf GM, Ram V, Singh V, Alghamdi BS, Abuzenadah AM, Singh MF* (2022) Brain augmentation and neuroscience technologies: current applications, challenges, ethics and future prospects. *Front Syst Neurosci* 16: 1000495.  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.1000495>
75. *Ketz N, Jones AP, Bryant NB, Clark VP, Pilly PK* (2018) Closed-Loop Slow-Wave tACS Improves Sleep-Dependent Long-Term Memory Generalization by Modulating Endogenous Oscillations. *J Neurosci* 38(33): 7314–7326.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0273-18.2018>
76. *Mansouri F, Shanbour A, Mazza F, Fettes P, Zariffa J, Downar J* (2019) Effect of Theta Transcranial Alternating Current Stimulation and Phase-Locked Transcranial Pulsed Current



- Stimulation on Learning and Cognitive Control. *Front Neurosci* 13: 1181.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01181>
77. Ngo HV, Seibold M, Boche DC, Mölle M, Born J (2019) Insights on auditory closed-loop stimulation targeting sleep spindles in slow oscillation up-states. *J Neurosci Methods* 316: 117–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.09.006>
  78. Debellemanière E, Pinaud C, Schneider J, Arnal PJ, Casson AJ, Chennaoui M, Galtier M, Navarrete M, Lewis PA (2022) Optimising sounds for the driving of sleep oscillations by closed-loop auditory stimulation. *J Sleep Res* 31(6): e13676.  
<https://doi.org/10.1111/jsr.13676>
  79. Ruch S, Schmidig FJ, Knüsel L, Henke K (2022) Closed-loop modulation of local slow oscillations in human NREM sleep. *Neuroimage* 264: 119682.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119682>
  80. Zrenner B, Zrenner C, Gordon PC, Belardinelli P, McDermott EJ, Soekadar SR, Fallgatter AJ, Ziemann U, Müller-Dahlhaus F (2020) Brain oscillation-synchronized stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in depression using real-time EEG-triggered TMS. *Brain Stimul* 13(1): 197–205.  
<https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.10.007>
  81. Faller J, Doose J, Sun X, McIntosh JR, Saber GT, Lin Y, Teves JB, Blankenship A, Huffman S, Goldman RI, George MS, Brown TR, Sajda P (2022) Daily prefrontal closed-loop repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) produces progressive EEG quasi-alpha phase entrainment in depressed adults. *Brain Stimul* 15(2): 458–471.  
<https://doi.org/10.1016/j.brs.2022.02.008>
  82. Pino O (2021) A randomized controlled trial (RCT) to explore the effect of audio-visual entrainment among psychological disorders. *Acta Biomed* 92(6): e2021408.  
<https://doi.org/10.23750/abm.v92i6.12089>
  83. Константинов КВ, Леонова МЛ, Мирошников ДБ, Клименко ВМ (2014) Особенности восприятия акустического образа собственной биоэлектрической активности головного мозга. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 100(6): 710–721. [Konstantinov KV, Leonova ML, Miroshnikov DB, Klimentko VM (2014) Peculiarities of perception of the acoustic image of the own bioelectrical activity of the brain. *Russ J Physiol* 100(6): 710–721. (In Russ)].
  84. Константинов КВ, Леонова МЛ, Клименко ВМ (2015) Зависимость динамики в диапазоне тета-волн от временной задержки и уровня согласованности предъявления акустического образа собственной ЭЭГ. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101(4): 381–491. [Konstantinov KV, Leonova ML, Klimentko VM (2015) Dependence of dynamics in the range of theta waves on the time delay and the level of consistency in the presentation of the acoustic image of one's own EEG. *Russ J Physiol* 101(4): 381–491. (In Russ)].
  85. Иванова ВА, Кормушкина ЕА (2021) Применение метода биоакустической коррекции в реабилитации детей раннего возраста с расстройствами аутистического спектра. *Физическая и реабилит мед* 3(1): 48–53. [Ivanova VA, Kormushkina EA (2021) Application of the method of bioacoustic correction in the rehabilitation of young children with autism spectrum disorders. *Fizicheskaya i Reabilit Med* 3(1): 48–53. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.26211/2658-4522-2021-3-1-48-53>
  86. Щегольков АМ, Алехнович АВ, Тимергазина ЭЗ, Дыбов МД, Массальский РИ (2022) Влияние биоакустической коррекции на процесс медицинской реабилитации больных с последствиями преходящих цереброваскулярных нарушений (обзор). *Госпит мед: наука и практика* 5(4): 46–49. [Shchegolkov AM, Alekhnovich AV, Timergazina EZ, Dybov MD, Massal'skii RI (2022) Influence of bioacoustic correction on the process of medical rehabilitation of patients with consequences of transient cerebrovascular disorders (review). *Gospit Med: Nauka i Praktika* 5(4): 46–49. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.34852/GM3CVKG.2022.17.46.009>
  87. Tegeler CL, Gerdes L, Shaltout HA, Cook JF, Simpson SL, Lee SW, Tegeler CH (2017) Successful use of closed-loop allostatic neurotechnology for post-traumatic stress symptoms in military personnel: self-reported and autonomic improvements. *Mil Med Res* 4(1): 38.  
<https://doi.org/10.1186/s40779-017-0147-0>
  88. Tegeler CL, Shaltout HA, Lee SW, Simpson SL, Gerdes L, Tegeler CH (2020) Pilot Trial of a Noninvasive Closed-Loop Neurotechnology for Stress-Related Symptoms in Law Enforcement: Improvements in Self-Reported Symptoms and Autonomic Function. *Glob Adv Health Med* 9: 2164956120923288.  
<https://doi.org/10.1177/2164956120923288>
  89. Shaltout HA, Lee SW, Tegeler CL, Hirsch JR, Simpson SL, Gerdes L, Tegeler CH (2018) Improvements in Heart Rate Variability, Baroreflex Sensitivity, and Sleep After Use of Closed-Loop Allostatic Neurotechnology by a Heterogeneous Cohort. *Front Public Health* 6: 116.  
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00116>
  90. Tegeler CL, Munger Clary H, Shaltout HA, Simpson SL, Gerdes L, Tegeler CH (2023) Cereset Research Standard Operating Procedures for Insomnia: A Randomized, Controlled Clinical

- Trial. *Glob Adv Integr Med Health* 12: 27536130221147475.  
<https://doi.org/10.1177/27536130221147475>
91. *Fedotchev A, Radchenko G, Zemlianaia A* (2018) On one approach to health protection: Music of the brain. *J Integr Neurosci* 17(3–4): 309–315.  
<https://doi.org/10.3233/JIN-170053>
  92. *Fedotchev AI, Bondar' AT, Bakhchina AV, Parin SB, Polevaya SA, Radchenko GS* (2017) Effects of Musical Acoustic Signals Controlled by the Subject's EEG Oscillators. *Neurosci Behav Physiol* 47(1): 47–51.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0365-z>
  93. *Fedotchev AI, Zemlyanaya AA, Savchuk LV, Polevaya SA* (2019) Neurointerface with Double Feedback from Subject's EEG for Correction of Stress-induced States. *Sovrem Tehnol Med* 11(1): 150–154.  
<https://doi.org/10.17691/stm2019.11.1.17>
  94. *Fedotchev AI, Parin SB, Polevaya SA, Zemlyanaya AA* (2022) EEG-based Musical Neurointerfaces in the Correction of Stress-induced States. *Brain-Computer Interfaces* 9(1): 1–6.  
<https://doi.org/10.1080/2326263X2021.1964874>
  95. *Mukhina EA, Polevaya SA, Parin SB, Fedotchev AI* (2021) Cognitive rehabilitation of patients with acute cerebrovascular accident using EEG-guided adaptive neurostimulation. *Opera Med Physiol* 8(4): 90–96.  
<https://doi.org/10.24412/2500-2295-2021-4-90-96>
  96. *Fedotchev AI, Parin SB, Polevaya SA* (2021) Adaptive Neurostimulation Methods in Correcting Posttraumatic Stress Disorder and Professional Burnout Syndrome. *Opera Med Physiol* 8(2): 68–74.  
<https://doi.org/10.24412/2500-2021-2-68-74>
  97. *Polevaya SA, Parin SB, Zemlyanaya AA, Fedotchev AI* (2022) Dynamics of EEG reactions under combination of resonance scanning and adaptive neurostimulation in patients with post-COVID syndrome. *Opera Med Physiol* 9(2): 103–109.  
<https://doi.org/10.24412/2500-2295-2022-2-103-109>
  98. *Fedotchev AI* (2022) Closed-Loop Adaptive Neurostimulation Technologies in Cognitive Rehabilitation of High-Tech Specialists. *Sovrem Tehnol Med* 14(4): 34–40.  
<https://doi.org/10.17691/stm2022.14.4.04>
  99. *Krauss JK, Lipsman N, Aziz T, Boutet A, Brown P, Chang JW, Davidson B, Grill WM, Hariz MI, Horn A, Schulder M, Mammis A, Tass PA, Volkmann J, Lozano AM* (2021) Technology of deep brain stimulation: current status and future directions. *Nat Rev Neurol* 17(2): 75–87.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-020-00426-z>
  100. *Frey J, Cagle J, Johnson KA, Wong JK, Hilliard JD, Butson CR, Okun MS, de Hemptinne C* (2022) Past, Present, and Future of Deep Brain Stimulation: Hardware, Software, Imaging, Physiology and Novel Approaches. *Front Neurol* 13: 825178.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.825178>
  101. *De Ridder D, Maciaczyk J, Vanneste S* (2021) The future of neuromodulation: smart neuromodulation. *Expert Rev Med Devices* 18(4):307–317.  
<https://doi.org/10.1080/17434440.2021.1909470>
  102. *Neumann WJ, Gilron R, Little S, Tinkhauser G* (2023) Adaptive Deep Brain Stimulation: From Experimental Evidence Toward Practical Implementation. *Mov Disord*.  
<https://doi.org/10.1002/mds.29415>
  103. *Chandrabhatla AS, Pomeranec JJ, Horgan TM, Wat EK, Ksendzovsky A* (2023) Landscape and future directions of machine learning applications in closed-loop brain stimulation. *NPJ Digit Med* 6(1): 79.  
<https://doi.org/10.1038/s41746-023-00779-x>
  104. *Takeuchi Y, Berényi A* (2020) Oscillotherapeutics – Time-targeted interventions in epilepsy and beyond. *Neurosci Res* 152: 87–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2020.01.002>
  105. *Földi T, Lőrincz ML, Berényi A* (2021) Temporally Targeted Interactions With Pathologic Oscillations as Therapeutical Targets in Epilepsy and Beyond. *Front Neural Circuits* 15: 784085.  
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.784085>
  106. *Takeuchi Y, Li Q, Kawano T, Nagai J, Mima T* (2022) Editorial: Oscillotherapeutics - toward real-time control of pathological oscillations in the brain. *Front Behav Neurosci* 16: 1021616.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1021616>
  107. *Poltorak A* (2021) Replicating Cortical Signatures May Open the Possibility for “Transplanting” Brain States via Brain Entrainment. *Front Hum Neurosci* 15: 710003.  
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.710003>
  108. *Федотчев АИ, Журавлев ГИ, Ексина КИ, Силантьева ОМ, Полевая СА* (2018) Оценка эффективности музыкального ЭЭГ нейроинтерфейса с дополнительным контуром управления от сердечного ритма. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104(1): 122–128.  
[*Fedotchev AI, Zhuravlev GI, Eksina KI, Silant'eva OM, Polevaya SA* (2018) Evaluation of the

- effectiveness of the musical EEG neural interface with an additional control loop from the heart rate. *Russ J Physiol* 104(1): 122–128. (In Russ)].
109. Федотчев АИ, Парин СБ, Громов КН, Савчук ЛВ, Полевая СА (2019) Комплексная обратная связь от биопотенциалов мозга и сердца в коррекции стресс-индуцированных состояний. *Журн высш нервн деят им ИП Павлова* 69(2): 187–193. [Fedotchev AI, Parin SB, Gromov KN, Savchuk LV, Polevaya SA (2019) Complex feedback from the biopotentials of the brain and heart in the correction of stress-induced conditions. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 69(2): 187–193. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S0044467719020059>
  110. Fedotchev AI, Parin SB, Polevaya SA, Zemlianaia AA (2019) Effects of Audio–Visual Stimulation Automatically Controlled by the Bioelectric Potentials from Human Brain and Heart. *Human Physiol* 45(5): 523–526.  
<https://doi.org/10.1134/S0362119719050025>
  111. Savchuk LV, Polevaya SA, Parin SB, Bondar AT, Fedotchev AI (2022) Resonance Scanning and Analysis of the Electroencephalogram in Determining the Maturity of Cortical Rhythms in Younger Schoolchildren. *Biophysics* 67(2): 274–280.  
<https://doi.org/10.1134/S000635092202018X>
  112. Fedotchev A, Parin S, Polevaya S (2023) Resonance scanning as an efficiency enhancer for EEG-guided adaptive neurostimulation. *Life* 13: 620.  
<https://doi.org/10.3390/life13030620>

### **Methods of Closed-Loop Adaptive Neurostimulation: Features, Achievements and Prospects for Development**

**A. I. Fedotchev\***

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

*\*e-mail: fedotchev@mail.ru*

An innovative approach to the organization of stimulation procedures is analyzed – closed-loop adaptive neurostimulation, in which the parameters of sensory stimulation are automatically controlled by feedback signals from the person’s own physiological characteristics. The effects of using invasive and non-invasive magnetic and electrical brain stimulation, as well as the effects of closed-loop acoustic and audiovisual stimulation, controlled by human rhythmic processes are considered. Numerous examples demonstrate the features and achievements of a new approach in the treatment of various psychosomatic disorders and cognitive rehabilitation of a person. The prospects for development of this research area are outlined. The results of the author’s own research in this direction are presented.

*Keywords:* sensory stimulation, feedback, functional state correction, automatic modulation, electroencephalogram (EEG), heart rate, respiratory rhythm

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

МАРКЕРЫ НЕЙРООНТОГЕНЕЗА В ГИПОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К СТРЕССУ  
ПЕРИОД: СРАВНЕНИЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ И ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. А. О. Манолова<sup>1</sup>, \*, Н. В. Гуляева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

*\*E-mail: anna.manolova@ihna.ru*

Поступила в редакцию 28.08.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 05.09.2023 г.

В настоящее время не вызывает сомнений, что целый ряд заболеваний психоневрологического спектра ассоциированы со стрессом в детском возрасте. Для изучения механизмов раннего стресса используют различные модели на лабораторных грызунах, позволяющие получить данные о механизмах патогенеза психопатологий, которые невозможно исследовать на людях. Для успешной трансляции данных необходимо, в частности, сравнение процессов нейроонтогенеза в момент предъявления воздействия и последующие периоды. В литературе немало сравнительных исследований, касающихся развития нейронов и нейрональных сетей, а также изменений гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. В последние годы достоверно показано, что важным участником как развития мозга, так и его реакции на стресс являются глиальные клетки. Подкрепляется мнение о том, что именно микроглия и астроциты представляют наиболее перспективные мишени для терапевтического воздействия при стресс-зависимых заболеваниях. Тем не менее, до сих пор отсутствуют сравнительные аналитические исследования, охватывающие как стресс-реализующие системы, так и нейрональные и глиальные маркеры развития. Данный обзор, заполняющий этот пробел, может дать новый ракурс для рассмотрения проблем моделирования детского стресса и трансляции полученных данных. Представленный анализ суммирован в сравнительной схеме основных событий нейроонтогенеза лабораторных грызунов и человека в гипочувствительный к стрессу период, эта схема дополняет существующее представление о соответствии этапов развития мозга у лабораторных грызунов и человека. Представленные данные позволяют наметить точки роста и ставят новые вопросы перед исследователями стресса в раннем онтогенезе.

*Ключевые слова:* детский стресс, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, гипочувствительный к стрессу период, микроглия, астроглия

**DOI:** 10.31857/S0869813923090078, **EDN:** ORQDAW

## ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени разработано множество моделей стресса в раннем онтогенезе на животных. Спектр психических и неврологических заболеваний, моделируемых путем воздействия в раннем возрасте, очень широк: от аутизма и шизофрении до депрессии и болезни Альцгеймера. При этом в разных работах, как правило,

---

**Список использованных сокращений:** АКТГ – адрено-кортико-тропный гормон; ГД – гестационный день; ГСП – гипочувствительный к стрессу период; КРФ – кортикотропин рилизинг фактор; НБ – неделя беременности; ПД – постнатальный день.

исследуют влияние стресса изолированно на нейроны и/или связи между ними [1], на различные типы глиальных клеток: астроглию [2, 3], микроглию [4–6], олигодендроциты [7]. При этом очень редко рассматривают взаимодействие различных типов клеток между собой, как это сделано в работах [8, 9].

Сравнение изменений маркеров развития различных систем, а также изменения в их соотношении, вызванные экспериментальным воздействием, необходимо для понимания более полной картины последствий экспериментального воздействия. Несомненно, что при трансляции в клинику данных, полученных на животных моделях, необходимо по возможности убедиться, будут ли эти соотношения сходными с таковыми для человека, чтобы можно было предполагать, что вызванные экспериментальным воздействием изменения отражают ситуацию в клинике. Принято считать, что последовательность событий в развитии нейронов одинакова для всех млекопитающих и основные различия касаются только временных масштабов [10, 11]. При этом с 70-х годов, на основании данных Dobbing и Sands по измерению массы развивающегося мозга, сложилось представление о том, что первая постнатальная неделя жизни лабораторных грызунов соответствует развитию мозга в третьем триместре у человека [12]. Это соответствие показано для развития нейронов и, в целом, оно хорошо соблюдается [10]. Учитывая взаимовлияние разных типов клеток ЦНС, в том числе и во время их развития, несомненно необходимость проверить это соответствие и для основных типов глиальных клеток (микроглии, астроцитов, олигодендроцитов). Однако до настоящего времени не было опубликовано аналитических обзорных данных, охватывающих развитие всех трех типов глиальных клеток в раннем постнатальном онтогенезе, тем более в сравнении с развитием нейронов. В связи с этим, основной целью этого обзора является попытка совмещения на одной временной шкале развития нейронов и глиальных клеток для лабораторных грызунов и для человека с целью сравнения этих соответствующих видовых шкал.

В развитии лимбико-гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси важным этапом является гипочувствительный к стрессу период (ГСП), и в большинстве моделей детского стресса стрессирующее воздействие предьявляется именно в этот период, в связи с чем в данном обзоре основное внимание уделено развитию в ГСП. Объем данных по развитию каждого из типов клеток огромен, и в одном обзоре невозможно подробно рассмотреть все данные, поэтому, в основном, собрана информация по неокортексу и гиппокампу, использованы только некоторые, наиболее изученные маркеры развития и события клеточного онтогенеза. Каждый раздел данного обзора в дальнейшем необходимо будет значительно дополнить и провести более детальный анализ в рамках соответствующих самостоятельных работ. Этот обзор призван впервые создать целостное представление о соответствии развития разных типов клеток ЦНС в период раннего онтогенеза.

## 1. РАЗВИТИЕ НЕЙРОНОВ И ИХ СВЯЗЕЙ

Последовательность основных стадий развития мозга в ходе онтогенеза консервативна среди млекопитающих и достаточно подробно описана [13, 14]. На основе этих описаний создаются математические модели, позволяющие соотносить созревание мозга различных видов млекопитающих (в первую очередь лабораторных грызунов и приматов, в том числе человека) [15, 16]. Существуют также он-лайн базы данных, созданные именно для сравнительного анализа развития мозга разных видов млекопитающих: [www.translatingtime.org](http://www.translatingtime.org), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8361683/>. Зачастую добавление в математическую модель новых событий нейронального онтогенеза приводит к смещению установленных ранее соответствий. При этом во всех работах отмечается сложность сопоставления развития в постнатальном пери-

оде по сравнению с пренатальным периодом, поскольку в постнатальном периоде развитие существенно зависит от афферентации как сенсорного входа извне (окружающая среда) [17–20], так и собственной двигательной активности организма [21–23]. Тем не менее, многие этапы развития мозга, проходящие у грызунов в раннем постнатальном периоде, у человека и высших приматов происходят пренатально. Изначально это предположили Dobbing и Sands [12]. Эти авторы сравнивали скорость изменения веса мозга во время развития у 7 видов млекопитающих, оценивая возраст максимального скачка роста мозга, который они определили как максимальное увеличение отношения веса развивающегося мозга к весу взрослого (зрелого) мозга. Оказалось, что для крыс такой скачок роста мозга приходится на конец первой постнатальной недели (ПД7), а у людей – примерно на день рождения [12]. Это основанное на довольно грубом измерении (только один и при этом макроскопический параметр) представление существовало несколько десятилетий, прежде чем стали появляться сравнительные анализы и модели, учитывающие более тонкие структурные изменения. Тем не менее, более современные исследования в большинстве своем подтверждают это представление, при этом углубляя и уточняя его. Сравнения развития различных видов проводятся по определенным ключевым событиям нейронального онтогенеза, таким как нейрогенез, массивный апоптоз, синаптогенез, элиминация синапсов, миелинизация. Очевидно, что для различных структур мозга эти события происходят в различные временные интервалы. Ниже рассмотрено сравнение этих процессов (для более детального рассмотрения можно обратиться к [10, 24]).

По нейрогенезу сопоставление сроков дает следующую картину. У грызунов нейрогенез в большинстве корковых и подкорковых структур начинается в гестационный день (ГД) 9.5 и заканчивается к 15 постнатальному дню (ПД) [25] (если не принимать во внимание активность нейрогенных ниш взрослого мозга). У людей нейрогенез в отделах коры происходит преимущественно во время эмбрионального развития, но может продолжаться до 2.5-летнего возраста [26, 27]. В гиппокампе пик нейрогенеза у грызунов отмечается в период ГД 14–17 [10], а у людей на 9-й неделе беременности (ГД60) [13]. Важно учитывать, что пирамидные слои аммонова рога гиппокампа развиваются раньше гранулярного слоя зубчатой фасции. Так, на момент рождения у грызунов большинство пирамидных нейронов гиппокампа уже существуют, в то время как в зубчатой фасции присутствует только около 15% гранулярных нейронов [28], а у приматов (макак-резусов) к моменту рождения появляется около 80% гранулярных нейронов [29]. У человека максимальное число гранулярных нейронов зубчатой фасции достигается пренатально, примерно на 34-й неделе беременности [30, 31], в то время как у грызунов максимум наблюдается постнатально, к концу 1-го месяца [32].

Другим важным событием нейронального онтогенеза в развитии мозга является формирование синапсов. Первые исследования синаптогенеза в развивающемся мозге человека были проведены Huttenlocher и соавт. [33]. Авторы продемонстрировали, что синаптогенез начинается около 20-й недели эмбриогенеза. Значительное повышение числа новых синапсов происходит после рождения, особенно в первые постнатальные месяцы, и 50% взрослого уровня синаптической плотности достигаются примерно к двум годам. Последующие работы подтверждали эти данные [34] и уточняли временные периоды синаптогенеза для различных структур: в первичной зрительной коре пик синаптической плотности приходится на возраст 8–12 мес. [35], а в префронтальной коре на возраст 2–4 года [27]. Для гиппокампа характерны следующие базовые временные точки: появление синапсов на дистальных участках дендритов пирамидных нейронов поля СА3 – 3–7-й постнатальные месяцы; появление синапсов на проксимальных частях дендритов пирамидных нейронов поля СА3 – при рождении; созревание синапсов пирамидных

нейронов поля СА3 – в возрасте 3–5 лет [30]; плотность синапсов в молекулярном слое зубчатой фасции достигает уровня взрослого мозга на 7–10-й постнатальные месяцы [36]. При этом в префронтальной коре синаптогенез может идти вплоть до подросткового возраста [37].

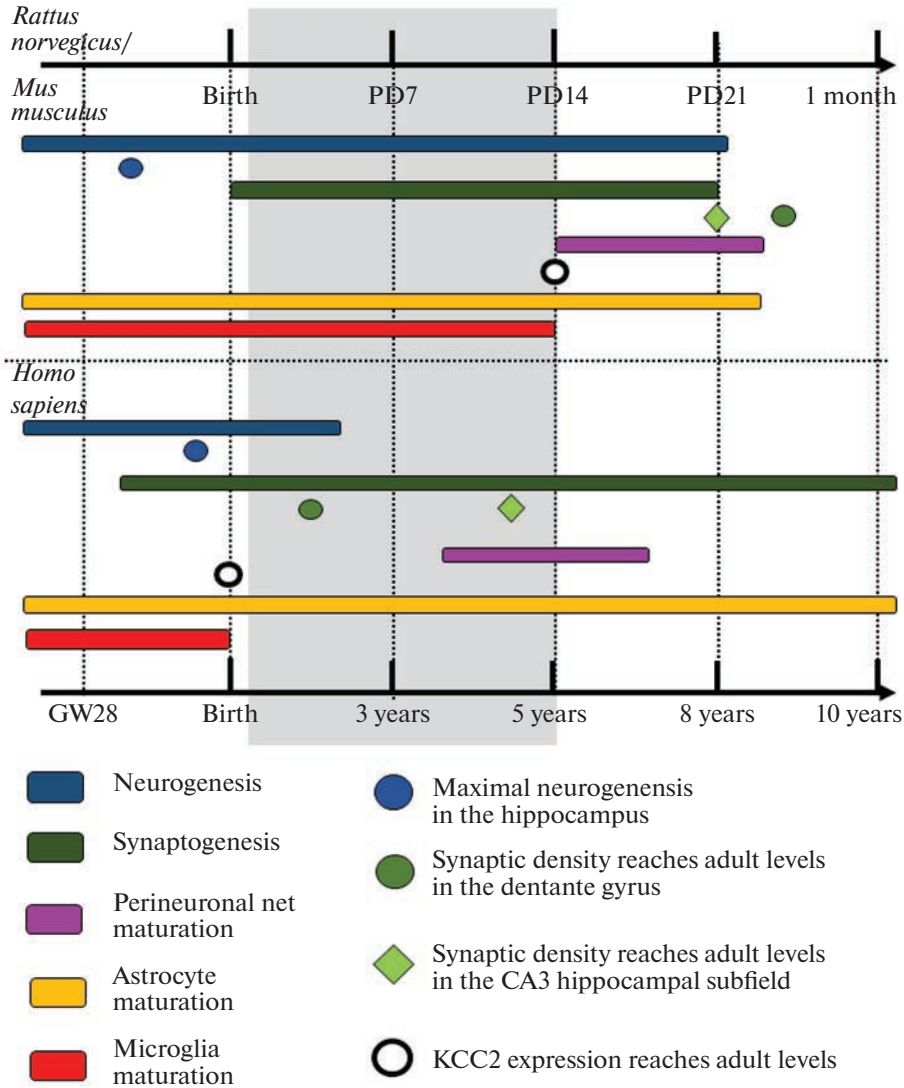
У грызунов критический период синаптогенеза происходит в первые 3 постнатальные недели с пиком на 2-й неделе. Так, синаптическая плотность соматосенсорной коры у крыс и мышей довольно низкая в первую постнатальную неделю, начинает нарастать с ПД10 и достигает взрослого уровня к ПД30 [38, 39]. В молекулярном слое зубчатой фасции до ПД4 число синапсов составляет менее 1% от взрослого уровня, а уровень плотности синапсов, близкий к уровню во взрослом мозге, достигается к ПД25 [40]. Начало увеличения числа синапсов на дендритах пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа соответствует ПД7–9, а уровень, характерный для взрослого мозга, достигается к ПД21 [41]. Одним из маркеров окончания периода синаптогенеза является созревание перинеурональных сетей, окружающих тела и начальные сегменты отростков тормозных нейронов. Перинеурональные сети представляют собой внеклеточный матрикс, состоящий из хондроитинсульфата, гиалуриновой кислоты и протеогликанов (в частности агреккана). Показано, что в коре мозга крыс созревание перинеурональных сетей заканчивается к ПД14–26 [42]. В работе [43] показано, что у человека агреккан начинает экспрессироваться в префронтальной коре через 2 мес. после рождения, а в гиппокампе – не раньше, чем в 2 года. Примерно к 8-ми годам перинеурональные сети приобретают вид, неотличимый от перинеурональных сетей взрослого мозга. В другой работе показано, что в возрасте от 12 до 25 лет у человека перинеурональные сети почти не изменяются, и это косвенно подтверждает представление о том, что созревание перинеурональных сетей заканчивается раньше 12 лет [44].

Важным событием нейронального онтогенеза является сдвиг в сигналинге ГАМКергической системы. Активация рецепторов ГАМК в незрелом мозге запускает деполаризацию и возбуждение, в то время как во взрослом мозге реализуется тормозная роль ГАМК-сигналинга [45]. Опосредованное ГАМК возбуждение в незрелом мозге считают важным во многих процессах, происходящих при развитии, включая дифференцировку нейронов и ветвление дендритного дерева [45, 46]. В основе происходящего при развитии функционального изменения ГАМКергической системы лежит градиент внутри- и внеклеточной концентрации хлорид анионов. В развивающемся мозге внутриклеточная концентрация этих ионов выше за счет специфических транспортеров, включающих NKCC1 (Na–K–Cl ко-транспортер, осуществляющий импорт хлорида) и KCC2 (K–Cl ко-транспортер, осуществляющий экспорт хлорида) [47]. Экспрессия NKCC1 достаточно высока во время эмбриогенеза и в раннем постнатальном периоде, а активность KCC2 в это время минимальна, в результате чего хлорид анион накапливается в незрелых нейронах. Экспрессия KCC2 увеличивается к концу второй постнатальной недели в коре мозга крыс [46, 48], а у людей примерно через 40 недель после зачатия [49].

Таким образом, по таким показателям, как нейрогенез и экспрессия транспортеров хлорид-анионов, развитие мозга приматов, и в частности человека, в третьем триместре беременности, действительно, соответствует примерно ПД1–ПД7–10 у лабораторных грызунов. При этом значительная часть синаптогенеза в коре у обеих этих групп млекопитающих проходит в постнатальном периоде (рис. 1).

## 2. СОЗРЕВАНИЕ ДРУГИХ ТИПОВ КЛЕТОК

Принципиально важно, что для нормального созревания нейронов необходима соответствующая среда. Эту среду в значительной степени формируют глиальные клетки: микроглия и астроглия. Поэтапное созревание нейронов и их связей ассо-



**Рис. 1.** Сравнение основных событий нейроонтогенеза лабораторных грызунов и человека в гипочувствительный к стрессу период (ГСП) (по данным, представленным в работах [10, 30, 42, 43, 48, 49, 56, 61, 62, 67, 68, 82]). Поскольку соответствие шкал возрастов довольно условное, эти шкалы нормированы именно по ГСП. Как у грызунов, так и у человека в ГСП проходят синаптогенез и созревание астроцитов, что соответствует предположению об ассоциации ГСП с усиленной адаптацией к условиям внешней среды в раннем онтогенезе. При этом основная волна нейрогенеза и переключение транспортеров хлорид-ионов на тормозных нейронах у человека происходит до ГСП, в то время как у грызунов идет во время ГСП. Обращает на себя внимание, что созревание микроглии происходит у человека, в основном, до рождения, в то время как у грызунов последние стадии созревания микроглии идут именно в ГСП. Способность зрелой микроглии к активации у взрослых программируется у незрелой микроглии глюкокортикоидами. Потенциально более высокая подверженность микроглии активации может быть ассоциирована с повышенным риском развития психоневрологических заболеваний. Поэтому созревание микроглии у лабораторных грызунов и человека на разном “глюкокортикоидном фоне” вызывает вопросы, как к правомерности трансляции данных модельных экспериментов в клинику, так и к самой постановке модельных экспериментов. ГСП выделен серым фоном. ПД – постнатальный день; KCC2 – K–Cl котранспортер.



цировано с поэтапным созреванием глиальных клеток. Клетки микроглии не только фагоцитируют апоптотирующие нейроны, но и выделяют разнообразные факторы, способствующие выживанию нейронов и прорастанию аксонов [50, 51]. В свою очередь, нейроны зависимо от их активности влияют на состояние микроглиальных клеток [52]. Одним из механизмов такого влияния может быть выделение нейронами фракталкина (хемокина CX3CL1) [53, 54]. Созревание астроцитов также происходит параллельно с созреванием нейрональных сетей, и при этом осуществляется взаимовлияние этих типов клеток. Например, астроциты секретируют компоненты внеклеточного матрикса тромбоспондины, протеогликаны глипиканы и многие другие молекулы, необходимые для синаптогенеза [55], при этом само развитие/созревание астроцитов зависит от активности нейронов [56]. Неудивительно, что проводятся исследования взаимодействия трех типов клеток (нейронов, астроцитов и микроглии) [57]. Получены данные о влиянии уже зрелых микроглиоцитов на процесс миелинизации: не влияя на созревание олигодендроглии само по себе, микроглия регулирует степень миелинизации, выделяя трансформирующий фактор роста бета (TGFbeta) [58]. Ниже проведено сравнение периодов созревания каждого типа глиальных клеток у лабораторных грызунов и у человека. Более развернутое описание созревания микроглии и астроцитов описано и проанализировано в нашей недавней работе [59].

### *2.1. Микроглия*

В период массивного апоптоза нейронов микроглия в развивающемся мозге еще не зрелая (так называемая “пре-микроглия” [60]). Пре-микроглия отличается от микроглии во взрослом мозге формой, паттерном экспрессии генов, набором белков. Этот период, в котором микроглия находится в переходной форме, у грызунов продолжается с ГД14 по ПД9 [60]. Несмотря на то, что, как считают, основная функция пре-микроглии – фагоцитоз апоптотирующих нейронов (и эта функция сохраняется у зрелой микроглии), эта форма микроглии отличается от амебной микроглии взрослого мозга, появляющейся в патологических условиях: пре-микроглия лишь незначительно секретирует провоспалительные цитокины, и профиль экспрессии ее генов значительно отличается от такового активированной микроглии взрослого мозга [61, 62]. У грызунов этот этап созревания микроглии заканчивается к концу первой постнатальной недели. Изменяется форма клеток, паттерн экспрессии генов и одной из основных функций микроглии становится фагоцитоз синапсов (synapse pruning) [63]. К концу второй постнатальной недели паттерн экспрессии генов микроглии фактически не отличается от такового у микроглии во взрослом мозге [62]. Однако время созревания микроглии различается в разных структурах. Так, например, в гиппокампе микроглия аммонова рога (полей CA1 и CA3) созревает раньше, чем в зубчатой фасции [64], а в преоптическом ядре гипоталамуса в ПД2 идет уже прунинг синапсов микроглией, требующий более зрелой формы клеток [65]. В течение первых двух постнатальных недель параллельно с созреванием происходит увеличение числа клеток [66]. У людей, предположительно, стадия пре-микроглии начинается со второй половины беременности: в это время заканчивается миграция клеток микроглии и начинается трансформация морфологии клеток – клетки принимают более зрелую, рамифицированную форму [67]. К 35-й неделе беременности клетки микроглии человеческого плода уже имеют морфологию, полностью сходную с таковой микроглии во взрослом мозге [68]. Стадия пре-микроглии идет параллельно с массивным нейрогенезом, сопровождающимся значительным апоптозом. У грызунов созревание микроглии и окончание массивного нейрогенеза совпадают по времени (ПД14–15), а у людей созревание микроглии заканчивается несколько раньше окончания массивного

ванного нейрогенеза [68–70], хотя для того, чтобы с уверенностью можно было это утверждать, необходимо уточнение данных по структурам. Интересно, что и созревание иммунной системы человека (и высших приматов) считается завершенным на 40-й неделе беременности [71], т.е. по срокам этот период совпадает с созреванием микроглии.

Как и у лабораторных грызунов, у людей период синаптогенеза связан с увеличением числа клеток и качественными изменениями микроглии. Так, показано, что у людей число микроглиоцитов во фронтальной коре (поле 6) нарастает с рождения и достигает максимума в период 3–7 лет, после чего начинает снижаться [72]. Авторы считают, что повышение плотности микроглиоцитов происходит параллельно со снижением числа пирамидных нейронов и может быть связано с фагоцитированием апоптотических телец. Исследование [73] показало, что гиппокампальную микроглию по свойствам транскриптома можно разделить на 5 подпопуляций. Одна из них соответствует большинству клеток во взрослом гиппокампе, и доля клеток этого типа от общего числа микроглиальных клеток увеличивается с возрастом, не прекращая увеличиваться даже после пубертатного периода. Клетки этого типа экспрессируют белок комплекса гистосовместимости II CD83, цитокин CCL2 и транскрипционный фактор EGR3, а сам тип клеток связывают с мониторингом окружения и определяют как “специфичный для человека основной гомеостатический подтип с небольшой степенью активации”. Доля клеток другой подпопуляции, экспрессирующих гликопротеин внеклеточного матрикса секретиремый фосфопротеин 1 (SPP1) и триггерный рецептор миелоидных клеток 2 (TREM2, трансмембранный метаботропный рецептор, ассоциированный с активацией кальций-зависимых киназ внутри клетки, связанный с фагоцитирующей функцией микроглии) уменьшается с возрастом, начиная с раннего детского, а после подросткового составляет лишь малую часть всей популяции. Этот тип клеток ассоциируют с аутофагией и нейровоспалительным ответом. Другие подпопуляции по паттерну экспрессируемых ими генов связывают с ремоделированием аксонов и синапсов, а также с дифференцировкой глии и миелинизацией. Число клеток этих типов не меняется с возрастом. Таким образом, у людей изменения микроглии более пролонгированы, чем у лабораторных грызунов, у которых не обнаружено развития микроглиальных клеток позднее ПД14 [61, 62].

## 2.2. Астроглия

Синаптогенез является следующей ключевой стадией развития нейронов после пролиферации и апоптоза. В этом процессе принимают активное участие как микроглия, так и астроциты. У грызунов в коре мозга этот процесс активно происходит на протяжении 2 и 3 постнатальных недель. Активная пролиферация астроцитов идет на первой постнатальной неделе [74], когда астроциты участвуют в формировании гемато-энцефалического барьера [75]. Также на первой неделе астроциты начинают экспрессировать рецепторы и транспортеры глутамата (транспортер возбуждающих аминокислот 1, EAAT-1, и транспортер глутамата 1, GLT-1) [76, 77]. В период ПД14–26 в неокортексе происходит созревание протоплазматических астроцитов и обволакивание синапсов концевыми пластинками астроцитов [56]. Тромбоспондины, глипиканы и другие молекулы, секретиремые астроцитами в этот период, необходимы для формирования возбуждающих путей, которое в это время идет особенно активно [55, 78]. Параллельно происходит созревание самих астроцитов, а также связей между ними [79, 80]. Если у грызунов массивированный астроцитогенез следует за нейрогенезом, то у людей нейрогенез и глиогенез, по всей видимости, существенно перекрываются по времени [81, 82]. У грызунов дифференцировка астроцитов из клеток-предшественников идет, в основном, постна-

тально, в то время как у людей зрелые, полностью дифференцированные астроциты присутствуют уже в первой половине беременности [83]. Тем не менее, и у людей, и у грызунов значимое увеличение плотности популяции астроцитов в коре происходит постнатально. Так, показано, что плотность популяции астроцитов возрастает в неокортексе (поля 6 и 17) почти в 2 раза у грудных детей по сравнению с плодами второй половины беременности, а затем постепенно снижается к юношескому возрасту, причем снижение составляет около 15% [84]. Если во взрослом мозге мышей соотношение астроцитов к нейронам составляет 1 : 3, то у людей оно 1 : 1.4 [85]. Но различие астроцитов в мозге грызунов и людей не ограничивается их относительным количеством: опубликованы работы о качественных различиях, и полученные данные показывают, что астроциты людей как морфологически [86], так и функционально отличны от астроцитов грызунов [87]. Сравнительный анализ транскриптомов астроцитов мыши и человека показал, что в астроцитах человека повышена экспрессия гена вовлеченного в метаболизм жирных кислот аполиipoproteина С-II (APOC2), а также генов ферментов альфа-амилазы 2В (AMY2B) и кинуренин аминотрансферазы 2 (AADAT), участвующих соответственно в метаболизме гликогена и возбуждающей трансмиссии, опосредованной трансаминазой [88]. В то же время в астроцитах мыши наиболее высока экспрессия генов, вовлеченных в митохондриальное дыхание [89]. Для человеческих астроцитов характерна повышенная секреция внеклеточных факторов и элементов внеклеточного матрикса [89]. Например, когда ближе к окончанию периода массивированного синаптогенеза снижается секреция астроцитами тромбоспондинов TSP1 и TSP2, начинается секреция TSP4 [78], который считается ответственным за поддержание синаптогенеза во взрослом мозге. При этом показано, что в мозге человека экспрессия TSP4 значимо выше, чем экспрессия во взрослом мозге других видов, включая низших нечеловекообразных приматов [90]. Таким образом, как и в случае с микроглией, развитие астроцитов сопровождается развитием нейрональных сетей. Однако, несмотря на это сходство с развитием астроцитов у лабораторных грызунов, специализация астроцитов человека и выполняемые ими функции значительно шире, и развитие астроцитов более пролонгировано. Учитывая перечисленные выше факты, сравнение периодов развития таких эволюционно неконсервативных клеток представляется довольно сложным, и это по крайней мере должно быть учтено при интерпретации данных на лабораторных животных с трансляцией на человека.

### *2.3. Олигодендроциты и миелинизация*

Миелинизация является одним из важных нейрональных событий онтогенеза. Несмотря на то, что некоторые процессы миелинизации уже идут в ГСП, наиболее активно миелинизация происходит уже после него. Так, у грызунов пик миелинизации приходится примерно на ПД20 [91], а у людей — на 17 лет [92]. Несомненно, стрессорные воздействия в более ранний период влияют на процесс миелинизации в соответствующих возрастах, но такое влияние может осуществляться путем регуляции созревания олигодендроцитов, а также опосредованно путем изменения состояния микроглии и астроцитов. У крыс в возрасте с ПД0 по ПД7 в неокортексе и гиппокампе возрастает число предшественников олигодендроцитов (OPC, oligodendrocyte precursor cells) [93], а с ПД7 по ПД11 примерно в 2.5 раза увеличивается число пре-олигодендроцитов (немиелинизирующих, митотически активных предшественников олигодендроцитов) [94]. У людей пре-олигодендроциты преобладают в популяции (с учетом всех клеток, относящихся к разным типам олигодендроцитов) в период с 18-й по 28-ю неделю после зачатия, а в период 28–40 нед преобладают уже незрелые олигодендроциты (постмитотические, миелинизирующие)

[95, 96]. В постнатальном периоде в гиппокампе процент предшественников олигодендроцитов и пре-олигодендроцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор, связанный с экспрессией ренина, SOX-6, снижается от примерно 35% от всей популяции олигодендроцитов у новорожденных до 20% у подростков и далее остается неизменным до взрослого возраста [73]. Таким образом, у крыс идет активная пролиферация предшественников олигодендроцитов и дифференцировка пре-олигодендроцитов в ранний постнатальный период, в то время как у человека эти процессы, в основном, проходят пренатально, но процесс дифференцировки олигодендроцитов в гиппокампе проходит в постнатальный период.

### 3. СРАВНЕНИЕ ГИПОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К СТРЕССУ ПЕРИОДА

Известно, что в первые две недели жизни у грызунов функционирование системы стресс-реакции значительно отличается от такового у взрослых животных: уровень циркулирующих глюкокортикоидов низкий, и отсутствует повышение уровня адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортикостерона в ответ на ряд стрессирующих воздействий [97]. Предполагается, что в этот период происходит формирование обратных связей гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [98]. Важно, что для развития (в том числе деления и дифференцировки клеток) необходим определенный уровень глюкокортикоидов. Несмотря на то, что высокий их уровень подавляет развитие, глюкокортикоиды необходимы для регуляции экспрессии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, необходимой для миелинизации [99]. Определенный уровень глюкокортикоидов необходим также для оптимального баланса нейротрансмиттеров в верхнем шейном ганглии [100]. Если предполагать, что такой относительно низкий и стабильный уровень глюкокортикоидов необходим для тех процессов нейроонтогенеза, которые происходят у крыс в ПД2–14, то аналогичную стабилизацию кортизола на некотором невысоком уровне можно было бы ожидать у людей во второй половине третьего триместра и до 6 месяцев–года. Однако в третьем триместре у плода наблюдают повышение секреции кортизола [101, 102]. Примерно с 34–35-й недели беременности снижается уровень фермента 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназы типа 2 (11beta-HSD-2) [103, 104], инактивирующей в ходе беременности кортизол матери. Предполагается, что увеличение доли материнского кортизола на последних сроках беременности приводит к снижению секреции АКТГ плодом, что, в свою очередь, должно гарантировать своевременное созревание органов плода [105]. Возможно, что этот механизм отчасти является аналогом ГСП у грызунов (имея в виду часть этого периода с ПД2 по ПД7–10). При этом кажется логичным, что развитие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (и тем более лимбико-гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой) оси должно происходить постнатально, так как именно в постнатальный период значительно повышается количество стрессирующих стимулов и, следовательно, необходимость адаптации к ним. Действительно, показано, что у новорожденных постепенно снижается ответ на стрессирующий стимул в течение первого полугодия жизни [106], и вплоть до дошкольного возраста уровень кортизола у детей почти не повышается в ответ на стрессирующие стимулы [107]. При интерпретации этих данных следует учесть ряд экспериментальных ограничений. Во-первых, применяют неинвазивные методики определения кортизола у детей, как правило, используя в качестве биоматериала слюну, оценка кортизола в которой имеет ряд недостатков [108]. Во вторых, у детей сложно измерить уровень АКТГ (так как это требует взятия крови) и, тем более, кортикотропин рилизинг фактора (КРФ), оценка достоверного уровня которого требует в качестве биоматериала цереброспинальную жидкость. В-третьих, на уровень кортизола у детей влияет присутствие значимого взрослого во время стрессирующего воздействия: в отсутствие

значимого взрослого уровень кортизола поднимается на те стимулы, которые остаются незначимыми в его присутствии [107]. Важно, что у крыс в случае депривации кормящей самки также появляется увеличение уровня циркулирующих глюкокортикоидов в ответ на стрессирующее воздействие в ГСП [109]. В-четвертых, реакция на стресс существенно зависит от темперамента ребенка [110] и от семейной предыстории (например, наличия у матери депрессии на поздних сроках беременности или после родов) [111]. Тем не менее, период с 6 месяцев и до дошкольного возраста (4–6 лет) выделяется исследователями как период с отсутствием повышения уровня кортизола в ответ на стрессирующее воздействие [107, 112]. В это время у детей идет развитие мозжечка (миграция клеток, дифференцировка и миелинизация), активны синаптогенез и миелинизация в соматосенсорной, слуховой и ассоциативной областях коры, а также параллельно с этими процессами идет глиогенез (не столько пролиферация, сколько созревание самих клеток, связей между ними и формирование миелиновых оболочек олигодендроцитами) [10]. До настоящего времени неясно, в какой степени отсутствие ответа стресс-реализующей системы связано с созреванием и ростом органов, в том числе ЦНС, а также с созреванием и стабилизацией самой системы стресс-реализации (лимбико-гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании стресса в детском возрасте необходимо учитывать то, что зачастую воздействие наносится во время ГСП. И у лабораторных грызунов, и у людей этот период является постнатальным: он начинается через небольшое время после рождения (у грызунов – в ПД2, у людей – с 6 мес.) и заканчивается раньше подросткового возраста (у грызунов – в ПД14, у людей – примерно в 4–6 лет). В данном обзоре был проведен анализ развития трех типов глиальных клеток (микроглии, астроцитов и олигодендроцитов) в ГСП в сравнении с развитием нейронов. Основные выводы этого анализа схематически суммированы на рис. 1. Сформировавшееся представление о том, что стабильный низкий уровень глюкокортикоидов необходим для адекватного развития нейрональных систем, представляется очень логичным и разумным, но непонятно, как увязать его с тем фактом, что на данный постнатальный период развития как у грызунов, так и у людей приходится различные ключевые события нейроонтогенеза, зависимые от глюкокортикоидов. Так, у грызунов ГСП совпадает с периодом массивного нейрогенеза, в то время как у людей массивный нейрогенез происходит пренатально, т.е. до ГСП. Взрослый уровень экспрессии KCC2 в мозге грызунов достигается к концу ГСП, при этом у людей он отмечается уже на момент рождения, т.е. также раньше ГСП. Синаптогенез и созревание астроцитов и у людей, и у грызунов начинается раньше ГСП и продолжается после него. В контексте стресса в раннем онтогенезе и связанных с ним психоневрологических заболеваний особое внимание обращает на себя тот факт, что у грызунов окончание ГСП совпадает с созреванием микроглии, а у людей созревание микроглии, в основном, происходит пренатально, в третьем триместре. Для микроглии показано “программирование” глюкокортикоидами, определяющее порог активации микроглии фактически на всю последующую жизнь. Следовательно, у грызунов микроглия созревает на фоне пониженного уровня циркулирующих глюкокортикоидов, в то время как у людей для периода созревания микроглии (третий триместр) показан повышенный уровень циркулирующих глюкокортикоидов. Иммунная система грызунов дозревает постнатально, и ее дозревание совпадает как с созреванием микроглии, так и с ГСП. У людей иммунная система считается зрелой к моменту рождения, т.е. ее созревание и созревание микроглии совпадают между собой, но не совпадают с ГСП. Учитывая важность

состояния микроглии при развитии заболеваний психоневрологического спектра, тот факт, что ее развитие происходит у людей и на моделях у грызунов на разном фоне циркулирующих глюкокортикоидов, позволяет ставить вопрос о корректности прямой трансляции данных, полученных на моделях детского стресса с предъяснением воздействия в раннем постнатальном периоде. Необходимо дальнейшее исследование созревания микроглии у людей в постнатальном периоде с учетом различных маркеров конкретных структур мозга для того, чтобы можно было с уверенностью говорить о сравнении механизмов этиологии заболеваний, вызванных стрессом в раннем онтогенезе, у лабораторных грызунов и человека и корректно транслировать экспериментальные данные в клинику.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00463).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.О.М., Н.В.Г.), сбор данных (А.О.М.), анализ данных (А.О.М., Н.В.Г.), написание и редактирование манускрипта (А.О.М., Н.В.Г.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kronman H, Torres-Berrio A, Sidoli S, Issler O, Godino A, Ramakrishnan A, Mews P, Lardner CK, Parise EM, Walker DM, van der Zee YY, Browne CJ, Boyce BF, Neve R, Garcia BA, Shen L, Peña CJ, Nestler EJ* (2021) Long-term behavioral and cell-type-specific molecular effects of early life stress are mediated by H3K79me2 dynamics in medium spiny neurons. *Nat Neurosci* 24: 667–676. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00814-8>
2. *Abbink MR, Kotah JM, Hoeijmakers L, Mak A, Yvon-Durocher G, van der Gaag B, Lucassen PJ, Korosi A* (2020) Characterization of astrocytes throughout life in wildtype and APP/PS1 mice after early-life stress exposure. *J Neuroinflammation* 17: 91. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01762-z>
3. *Wu X, Li L, Zhou B, Wang J, Shao W* (2023) Connexin 43 regulates astrocyte dysfunction and cognitive deficits in early life stress-treated mice. *Exp Brain Res* 241: 1207–1214. <https://doi.org/10.1007/s00221-023-06587-9>
4. *Osborne BF, Turano A, Caulfield JJ, Schwarz JM* (2019) Sex- and region-specific differences in microglia phenotype and characterization of the peripheral immune response following early-life infection in neonatal male and female rats. *Neurosci Lett* 692: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.044>
5. *Bilbo SD* (2010) Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. *Neurobiol Learn Mem* 94: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.001>
6. *Reemst K, Kracht L, Kotah JM, Rahimian R, van Irsen AAS, Congrains Sotomayor G, Verboon LN, Brouwer N, Simard S, Turecki G, Mechawar N, Kooistra SM, Eggen BJJ, Korosi A* (2022) Early-life stress lastingly impacts microglial transcriptome and function under basal and immune-challenged conditions. *Transl Psychiatry* 12: 507. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02265-6>
7. *Breton JM, Barraza M, Hu KY, Frias SJ, Long KLP, Kaufer D* (2021) Juvenile exposure to acute traumatic stress leads to long-lasting alterations in grey matter myelination in adult female but not male rats. *Neurobiol Stress* 14: 100319. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100319>
8. *Bolton JL, Short AK, Othy S, Kooiker CL, Shao M, Gunn BG, Beck J, Bai X, Law SM, Savage JC, Lambert JJ, Belelli D, Tremblay M-È, Cahalan MD, Baram TZ* (2022) Early stress-induced impaired microglial pruning of excitatory synapses on immature CRH-expressing neurons provokes aberrant adult stress responses. *Cell Rep* 38: 110600. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110600>

9. *Teissier A, Le Magueresse C, Olusakin J, Andrade da Costa BLS, De Stasi AM, Bacci A, Imamura Kawasawa Y, Vaidya VA, Gaspar P* (2020) Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry* 25: 1159–1174.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2>
10. *Rice D, Barone S* (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3: 511–533.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
11. *Fung SJ, Webster MJ, Sivagnanasundaram S, Duncan C, Elashoff M, Weickert CS* (2010) Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 167: 1479–1488.  
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09060784>
12. *Dobbing J, Sands J* (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3: 79–83.  
[https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90022-7)
13. *Clancy B, Kersh B, Hyde J, Darlington RB, Anand KJS, Finlay BL* (2007) Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics* 5: 79–94.  
<https://doi.org/10.1385/ni:5:1:79>
14. *Molnár Z, Clowry G* (2012) Cerebral cortical development in rodents and primates. *Prog Brain Res* 195: 45–70.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00003-9>
15. *Clancy B, Darlington RB, Finlay BL* (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105: 7–17.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00171-3)
16. *Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL* (2013) Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33: 7368–7383.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013>
17. *Raevsky VV, Alexandrov LI, Vorobyeva AD, Golubeva TB, Korneeva EV, Kudriashov IE, Kudriashova IV, Pigareva ML, Sitnikova EYu, Stashkevitch IS* (1997) Sensory information—The major factor of ontogeny. *Neurosci Behav Physiol* 27: 455–461.  
<https://doi.org/10.1007/BF02462947>
18. *Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S, Rico-Barrio I, Lafuente JV, Argandoña EG* (2012) Enriched and deprived sensory experience induces structural changes and rewires connectivity during the postnatal development of the brain. *Neural Plast* 2012: 305693.  
<https://doi.org/10.1155/2012/305693>
19. *Henschke JU, Oelschlegel AM, Angenstein F, Ohl FW, Goldschmidt J, Kanold PO, Budinger E* (2018) Early sensory experience influences the development of multisensory thalamocortical and intracortical connections of primary sensory cortices. *Brain Struct Funct* 223: 1165–1190.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1549-1>
20. *Hensch TK* (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6: 877–888.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1787>
21. *Sibinga MS, Friedman CJ, Steisel IM, Sinnamon HM* (1968) The effect of immobilization and sensory restriction on children with phenylketonuria. *Pediatr Res* 2: 371–377.  
<https://doi.org/10.1203/00006450-196809000-00006>
22. *Baek S-S, Jun T-W, Kim K-J, Shin M-S, Kang S-Y, Kim C-J* (2012) Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups. *Brain Dev* 34: 45–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2011.01.011>
23. *Gomes da Silva S, Arida RM* (2015) Physical activity and brain development. *Expert Rev Neurother* 15: 1041–1051.  
<https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1077115>
24. *Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ* (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106–107: 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
25. *Babikian T, Prins ML, Cai Y, Barkhoudarian G, Hartonian I, Hovda DA, Giza CC* (2010) Molecular and physiological responses to juvenile traumatic brain injury: focus on growth and metabolism. *Dev Neurosci* 32: 431–441.  
<https://doi.org/10.1159/000320667>
26. *Herschkowitz N, Kagan J, Zilles K* (1997) Neurobiological bases of behavioral development in the first year. *Neuropediatrics* 28: 296–306.  
<https://doi.org/10.1055/s-2007-973720>
27. *Lenroot RK, Giedd JN* (2006) Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 718–729.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.001>

28. *Diamond A* (1990) Rate of maturation of the hippocampus and the developmental progression of children's performance on the delayed non-matching to sample and visual paired comparison tasks. *Ann N Y Acad Sci* 608: 394–426; discussion 426–433.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb48904.x>
29. *Rakic P, Nowakowski RS* (1981) The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 196: 99–128.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901960109>
30. *Seress L, Ribak CE* (1995) Postnatal development and synaptic connections of hilar mossy cells in the hippocampal dentate gyrus of rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 355: 93–110.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903550111>
31. *Arnold SE, Trojanowski JQ* (1996) Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *J Comp Neurol* 367: 274–292.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960401\)367:2<274::AID-CNE9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960401)367:2<274::AID-CNE9>3.0.CO;2-2)
32. *Bayer SA* (1980) Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 190: 87–114.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901900107>
33. *Huttenlocher PR* (1979) Synaptic density in human frontal cortex – developmental changes and effects of aging. *Brain Res* 163: 195–205.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90349-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90349-4)
34. *Huttenlocher PR, Dabholkar AS* (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 387: 167–178.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19971020\)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971020)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z)
35. *Huttenlocher PR, de Courten C, Garey LJ, Van der Loos H* (1982) Synaptogenesis in human visual cortex—evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci Lett* 33: 247–52.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90379-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90379-2)
36. *Seress L, Abraham H* (2001) Pre- and postnatal morphological development of the human hippocampal formation. In: *Handbook of developmental cognitive neuroscience*. MIT press. 936.
37. *Uylings HBM, Van Eden CG* (1991) Chapter 3 Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier. 31–62.
38. *De Felipe J, Marco P, Fairén A, Jones EG* (1997) Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cereb Cortex N Y N* 1991 7: 619–634.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/7.7.619>
39. *Micheva KD, Beaulieu C* (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373: 340–354.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960923\)373:3<340::AID-CNE3>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960923)373:3<340::AID-CNE3>3.0.CO;2-2)
40. *Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G* (1973) A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 63: 195–204.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90088-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90088-7)
41. *Ribak CE, Seress L, Amaral DG* (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14: 835–857.  
<https://doi.org/10.1007/BF01170832>
42. *Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Nishi M* (2015) Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plast* 2015: 256389.  
<https://doi.org/10.1155/2015/256389>
43. *Rogers SL, Rankin-Gee E, Risbud RM, Porter BE, Marsh ED* (2018) Normal Development of the Perineuronal Net in Humans; In Patients with and without Epilepsy. *Neuroscience* 384: 350–360.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.039>
44. *Mauney SA, Athanas KM, Pantazopoulos H, Shaskan N, Passeri E, Berretta S, Woo T-UW* (2013) Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 74: 427–435.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.007>
45. *Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E* (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 18: 467–486.  
<https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
46. *Tyzio R, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R* (2007) Timing of the developmental switch in GABA(A) mediated signaling from excitation to inhibition in CA3 rat hippocampus using gramicidin perforated patch and extracellular recordings. *Epilepsia* 48 Suppl 5: 96–105.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01295.x>



47. *Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K* (2009) Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 61: 820–838.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>
48. *Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R* (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87: 1215–1284.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
49. *Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ* (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11: 1205–1213.  
<https://doi.org/10.1038/nm1301>
50. *Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A* (2014) Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur J Neurosci* 39: 1551–1557.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12508>
51. *Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T* (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16: 543–551.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3358>
52. *Logiacco F, Xia P, Georgiev SV, Franconi C, Chang Y-J, Ugursu B, Sporbert A, Kühn R, Kettenmann H, Semtner M* (2021) Microglia sense neuronal activity via GABA in the early postnatal hippocampus. *Cell Rep* 37: 110128.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110128>
53. *Méndez-Salcido FA, Torres-Flores MI, Ordaz B, Peña-Ortega F* (2022) Abnormal innate and learned behavior induced by neuron-microglia miscommunication is related to CA3 reconfiguration. *Glia* 70: 1630–1651.  
<https://doi.org/10.1002/glia.24185>
54. *Bertot C, Groc L, Avignone E* (2019) Role of CX3CR1 Signaling on the Maturation of GABAergic Transmission and Neuronal Network Activity in the Neonate Hippocampus. *Neuroscience* 406: 186–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.006>
55. *Clarke LE, Barres BA* (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14: 311–321.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3484>
56. *Morel L, Higashimori H, Tolman M, Yang Y* (2014) VGluT1+ Neuronal Glutamatergic Signaling Regulates Postnatal Developmental Maturation of Cortical Protoplasmic Astroglia. *J Neurosci* 34: 10950–10962.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-14.2014>
57. *Lana D, Ugolini F, Nosi D, Wenk GL, Giovannini MG* (2021) The Emerging Role of the Interplay Among Astrocytes, Microglia, and Neurons in the Hippocampus in Health and Disease. *Front Aging Neurosci* 13: 651973.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.651973>
58. *McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, Uyeda A, Bogie JFJ, Hoffmann A, Holloway RK, Molina-Gonzalez I, Askew KE, Mitchell S, Mungall W, Dodds M, Dittmayer C, Moss J, Rose J, Szymkowiak S, Amann L, McColl BW, Prinz M, Spires-Jones TL, Stenzel W, Horsburgh K, Hendriks JJA, Pridans C, Muramatsu R, Williams A, Priller J, Miron VE* (2023) Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature* 613: 120–129.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05534-y>
59. *Aniol V, Manolova A, Gulyaeva N* (2022) Early Life Events and Maturation of the Dentate Gyrus: Implications for Neurons and Glial Cells. *Int J Mol Sci* 23.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23084261>
60. *Lenz KM, Nelson LH* (2018) Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Front Immunol* 9: 698.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00698>
61. *Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA* (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1738–E1746.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
62. *Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, Vargas Aguilar S, Spinrad A, Sarrazin S, Ben-Yehuda H, David E, Zelada González F, Perrin P, Keren-Shaul H, Gury M, Lara-Astaiso D, Thaiss CA, Cohen M, Bahar Halpern K, Baruch K, Deczkowska A, Lorenzo-Vivas E, Itzkovitz S, Elinav E, Sieweke MH, Schwartz M, Amit I* (2016) Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353: aad8670.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad8670>
63. *Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT* (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary

- for normal brain development. *Science* 333: 1456–1458.  
<https://doi.org/10.1126/science.1202529>
64. *Stepanichev MY, Goryakina T, Manolova A, Lazareva N, Kvichanskii A, Tretyakova L, Volobueva M, Gulyaeva N* (2021) Neonatal proinflammatory challenge evokes a microglial response and affects the ratio between subtypes of GABAergic interneurons in the hippocampus of juvenile rats: sex-dependent and sex-independent effects. *Brain Struct Funct* 226: 563–574.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02199-z>
65. *Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM* (2013) Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33: 2761–2772.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013>
66. *Alliot F, Godin I, Pessac B* (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145–152.  
[https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00113-3)
67. *Kostović I, Judas M* (2002) Correlation between the sequential ingrowth of afferents and transient patterns of cortical lamination in preterm infants. *Anat Rec* 267: 1–6.  
<https://doi.org/10.1002/ar.10069>
68. *Esiri MM, al Izz MS, Reading MC* (1991) Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *J Clin Pathol* 44: 102–106.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.44.2.102>
69. *Billiards SS, Haynes RL, Folkert RD, Trachtenberg FL, Liu LG, Volpe JJ, Kinney HC* (2006) Development of microglia in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J Comp Neurol* 497: 199–208.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20991>
70. *Ambrose N, Rodriguez M, Waters KA, Machaalani R* (2020) Microglia in the human infant brain and factors that affect expression. *Brain Behav Immun – Health* 7: 100117.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100117>
71. *Burns-Naas LA, Hastings KL, Ladics GS, Makris SL, Parker GA, Holsapple MP* (2008) What’s So Special about the Developing Immune System? *Int J Toxicol* 27: 223–254.  
<https://doi.org/10.1080/10915810801978110>
72. *Мальцева НВ, Волчегорский ИА, Шемяков СЕ* (2016) Возрастные изменения морфометрических характеристик нейронов, клеток микроглии и активность ферментов антиоксидантной защиты в коре головного мозга человека на начальных этапах постнатального онтогенеза. *Морфол вестн* 24(1): 112–115. [*Maltseva NV, Volchegorskii IA, Shemyakov SE* (2016) Age changes of morphometric characteristics of neurons, microglia cells and antioxidant protection enzymes activity in human cortex at the initial stages of postnatal ontogenesis. *Morphol newlett* 24(1): 112–115. (In Russ)].  
[https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24\(1\)](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24(1))
73. *Su Y, Zhou Y, Bennett ML, Li S, Carceles-Cordon M, Lu L, Huh S, Jimenez-Cyrus D, Kennedy BC, Kesler SK, Viaene AN, Helbig I, Gu X, Kleinman JE, Hyde TM, Weinberger DR, Nauen DW, Song H, Ming G-L* (2022) A single-cell transcriptome atlas of glial diversity in the human hippocampus across the postnatal lifespan. *Cell Stem Cell* 29: 1594–1610.e8.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.09.010>
74. *Ge W-P, Miyawaki A, Gage FH, Jan YN, Jan LY* (2012) Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* 484: 376–380.  
<https://doi.org/10.1038/nature10959>
75. *Engelhardt B* (2003) Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 314: 119–129.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-003-0751-z>
76. *Regan MR, Huang YH, Kim YS, Dykes-Hoberg MI, Jin L, Watkins AM, Bergles DE, Rothstein JD* (2007) Variations in Promoter Activity Reveal a Differential Expression and Physiology of Glutamate Transporters by Glia in the Developing and Mature CNS. *J Neurosci* 27: 6607–6619.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0790-07.2007>
77. *Schools GP, Kimelberg HK* (1999) mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res* 58: 533–543.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991115\)58:4<533::AID-JNR6>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991115)58:4<533::AID-JNR6>3.0.CO;2-G)
78. *Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA, Mullen CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Moshier DF, Bornstein P, Barres BA* (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120: 421–433.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
79. *Yamamoto T, Vukelic J, Hertzberg EL, Nagy JI* (1992) Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain. *Dev Brain Res* 66: 165–180.  
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(92\)90077-A](https://doi.org/10.1016/0165-3806(92)90077-A)
80. *Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH* (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev*

- Neurosci 22: 73–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008>
81. *Malik S, Vinukonda G, Vose LR, Diamond D, Bhimavarapu BBR, Hu F, Zia MT, Hevner R, Zecevic N, Ballabh P* (2013) Neurogenesis Continues in the Third Trimester of Pregnancy and Is Suppressed by Premature Birth. *J Neurosci* 33: 411–423.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4445-12.2013>
  82. *Degl'Innocenti E, Dell'Anno MT* (2023) Human and mouse cortical astrocytes: a comparative view from development to morphological and functional characterization. *Front Neuroanat* 17: 1130729.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1130729>
  83. *Sturrock RR* (1986) Postnatal ontogenesis of astrocytes. In: *Astrocytes Pt 1: Development, Morphology, and Regional Specialization of Astrocytes*. Elsevier. 2012. 394.
  84. *Мальцева НВ, Волчегорский ИА, Шемяков СЕ* (2015) Взаимосвязь активности моноаминоксидазы B и количества астроцитов в развивающемся мозге человека. *Морфол ведом 4*: 9–14. [*Mal'tseva NV, Volchegorskii IA, Shemyakov SE* (2015) Correlation of monoamine oxidase b activity and number of astrocytes in the developing human brain. *Morphol Newslett* 23(4): 9–14. (In Russ)].  
[https://doi.org/10.20340/mv-mn.2015.0\(4\):9-14](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2015.0(4):9-14)
  85. *Nedergaard M, Ransom B, Goldman S* (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523–530.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
  86. *Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M* (2009) Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J Neurosci* 29: 3276–3287.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
  87. *Vasile F, Dossi E, Rouach N* (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222: 2017–2029.  
<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
  88. *Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MSB, Li G, Duncan JA, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MGH, Barres BA* (2016) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89: 37–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
  89. *Li J, Pan L, Pembroke WG, Rexach JE, Godoy MI, Condro MC, Alvarado AG, Harteni M, Chen Y-W, Stiles L, Chen AY, Wanner IB, Yang X, Goldman SA, Geschwind DH, Kornblum HI, Zhang Y* (2021) Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nat Commun* 12: 3958.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24232-3>
  90. *Preuss TM, Cáceres M, Oldham MC, Geschwind DH* (2004) Human brain evolution: insights from microarrays. *Nat Rev Genet* 5: 850–860.  
<https://doi.org/10.1038/nrg1469>
  91. *Wiggins RC* (1986) Myelination: a critical stage in development. *Neurotoxicology* 7: 103–120.
  92. *Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Posnert G, Brundin L, Druid H, Frisén J* (2014) Dynamics of Oligodendrocyte Generation and Myelination in the Human Brain. *Cell* 159: 766–774.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.011>
  93. *Chen P, Cai W, Wang L, Deng Q* (2008) A morphological and electrophysiological study on the postnatal development of oligodendrocyte precursor cells in the rat brain. *Brain Res* 1243: 27–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.029>
  94. *Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W* (1997) Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137: 459–468.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.137.2.459>
  95. *Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, Back SA* (2003) Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 181: 231–240.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00032-3)
  96. *Dean JM, Moravec MD, Grafe M, Abend N, Ren J, Gong X, Volpe JJ, Jensen FE, Hohimer AR, Back SA* (2011) Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev Neurosci* 33: 251–260.  
<https://doi.org/10.1159/000327242>
  97. *M. Vázquez D* (1998) Stress and the developing limbic–hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23: 663–700.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(98\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(98)00029-8)
  98. *Sapolsky R, Meaney M* (1986) Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* 396: 65–76.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(86\)80190-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(86)80190-1)

99. Kumar S, Cole R, Chiappelli F, de Vellis J (1989) Differential regulation of oligodendrocyte markers by glucocorticoids: post-transcriptional regulation of both proteolipid protein and myelin basic protein and transcriptional regulation of glycerol phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6807–6811.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6807>
100. McLennan IS, Hill CE, Hendry IA (1980) Glucocorticosteroids modulate transmitter choice in developing superior cervical ganglion. *Nature* 283: 206–207.  
<https://doi.org/10.1038/283206a0>
101. Lockwood CJ, Radunovic N, Nastic D, Petkovic S, Aigner S, Berkowitz GS (1996) Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. *J Perinat Med* 24: 243–251.  
<https://doi.org/10.1515/jpme.1996.24.3.243>
102. Murphy BE (1982) Human fetal serum cortisol levels related to gestational age: evidence of a midgestational fall and a steep late gestational rise, independent of sex or mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 144: 276–282.  
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(82\)90579-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(82)90579-8)
103. Schoof E, Girstl M, Frobenius W, Kirschbaum M, Repp R, Knerr I, Rascher W, Dötsch J (2001) Course of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase mRNA expression during human gestation. *Eur J Endocrinol* 145: 187–192.  
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1450187>
104. Murphy VE, Clifton VL (2003) Alterations in human placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. *Placenta* 24: 739–744.  
[https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(03\)00103-6](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(03)00103-6)
105. Howland MA, Sandman CA, Glynn LM (2017) Developmental origins of the human hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Expert Rev Endocrinol Metab* 12: 321–339.  
<https://doi.org/10.1080/17446651.2017.1356222>
106. Jansen J, Beijers R, Riksen-Walraven M, de Weerth C (2010) Cortisol reactivity in young infants. *Psychoneuroendocrinology* 35: 329–338.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.008>
107. Gunnar MR, Donzella B (2002) Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology* 27: 199–220.  
[https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(01\)00045-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00045-2)
108. Schwartz EB, Granger DA, Susman EJ, Gunnar MR, Laird B (1998) Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Dev* 69: 1503–1513.
109. Kloet ER de, Oitzl MS (2003) Who cares for a stressed brain? The mother, the kid or both? *Neurobiol Aging* 24: S61–S65.  
[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00057-5)
110. Davis EP, Donzella B, Krueger WK, Gunnar MR (1999) The start of a new school year: Individual differences in salivary cortisol response in relation to child temperament. *Dev Psychobiol* 35: 188–196.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199911\)35:3<188::AID-DEV3>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199911)35:3<188::AID-DEV3>3.0.CO;2-K)
111. Hessel D, Dawson G, Frey K, Panagiotides H, Self H, Yamada E, Osterling J (1998) A longitudinal study of children of depressed mothers: psychobiological findings related to stress. In: Hann DM, Huffman LC, Lederhendler KK, Minecke D (Eds.) *Advancing Research on Developmental Plasticity: Integrating the Behavioral Sciences and the Neurosciences of Mental Health*. National Institutes of Mental Health. Bethesda. MD. 256.
112. Gunnar MR, Vazquez DM (2001) Low cortisol and a flattening of expected daytime rhythm: potential indices of risk in human development. *Dev Psychopathol* 13: 515–538.  
<https://doi.org/10.1017/s0954579401003066>

### Markers of Neuroontogenesis in the Stress-Hyporesponsive Period: Comparison of Laboratory Rodents and Humans

A. O. Manolova<sup>a</sup>, \*, and N. V. Gulyaeva<sup>a</sup>

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

\*e-mail: [anna.manolova@ihna.ru](mailto:anna.manolova@ihna.ru)

Nowadays there is a number of neuropsychiatric diseases that are considered to be associated with early life stress. Various models are used on laboratory rodents to elucidate the mechanisms of the pathogenesis of psychopathologies that cannot be studied in hu-

mans. For successful translation of data, it is necessary to compare the processes of neuroontogenesis at the moment of exposure and subsequent periods. There are many comparative studies concerning the development of neurons and neuronal networks, as well as changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In recent years, it has been reliably shown that glial cells are an important participant in both brain development and its response to stress. The opinion that it is microglia and astrocytes that represent the most promising targets for therapeutic intervention in stress-related diseases is supported. However, there are still no comparative analytical studies covering both stress-realizing systems and neuronal and glial markers of development. This review fills this gap. Here we provide a new perspective for considering the problems of modeling childhood stress and translating the data obtained. The presented analysis, on the one hand, supplements the existing understanding of the correspondence between the stages of brain development in laboratory rodents and humans, and, on the other hand, marks points of growth and raises new questions for researchers of stress in early ontogenesis.

*Keywords:* early life stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hyporesponsive stress period, microglia, astroglia

МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ  
СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК  
ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИИ ЛИНИИ JURKAT

© 2023 г. Э. А. Старикова<sup>1, 2, 3, \*</sup>, Дж. Т. Маммедова<sup>1</sup>, А. Ожиганова<sup>1</sup>,  
Л. А. Бурова<sup>1</sup>, И. В. Кудрявцев<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт медицинского образования Национального медицинского исследовательского  
центра им. В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: Starickova@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.05.2023 г.

После доработки 12.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Стратегия депривации аргинина рассматривается как перспективное направление терапии раковых заболеваний. Целью исследования было изучение влияния аргининдеиминазы пиогенного стрептококка на клетки лимфобластной лейкемии Jurkat. Для этого сравнивали эффекты супернатантов разрушенных стрептококков исходного штамма, экспрессирующего аргининдеиминазу, и его изогенного мутанта с инактивированным геном аргининдеиминазы – *arcA*. Пролиферацию клеток оценивали в МТТ-тесте. Остальные параметры исследовали с помощью проточной цитометрии. Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали с использованием ДНК-связывающего красителя DAPI и антител против циклина A2. Интенсивность аутофагии оценивали с помощью реагента LysoTracker™ Green DND-26. Для оценки жизнеспособности клетки докрашивали DAPI. Исследования показали, что стрептококковый фермент подавлял пролиферативную активность клеток Jurkat, повышал долю клеток в фазах покоя G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, снижал долю клеток в фазах синтеза S/G<sub>2</sub> и усиливал аутофагию без снижения жизнеспособности. Добавка аргинина нивелировала эффекты аргининдеиминазы. Полученные результаты открывают возможность использования аргинин-гидролизующей активности стрептококкового фермента для сочетанной терапии онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** стрептококковая аргининдеиминаза, аргинин, клетки линии Jurkat, пролиферация, клеточный цикл, аутофагия

DOI: 10.31857/S086981392309011X, EDN: ORFKIS

## ВВЕДЕНИЕ

Аргинин является условно незаменимой аминокислотой, которая вовлечена в жизненно важные физиологические и патологических процессы [1]. Аргинин необходим для эффективного иммунного ответа и регенерации [2, 3]. В условиях стресса и различных катаболических состояниях, включая гемолитические анемии

[4–7], астму [8, 9], беременность [10], сепсис, ожоги и травмы [2, 11–13], когда способность эндогенного синтеза аминокислоты не может компенсировать потребности организма, аргинин становится незаменимым.

Метаболизм аргинина играет двойственную роль при опухолевом росте. С одной стороны, дефицит этой аминокислоты вызывает иммуносупрессию и подавление противоопухолевых иммунных реакций [3, 14]. С другой стороны, опухолевые клетки сами нуждаются в аргинине для поддержания высокого уровня пролиферативной активности [3, 15].

Аргинин относится к протеиногенным аминокислотам, поэтому в случае его дефицита останавливается синтез белка [16]. При этом в клетке из-за накопления незаряженных аминоксил-тРНК происходит активация стресс киназы – *general control nonderepressible 2 (GCN2)* и ее нижележащей мишени – фактора инициации трансляции (*eukaryotic translation initiation factor 2A, eIF2A*). Когда содержание аргинина истощается, клетки подвергаются остановке клеточного цикла при  $G_0/G_1$  и пребывают в состоянии покоя до тех пор, пока концентрация аргинина не повысится до нормального уровня [17].

В исследованиях *in vitro* было установлено, что в опухолевых клетках на ранней стадии аргининового голодания (0–48 ч) происходит инактивация аргинин-зависимого сигнального каскада *mechanical target of rapamycin – mTOR* [18]. Одним из последствий этого становится усиление киназной активности *Unc-51 like autophagy activating kinase – ULK1/2*, которая запускает фосфорилирование *Autophagy Related 13 – Atg13* и аутофагию [19, 20]. Во время депривации аргинина на поздних стадиях в различных типах раковых клеток (рак поджелудочной железы, острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря и печени) происходит индукция апоптоза [21].

Производные аргинина – оксид азота (*nitric oxide, NO*), полиамины, нуклеотиды, пролин и глутамат способствуют росту и мутагенезу опухолевых клеток [15]. Роль аргинина при опухолевом росте подтверждают данные о том, что ферменты метаболизма аргинина (орнитиндекарбоксилаза, индуцибельная синтаза оксида азота (*inducible nitric oxide synthase, iNOS*), аргиназа) и переносчики аминокислот (*cationic amino acid transporter (CAT)* и *Solute Carrier Family 6 Member 14 (SLC6A14)*) задействованы в развитии опухоли [18]. Опухолевые клетки нуждаются в аргиназах для лучшей пролиферации и метастазирования. Например, аргиназа I в клетках нейробластомы запускает экспрессию сигнальных каскадов АКТ и ERK, индуцирующих деление клеток [22]. Активность аргиназы II в опухолях щитовидной железы связана с повышенной экспрессией пролиферативных маркеров Ki-67 и PCNA [23]. Экспрессия аргиназы II на клетках меланомы способствует пролиферативному и миграторному фенотипу клеток с высоким уровнем молекулы адгезии ICAM-1 [24]. Экспрессия iNOS при раке мочевого пузыря человека считается плохим прогностическим фактором, связанным с инвазией и рецидивом опухоли [25]. Подавление экспрессии iNOS приводит к значительному снижению темпов роста клеток глиомы линии C6 [26].

Аргининдеимианаза (АДИ) – микробный фермент, который осуществляет гидролиз аргинина с образованием цитруллина и аммиака [27, 28]. Ферменты, полученные из *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Thermophilic Aspergillus fumigatus* KJ434941, *Mycoplasma arginini* прошли и проходят множество клинических испытаний в разных странах в качестве препаратов для сочетанной терапии онкологических заболеваний [29–32]. Было показано, что конъюгированная с полиэтиленгликолем аргининдеимианаза (ADI-PEG20) через истощение аргинина индуцирует аутофагию и последующую гибель раковых клеток [33]. ADI-PEG20 хорошо зарекомендовала себя в клинических испытаниях II стадии у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [34]. Кроме того, ADI-PEG20 показала высокую эффективность у пациентов с аргининосукцинатсинтетаза-1 (ASS1)-негативной мела-

ной [35]. Наилучшие эффекты наблюдались при использовании ADI-PEG20 в сочетании с ингибитором аутофагии — хлорохином [36] или цитостатиками [37].

В данном исследовании изучали противоопухолевую активность стрептококковой АДИ в отношении клеток лимфобластной лейкемии линии Jurkat. Путем сравнения эффектов исходного штамма, экспрессирующего АДИ, и его изогенного мутанта с инактивированным геном АДИ — *arcA* было установлено, что стрептококковый фермент подавлял пролиферативную активность и усиливал аутофагию клеток без снижения их жизнеспособности.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Получение супернатантов разрушенных стрептококков*

Исследование проводили с использованием *Streptococcus pyogenes* штамма M49-16 и его изогенного мутанта M49-16del*ArcA* с инактивированным геном аргининдеиминазы *arcA*. Штаммы, а также супернатанты разрушенных стрептококков были получены и стандартизированы, как описано в [38], и любезно предоставлены профессором А.Н. Суворовым (Отдел молекулярной микробиологии ФБГНУ “ИЭМ”). Супернатанты разрушенных стрептококков (СРС) исходного и мутантного штаммов, содержащие внутриклеточные биологически активные вещества стрептококков, получали согласно описанной ранее методике [39].

### *Культивирование клеток линии Jurkat*

Клетки линии Jurkat были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН). Линия Jurkat была выделена из крови больного Т-лимфобластной лейкемией. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Invotrigen, США), 2 мМ глутамин (Биолот, Россия), 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия) (полная культуральная среда) во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Пересев культуры осуществляли 1 раз в 3–4 дня. Кратность пересева составляла 1 : 5.

### *Влияние аргининдеиминазы на пролиферацию клеток Jurkat*

Влияние стрептококковой АДИ на пролиферацию клеток Jurkat изучали в МТТ-тесте. Для этого 100 мкл клеточной суспензии в концентрации 1 млн/мл вносили в 96-луночный плоскодонный планшет (Sarstedt, Австрия). Здесь и далее действие АДИ на исследуемые параметры изучали путем сравнения СРС исходного и мутантного штаммов. СРС вносили в разведении 1/200 и 1/400 (v/v). Для подтверждения того, что действие фермента связано с деплечией аргинина, в среду для культивирования клеток добавляли L-аргинин (Sigma, США) в супрафизиологической концентрации 2 мМ. Клетки инкубировали 72 ч и на последние 4 ч в лунки вносили МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) (Sigma, США) в концентрации 0.5 мг/мл. Для лизиса клеток и растворения кристаллов формазана в лунки вносили 100 мкл лизирующего буфера, содержащего 10%-ный додецилсульфат натрия (Serva, Германия) в 0.01 N HCl и инкубировали 18 ч при 37°C. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Bio-Rad, Япония) при длине волны 570 нм. Оптическую плотность контрольных лунок принимали за 100% пролиферативной активности.

Для изучения распределения по фазам клеточного цикла клетки засеивали в 12-луночный планшет (Sarstedt, Австрия) по 1 млн клеток в 1 мл полной культуральной среды и инкубировали с исследуемыми субстанциями 72 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>. Клетки пермеабелизировали 80%-ным ледяным ме-



танолом в течение 5 мин. Для оценки доли клеток в фазах синтеза (S/G<sub>2</sub>) проводили окрашивание клеточной суспензии мечеными FITC антителами против циклина A2 (Becton Coulter, США, кат. № PNA22327) в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки количества ДНК в клетках дополнительно проводили окрашивание клеточной суспензии ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США). Краситель вносили в концентрации 300 нМ и инкубировали 10 мин. Анализ образцов проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios™ (Beckman Coulter, США). Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью алгоритма Michael H. Fox, встроенного в программное обеспечение Kaluza Analysis 2.1 (США). Результаты выражали в процентах.

#### *Влияние аргининдеиминазы на процессы аутофагии*

Для оценки влияния СРС на процессы аутофагии в лунки 24-луночного планшета (Sarstedt, Австрия) вносили 500 мкл клеточной суспензии в концентрации 1 млн/мл. После этого добавляли СРС в разведении 1/400 (v/v) и L-аргинин (Sigma, США) в концентрации 2 мМ. По окончании 24-часовой инкубации пробы переносили в пробирки для цитометрии. Клетки осаждали путем центрифугирования при 300 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Пробы окрашивали красителем Lysotracker Green DND-26 (Invitrogen, США) в концентрации 50 нМ. После 15-минутной инкубации проводили две отмывки клеток путем центрифугирования в фосфатно-солевом буфере (pH 7.0) при 300 g в течение 5 мин. Для оценки доли клеток в состоянии некроза и исключения их из анализа клеточную суспензию окрашивали ДНК-связывающим красителем DAPI в концентрации 300 нМ. Пробы анализировали на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Результаты выражали в средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI).

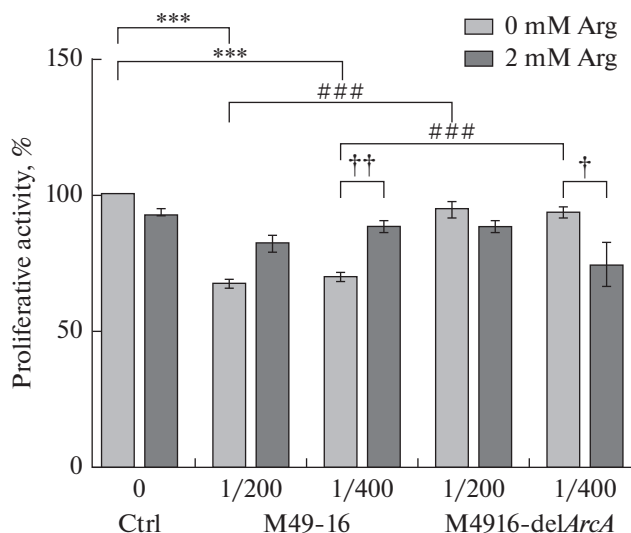
#### *Статистическая обработка*

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2010, Statistica 12.0, Kaluza Analysis 2.1 и GraphPad Prism 8. Для анализа нормальности распределения выборки использовали критерий Шапиро–Уилка. Далее выборку анализировали на наличие статистических значимых различий с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в случае нормального распределения, или критерия Крускала–Уоллиса при ненормальном распределении. Затем проводили поиск попарных достоверных различий, при нормальном распределении использовали апостериорный тест Тьюки, при ненормальном распределении – критерий Данна. Данные в случае нормального распределения, представлены как среднее ± ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ), при ненормальном распределении – как медиана [25 квартиль; 75 квартиль] (Med [Q25; Q75]). Во всех экспериментах различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Сравнение влияния супернатантов разрушенных стрептококков исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на пролиферативную активность клеток Jurkat*

В присутствии СРС исходного штамма в разведениях 1/400 и 1/200 пролиферативная активность клеток статистически значимо снижалась по сравнению с контролем (рис. 1). СРС мутантного штамма в разведении 1/400 также статистически значимо, но слабее, чем исходный штамм подавлял пролиферацию. Введение добавки аргинина приводило к статистически значимому снижению исследуемого

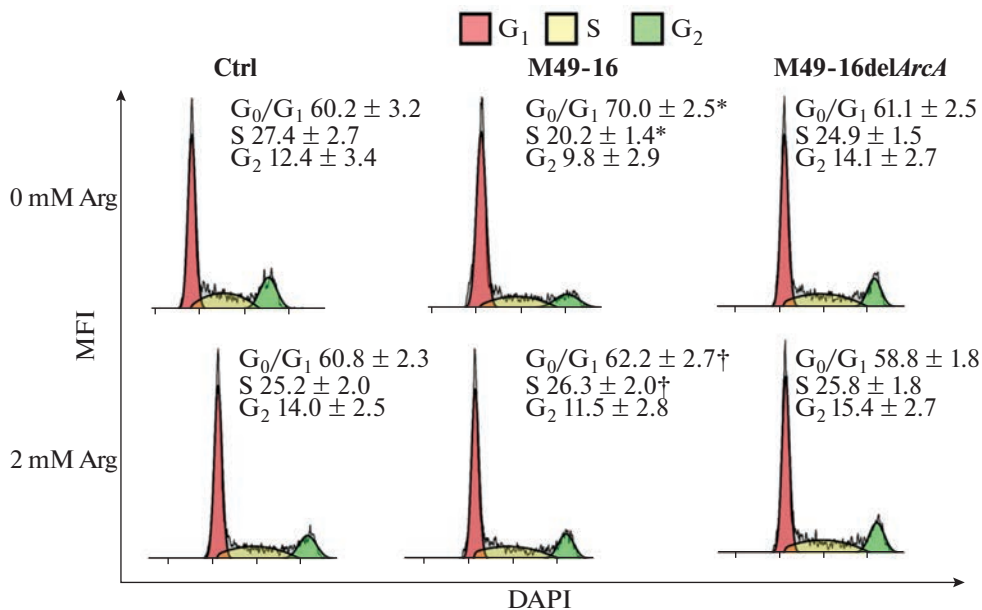


**Рис. 1.** Сравнение влияния супернатантов разрушенных исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на пролиферативную активность клеток Jurkat. Пролиферативную активность изучали в МТТ-тесте. Данные представлены как Med [Q25; Q75],  $n = 18$ . Отличия статистически значимы по сравнению с контролем при  $***p < 0.001$ ; пролиферация клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16delArcA достоверно выше, чем пролиферация клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16, при  $###p < 0.001$ ; отличия статистически значимы по сравнению с этим параметром без добавки аргинина, при  $††p < 0.01$ ,  $†p < 0.05$ .

показателя в стандартных условиях культивирования и в присутствии СРС мутантного штамма. При этом добавка аргинина достоверно восстанавливала уровень пролиферации, подавленный под влиянием СРС исходного штамма. Для подтверждения этих результатов в дальнейших исследованиях изучали действие АДИ на распределение клеток по фазам клеточного цикла.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла показал, что в стандартных условиях большая часть ( $60.2 \pm 3.2\%$ ) клеток находилась в фазе покоя ( $G_0/G_1$ ), доля клеток в фазе синтеза (S) составляла  $27.3 \pm 2.7\%$ , а доля клеток в фазе  $G_2$  и делящихся клеток (M) —  $12.4 \pm 3.4\%$  (рис. 2). Доли клеток в фазах клеточного цикла в присутствии СРС мутантного штамма не отличались от этих показателей в контроле. В присутствии СРС исходного штамма происходило статистически значимое изменение доли клеток в фазах  $G_0/G_1$  и S: доля клеток в фазах покоя увеличивалась на 10%, напротив, доля клеток в фазе синтеза уменьшалась на 7%. Добавление аргинина в культуру клеток, которые инкубировали в присутствии СРС исходного штамма, восстанавливало соотношение доли клеток в фазах клеточного цикла до значений близких к контролю.

Далее проводили анализ экспрессии в клетках циклина A2, уровень которого строго синхронизирован с ходом клеточного цикла. Комплекс циклин – cyclin-dependent kinase 2 (A2-CDK2) – инициирует репликацию ДНК и необходим для прогрессирования S-фазы. Для прохождения через фазу  $G_2$  в фазу M циклин A2 образует комплексы с CDK1, после чего деградирует по убиквитин-зависимому пути протеолиза на ранних стадиях митоза [40]. Исследования подтвердили ранее полученные результаты. В частности, в контроле доля клеток в фазах синтеза S/ $G_2$  со-



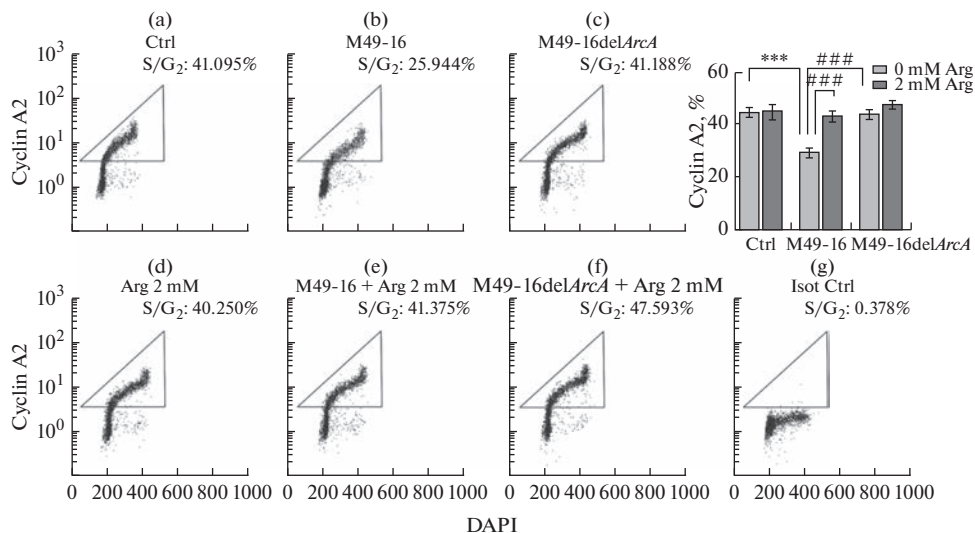
**Рис. 2.** Сравнение влияния супернатантов разрушенных исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на распределение клеток Jurkat по фазам клеточного цикла. Клеточную суспензию окрашивали ДНК-связывающим красителем DAPI. Здесь и далее образцы анализировали с использованием проточной цитометрии. Процент клеток в различных фазах клеточного цикла подсчитывали с использованием программного обеспечения для анализа Kaluza 2.2, основанного на алгоритме Майкла Х. Фокса. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 18$ . Отличия статистически значимы: \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем; † $p < 0.05$  – по сравнению с этим параметром без добавки аргинина.

ставляла приблизительно 40%. В присутствии СРС мутантного штамма значение этого параметра не отличалось от контроля. Культивирование клеток в присутствии СРС исходного штамма приводило к двукратному снижению доли клеток в фазах синтеза до 20%. Введение добавки аргинина полностью отменяло ингибирующее действие СРС исходного штамма, но не оказывало никакого действия на клетки, которые культивировали в стандартных условиях и в присутствии мутантного штамма.

Таким образом, с помощью МТТ-теста и анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла и доли циклин А2-позитивных клеток было установлено, что стрептококковая АДИ подавляет пролиферацию клеток Jurkat за счет истощения аргинина в культуре.

*Сравнение влияния супернатантов разрушенных стрептококков  
исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA)  
штаммов на интенсивность процессов аутофагии клеток Jurkat*

Дефицит нутриентов приводит к активации в клетках процессов аутофагии, которые призваны компенсировать недостающие аминокислоты и другие метаболиты [41]. Поэтому в дальнейших исследованиях проводили изучение влияния аргининдеиминазы на процессы аутофагии. Для этого использовали краситель Lyso-



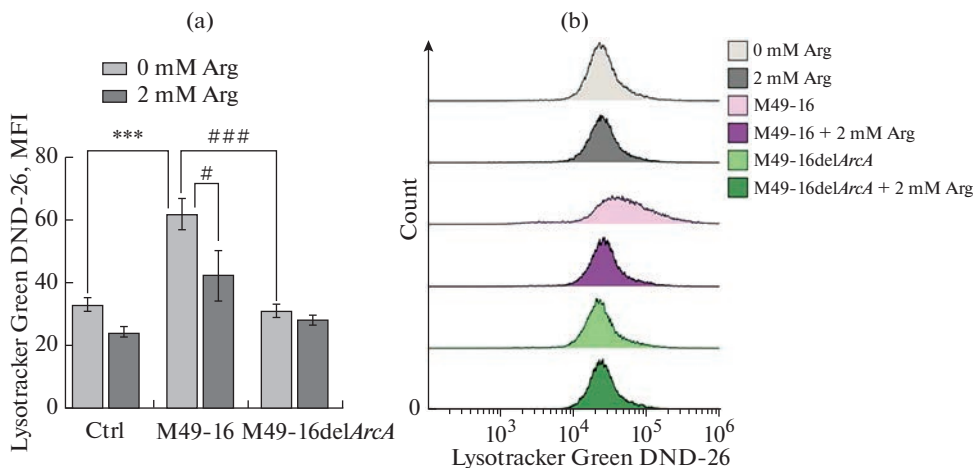
**Рис. 3.** Сравнение влияния супернатантов разрушенных исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на долю циклин A2-позитивных клеток Jurkat.

Репрезентативные проточно-цитометрические гистограммы, отражающие прогрессию клеточного цикла. (a) – культуральная среда (контроль); (b) – CPC M49-16; (c) – CPC M49-16delArcA; (d) – 2 mM аргинина; (e) – CPC M49-16 и 2 mM аргинина; (f) – CPC M49-16delArcA и 2 mM аргинина; (g) – контроль изотипических антител. Проводили окрашивание клеточной суспензии мечеными FITC антителами против циклина A2. Пробы анализировали на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter) и программного обеспечения Kaluza Analysis 2.1. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 5-6$ . Отличия статистически значимы при  $p < 0.001$ : \*\*\* – по сравнению с контролем, ###  $p < 0.001$  – по сравнению с CPC исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 (*S. pyogenes* M49-16).

Tracker Green DND-26, который накапливается в органеллах с низким уровнем pH, а интенсивность флуоресценции клеток отражает уровень процессов аутофагии [42]. Было установлено, что в присутствии CPC мутантного штамма интенсивность аутофагии не отличалась от таковой в контроле (рис. 4). При культивировании клеток в присутствии CPC исходного штамма происходило статистически значимое двукратное усиление интенсивности аутофагии по сравнению с этим показателем в стандартных условиях культивирования. При этом введение добавки аргинина снижало уровень аутофагии до значений этого параметра в контроле.

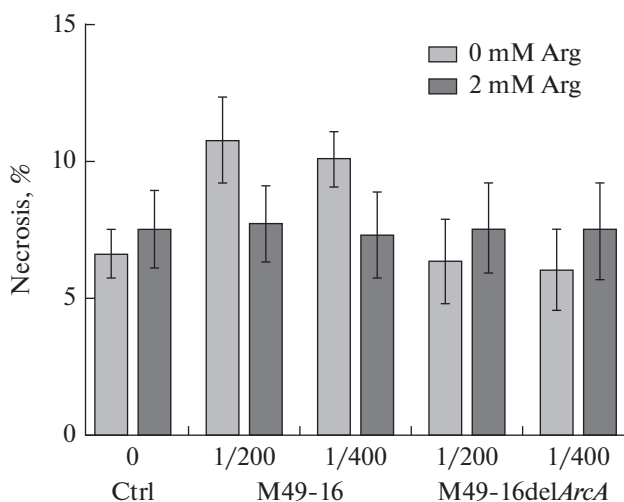
#### Сравнение влияния супернатантов разрушенных стрептококков исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на жизнеспособность клеток Jurkat

В дальнейших исследованиях изучали, не связано ли ингибирующее пролиферацию клеток действие АДИ, а также усиление процесса аутофагии, со снижением их жизнеспособности. Для этого проводили анализ доли клеток в состоянии некроза (рис. 5). Было установлено, что в присутствии CPC исходного штамма происходило слабое повышение доли клеток в состоянии некроза, однако эти изменения не были достоверными. В других условиях культивирования достоверного снижения жизнеспособности клеток тоже не было зарегистрировано.



**Рис. 4.** Сравнение влияния супернатантов разрушенных исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на процессы аутофагии клеток Jurkat.

(a) – гистограмма, основанная на данных проточной цитометрии, показывающая количественные различия уровня аутофагии клеток Jurkat. (b) – репрезентативные гистограммы проточной цитометрии, отражающие уровень аутофагии клеток Jurkat. Пробы окрашивали LysoTracker DND-26 Green и анализировали методом проточной цитометрии. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 4-9$ . Отличия статистически значимы: \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, † – по сравнению с этим параметром без добавки аргинина.



**Рис. 5.** Сравнение влияния супернатантов разрушенных исходного (*S. pyogenes* M49-16) и мутантного (*S. pyogenes* M49-16delArcA) штаммов на жизнеспособность клеток Jurkat. Клеточные суспензии окрашивали ДНК-связывающим красителем DAPI в концентрации 300 нМ. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 4-5$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставление эффектов СРС исходного и мутантного штаммов показало, что стрептококковая АДИ подавляет пролиферацию клеток линии Jurkat (рис. 1–3), что согласуется с данными, полученными ранее, с использованием АДИ других микробов. Так, в 2000 г. Gong и соавт. установили, что АДИ, выделенная из микоплазмы, ингибировала прохождение Jurkat по фазам клеточного цикла. Причем, было показано, что для блокировки прохождения клеточного цикла клеток Jurkat требовалась меньшая концентрация фермента, по сравнению с той, которая была необходима для первичных лимфоцитов. А высокие концентрации фермента (200 нг/мл) вызывали апоптоз клеток [43].

Позже было установлено, что культивирование Jurkat в течение 24 ч в среде, не содержащей аргинин, приводило к снижению экспрессии зета-цепи (CD3zeta) Т-клеточного рецептора. Введение добавки аргинина восстанавливало уровень экспрессии этой молекулы до контрольных значений. Также при культивировании в дефицитной по аргинину среде наблюдалось значительное снижение пролиферации клеток. Таким образом, было установлено, что депривация аргинина может подавлять пролиферацию Jurkat за счет регуляции сигналов от Т-клеточного рецептора [44]. Антипролиферативное действие на клетки линии Jurkat было также описано для ADI-PEG20, выделенной из *Vibrio alginolyticus* [45].

Сопоставление полученных в нашей работе результатов с данными других исследователей показывают, что ингибирующее пролиферацию клеток Jurkat действие АДИ СРС *S. pyogenes* M49-16 было выражено слабее, если сравнивать с антипролиферативными эффектами фермента, выявленными в работах других авторов. Эти могут быть прежде всего связаны с тем, что ферменты, выделенные из разных микроорганизмов, отличаются по своим биохимическим характеристикам (оптимум рН, удельная активность, процессивность, сродство к субстрату). Также нужно учитывать некоторые методические отличия, как например, использование рекомбинатного белка, его конъюгата с полиэтиленгликолем или фермента в составе супернатанта разрушенных стрептококков.

Также в литературе встречается ряд исследований, в которых изучали эффекты аргиназы или дефицитной по аргинину среды. Bernard и соавт. показали, что аргиназа эритроцитов значительно подавляла пролиферацию клеток Jurkat за счет снижения содержания аргинина в культуральной среде. Анализ с использованием селективного ингибитора Nor-НОНА показал, что подавление активности этого фермента восстанавливает пролиферацию клеток, обработанных эритроцитами [13].

В другой работе [46], изучали молекулярные механизмы нарушения функциональной активности лимфоцитов при их культивировании в дефицитной по аргинину среде. Было установлено, что в отсутствие аргинина происходила остановка в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла активированных митогеном Jurkat. Восполнение дефицита аминокислоты восстанавливало нормальный профиль клеточного цикла и пролиферации клеток. Кроме того, депривация аргинина вызывала подавление экспрессии ряда мембранных антигенов, включая CD247, и развитие ER-стресса. С помощью генетического и биохимического подходов было подтверждено, что истощение аргинина также индуцировало развитие аутофагии клеток Jurkat. А ингибирование аутофагии при голодании клеток приводило к развитию апоптоза [46]. Результаты наших исследований согласуются с этими данными и показывают, что стрептококковая АДИ за счет создания дефицита аргинина запускает в клетках Jurkat процесс аутофагии (рис. 4), что, вероятно, спасает их от гибели, как подтверждают данные по оценке жизнеспособности (рис. 5).

В исследовании Di Marzio и соавт. изучали действие супернатантов разрушенных *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus brevis*, авторами было установлено, что

после 18 ч инкубации в присутствии бактериальных факторов уровень апоптоза в культуре клеток линии Jurkat возрастал до 86% по сравнению с 3% в контроле. Авторы предположили, что апоптоз был вызван высоким уровнем активности АДИ, которая, истощая субстрат для аргиназы, может подавлять синтез полиаминов, необходимых для пролиферации клеток [47]. Однако наши эксперименты с использованием разных методов оценки жизнеспособности клеток показали, что стрептококковая АДИ не вызывала значительного усиления гибели клеток в культуре (рис. 5).

Результаты данного исследования показывают, что стрептококковая АДИ обладает потенциальным противоопухолевым действием. Под влиянием фермента происходит подавление пролиферации клеток, что, вероятно, вызвано их голоданием. При этом не наблюдается усиления гибели клеток, но происходит компенсаторное усиление процессов аутофагии. Полученные данные подтверждают возможность использования аргинин-гидролизующей активности стрептококкового фермента для сочетанной терапии онкологических заболеваний.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20013, <https://rscf.ru/project/22-24-20013/>, и Региона (грант Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 14 апреля 2022 г. № 45/2022).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Э.А.С.), сбор данных (Д.Т.М., Э.А.С., О.А., Л.А.Б.), обработка данных (Э.А.С., Д.Т.М., О.А.), написание и редактирование рукописи (Э.А.С., Л.А.Б., В.К.И.).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность заведующему отделом молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, д. м. н., профессору А.Н. Суворову за предоставленные штаммы *S. pyogenes*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Morris SM Jr* (2016) Arginine Metabolism Revisited. *J Nutrition* 146: 2579S–2586S. <https://doi.org/10.3945/jn.115.226621>
2. *Kirk SJ, Barbul A* (1990) Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 14: 226S–229S. <https://doi.org/10.1177/014860719001400514>
3. *Starikova EA, Rubinstein AA, Mammedova JT, Isakov DV, Kudryavtsev IV* (2023) Regulated Arginine Metabolism in Immunopathogenesis of a Wide Range of Diseases: Is There a Way to Pass between Scylla and Charybdis? *Current Issues Mol Biol* 45: 3525–3551. <https://doi.org/10.3390/cimb45040231>

4. *Morris CR* (2014) Alterations of the arginine metabolome in sickle cell disease: a growing rationale for arginine therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 28: 301–321.  
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.11.008>
5. *Morris CR, Kim H-Y, Klings ES, Wood J, Porter JB, Trachtenberg F, Sweeters N, Olivieri NF, Kwiatkowski JL, Virzi L, Hassell K, Taher A, Neufeld EJ, Thompson AA, Larkin S, Suh JH, Vichinsky EP, Kuypers FA, Thalassaemia Clinical Research Network* (2015) Dysregulated arginine metabolism and cardiopulmonary dysfunction in patients with thalassaemia. *Br J Haematol* 169: 887–898.  
<https://doi.org/10.1111/bjh.13452>
6. *Morris CR* (2008) Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 177–185.  
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.177>
7. *Morris CR, Kuypers FA, Lavrisha L, Ansari M, Sweeters N, Stewart M, Gildengorin G, Neumayr L, Vichinsky EP* (2013) A randomized, placebo-controlled trial of arginine therapy for the treatment of children with sickle cell disease hospitalized with vaso-occlusive pain episodes. *Haematologica* 98: 1375–1382.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2013.086637>
8. *Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM* (2004) Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 148–153.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200309-1304OC>
9. *Morris CR* (2013) Arginine and asthma. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 77: 1–15.  
<https://doi.org/10.1159/000351365>
10. *Hsu C-N, Tain Y-L* (2019) Impact of Arginine Nutrition and Metabolism during Pregnancy on Offspring Outcomes. *Nutrients* 11: 1452.  
<https://doi.org/10.3390/nu11071452>
11. *Clark A, Imran J, Madni T, Wolf SE* (2017) Nutrition and metabolism in burn patients. *Burns & Trauma* 5: 11.  
<https://doi.org/10.1186/s41038-017-0076-x>
12. *Pribis JP, Zhu X, Vodovotz Y, Ochoa JB* (2012) Systemic Arginine Depletion After a Murine Model of Surgery or Trauma. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 36: 53–59.  
<https://doi.org/10.1177/0148607111414579>
13. *Bernard AC, Mistry SK, Morris SM, O'Brien WE, Tsuei BJ, Maley ME, Shirley LA, Kearney PA, Boulanger BR, Ochoa JB* (2001) Alterations in arginine metabolic enzymes in trauma. *Shock* 15: 215–219.  
<https://doi.org/10.1097/00024382-200115030-00009>
14. *Martí I Líndez A-A, Reith W* (2021) Arginine-dependent immune responses. *Cell Mol Life Sci* 78: 5303–5324.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
15. *Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A* (2017) Arginine-Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. *J Surg Oncol* 115: 273–280.  
<https://doi.org/10.1002/jso.24490>
16. *Zhao C, Guo H, Hou Y, Lei T, Wei D, Zhao Y* (2023) Multiple Roles of the Stress Sensor GCN2 in Immune Cells. *Int J Mol Sci* 24: 4285.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24054285>
17. *Patil MD, Bhaumik J, Babykutti S, Banerjee UC, Fukumura D* (2016) Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene* 35: 4957–4972.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.37>
18. *Chen C-L, Hsu S-C, Ann DK, Yen Y, Kung H-J* (2021) Arginine Signaling and Cancer Metabolism. *Cancers (Basel)* 13: 3541.  
<https://doi.org/10.3390/cancers13143541>
19. *Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim D-H* (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20: 1992–2003.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>
20. *Szlosarek PW* (2014) Arginine deprivation and autophagic cell death in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 14015–14016.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1416560111>
21. *Ishimwe N, Zhang W, Qian J, Zhang Y, Wen L* (2020) Autophagy regulation as a promising approach for improving cancer immunotherapy. *Cancer Lett* 475: 34–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.034>
22. *Hackett CS, Quigley DA, Wong RA, Chen J, Cheng C, Song YK, Wei JS, Pawlikowska L, Bao Y, Goldenberg DD, Nguyen K, Gustafson WC, Rallapalli SK, Cho Y-J, Cook JM, Kozlov S, Mao J-H, Van Dyke T, Kwok P-Y, Khan J, Balmain A, Fan Q, Weiss WA* (2014) Expression quantitative trait loci and receptor pharmacology implicate Arg1 and the GABA-A receptor as therapeutic targets



- in neuroblastoma. *Cell Rep* 9: 1034–1046.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.046>
23. *Sousa MSA, Latini FRM, Monteiro HP, Cerutti JM* (2010) Arginase 2 and nitric oxide synthase: Pathways associated with the pathogenesis of thyroid tumors. *Free Radic Biol Med* 49: 997–1007.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.006>
  24. *Yu Y, Ladeiras D, Xiong Y, Boligan KF, Liang X, von Gunten S, Hunger RE, Ming X-F, Yang Z* (2020) Arginase-II promotes melanoma migration and adhesion through enhancing hydrogen peroxide production and STAT3 signaling. *J Cell Physiol* 235: 9997–10011.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.29814>
  25. *Belgorosky D, Girouard J, Langle YV, Hamelin-Morrisette J, Marino L, Agüero EI, Malagrino H, Reyes-Moreno C, Eiján AM* (2020) Relevance of iNOS expression in tumor growth and maintenance of cancer stem cells in a bladder cancer model. *J Mol Med (Berl)* 98: 1615–1627.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-020-01973-0>
  26. *Girotti AW, Fahey JM, Korytowski W* (2020) Nitric oxide-elicited resistance to anti-glioblastoma photodynamic therapy. *Cancer Drug Resist* 3: 401–414.  
<https://doi.org/10.20517/cdr.2020.25>
  27. *Galleo P, Planell R, Benach J, Querol E, Perez-Pons JA, Reverter D* (2012) Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in *Mycoplasma penetrans*. *PLoS One* 7: e47886.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047886>
  28. *Hirose Y, Yamaguchi M, Sumitomo T, Nakata M, Hanada T, Okuzaki D, Motooka D, Mori Y, Kawasaki H, Coady A, Uchiyama S, Hiraoka M, Zurich RH, Amagai M, Nizet V, Kawabata S* (2021) *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Rep* 34: 108924.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108924>
  29. *Zhang L, Liu M, Jamil S, Han R, Xu G, Ni Y* (2015) PEGylation and pharmacological characterization of a potential anti-tumor drug, an engineered arginine deiminase originated from *Pseudomonas plecoglossicida*. *Cancer Lett* 357: 346–354.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.042>
  30. *Abou-Alfa GK, Qin S, Ryoo B-Y, Lu S-N, Yen C-J, Feng Y-H, Lim HY, Izzo F, Colombo M, Sarker D, Bolondi L, Vaccaro G, Harris WP, Chen Z, Hubner RA, Meyer T, Sun W, Harding JJ, Hollywood EM, Ma J, Wan PJ, Ly M, Bomalaski J, Johnston A, Lin C-C, Chao Y, Chen L-T* (2018) Phase III randomized study of second line ADI-PEG 20 plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 29: 1402–1408.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy101>
  31. *Wei J, Bera TK, Liu XF, Zhou Q, Onda M, Ho M, Tai C-H, Pastan I* (2018) Recombinant immunotoxins with albumin-binding domains have long half-lives and high antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E3501–E3508.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1721780115>
  32. *Li R, Yang H, Jia D, Nie Q, Cai H, Fan Q, Wan L, Li L, Lu X* (2016) Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL. *J Control Release* 228: 96–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.004>
  33. *Changou CA, Chen Y-R, Xing L, Yen Y, Chuang FYS, Cheng RH, Bold RJ, Ann DK, Kung H-J* (2014) Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 14147–14152.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1404171111>
  34. *Izzo F, Marra P, Beneduce G, Castello G, Vallone P, De Rosa V, Cremona F, Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA, Ng C, Curley SA* (2004) Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 22: 1815–1822.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.120>
  35. *Feun LG, Marini A, Walker G, Elgart G, Moffat F, Rodgers SE, Wu CJ, You M, Wangpaichitr M, Kuo MT, Sisson W, Jungbluth AA, Bomalaski J, Savaraj N* (2012) Negative argininosuccinate synthetase expression in melanoma tumours may predict clinical benefit from arginine-depleting therapy with pegylated arginine deiminase. *Br J Cancer* 106: 1481–1485.  
<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.106>
  36. *Syed N, Langer J, Janczar K, Singh P, Lo Nigro C, Lattanzio L, Coley HM, Hatzimichael E, Bomalaski J, Szlosarek P, Awad M, O'Neil K, Roncaroli F, Crook T* (2013) Epigenetic status of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase modulates autophagy and cell death in glioblastoma. *Cell Death Dis* 4: e458.  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2012.197>

37. *Savaraj N, Wu C, Li Y-Y, Wangpaichitr M, You M, Bomalaski J, He W, Kuo MT, Feun LG* (2015) Targeting argininosuccinate synthetase negative melanomas using combination of arginine degrading enzyme and cisplatin. *Oncotarget* 6: 6295–6309.
38. *Starikova EA, Sokolov AV, Vlasenko AY, Burova LA, Freidlin IS, Vasilyev VB* (2016) Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem Cell Biol* 94: 129–137.  
<https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0069>
39. *Starikova EA, Golovin AS, Vasilyev KA, Karaseva AB, Serebriakova MK, Sokolov AV, Kudryavtsev IV, Burova LA, Voynova IV, Suvorov AN, Vasilyev VB, Freidlin IS* (2019) Role of arginine deiminase in thymic atrophy during experimental *Streptococcus pyogenes* infection. *Scand J Immunol* 89: e12734.  
<https://doi.org/10.1111/sji.12734>
40. *Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q* (2020) The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 21: 1960.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21061960>
41. *He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S, Ma X* (2018) Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv Nutr* 9: 493–504.  
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy011>
42. *Chikte S, Panchal N, Warnes G* (2014) Use of LysoTracker dyes: A flow cytometric study of autophagy. *Cytometry Part A* 85: 169–178.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22312>
43. *Gong H, Zölzer F, von Recklinghausen G, Havers W, Schweigerer L* (2000) Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia* 14: 826–829.  
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401763>
44. *Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, Zea AH, Ochoa AC* (2001) L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res* 7: 958s–965s.
45. *Unissa R, Sudhakar M, Reddy ASK* (2016) Evaluation of in vitro Anti-proliferative Activity of L-arginine deiminase from Novel Marine Bacterial Isolate. *Microbiol Res J Int* 1–10.  
<https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/23592>
46. *García-Navas R, Munder M, Mollinedo F* (2012) Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy* 8: 1557–1576.  
<https://doi.org/10.4161/auto.21315>
47. *Di Marzio L, Russo FP, D'Alò S, Biordi L, Ulisse S, Amicosante G, De Simone C, Cifone MG* (2001) Apoptotic effects of selected strains of lactic acid bacteria on a human T leukemia cell line are associated with bacterial arginine deiminase and/or sphingomyelinase activities. *Nutr Cancer* 40: 185–196.  
[https://doi.org/10.1207/S15327914NC402\\_16](https://doi.org/10.1207/S15327914NC402_16)

### Mechanisms of Antiproliferative Action of Streptococcal Arginine Deiminase Against Jurkat Lymphoblastic Leukemia Cells

E. A. Starikova<sup>a, b, c, \*</sup>, J. T. Mammedova<sup>a</sup>, A. Ozhiganova<sup>a</sup>,  
L. A. Burova<sup>a</sup>, and I. V. Kudryavtsev<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

<sup>b</sup> The First St. Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

<sup>c</sup> Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

\*e-mail: Starickova@yandex.ru

Arginine deprivation strategy is considered as a promising trend in cancer therapy. The aim of the study was to investigate the influence of streptococcal arginine deiminase on Jurkat lymphoblastic leukemia cells. The effects of the supernatants of the destroyed streptococci of the original strain expressing arginine deiminase and its isogenic mutant with the inactivated *arcA* gene were compared. Cell proliferation was evaluated in an MTT-test. The remaining parameters were examined using flow cytometry. The cell cycle changes were studied using DAPI dye and anti-cyclin A2 antibodies. The autophagy

gy intensity was assessed using the LysoTracker™ Green DND-26 reagent. To investigate cell viability DAPI staining was performed. Streptococcal arginine deiminase suppressed proliferative activity Jurkat lymphoblastic leukemia cells, increased the proportion of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases, reduced S/G<sub>2</sub> phases proportion of cells and enhanced autophagy, without declining viability. Arginine supplementation leveled the effects of the enzyme. The obtained results open up the possibility of using arginine-hydrolyzing activity of the streptococcal enzyme for combined therapy of oncological diseases.

*Keywords:* streptococcal arginine deiminase, Jurkat cells, proliferation, cell cycle, autophagy

АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ И ПЛОТНОСТИ НЕЙРОНОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ  
МЫШЕЙ В6.Сg-Tg(Prrp-SNCA\*A53T)23Mkle/J-МОДЕЛИ  
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2023 г. И. Н. Рожкова<sup>1</sup>, С. В. Окопруг<sup>1</sup>, Е. Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, Т. А. Рахманова<sup>1, 2</sup>,  
Д. А. Лебедева<sup>1, 2</sup>, В. С. Козенева<sup>1, 2</sup>, Н. В. Хоцкий<sup>1</sup>, С. Я. Амстиславский<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

\*E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Болезнь Паркинсона (БП) является прогрессирующей возрастной нейродегенеративной патологией центральной нервной системы, при которой происходит избирательная потеря дофаминергических нейронов nigrostriарного пути и для которой характерно наличие специфических включений (телец Леви) в дофаминовых нейронах. Для изучения механизмов возникновения данной патологии и для поиска возможных путей ее коррекции созданы генетические модели БП на мышах. Трансгенные мыши линии В6.Сg-Tg(Prrp-SNCA\*A53T)23Mkle/J (далее в тексте В6.Сg-Tg) имеют мутацию А53Т в гене альфа-синуклеина человека и представляют собой модель БП. Целью данной работы было исследование локомоторной активности и уровня тревожности, а также плотности нейронов в головном мозге самцов мышей линии В6.Сg-Tg в возрасте шести месяцев. В качестве контроля были использованы мыши С57BL/6J (дикий тип) того же пола и возраста. Полученные результаты показывают, что для мышей В6.Сg-Tg характерна высокая двигательная активность и низкая тревожность. Наряду с этим у них было обнаружено избирательное снижение плотности нейронов в субвентрикулярной зоне, черной субстанции, а также зонах СА1, СА3, СА4 и гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа. Таким образом, мыши линии В6.Сg-Tg в возрасте шести месяцев лишь частично соответствуют основным патофизиологическим признакам БП, таким как снижение плотности нейронов в черной субстанции, а также в СА1 и СА3 зонах гиппокампа. Однако при этом у них отсутствует брадикинезия и тревожность.

**Ключевые слова:** мыши С57BL/6J, В6.Сg-Tg(Prrp-SNCA\*A53T)23Mkle/J, болезнь Паркинсона, двигательная активность, тревожность, головной мозг, плотность нейронов

DOI: 10.31857/S0869813923090091, EDN: ORGVEX

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является прогрессирующей возрастной нейродегенеративной патологией центральной нервной системы (ЦНС), характеризующейся избирательной потерей дофаминергических нейронов nigrostriарного пути и на-

личием специфических включений (телец Леви) в дофаминовых нейронах [1, 2]. Данное заболевание является вторым по распространенности среди нейродегенеративных расстройств после болезни Альцгеймера и представляет собой разновидность синуклеинопатии [3, 4]. При точечной мутации *A53T* у людей с БП белок альфа-синуклеин накапливается в различных отделах головного мозга [5, 6]. Обычно альфа-синуклеин распределяется в пресинаптической мембране нейронов, контролируя транспорт синаптических везикул [7]. Избыточное накопление альфа-синуклеина характерно для патологических состояний, а его агрегаты распределяются в телах клеток или нейритах, нарушая функционирование ядра, повреждая синаптические везикулы и большинство органелл нейронов [8]. Такие изменения в ЦНС приводят по мере развития БП к неконтролируемому тремору, ригидности, нарушению двигательной активности и постверхальных реакций, когнитивным расстройствам, дисфункции вегетативной нервной системы и нарушению сна [9]. У пациентов с БП выделяют пять стадий развития патологии, при которых наблюдают нарушения в различных структурах головного мозга, в частности в черной субстанции, гиппокампе, полосатом теле и префронтальной коре [10–23]. Черная субстанция является одной из структур головного мозга, которая поражается к третьей стадии БП, что сопровождается чрезмерным накоплением в ее клетках альфа-синуклеина и приводит к двигательным нарушениям [10, 15, 20]. К четвертой стадии БП у пациентов обнаружено накопление альфа-синуклеина в СА2 зоне гиппокампа, важной структуре, отвечающей за обработку пространственной информации, эпизодическую и социальную память [11]. Наряду с этим при БП обнаружены нарушения в СА1 и СА3 зонах гиппокампа [18, 21, 22]. При помощи функциональной магнитно-резонансной томографии было установлено, что в состоянии покоя у людей с БП имеет место снижение спонтанной нейронной активности в префронтальной коре, а также уменьшение серого вещества в данной области, что связывают с нарушением когнитивных функций при БП [13, 14]. Также было показано уменьшение объема хвостатого ядра полосатого тела при БП, что может быть признаком прогрессирования заболевания [16].

Помимо исследований на людях, БП широко изучают на токсических [24–26] и генетических [27–36] моделях БП, созданных на мышах. Генетические модели БП считаются надежными для изучения патогенетических механизмов развития паркинсонизма [27, 28, 37, 38]. Такие модели представлены трансгенными линиями мышей, у которых экспрессируется мутантная форма *A30P* и/или *A53T* гена альфа-синуклеина человека [24, 27, 28].

Основными симптомами БП у мышей считают нарушения локомоторной активности, изменение уровня тревожности и когнитивных функций, а также нарушения в различных структурах головного мозга, которые не полностью гомологичны нарушениям, характерным для БП человека [24, 35, 38–41]. Трансгенные гемизиготные мыши линии *B6.Cg-Tg(Pmp-SNCA\**A53T*)23Mkle/J* (далее по тексту *B6.Cg-Tg*) с мутацией *A53T* в гене альфа-синуклеина человека были созданы в Джексоновской лаборатории (США) [42] и выбраны в качестве модели БП для нашего исследования. Мыши этой линии демонстрируют изменения локомоторной активности в более раннем возрасте, чем мыши с мутацией *A30P* [28], что создает определенные предпочтения в пользу выбора именно первой модели.

Для изучения двигательного поведения, тревожности, исследовательской активности и когнитивных способностей у мышей с симптомами БП используют тест открытого поля (ОП), приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), ротарод, водный тест Морриса, тесты с вращающимся стержнем и тест на распознавание нового объекта [26, 38, 40, 41, 43, 44]. В качестве поведенческих маркеров линий мышей, являющихся моделями БП, чаще всего выбирают двигательную актив-

ность и уровень тревожности, хотя результаты этих работ достаточно противоречивы [38–41, 45, 46].

Помимо исследования поведения, у мышей с симптомами БП при помощи гистологических и иммуногистохимических методов изучали развитие нервной системы [26, 30, 44, 47]. Гиппокамп находится в центре внимания этих исследований, поскольку изменения в гиппокампе характерны для БП и некоторых других нейродегенеративных заболеваний [48–50]. В частности, в зонах СА2 и СА3 гиппокампа обнаружены изменения как на генетической модели БП, созданной на мышах В6.С3-Tg(Pnnp-SNCA\*A53T)83Vle/J (линия В6.С3-Tg), так и у людей при данной патологии [10].

В нашей работе была исследована трансгенная линия В6.Сg-Tg, у которой экспрессируется мутантная форма *A53T* гена альфа-синуклеина человека, а также имеется ряд биохимических и поведенческих особенностей, характерных для синуклеинопатий [29, 30, 51]. Эта модель воспроизводит основные симптомы синуклеинопатии, включая развивающуюся с возрастом нейродегенерацию, характерную для БП [35, 37]. У мышей В6.Сg-Tg показана обонятельная дисфункция [51]. Однако по координации движений и равновесия в тестах ротарод и подвешивание на проволоке различий с контролем обнаружено не было [51]. Ранее было показано, что мыши В6.Сg-Tg в возрасте пяти–шести месяцев отличаются повышенной локомоторной активностью [52, 53]. До проведения настоящего исследования уровень тревожности у мышей линии В6.Сg-Tg в этом возрасте не оценивали.

В возрасте пяти месяцев у мышей В6.Сg-Tg была обнаружена низкая активность аутофагии в префронтальной коре, стриатуме и черной субстанции по сравнению с контрольными мышами С57BL/6J, а также снижение уровня тирозингидроксилазы в стриатуме, но не в черной субстанции [29]. Кроме того, у В6.Сg-Tg линии выявлено снижение уровня мРНК *Cst3* (цистатина С) в стриатуме и миндалевидном теле по сравнению с контролем [30]. По уровню апоптоза нейронов в субвентрикулярной зоне различий между линиями мышей обнаружено не было, однако было установлено снижение нейрогенеза у мышей В6.Сg-Tg [51]. Между тем плотность нейронов в таких важных для развития БП отделах мозга, как префронтальная кора, структуры нигростриарного пути и гиппокамп на данной модели до сих пор не изучали, хотя на сходных моделях было обнаружено уменьшение числа нейронов в различных зонах гиппокампа, а также в черной субстанции [10, 36].

Настоящее исследование направлено 1) на анализ общей и исследовательской активности, а также уровня тревожности; 2) на оценку плотности нейронов в префронтальной коре, СА1, СА2, СА3, СА4 областей и зубчатой извилины гиппокампа, хвостатого ядра полосатого тела и субвентрикулярной зоны, а также черной субстанции у контрольных мышей С57BL/6J (дикий тип) и мышей В6.Сg-Tg (модель болезни Паркинсона).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

В эксперименте были исследованы две линии мышей, а именно: семь самцов В6.Сg-Tg(Pnnp-SNCA\*A53T)23Mkle/J (далее по тексту – В6.Сg-Tg), гемизиготные мыши, моделирующие БП, полученные из Джексоновской лаборатории (США) [42] и 15 самцов контрольной линии С57BL/6J (далее по тексту – С57BL). Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером 34.3 × 29.2 × 15.5 см, при температуре 22–24°C и влажности 40–50%, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня–ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстила использовали березовую щепу, фракционную для содержания

лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Животные имели постоянный доступ к автоклавированному стандартизированному комбикорму для лабораторных крыс и мышей “Дельта Фидс” ЛБК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 (Био-Про, Россия) и очищенной воде “Северянка” (Экопроект, Россия), обогащенной минеральными добавками.

#### *Анализ поведения*

Изучение поведения проводили у семи самцов В6.Сg-Tg и 15 самцов C57BL в возрасте шести месяцев. Общую двигательную активности и тревожность изучали с помощью тестов открытое поле (ОП) и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Каждого самца помещали в чистую, индивидуально вентилируемую клетку за два дня до тестирования. Для устранения запахов все поверхности камер для тестирования очищали после каждого животного 6%-ным раствором перекиси водорода. Поведение регистрировали с помощью вертикальных видеокамер и анализировали с помощью программно-аппаратного комплекса EthoVisionXT (Noldus, Нидерланды).

#### *Тест открытое поле*

Тест ОП традиционно используют для оценки поведенческих профилей грызунов [54, 55]. Время проведения испытания с 16:00 до 18:00, что совпадало с началом темного времени суток в комнате содержания животных (16:00), то есть в период наибольшей активности животных. Для проведения теста использовали круглую арену (OpenScience, Россия) диаметром 60 см из белого поливинилхлорида, огороженную стенкой высотой 30 см. Продолжительность теста составляла пять минут. Регистрировали стандартные параметры: 1) пройденное расстояние, 2) время, проведенное в центре, 3) время, проведенное на периферии, 4) число вертикальных стоек и 5) число грумингов. Регистрацию поведения проводили два исследователя вручную.

#### *Тест приподнятый крестообразный лабиринт*

Тест ПКЛ используют для оценки уровня тревожности и двигательной активности, часто в сочетании с тестом ОП [55, 56]. Лабиринт, использованный в данном исследовании, состоял из двух открытых ( $25 \times 5/30 \times 5.5$  см) и двух закрытых ( $25 \times 5 \times 30/30 \times 5.5 \times 14.5$  см) рукавов, разделенных центральной ареной ( $5 \times 5$  см). Установка располагалась на высоте 50 см над поверхностью пола и освещалась лампой накаливания (40 Вт), расположенной сверху на высоте 130 см. Продолжительность теста составляла пять минут. Регистрировали стандартные параметры: 1) доля времени нахождения в открытых и закрытых рукавах, 2) доля исследованной площади в открытых и закрытых рукавах, 3) число свешиваний с рукавов и 4) число вытягиваний [55, 56].

#### *Интракардиальная перфузия*

Перфузию осуществляли через систему кровообращения для фиксации тканей головного мозга, как описано ранее [57]. Сразу после окончания поведенческих тестов мышей наркотизировали, вводя им внутримышечно 75 мкл (на 10 г массы тела) медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и 60 мкл (на 10 г массы тела) золетила (Virbas, Франция). Далее им вводили через кровеносную систему 30–50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 4%-ный раствор формалина, приготовленного на PBS. После этого мозг извлекали и помещали в 30%-ный

раствор сахарозы, приготовленный на PBS с добавлением 10% формалина, при 4°C для обезвоживания и последующей фиксации в течение следующих 2 недель, пока фиксированный материал не опустится на дно колбы. Образцы мозга погружали в Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), затем замораживали и хранили при -70°C.

#### *Приготовление замороженных срезов мозга*

По пять животных каждой из исследуемой линии были выбраны случайным образом с целью гистологического анализа мозга. В соответствии с координатами атласа Paxinos и соавт. [58], делали замороженные срезы следующих областей головного мозга: 1) префронтальной коры (ПК) на расстоянии 2.46–2.22 мм от брегмы; 2) хвостатого ядра полосатого тела (ПТ) и субвентрикулярной зоны (subventricular zone – SVZ) на расстоянии 0.74–0.26 мм от брегмы; 3) гиппокампа (области CA1, CA2, CA3, CA4 и зубчатая извилина, dentate gyrus – DG) на расстоянии -1.46 (-1.82) мм от брегмы; 4) черной субстанции (ЧС) на расстоянии -3.20 (-3.60) мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили при -25°C на криотоме HM550 OP (Thermo Scientific, США) и помещали на предметные стекла Superfrost Plus, Menzel-Glaser (Thermo Fisher Scientific, США).

#### *Иммуногистохимическое окрашивание*

Окрашивание образцов проводили по протоколам производителей наборов с небольшими модификациями [57]. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение пяти минут в PBS. Затем после регидратации в 10 мМ щелочно-цитратного буфера (pH 9) при 95°C на водяной бане (TW-2.02, Elmi, Латвия) в течение 10 мин проводили индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы удаляли из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1% Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). После этого в каждую секцию на 30 мин добавляли ProteinBlock (ab64226, Abcam, Великобритания) и удаляли лишнюю жидкость в соответствии с рекомендацией производителя. После этого добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при 4°C во влажной темной камере.

Используемые концентрация антитела составляли 1:750 для anti-NeuN (ab177487, Abcam, Великобритания). Затем срезы промывали буфером PBS-Tween, удаляли лишнюю жидкость, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG & LAF488 (ab150077, Abcam, Великобритания) в концентрации 1 : 650 и оставляли во влажной среде в темной камере на два часа при 4°C. После этого образцы промывали буфером PBS-Tween, удаляли излишки жидкости и монтировали на предметные стекла в среде ProLong, Glass Antifade Mountant (Thermo P36982, Thermo Fisher Scientific, США). После добавления антител срезы обрабатывали в темной камере, защищенной от света.

#### *Анализ плотности нейронов*

Анализ плотности меченных антителами нейронов проводили с использованием прямого флуоресцентного микроскопа ZEISS AxioImager 2 (Carl Zeiss, Германия) для ПК (2/3 и 5/6 слоев), ПТ, SVZ, ЧС, а также CA1, CA2, CA3, CA4 (переходная область между CA3 и полиморфным слоем DG) и DG (гранулярного и полиморфного слоев) областей гиппокампа. Для создания поля зрения (5000 мкм<sup>2</sup>) использовали программу ImageJ. Вычисляли среднее число клеток, меченных антителами в



**Таблица 1.** Поведение в тесте открытое поле самцов мышей C57BL и B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев

Параметры	Группа		F, <i>p</i>
	C57BL	B6.Cg-Tg	
Пройденный путь, см	2365.3 ± 182.5	3956.8 ± 300.1	F <sub>(1,19)</sub> = 22.813 <i>p</i> = 0.0001
Время в центре, % от общего	11.0 ± 2.0	7.2 ± 1.4	F <sub>(1,19)</sub> = 1.5214 <i>p</i> > 0.05
Время на периферии, % от общего	89.0 ± 2.0	92.8 ± 1.4	F <sub>(1,19)</sub> = 1.5214 <i>p</i> > 0.05
Число грумингов	14.0 ± 2.4	22.4 ± 8.6	F <sub>(1,19)</sub> = 1.5209 <i>p</i> > 0.05
Число вертикальных стоек	27.8 ± 3.2	45.0 ± 4.8	F <sub>(1,19)</sub> = 37.59 <i>p</i> < 0.01

интересующей области с четырех срезов для каждого животного, и рассчитывали среднюю плотность (миллионов клеток,  $n \times 10^6$ ) в объеме (мм<sup>3</sup>).

#### Статистический анализ

Анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Поведенческие параметры оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением LSD-методом Фишера. Плотность нейронов во всех исследуемых областях головного мозга сравнивали между группами по *t*-критерию Стьюдента. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего ( $m \pm SEM$ ). За уровень значимости принимали  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Тест открытое поле

Результаты исследования мышей в тесте ОП представлены в табл. 1. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 22.813$ ;  $p < 0.001$ ] на параметр “пройденный путь”. *Post-hoc* анализ при помощи Fisher LSD сравнения показал, что самцы B6.Cg-Tg проходили большую дистанцию ( $p < 0.001$ ), чем самцы C57BL. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 37.59$ ;  $p < 0.01$ ] на параметр число вертикальных стоек. *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы B6.Cg-Tg делали больше стоек ( $p < 0.01$ ), чем самцы C57BL. Оба параметра свидетельствуют о высокой локомоторной активности мышей B6.Cg-Tg линии.

### Тест приподнятый крестообразный лабиринт

Данные тестирования в тесте ПКЛ представлены в табл. 2. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 4.7674$ ;  $p < 0.05$ ] на пройденный путь. *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы B6.Cg-Tg проходили большую дистанцию ( $p < 0.05$ ), чем самцы C57BL. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 10.822$ ;  $p < 0.01$ ] на время, проведенное в открытых рукавах. *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы B6.Cg-Tg дольше находились в открытых рукавах ( $p < 0.01$ ), чем

**Таблица 2.** Поведение в тесте приподнятый крестообразный лабиринт самцов мышей C57BL и B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев

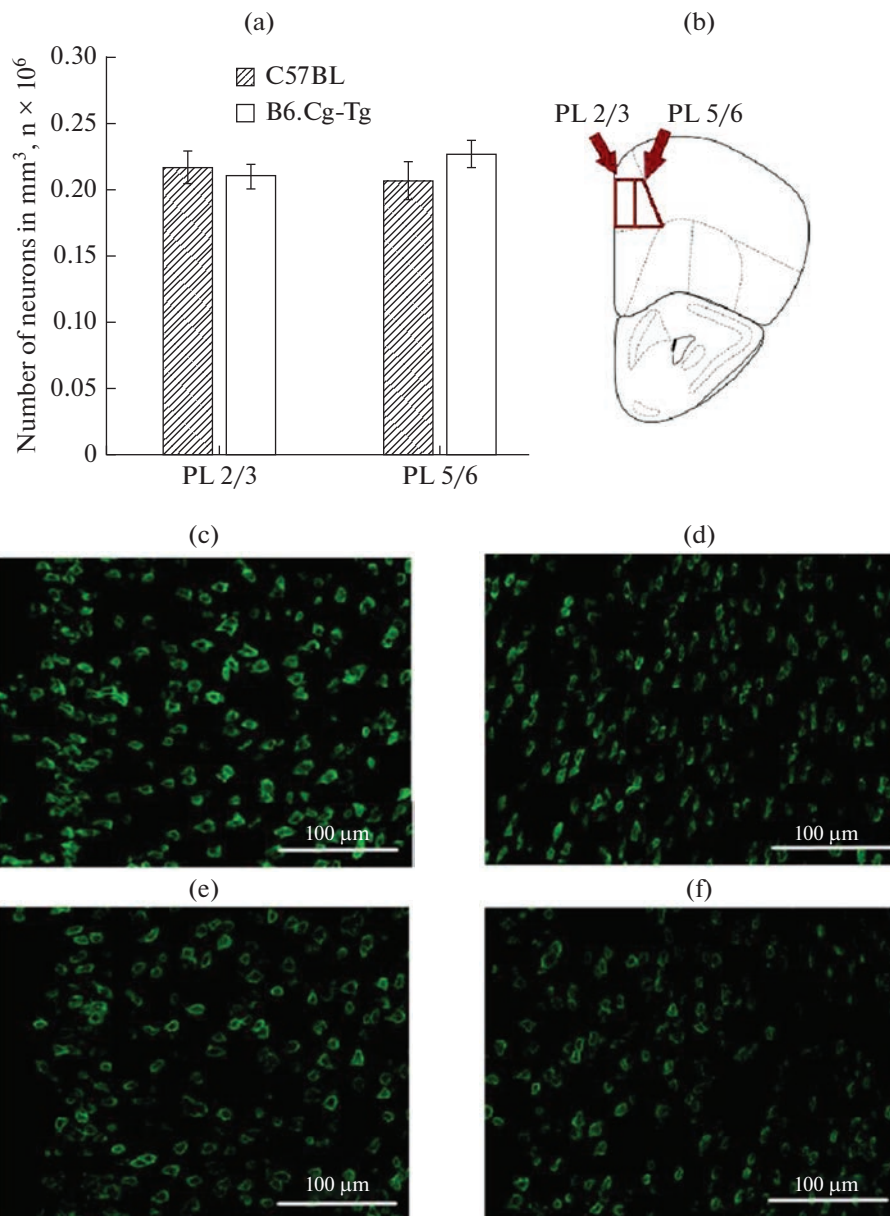
Параметры	Группа		F, p
	C57BL	B6.Cg-Tg	
Пройденный путь, см	1109.9 ± 77.6	1403.5 ± 109.7	$F_{(1,19)} = 4.7674$ $p < 0.05$
Время в закрытых рукавах, % от общего	75.9 ± 3.3	67.6 ± 4.7	$F_{(1,19)} = 2.0883$ $p > 0.05$
Время в центре, % от общего	11.7 ± 2.0	11.5 ± 2.8	$F_{(1,19)} = 2.2484$ $p > 0.05$
Время в открытых рукавах, % от общего	7.4 ± 2.4	20.9 ± 3.3	$F_{(1,19)} = 10.822$ $p < 0.01$
Число выглядываний	8.5 ± 3,0	24.3 ± 4.2	$F_{(1,19)} = 9.3112$ $p < 0.01$
Общее время выглядываний, с	2.8 ± 256	15.2 ± 3.6	$F_{(1,19)} = 7.7549$ $p < 0.05$
Число вытягиваний	11.6 ± 1.3	10.4 ± 1.8	$F_{(1,19)} = 0.2698$ $p > 0.05$
Общее время вытягиваний, с	5.2 ± 1.4	9.5 ± 2.0	$F_{(1,19)} = 3.1685$ $p > 0.05$

самцы C57BL. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 9.3112$ ;  $p < 0.01$ ] на число выглядываний. *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы B6.Cg-Tg выглядывали из рукавов лабиринта чаще ( $p < 0.01$ ), чем самцы C57BL. Однофакторный ANOVA выявил эффект линии [ $F_{(1,19)} = 7.7549$ ;  $p < 0.05$ ] на общее время выглядываний. *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы B6.Cg-Tg дольше выглядывали из закрытых рукавов ( $p < 0.05$ ), чем самцы C57BL. Результаты теста ПКЛ свидетельствуют о высокой локомоторной активности и низком уровне тревожности у мышей B6.Cg-Tg линии.

#### Анализ плотности нейронов

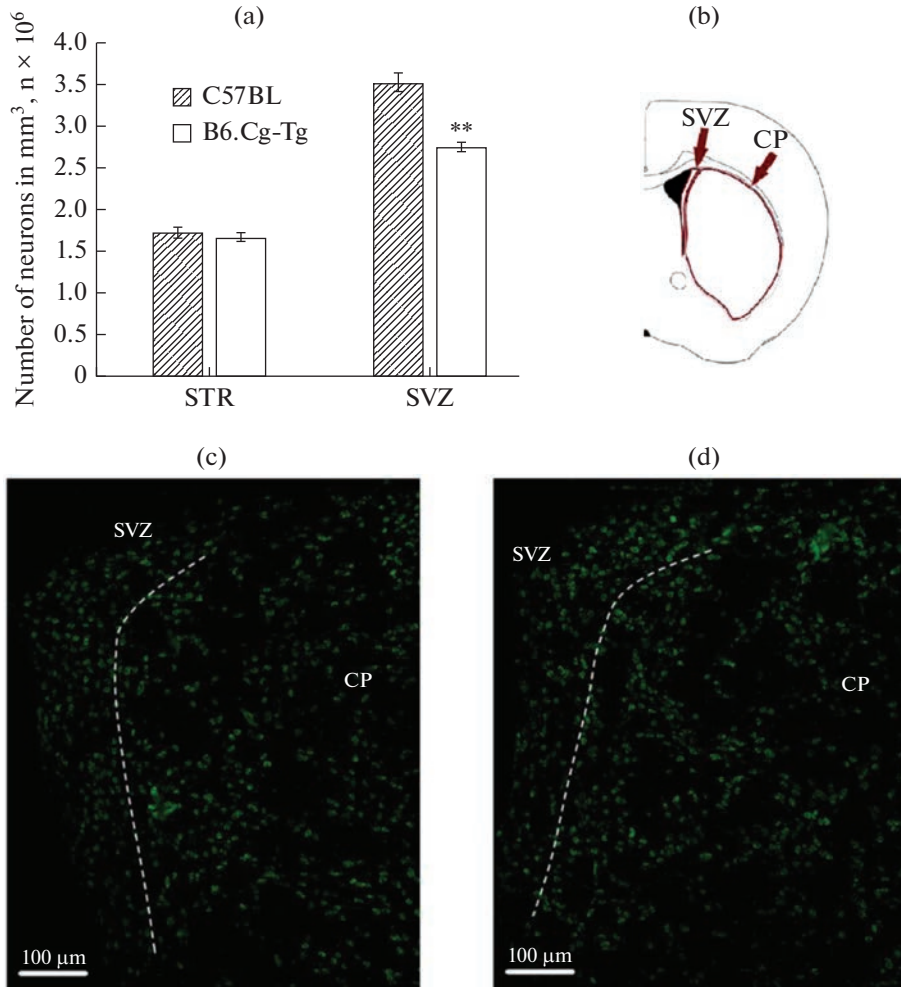
Данные по плотности нейронов в ПК (2/3 и 5/6 слоях), SVZ, ПТ и ЧС представлены на рис. 1–3. Статистический анализ не выявил различий по числу нейронов в ПК (2/3 и 5/6 слоях) и ПТ головного мозга у мышей B6.Cg-Tg и C57BL (рис. 1–2). Однако было обнаружено уменьшение числа нейронов ( $p < 0.01$ ) в SVZ у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с C57BL ( $0.28 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$  против  $0.35 \times 10^6 \pm 0.02 \times 10^6$ ) (рис. 2). Кроме того, статистический анализ выявил уменьшение числа нейронов ( $p < 0.05$ ) в ЧС у мышей B6.Cg-Tg группы по сравнению с контролем ( $0.11 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$  против  $0.14 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$ ) (рис. 3).

Данные по плотности нейронов в CA1, CA2, CA3, CA4 и DG областях гиппокампа представлены на рис. 4–5. Статистический анализ выявил уменьшение числа нейронов ( $p < 0.05$ ) в CA1 области у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с особями группы C57BL ( $1.09 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$  против  $1.28 \times 10^6 \pm 0.03 \times 10^6$ ) (рис. 4). Однако в CA2 области гиппокампа различий по числу нейронов выявлено не было (рис. 4). Также было обнаружено уменьшение числа нейронов в CA3 ( $p < 0.05$ ) и CA4 ( $p < 0.01$ ) областях гиппокампа, а также в гранулярном слое DG области ( $p < 0.01$ ) у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с контролем ( $0.72 \times 10^6 \pm 0.03 \times 10^6$  и  $0.85 \times 10^6 \pm 0.03 \times 10^6$



**Рис. 1.** Плотность нейронов в префронтальной коре головного мозга (2/3 и 5/6 слои) у самцов мышей B6.Cg-Tg и C57BL, нейроны мечены антителами против NeuN; (a) – число нейронов (в миллионах на  $\text{мм}^3$ ); (b) – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Микрофотографии срезов мозга данной области: (c–d) – C57BL (2/3 и 5/6 слои соответственно); (e–f) – B6.Cg-Tg (2/3 и 5/6 слои соответственно).

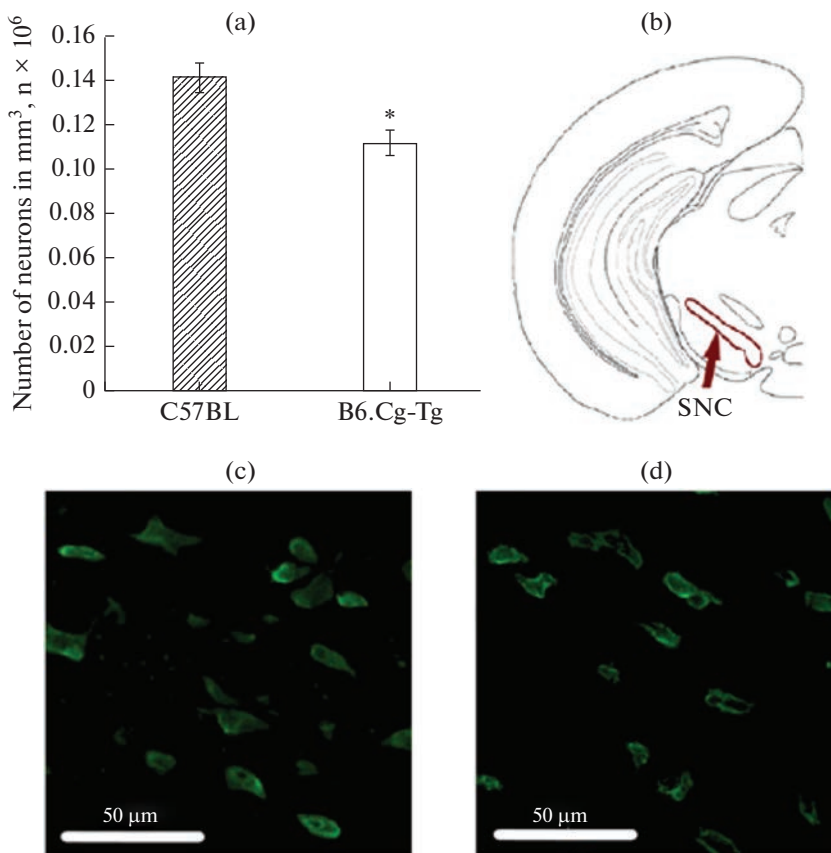
для CA3;  $0.29 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$  и  $0.33 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$  для CA4;  $1.43 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$  и  $1.62 \times 10^6 \pm 0.02 \times 10^6$  для DG) (рис. 5). Однако для полиморфного слоя DG области не было обнаружено различий по числу нейронов у мышей B6.Cg-Tg и C57BL (рис. 4).



**Рис. 2.** Плотность нейронов в субвентрикулярной зоне (subventricular zone – SVZ) и хвостом ядра полосатого тела (caudoputamen – CP), нейроны мечены антителами против NeuN; (a) – число нейронов (в миллионах на  $\text{мм}^3$ ); (b) – схематическое обозначение исследуемых областей в головном мозге. #Микрофотографии срезов мозга данной области: (c) – C57BL; (d) – B6.Cg-Tg. \*\*  $p < 0.01$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У мышей B6.Cg-Tg была обнаружена высокая локомоторная активность, что было подтверждено в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. Наши данные согласуются с результатами, полученными ранее на мышах этой линии [52, 53], а также на других линиях, являющихся моделями БП [46]. У мышей линии hA53T, которая также моделирует БП, двигательная активность также была повышена по сравнению с контролем (диким типом) [46]. В то же время некоторые исследования свидетельствуют, что в определенном возрасте двигательная активность у трансгенных мышей, моделирующих БП, может быть ниже таковой контрольных животных [38, 40, 41]. Так, у трансгенных мышей с мутацией A53T в гене альфа-синуклеина человека наблюдается снижение двигательной ак-

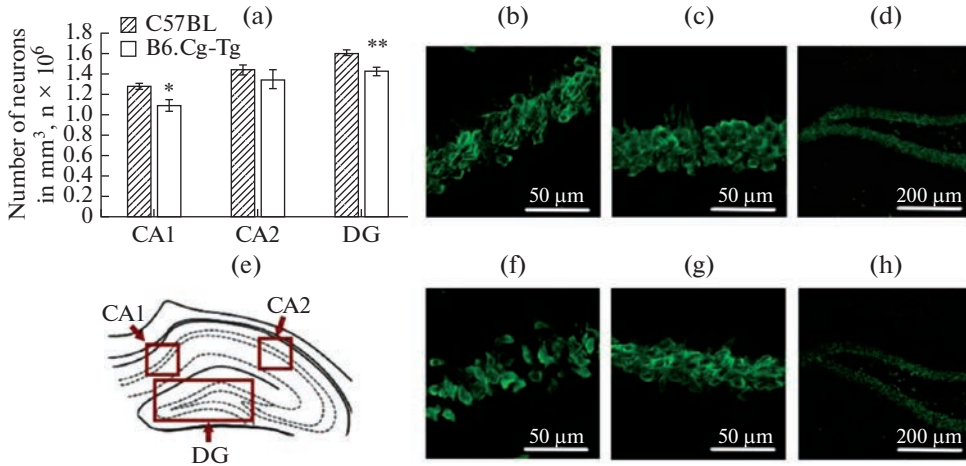


**Рис. 3.** Плотность нейронов в черной субстанции (substantia nigra – SNC), нейроны мечены антителами против NeuN; (a) – число нейронов (в миллионах на  $\text{mm}^3$ ); (b) – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге.

Микрофотографии срезов мозга данной области: (c) – C57BL; (d) – B6.Cg-Tg. \*  $p < 0.05$ .

тивности в возрасте восьми месяцев по сравнению с контролем в тесте ОП [39–41], как и у мышей линий SNCA [59] и A53T-a-Syn [38].

В нашем исследовании впервые изучено поведение мышей B6.Cg-Tg в тесте ПКЛ. Результаты этого теста свидетельствуют о снижении уровня тревожности у мышей B6.Cg-Tg. Ранее на трансгенных мышах TG hA53T SN, которые также моделируют БП, наблюдали снижение уровня тревожности по сравнению с диким типом [45]. В других работах у трансгенных мышей hA53T и A53T-a-Syn, моделирующих БП, наблюдали сложную динамику изменения уровня тревожности с возрастом [38, 46]. Так, в двухмесячном возрасте мыши hA53T проводили меньше времени в открытых рукавах по сравнению с мышами дикого типа, в восьмимесячном – различий по данному параметру с контролем не наблюдали, а в 12-месячном, наоборот, животные данной модели БП проводили больше времени в открытых рукавах по сравнению с контролем [46]. Уровень тревожности у мышей линии A53T-a-Syn, еще одной модели БП, также становился ниже с возрастом [38]. Следует отметить, что на особенности поведения мышей, относящихся к моделям БП, влияет



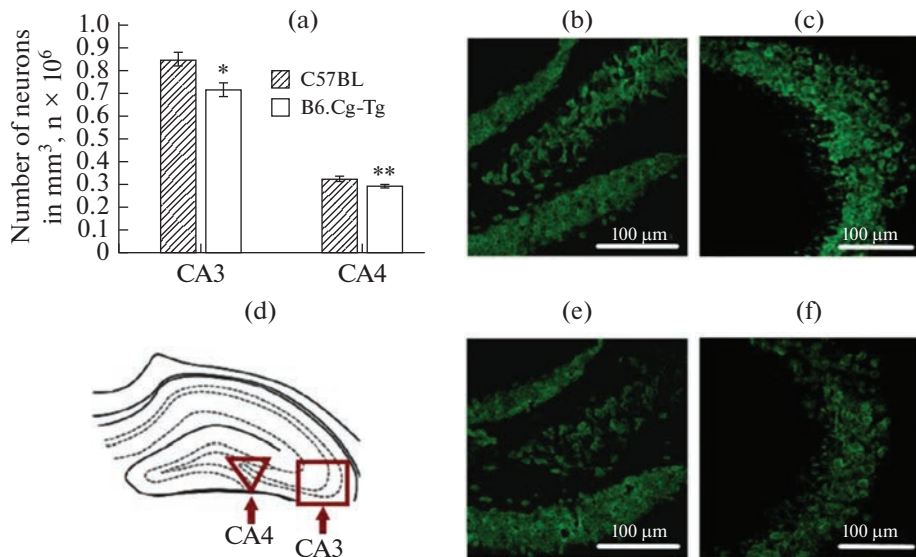
**Рис. 4.** Плотность нейронов в CA1, CA2 и в гранулярном слое DG областей гиппокампа, нейроны мечены антителами против NeuN; (a) – число нейронов (в миллионах на  $\text{mm}^3$ ); (e) – схематическое обозначение исследуемых областей в головном мозге.

Микрофотографии срезов мозга данных областей: (b–d) – C57BL (CA1, CA2 и гранулярного слоя DG области гиппокампа соответственно); (f–h) – B6.Cg-Tg (CA1, CA2 и гранулярного слоя DG области гиппокампа соответственно). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

способ получения трансгенной линии, а также их гомозиготность/гетерозиготность по соответствующему гену [27, 45].

Тревога и депрессивно-подобное состояние характерны для БП человека и проявляются еще до появления двигательных симптомов [60]. Механизмы, связанные с изменением поведения в тестах ОП и ПКЛ у мышей B6.Cg-Tg, моделирующих данное заболевание, остаются неясными. Между тем, следует отметить, что нейромедиатор дофамин вовлечен в тревожно-подобное поведение [61]. У трансгенных мышей A53T, моделирующих БП, в возрасте семи месяцев экспрессия дофамина снижена в прилежащем ядре и полосатом теле, что может быть связано с повышенной гиперактивностью, характерной для этой линии [28]. Имеются свидетельства того, что альфа-синуклеин влияет на дофаминовые системы головного мозга через модуляцию его выделения из нейронов [62, 63], влияя на синтез дофамина [64, 65]. Экспрессия A53T может приводить к нарушению регуляции синтеза дофамина у трансгенных мышей, приводя к гиперактивности по механизму, который наблюдают у животных с нокаутом дофамина [66, 67]. Исходя из полученных в нашей работе результатов можно сделать вывод о том, что мыши B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев имеют изменения в поведении, в частности повышение двигательной активности и снижение тревожности, что нехарактерно для БП человека. Однако можно предположить, что с возрастом поведение может меняться, как уже было показано для некоторых линий мышей с синуклеопатией.

В настоящей работе у мышей B6.Cg-Tg не было обнаружено изменения плотности нейронов в префронтальной коре, полосатом теле, а также в CA2 зоне и полиморфном слое DG области гиппокампа по сравнению с диким типом. Однако в субвентрикулярной зоне, черной субстанции, а также CA1, CA3, CA4 зонах и гранулярном слое DG областей гиппокампа у мышей B6.Cg-Tg число нейронов было существенно ниже по сравнению с контрольной линией. У пациентов с БП также обнаруживают нарушения в гиппокампе, в частности в CA1, CA2 и CA3 зонах [10–



**Рис. 5.** Плотность нейронов в CA3 и CA4 областях гиппокампа, нейроны мечены антителами против NeuN; (a) – число нейронов (в миллионах на  $\text{мм}^3$ ); (d) – схематическое обозначение исследуемых областей в головном мозге.

Микрофотографии срезов мозга данных областей: (b, e) – CA4 область гиппокампа (C57BL и B6.Cg-Tg соответственно); (c, f) – CA3 область гиппокампа (C57BL и B6.Cg-Tg соответственно). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

12, 21–23]. Роль CA1 в когнитивных нарушениях при БП была подтверждена аутопсией [21] и при помощи магнитно-резонансной томографии [22]. Было показано снижение объемов CA2–CA3 зон и эпизодической памяти при БП [23]. Снижение числа нейронов в SVZ и ЧС головного мозга у мышей B6.Cg-Tg может быть связано со снижением уровня нейрогенеза в субвентрикулярной зоне, что было подтверждено экспериментально на данной линии [51], либо с обнаруженным у них низким уровнем аутофагии в черной субстанции [29]. Дегградация нейронов в данной области головного мозга было отмечено также у мышей линии Pitx3-A53T $\alpha$ -Syn, являющейся трансгенной моделью БП [36], и характерно для болезни Паркинсона у людей [15, 20].

Наблюдаемое нами снижение общей плотности нейронов в CA3 области гиппокампа может быть связано с повышенной экспрессией альфа-синуклеина и уменьшением числа соматостатин-позитивных нейронов в данной области, что было показано на мышах трансгенной линии B6.C3-Tg [10], которая очень похожа на изучаемую нами модель БП. Снижение плотности кальретиинин- и кальбиндин-позитивных нейронов обнаружено у мышей B6.C3-Tg в CA1 зоне, а также кальретиинин-позитивных нейронов в гранулярном слое DG области гиппокампа [10]. Именно в этих областях нами было обнаружено снижение общего числа нейронов у мышей линии B6.Cg-Tg.

Особый интерес представляет CA4 область гиппокампа, в которой у мышей был обнаружен уникальный набор нейронов, отличный от соседних областей гиппокампа [68]. Данная зона представляет собой структуру между CA3 и DG областями и состоит преимущественно из пирамидных клеток, играет важную роль в формировании ассоциативной памяти, за счет опосредованных возбуждающих и тормозящих сигналов от CA3 зоны к гранулярному слою зубчатой извилины [69]. Неко-

торые исследователи не выделяют СА4 как отдельную область, считая ее частью полиморфного слоя DG [69]. Однако было показано, что область СА4 у мышей отличается плотностью рецепторов от зон СА3 и DG; в частности, в ней наблюдали высокие показатели экспрессии каинатных и AMPA-рецепторов [69]. Кроме того, зона СА4 отличается более низкой плотностью катехоламинергических и бензодиазепиновых, но не ГАМК-А-рецепторов по сравнению с другими областями гиппокампа [69]. Эти различия, а также функциональная специфика позволяет выделить СА4 в самостоятельную область гиппокампа у мышей [69]. Ранее анализ плотности нейронов в СА4 области гиппокампа у мышей, моделирующих БП, не проводили. В нашем исследовании впервые показано уменьшение плотности нейронов в СА4 области гиппокампа у мышей В6.Сg-Tg.

Гиппокамп является структурой мозга, имеющей ключевое значение для разных типов памяти [70]. На поздних этапах БП для нейронов этой структуры характерно накопление альфа-синуклеина, что сопровождается деменцией [71, 72]. Обнаруженное в настоящем исследовании изменение плотности нейронов в областях СА1, СА3, СА4 и гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа можно рассматривать как один из биомаркеров данной патологии, что показано как в нашем исследовании на модели В6.Сg-Tg, так и частично обнаружено другими авторами на сходной генетической модели БП, созданной на мышах [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе у самцов мышей В6.Сg-Tg линии было установлено повышение локомоторной активности, снижение тревожности и уменьшение плотности нейронов в субвентрикулярной зоне, черной субстанции, а также в СА1, СА3, СА4 и гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа, что можно рассматривать как биомаркеры синуклеопатии. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на попытках направленного воздействия в ходе пренатального развития, чтобы, в конечном итоге, обнаружить новые мишени для профилактики этой патологии.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 145 от 29.03.2023) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS № 123).

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФ № 23-25-00123 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” Института цитологии и генетики СО РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – С.Я.А., И.Н.Р., Е.Ю.Б., проведение поведенческих экспериментов – И.Н.Р., С.В.О., Т.А.Р., Д.А.Л., В.С.К., Н.В.Х., обработка резуль-



татов – С.В.О., Е.Ю.Б., Т.А.Р., С.Я.А., написание и редактирование рукописи – С.Я.А., С.В.О., Е.Ю.Б.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yun JW, Ahn JB, Kang BC* (2015) Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care. *Lab Anim Res* 31: 155–165. <https://doi.org/10.5625/lar.2015.31.4.155>
2. *Goswami P, Joshi N, Singh S* (2017) Neurodegenerative signaling factors and mechanisms in Parkinson's pathology. *Toxicol In Vitro* 43: 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.008>
3. *Crotty GF, Schwarzschild MA* (2022) What to test in parkinson disease prevention trials? Repurposed, low-risk, and gene-targeted drugs. *Neurology* 99: 34–41. <https://doi.org/10.1212/WNL.000000000000200238>
4. *Crotty GF, Ascherio A, Schwarzschild MA* (2017) Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Neurol* 298: 210–224. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.06.017>
5. *Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K* (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)* 110: 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
6. *Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL* (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
7. *Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH* (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8: 2804–2815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988>
8. *Wong YC, Krainc D* (2017)  $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med* 23: 1–13. <https://doi.org/10.1038/nm.4269>
9. *Albers JA, Chand P, Anch AM* (2017) Multifactorial sleep disturbance in Parkinson's disease. *Sleep Med* 35: 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.03.026>
10. *Flores-Cuadrado A, Ubeda-Banon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A* (2016) Hippocampal  $\alpha$ -synuclein and interneurons in Parkinson's disease: Data from human and mouse models. *Mov Disord* 31: 979–988. <https://doi.org/10.1002/mds.26586>
11. *Villar-Conde S, Astillero-Lopez V, Gonzalez-Rodriguez M, Villanueva-Anguita P, Saiz-Sanchez D, Martinez-Marcos A, Flores-Cuadrado A, Ubeda-Banon I* (2021) The human hippocampus in Parkinson's disease: An Integrative Stereological and Proteomic Study. *J Parkinsons Dis* 11: 1345–1365. <https://doi.org/10.3233/JPD-202465>
12. *Prakash KG, Bannur BM, Chavan MD, Saniya K, Sailesh KS, Rajagopalan A* (2016) Neuroanatomical changes in Parkinson's disease in relation to cognition: An update. *J Adv Pharm Technol Res* 7: 123–126. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.191416>
13. *Kang DZ, Chen FX, Chen FY, Liu Y, Wu G, Yu LH, Lin YX, Lin ZY* (2016) Altered regional homogeneity of prefrontal cortex in Parkinson's disease with mild cognitive impairment. *Chin Neurosurg J* 12: 10. <https://doi.org/10.1186/s41016-016-0028-5>
14. *Biundo R, Formento-Dojot P, Facchini S, Vallelunga A, Ghezzi L, Foscolo L, Meneghello F, Antonini A* (2011) Brain volume changes in Parkinson's disease and their relationship with cognitive and behavioural abnormalities. *J Neurol Sci* 310: 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.08.001>
15. *Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag A-E, Lang AE* (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 23: 6587–6596. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
16. *Lee SH, Kim SS, Tae WS, Lee SY, Choi JW, Koh SB, Kwon DY* (2011) Regional volume analysis of the Parkinson disease brain in early disease stage: gray matter, white matter, striatum, and thalamus. *AJNR Am J Neuroradiol* 32: 682–687. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2372>
17. *Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, Giladi N, Holloway RG, Moore CG, Wenning GK, Yahr MD, Seidl L* (2004) Movement disorder society task force on rat-

- ing scales for Parkinson's disease. Movement disorder society task force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord* 19: 1020–1028.  
<https://doi.org/10.1002/mds.20213>
18. *Das T, Hwang JJ, Poston KL* (2019) Episodic recognition memory and the hippocampus in Parkinson's disease: A review. *Cortex* 113: 191–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2018.11.021>
  19. *Pagano G, Niccolini F, Politis M* (2016) Imaging in Parkinson's disease. *Clin Med (Lond)* 16: 371–375.  
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-4-371>
  20. *Bae YJ, Kim JM, Sohn CH, Choi JH, Choi BS, Song YS, Nam Y, Cho SJ, Jeon B, Kim JH* (2021) Imaging the substantia nigra in Parkinson disease and other Parkinsonian syndromes. *Radiology* 300: 260–278.  
<https://doi.org/10.1148/radiol.2021203341>
  21. *Adamowicz DH, Roy S, Salmon DP, Galasko DR, Hansen LA, Masliah E, Gage FH* (2017) Hippocampal  $\alpha$ -synuclein in dementia with Lewy bodies contributes to memory impairment and is consistent with spread of pathology. *J Neurosci* 37: 1675–1684.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3047-16.2016>
  22. *Stav AL, Johansen KK, Auning E, Kalheim LF, Selnes P, Bjørnerud A, Hessen E, Aarstrand D, Fladby T* (2016) Hippocampal subfield atrophy in relation to cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease: a cross-sectional study. *NPJ Parkinsons Dis* 2: 15030.  
<https://doi.org/10.1038/npjparkd.2015.30>
  23. *Foo H, Mak E, Chander RJ, Ng A, Au WL, Sitoh YY, Tan LC, Kandiah N* (2016) Associations of hippocampal subfields in the progression of cognitive decline related to Parkinson's disease. *Neuroimage Clin* 14: 37–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2016.12.008>
  24. *Григорян ГА, Базян АС* (2007) Экспериментальные модели болезни Паркинсона на животных. Успехи физиол наук 38: 80–88. [*Grigoryan GA, Bazyan AS* (2007) The experimental models of Parkinson's disease in animals. *Advanc Physiol Sci* 38: 80–88. (In Russ)].
  25. *Stani F, Greco R, Levandis G, Ghezzi C, Daviddi F, Demartini C, Vegeto E, Fuzzati-Armentero MT, Blandini F* (2017) Influence of estrogen modulation on glia activation in a murine model of Parkinson's disease. *Front Neurosci* 11: 306.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00306>
  26. *Tang H, Gao Y, Zhang Q, Nie K, Zhu R, Gao L, Feng S, Wang L, Zhao J, Huang Z, Zhang Y, Wang L* (2017) Chronic cerebral hypoperfusion independently exacerbates cognitive impairment within the pathopoiesis of Parkinson's disease via microvascular pathologies. *Behav Brain Res* 333: 286–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.061>
  27. *Gomez-Isla T, Irizarry MC, Mariash A, Cheung B, Soto O, Schrupp S, Sondel J, Kotilinek L, Day J, Schwarzschild MA, Cha JH, Newell K, Miller DW, Ueda K, Young AB, Hyman BT, Ashe KH* (2003) Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol Aging* 24: 245–258.  
[https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00091-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00091-x)
  28. *Unger EL, Eve DJ, Perez XA, Reichenbach DK, Xu Y, Lee MK, Andrews AM* (2006) Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol Dis* 21: 431–443.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.005>
  29. *Pupyshev AB, Korolenko TA, Akopyan AA, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA* (2018) Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant  $\alpha$ -synuclein as an early event at synucleinopathy progression. *Neurosci Lett* 672: 140–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.001>
  30. *Korolenko TA, Shintyapina AB, Belichenko VM, Pupyshev AB, Akopyan AA, Fedoseeva LA, Russkikh GS, Vavilin VA, Tenditnik MV, Lin C-L, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA* (2020) Early Parkinson's disease-like pathology in a transgenic mouse model involves a decreased Cst3 mRNA expression but not neuroinflammatory response in the brain. *Med Univer* 3: 66–78.  
<https://doi.org/10.2478/medu-2020-0008>
  31. *Taguchi T, Ikuno M, Hondo M, Parajuli LK, Taguchi K, Ueda J, Sawamura M, Okuda S, Nakanishi E, Hara J, Uemura N, Hatanaka Y, Ayaki T, Matsuzawa S, Tanaka M, El-Agnaf OMA, Koike M, Yanagisawa M, Uemura MT, Yamakado H, Takahashi R* (2020)  $\alpha$ -SynucleinBAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model. *Brain* 143: 249–265.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awz380>
  32. *Huang Y, Liu Z, Li N, Tian C, Yang H, Huo Y, Li Y, Zhang J, Yu Z* (2022) Parkinson's disease derived exosomes aggravate neuropathology in SNCA\*A53T Mice. *Ann Neurol* 92: 230–245.  
<https://doi.org/10.1002/ana.26421>
  33. *Karikari AA, McFleder RL, Ribechini E, Blum R, Bruttel V, Knorr S, Gehmeyr M, Volkman J, Broichie JM, Ahsan F, Haack B, Monoranu CM, Keber U, Yeghiazaryan R, Pagenstecher A,*

- Heckel T, Bischler T, Wischhusen J, Koprach JB, Lutz MB, Ip CW (2022) Neurodegeneration by  $\alpha$ -synuclein-specific T cells in AAV-A53T- $\alpha$ -synuclein Parkinson's disease mice. *Brain Behav Immun* 101: 194–210.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.01.007>
34. Wang Y, Sun Z, Du S, Wei H, Li X, Li X, Shen J, Chen X, Cai Z (2022) The increase of  $\alpha$ -synuclein and alterations of dynein in A53T transgenic and aging mouse. *J Clin Neurosci* 96: 154–162.  
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2021.11.002>
35. Zhang Y, Wu Q, Ren Y, Zhang Y, Feng L (2022) A53T  $\alpha$ -synuclein induces neurogenesis impairment and cognitive dysfunction in line M83 transgenic mice and reduces the proliferation of embryonic neural stem cells. *Brain Res Bull* 182: 118–129.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.02.010>
36. Zheng M, Liu Y, Xiao Z, Jiao L, Lin X (2022) Tau knockout and  $\alpha$ -synuclein A53T synergy modulated parvalbumin-positive neurons degeneration staging in substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease-like model. *Front Aging Neurosci* 13: 784665.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.784665>
37. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL (2010) Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66: 646–661.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>
38. Oaks AW, Frankfurt M, Finkelstein DI, Sidhu A (2013) Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One* 8: e60378.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060378>
39. Liu Y, Yuan YH, Sun JD, Li J, Li ZP, Chen NH (2014) Nigrostriatal dynein changes in A53T alpha-synuclein transgenic mice. *F1000Res* 3: 68.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.3507.1>
40. Zhang Y, Wu Q, Zhang L, Wang Q, Yang Z, Liu J, Feng L (2019) Caffeic acid reduces A53T  $\alpha$ -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy *in vitro* and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 150: 104538.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104538>
41. Park HJ, Zhao TT, Kim SH, Lee CK, Hwang BY, Lee KE, Lee MK (2020) Ethanol extract from *Gynostemma pentaphyllum* ameliorates dopaminergic neuronal cell death in transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein. *Neural Regen Res* 15: 361–368.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.265557>
42. <https://www.jax.org/strain/006823>
43. Mograbi KM, de Castro AC, de Oliveira JA, Sales PJ, Covolan L, Del Bel EA, de Souza AS (2017) Effects of GABAa receptor antagonists on motor behavior in pharmacological Parkinson's disease model in mice. *Physiol Rep* 5: e13081.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.13081>
44. Langley MR, Ghaisas S, Palanisamy BN, Ay M, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2021) Characterization of nonmotor behavioral impairments and their neurochemical mechanisms in the MitoPark mouse model of progressive neurodegeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 341: 113716.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113716>
45. George S, van den Buuse M, San Mok S, Masters CL, Li QX, Culvenor JG (2008) Alpha-synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. *Exp Neurol* 210: 788–792.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.017>
46. Graham DR, Sidhu A (2010) Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res* 88: 1777–1183.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22331>
47. Oh SH, Lee SC, Kim DY, Kim HN, Shin JY, Ye BS, Lee PH (2017) Mesenchymal stem cells stabilize axonal transports for autophagic clearance of  $\alpha$ -synuclein in parkinsonian models. *Stem Cells* 35: 1934–1947.  
<https://doi.org/10.1002/stem.2650>
48. Lenka A, Ingalhalikar M, Shah A, Saini J, Arumugham SS, Hegde S, George L, Reddy V, Reddy YCJ, Yadav R, Pal PK (2018) Hippocampal subfield atrophy in patients with Parkinson's disease and psychosis. *J Neural Transm (Vienna)* 125: 1361–1372.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-018-1891-3>
49. DeFlitch L, Gonzalez-Fernandez E, Crawley I, Kang SH (2022) Age and Alzheimer's disease-related oligodendrocyte changes in hippocampal subregions. *Front Cell Neurosci* 16: 847097.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.847097>
50. Schmitt A, Tatsch L, Vollhardt A, Schneider-Axmann T, Raabe FJ, Roell L, Heinsen H, Hof PR, Falkai P, Schmitz C (2022) Decreased oligodendrocyte number in hippocampal subfield CA4 in schizophrenia: a replication study. *Cells* 11: 3242.
51. Seo JH, Kang SW, Kim K, Wi S, Lee JW, Cho SR (2020) Environmental enrichment attenuates oxidative stress and alters detoxifying enzymes in an A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mouse model

- of Parkinson's disease. *Antioxidants* (Basel) 9: 928.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9100928>
52. *Tikhonova MA, Tikhonova NG, Tenditnik MV, Ovsyukova MV, Akopyan AA, Dubrovina NI, Amstislavskaya TG, Khlestkina EK* (2020) Effects of grape polyphenols on the life span and neuroinflammatory alterations related to neurodegenerative Parkinson disease-like disturbances in mice. *Molecules* 25: 5339.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25225339>
53. *Tikhonova MA, Shoeva OY, Tenditnik MV, Ovsyukova MV, Akopyan AA, Dubrovina NI, Amstislavskaya TG, Khlestkina EK* (2020) Evaluating the effects of grain of isogenic wheat lines differing in the content of anthocyanins in mouse models of neurodegenerative disorders. *Nutrients* 12: 3877.  
<https://doi.org/10.3390/nu12123877>
54. *Kulikov VA, Khotskin NV, Nikitin SV, Lankin VS, Kulikov AV, Trapezev OV* (2014) Application of 3-D imaging sensor for tracking minipigs in the open field test. *J Neurosci Methods* 235: 219–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.07.012>
55. *Khotskin NV, Plyusnina AV, Kulikova EA, Bazhenova EY, Fursenko DV, Sorokin IE, Kolotygin I, Mormede P, Terenina EE, Shevelev OB, Kulikov AV* (2019) On association of the lethal yellow (AY) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior. *Behav Brain Res* 359: 446–456.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.013>
56. *Ragaeva DS, Tikhonova MA, Petrova OM, Igonina TN, Rozkova IN, Brusentsev EY, Amstislavskaya TG, Amstislavsky SY* (2017) Neonatal reflexes and behavior in hypertensive rats of ISIAH strain. *Physiol Behav* 175: 22–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.026>
57. *Рожкова ИН, Окотруб СВ, Брусенцев ЕЮ, Ульданова ЕЕ, Чуйко ЭА, Напримеров ВА, Липина ТВ, Амстиславская ТГ, Амстиславский СЯ* (2023) Изменения в социальном предпочтении места и плотность дофаминергических нейронов в вентральном тегментуме у Clns2-KO мышей. Вавиловск журн генетики и селекции 27: 177–184. [*Rozhkova IN, Okotrub SV, Brusentsev EY, Uldanova KE, Chuyko EA, Naprimerov VA, Lipina TV, Amstislavskaya TG, Amstislavsky SY* (2023) Alterations in the social-conditioned place preference and density of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in Clns2-KO mice. *Vavilov J Genet Breed* 27: 177–184. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-14>
58. *Paxinos G, Franklin K* (2012) *Mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed., Acad Press.
59. *Rothman SM, Griffioen KJ, Vranis N, Ladenheim B, Cong WN, Cadet JL, Haran J, Martin B, Mattson MP* (2013) Neuronal expression of familial Parkinson's disease A53T  $\alpha$ -synuclein causes early motor impairment, reduced anxiety and potential sleep disturbances in mice. *J Parkinsons Dis* 3: 215–229.  
<https://doi.org/10.3233/JPD-120130>
60. *Shiba M, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA* (2000) Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 15: 669–677.  
[https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200007\)15:4<669::aid-mds1011>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200007)15:4<669::aid-mds1011>3.0.co;2-5)
61. *Pogorelov VM, Rodriguiz RM, Insko ML, Caron MG, Wetsel WC* (2005) Novelty seeking and stereotypic activation of behavior in mice with disruption of the *Dat1* gene. *Neuropsychopharmacology* 30: 1818–1831.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300724>
62. *Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A* (2000) Mice lacking  $\alpha$ -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239–252.  
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80886-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80886-7)
63. *Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA* (2001) Expression of A53T mutant but not wild-type  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* 21: 9549–9560.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09549.2001>
64. *Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ* (2002) A role for  $\alpha$ -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22: 3090–3099.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03090.2002>
65. *Lee FJ, Liu F, Pristupa ZB, Niznik HB* (2001) Direct binding and functional coupling of  $\alpha$ -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15: 916–926.  
<https://doi.org/10.1096/fj.00-0334com>
66. *Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG* (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606–612.  
<https://doi.org/10.1038/379606a0>

67. Uhl GR, Vandenberg DJ, Miner LL (1996) Knockout mice and dirty drugs. Drug addiction. *Curr Biol* 6: 935–936.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00630-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00630-9)
68. Lothmann K, Deitersen J, Zilles K, Amunts K, Herold C (2021) New boundaries and dissociation of the mouse hippocampus along the dorsal-ventral axis based on glutamatergic, GABAergic and catecholaminergic receptor densities. *Hippocampus* 31: 56–78.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.23262>
69. Lisman JE, Talamini LM, Raffone A (2005) Recall of memory sequences by interaction of the dentate and CA3: a revised model of the phase precession. *Neural Networks* 18: 1191–1201.  
<https://doi.org/10.1016/j.neunet.2005.08.008>
70. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163: 3–22.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
71. Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K (2006) Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 21: 2042–2051. PMID:  
<https://doi.org/10.1002/mds.2106517078043>
72. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H (2013) 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 9: 13–24.  
<https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.242>

**Analysis of Behavior and Brain Neuronal Density  
in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA<sup>A53T</sup>)23Mkle/J Mice Modeling Parkinson's Disease**

**I. N. Rozhkova<sup>a</sup>, S. V. Okotrub<sup>a</sup>, E. Yu. Brusentsev<sup>a</sup>, T. A. Rakhmanova<sup>a, b</sup>,  
D. A. Lebedeva<sup>a, b</sup>, V. S. Kozeneva<sup>a, b</sup>, N. V. Khotskin<sup>a</sup>, and S. Ya. Amstislavsky<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia*

<sup>b</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: amstis@yandex.ru*

Parkinson's disease (PD) is a progressive age-related neurodegenerative pathology of the central nervous system, characterized by a selective loss of dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway and by the presence of specific inclusions (Lewy bodies) in dopamine neurons. To study the mechanisms of this pathology and to search for possible ways to correct it, genetic models of PD in mice have been created. Transgenic mice of the B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA<sup>A53T</sup>)23Mkle/J strain (referred as B6.Cg-Tg further in the text) represent a model of PD, have the *A53T* mutation in the human alpha-synuclein gene. The aim of this work was to study the locomotor activity and the level of anxiety, as well as the density of neurons in the brain of male B6.Cg-Tg mice at the age of six months. Wild type C57BL/6J mice of the same sex and age were used as controls. The results of the current study demonstrate that B6.Cg-Tg mice are characterized by the high locomotor activity and the low anxiety. Besides, a selective decrease in the density of neurons in the subventricular zone, the substantia nigra, as well as the CA1, CA3, CA4 zones and the granular layer of the dentate gyrus of the hippocampus was observed in these mice. Thus, mice of the B6.Cg-Tg strain at the age of six months only partially correspond to the main pathophysiological signs of PD. Decrease in the density of neurons in the substantia nigra, as well as in the CA1 and CA3 zones of the hippocampus of B6.Cg-Tg mice resemble similar changes in PD. However, these mice demonstrated neither bradykinesia nor high level of anxiety.

**Keywords:** mice, C57BL/6J, B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA<sup>A53T</sup>)23Mkle/J, Parkinson's disease, locomotor activity, anxiety, brain, neuronal density

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ БРЫЖЕЕЧНЫХ АРТЕРИЙ И СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА КОЖИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ ПОЧЕК

© 2023 г. Г. Т. Иванова<sup>1</sup>\*, О. Н. Береснева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

\*E-mail: ivanovagt@infran.ru

Поступила в редакцию 11.06.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

У людей с хронической болезнью почек часто развиваются сердечно-сосудистые осложнения, среди которых отмечаются эндотелиальная дисфункция, артериальная гипертензия и атеросклероз. Целью данной работы было провести сравнительный анализ реактивности сосудов микроциркуляторного русла (МЦР) кожи, оцененной методом лазерной доплеровской флоуметрии и брыжеечных артерий у крыс с резекцией 5/6 массы почек. Крысы Wistar были разделены на две группы: животным NE-группы ( $n = 15$ ) удаляли 5/6 массы ткани почек, контрольным животным SO-группы ( $n = 15$ ) выполняли ложную операцию. Через 8 нед. проводили оценку реактивности микрососудов кожи крыс на ионофорез ацетилхолина (ACh) и нитропрусида натрия (NP). Через неделю у крыс в условиях *in vivo* оценивали влияние нефрэктомии на реактивность предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий при действии агонистов, используя микрофото- и видеорегистрацию диаметра. Показано, что нефрэктомия не влияет на среднюю величину перфузии в коже крыс в покое, однако изменяет структуру частотного диапазона спектра колебаний показателя МЦР, повышая величину эндотелиального, нейрогенного и миогенного тонуса. NE приводит к развитию эндотелиальной дисфункции брыжеечных артерий и сосудов МЦР кожи, которая выражается в снижении реактивности на действие эндотелий-зависимого (ACh) и независимого от эндотелия (NP) вазодилататоров. Таким образом, развитие экспериментальной дисфункции почек приводит к изменениям спектральных составляющих флуктуаций показателя МЦР в коже, указывающим на повышение тонических влияний различного генеза на сосуды. Нефрэктомия сопровождается снижением реактивности микрососудов кожи и брыжеечных артерий, однако корреляции между увеличением показателя МЦР и амплитудой релаксации брыжеечных артерий при действии вазодилататорных агонистов на данном сроке наблюдения отсутствуют.

**Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, лазерная Допплеровская флоуметрия, вазодилатация, эндотелий, брыжеечная артерия, микроциркуляция

DOI: 10.31857/S0869813923090042, EDN: VPWAXK

### ВВЕДЕНИЕ

У людей с хронической болезнью почек (ХБП) высока вероятность развития сердечно-сосудистых заболеваний. Дисфункция почек может приводить к разви-

тию патологических изменений сердца, в частности к усилению гипертрофии левого желудочка, диастолической дисфункции, миокардиальному фиброзу [1]. Установлено, что у людей с нарушением почечной функции риск развития ишемической болезни сердца (ИБС) на 40–50% выше, чем у пациентов с отсутствием заболеваний почек [2]. Общепринятые факторы риска атеросклероза, такие как гиперхолестеринемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, гипергомоцистеинемия, считают причиной формирования дисфункции эндотелия при патологии почек [3, 4]. Атеросклероз и его проявления в коронарных артериях являются ключевым связующим звеном между ХБП и сердечно-сосудистой заболеваемостью и смертностью, однако патофизиологические механизмы изменений функционального состояния сосудов, связанных с ХБП, до конца не изучены. ХБП способствует развитию атеросклероза и ИБС, индуцируя повреждение эндотелиальных клеток [5], а также запускает хронические сосудистые воспалительные процессы, что отражается увеличением маркеров воспаления в крови пациентов [6–8]. Было показано, что повышенные уровни воспалительных биомаркеров, таких как С-реактивный белок, интерлейкин-6 или фактор некроза опухоли, связаны с высоким риском инфаркта миокарда у пациентов со снижением функции почек [9, 10].

Эндотелий участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов посредством выработки биологически активных веществ, которые по своему действию делятся на вазодилататоры и вазоконстрикторы. Чтобы контролировать сосудистый тонус, эндотелий синтезирует и высвобождает сосудорасширяющий оксид азота (NO) из аминокислоты L-аргинин. Кроме того, NO играет важную роль в регуляции проницаемости сосудов, адгезии лейкоцитов и пролиферации гладкомышечных клеток [11, 12]. Показано, что при ХБП эндотелиальная дисфункция развивается в ранние сроки и характеризуется снижением биодоступности NO [13, 14], обусловленным, в частности, снижением синтеза NO вследствие инактивации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и дефицита L-аргинина [15].

Важными медиаторами эндотелиальной дисфункции при ХБП являются уремические токсины, такие как асимметричный диметиларгинин (ADMA) и индоксилсульфат, накапливающиеся у пациентов при снижении функции почек. Эндотелиальные клетки являются источником ADMA, и его образование повышается в присутствии высоких концентраций метионина или гомоцистеина [16]. ADMA нарушает функцию эндотелия путем конкурентного ингибирования eNOS и тесно связан с наличием ИБС при ХБП [17]. Повышенные уровни ADMA у больных ХБП могут модулировать их атерогенный профиль и способствовать прогрессированию заболевания почек [16, 18]. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют полагать, что роль уремических токсинов может также распространяться на участие в сложных взаимоотношениях сердца и почек в качестве медиатора эндотелиальной дисфункции. Таким образом, причинами эндотелиальной дисфункции у больных ХБП могут являться: накопление уремических токсинов, оксидативный стресс, дислипидемия, ингибирование eNOS повышенной продукцией асимметричного диметиларгинина, артериальная гипертензия [19, 20].

Таким образом, несмотря на то, что в последние годы были выявлены различные потенциальные патофизиологические механизмы эндотелиальной дисфункции при ХБП, многие детали остаются неизвестными. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, участвующих в этом сложном процессе, имеет решающее значение для разработки новых терапевтических подходов.

В клинической практике для оценки состояния сосудов часто используют метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [21, 22], позволяющий регистрировать изменения потока крови в микроциркуляторном русле [23]. Применяют метод ЛДФ и в экспериментальных исследованиях [24]. По состоянию микроциркуляторного русла (МЦР) делают заключение о развитии нарушений регуляции тонуса

сосудов [25, 26]. Принято считать, что сосуды МЦР кожи по своим механизмам функционирования сходны с сосудами большего диаметра, и по изменению параметров ЛДФ можно судить о степени эндотелиальной дисфункции в крупных резистивных сосудах [27–29]. При этом наиболее информативными являются исследования динамики ЛДФ-параметров кожного кровотока у человека при проведении функциональных проб, например, постокклюзионной реактивной гиперемии. В нашем исследовании мы оценивали параметры МЦР кожи до и после проведения ионофореза вазодилатирующих агентов - ацетилхолина (ACh) и нитропруссид (NP).

Необходимо отметить, что в настоящее время имеются единичные данные об изменении реактивности МЦР кожи у пациентов с дисфункцией почек [30]. При асимптомной протеинурии было выявлено снижение вазодилататорной реакции на ACh, введенный в кожу ионофорезом. Умеренно увеличенное содержание С-реактивного белка коррелировало с эндотелиальной дисфункцией сосудов кожи [31]. Учитывая универсальность механизмов регуляции тонуса сосудов, можно предположить, что изменения функционального состояния сосудов МЦР может быть сходным с сосудами других бассейнов.

Однако вопрос о том, насколько по изменению реактивности сосудов МЦР кожи можно судить об изменении функционального состояния более крупных сосудов, требует дальнейшего решения [28]. В частности, это относится и к оценке сердечно-сосудистых осложнений у больных с нарушением функции почек. Существенный вклад в решение данной проблемы может внести оценка функционального состояния крупных сосудов и сосудов МЦР кожи у одного и того же животного при экспериментальном моделировании ХБП. Известно, что регуляция сосудистого тонуса осуществляется несколькими механизмами, эффективность которых различается в зависимости от диаметра и типа сосуда. Наши предыдущие исследования (*in vitro*) на изолированных сегментах крупных сосудов крыс с экспериментальным уменьшением количества функционирующих нефронов показали развитие эндотелиальной дисфункции, проявляющейся, в частности, в снижении ACh-индуцируемой дилатации колец аорты и верхней брыжеечной артерии [32]. В данном исследовании основное внимание уделено оценке реактивности более мелких брыжеечных артерий 2–3 порядка, регуляторные механизмы которых обладают большей схожестью с сосудами МЦР кожи. Кроме того, был выбран режим *in vivo*, при котором сохраняется естественный кровоток по исследуемому сосуду.

Таким образом, целью данной работы было провести сравнительный анализ реактивности сосудов МЦР кожи, исследованной с помощью ЛДФ, и брыжеечных артерий в условиях *in vivo* у крыс с резекцией 5/6 массы почек.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на половозрелых самцах крыс стока Wistar (Центр коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН), исходной массой 280–320 г. Крысы были случайным образом распределены на 2 группы.

Для создания экспериментальной дисфункции почек животным первой группы ( $n = 15$ ) удаляли 5/6 массы ткани почек (5/6 NE). Операцию выполняли в два этапа с интервалом в одну неделю. На первом этапе осуществляли резекцию 2/3 части левой почки, на втором – полностью удаляли правую почку. Вторую (контрольную) группу составляли ложнопериоперированные (SO) крысы ( $n = 15$ ). Во время проведения ложной операции выполняли хирургические манипуляции, аналогичные нефрэктомии, но без удаления почечной ткани. В качестве наркоза использовали тилетамин/золазепам (10 мг/кг, Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция) в комплексе с ксилазин гидрохлоридом (5 мг/кг, Рометар, Bioveta, Чешская республика).



Длительность наблюдения составила 2 месяца после второго этапа операции. Во время эксперимента все животные получали стандартный пищевой рацион и имели доступ к пище и воде *ad libitum*. Крыс содержали по 5 особей в клетке при температуре 20–22°C и световом режиме 12 ч свет/12 ч темнота.

Перед началом и окончанием эксперимента у бодрствующих животных измеряли артериальное давление (АД) манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр фирмы (ELEMA, Швеция). Среднее трех последовательных измерений считали величиной АД. Исходное АД (систолическое) у крыс NE-группы составляло  $122 \pm 5$  мм рт. ст., SO-группы –  $120 \pm 6$  мм рт. ст. ( $p > 0.05$ ).

Эвтаназию животных осуществляли сразу после исследования реактивности брыжеечных артерий введением избыточной дозы наркоза, после этого отбирали пробу крови для последующего анализа. Концентрацию мочевины в сыворотке крови определяли на биохимическом анализаторе FURUNO-90 (Япония).

За неделю до окончания эксперимента проводили оценку кожной МЦР методом ЛДФ с помощью анализатора лазерной микроциркуляции крови “ЛАКК-ОП” (НПП “Лазма”, Россия). Длина волны исходящего излучения была 1064 нм, мощность лазерного излучения на выходе волоконного оптического зонда – не более 1 мВт. Калибровку “нулевого” показания проводили на специальном диске из фторопласта, встроенном в прибор.

Для исследования МЦР крыс наркотизировали тилетамин/золазепамом (20 мг/кг, Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция). Анализатор размещали на дорзо-латеральной поверхности поясничной части спины крысы, с которой предварительно удаляли шерсть и дезинфицировали. Датчик располагался свободно на поверхности кожи, не сдавливая микрососуды. При записи исходной ЛДФ место расположения датчика фиксировали, чтобы стандартизировать место записи после ионофореза вазоактивных агентов.

В физиологических условиях происходят постоянные изменения радиуса кровеносных сосудов, что вызывает непрерывное колебание интенсивности общей МЦР кожи, которое отражается в соответствующих флуктуациях регистрируемого сигнала. Вейвлет-анализ позволяет оценить характеристики периодических составляющих этих колебаний в различных диапазонах. В зависимости от генеза, для крыс принято выделять 5 диапазонов спектра: 0.01–0.05 Гц – эндотелиальный, 0.15–0.4 Гц – миогенный, 0.05–0.15 Гц – нейрогенный, 2–5 Гц – сердечный и 0.4–2.0 Гц – дыхательный [33]. В наших экспериментах мы оценивали только эндотелиальный, нейрогенный и миогенный диапазоны.

Для оценки функционального состояния сосудов МЦР кожи часто используют тестовые воздействия (ионофорез вазоактивных препаратов, микродиализ) [26]. В нашем исследовании для изучения реактивности сосудов кожи были выбраны обладающие сосудорасширяющим действием ACh (Sigma-Aldrich, США) и NR (ICN Biomedicals, США), которые в течение 2 мин вводили в кожу методом ионофореза 1%-ного раствора соответствующего вазодилататора с помощью прибора для ионофореза “ЭЛФОР-ПРОФ” (Россия). Оценивали изменение показателей МЦР кожи до и после действия ACh и NR.

Исследование показателей МЦР у каждой крысы выполняли в четыре этапа, ЛДФ записывали в течение 8 мин на каждом этапе. Сначала регистрировали исходную МЦР, затем проводили ионофорез ACh на этом же участке кожи, после чего снова записывали МЦР. Аналогичный протокол использовали для исследования реакции МЦР на NR. Зоны оценки МЦР и ионофореза для каждого агониста не перекрывались.

По результатам ЛДФ оценивали следующие показатели. Показатель МЦР – среднее значение амплитуды МЦР за период наблюдения,  $K_v$  – коэффициент вариации амплитуды МЦР, максимальные значения колебаний перфузии в эндоте-

лиальном (Аэ), нейрогенном (Ан) и миогенном (Ам) диапазонах. На основе полученных характеристик проводили расчет эндотелиального (ЭТ) компонента сосудистого тонуса по формуле:

$$\text{ЭТ} = (\sigma P) / (A \text{Э} M),$$

где ЭТ – эндотелиальный тонус,  $\sigma$  – среднее квадратическое отклонение показателя МЦР,  $P$  – среднее артериальное давление, Аэ – наибольшее значение амплитуды колебаний перфузии в эндотелиальном диапазоне, М – среднее значение показателя МЦР.

Нейрогенный (НТ) и миогенный (МТ) тонус рассчитывали аналогично, заменяя в формуле Аэ на соответствующие тонусу Ан или Ам.

Через неделю после ЛДФ исследовали реактивность брыжеечных артерий, оценивая динамику диаметра сосудов в ответ на действие вазодилататорных агентов в условиях *in vivo*. Для этого животных наркотизировали тилетамин/золазепамом (20 мг/ кг массы крысы, Золетил 100, Vibac, Франция). Через разрез стенки брюшной полости выводили петлю тонкого кишечника, расправляли и помещали в специальный желоб, который фиксировали в термостабилизированной при температуре 37°C камере с протекающим раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl<sub>2</sub> – 2.5; MgCl<sub>2</sub> – 1.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; NaHCO<sub>3</sub> – 15.5; глюкоза – 11.5. Раствор сатурировали газовой смесью, состоящей из 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, pH раствора поддерживали на уровне 7.4. Перед тестированием сосуд 30 мин стабилизировали. Затем проводили исследования согласно выбранному протоколу.

Для оценки эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации использовали введение в омывающий сосуд раствор ACh  $1 \times 10^{-5}$  моль/л или NP  $1 \times 10^{-6}$  моль/л на фоне предварительного сокращения сосуда PE (Sigma-Aldrich, США)  $1 \times 10^{-5}$  моль/л. Амплитуду дилатации выражали в процентах от амплитуды констрикции, вызванной PE. Маточные растворы ACh, NP, PE готовили на основе дистиллированной воды.

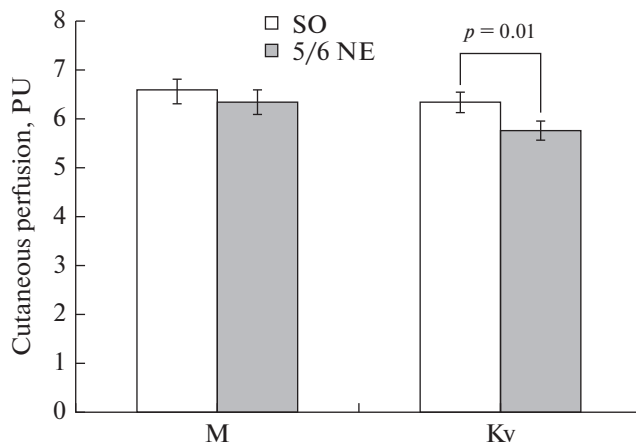
Микрофото- и видеорегистрацию брыжеечных артерий у крыс *in vivo* осуществляли с использованием микроскопа Биомед МС-1Т-ZOOM (Россия) и камеры BASLER acA4600-10uc (Германия), измерение диаметра артерий выполняли в программе MultiMedia Catalog (MMC).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica v.12. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SE$ ). Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В случае распределения вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении двух независимых групп применяли  $U$ -критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что через 2 мес. у нефрэктомированных крыс уровень мочевины крови повышался и составлял  $14.2 \pm 0.9$  ммоль/л по сравнению с контролем ( $4.9 \pm 0.6$  ммоль/л,  $p < 0.001$ ). У животных с уменьшением количества функционирующих нефронов наблюдался также подъем уровня систолического АД (в NE-группе –  $152 \pm 9$  мм рт. ст.; в контрольной группе –  $127 \pm 8$  мм рт. ст.,  $p < 0.001$ ).

На первом этапе исследования была проведена оценка реактивности сосудов МЦР кожи крыс. Анализ исходных ЛДФ-грамм показал, что среднее значение показателя МЦР у крыс после нефрэктомии значимо не отличалось от показателя у



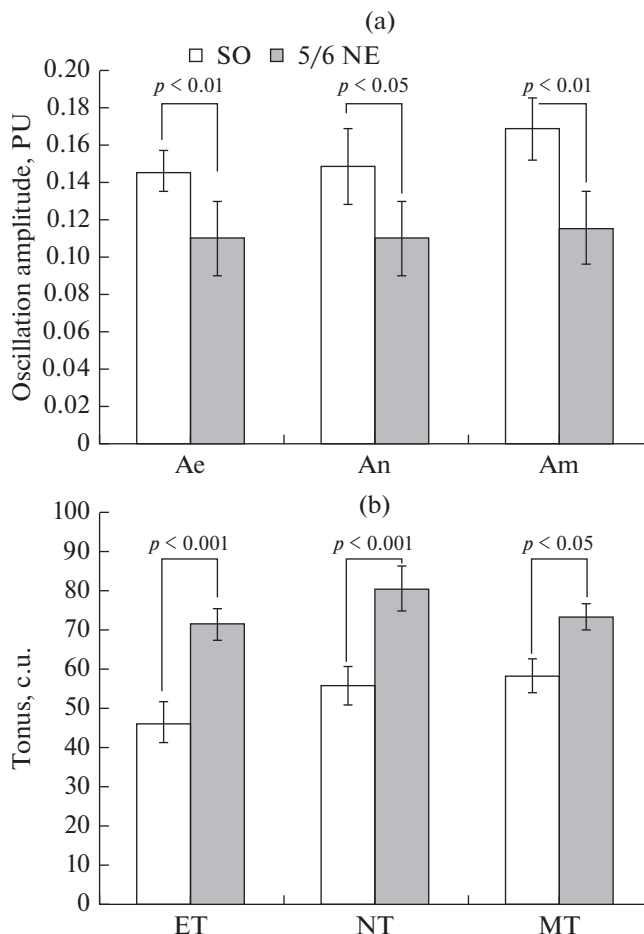
**Рис. 1.** Влияние нефрэктомии на микроциркуляцию кожи крыс. По оси абсцисс – характеристики микроциркуляции: М – среднее значение показателя микроциркуляции, Kv – коэффициент вариации амплитуды МЦР; по оси ординат – показатель микроциркуляции, PU – перфузионные единицы. Экспериментальные группы: SO – ложнооперированные крысы, 5/6 NE – крысы после удаления 5/6 массы действующих нефронов. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка.  $p$  – значимость различий между группами.

контрольных животных (рис. 1), можно лишь отметить некоторую тенденцию к его снижению, однако Kv был на 9.4% ниже, чем в контрольной группе.

С помощью Вейвлет-анализа спектральных составляющих колебаний показателя МРЦ выявлено, что уменьшение количества функционирующих нефронов приводит к снижению осцилляций перфузии во всех трех исследованных диапазонах: максимальная амплитуда колебаний показателя МЦР снижалась на 26.7% – в эндотелиальном, на 26.4% – в нейрогенном и на 29.4% – в миогенном диапазонах спектра (рис. 2a). Рассчитанные показатели ЭТ, НТ и МТ сосудов кожи крыс, подвергнутых NE, отличались от животных SO-группы (рис. 2b). Величина ЭТ у крыс после удаления 5/6 массы ткани почек была выше аналогичного показателя контрольных животных на 53.1%, НТ – на 43.8%, МТ – на 25.5%.

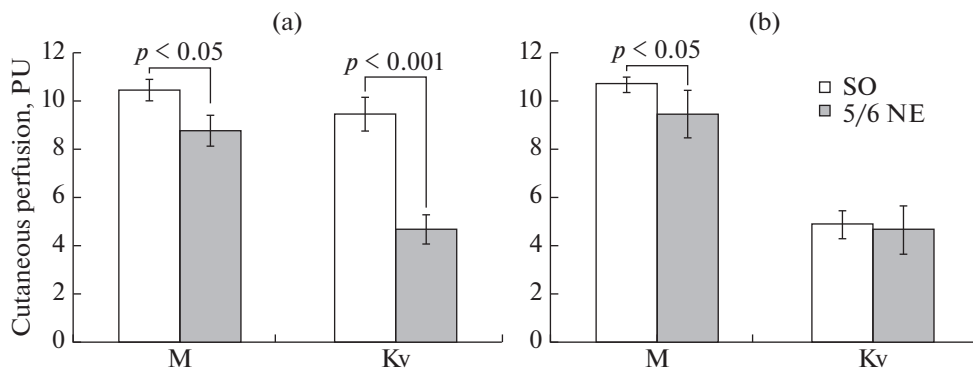
Для оценки реактивности сосудов МЦР кожи крыс проводили регистрацию ЛДФ-граммы после ионофореза ACh. Эксперименты показали, что показатель перфузии после введения ACh у NE-крыс оказался в среднем на 18.1% ниже, чем в контрольной группе (рис. 3a), при этом его увеличение у животных после нефрэктомии составляло  $37.7 \pm 4.4\%$  от исходного показателя МЦР, а у контрольных –  $58.9 \pm 4.2\%$  ( $p < 0.001$ ). Кроме того, у NE-крыс ионофорез ACh вызвал снижение Kv на  $18.7 \pm 7.7\%$  по сравнению с исходным значением, тогда как у SO-животных Kv увеличился на  $49.3 \pm 7.4\%$  по сравнению с величиной до ионофореза.

Проведение ионофореза NP также вызывало увеличение показателя МЦР кожи. Однако реактивность на NP различалась у крыс исследованных групп (рис. 3b). Так, величина показателя МЦР при действии NP у животных после нефрэктомии оказалась на 8.4% меньше, чем у SO-животных ( $p < 0.05$ ), при этом NP у NE-крыс вызвал увеличение показателя микроциркуляции на  $47.4 \pm 4.7\%$  от исходного уровня, а у животных SO-группы – на  $62.7 \pm 3.2\%$  – ( $p < 0.01$ ). Изменение Kv после ионофореза NP было аналогичным у крыс обеих групп, Kv снижался на  $19.3 \pm 3.4\%$  у животных NE-группы, на  $23.1 \pm 8.9\%$  у SO-крыс.



**Рис. 2.** Влияние нефрэктомии на эндотелиальный, нейрогенный и миогенный компоненты тонуса сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс. (а): по оси абсцисс – диапазон колебаний (Ае – эндотелиальная, Ап – нейрогенная, Ам – миогенная частотная составляющая спектра), по оси ординат – максимальная амплитуда колебаний показателя микроциркуляции, PU – перфузионные единицы. (б): по оси абсцисс – диапазон ЕТ (эндотелиального), NT (нейрогенного) и МТ (миогенного) тонуса; по оси ординат – величина тонуса, усл. ед. Экспериментальные группы: SO – ложнооперированные крысы, 5/6 NE – крысы после удаления 5/6 массы действующих нефронов. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. *p* – значимость различий между группами.

На втором этапе исследования (через 5–6 дней после ЛДФ) изучали влияние NE на величину дилатации предварительно сокращенных PE брыжеечных артерий крыс при действии тех же сосудорасширяющих агонистов – ACh и NP, что и при регистрации показателя перфузии МЦР кожи. Однако сначала оценивали констрикторные ответы на PE у животных разных групп, поскольку для стандартизации измерений амплитуду релаксации принято выражать в процентах от величины сокращения сосуда при действии PE. Анализ полученных результатов показал, что на данном сроке эксперимента NE не оказывала влияния на величину вызванной PE констрикции брыжеечных артерий крыс: у животных с NE амплитуда кон-



**Рис. 3.** Влияние нефрэктомии на реактивность сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс. Среднее значение показателя микроциркуляции (М) и коэффициент вариации (Kv) амплитуды МЦР после ионофореза ацетилхолина (а) и нитропруссид натрия (б). По оси ординат – показатель микроциркуляции, PU – перфузионные единицы. Экспериментальные группы: SO – ложнооперированные крысы, 5/6 NE – крысы после удаления 5/6 массы действующих нефронов. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка.  $p$  – значимость различий между группами.

стрикции составляла  $63.1 \pm 5.4\%$ , у животных SO-группы –  $63.9 \pm 4.8\%$  ( $p > 0.05$ ) от исходного диаметра сосудов.

Действие ACh в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  моль/л на предварительно сокращенные PE сосуды вызывало их релаксацию, величина которой различалась у крыс исследуемых групп (рис. 4). Нефрэктомия приводила к снижению реактивности сосудов – амплитуда ACh-индуцированной дилатации брыжеечных артерий крыс данной группы была в среднем на 32.5% меньше, чем в контроле.

Для оценки реактивности брыжеечных артерий на различные концентрации ACh было проведено исследование кумулятивного эффекта ступенчатого повышения концентрации в пределах  $1 \times 10^{-10}$  моль/л– $1 \times 10^{-5}$  моль/л. Результаты показали, что NE приводит к значительному снижению дилататорной реакции на ACh по сравнению с SO-группой: уже при концентрации  $1 \times 10^{-8}$  моль/л релаксация была значимо ниже, а при повышении концентрации ACh эта разница усиливалась (рис. 5а).

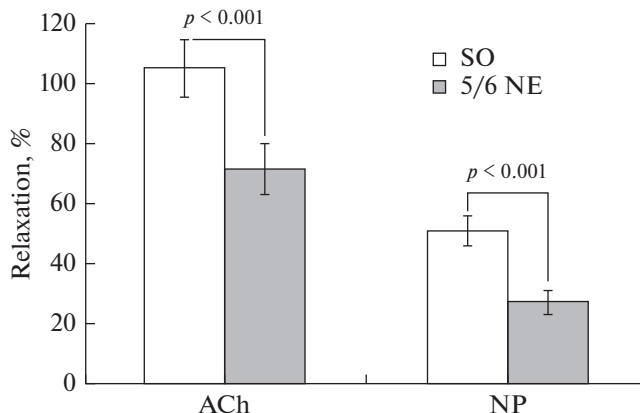
Подсчет площади под кривой для ACh показал, что общая реактивность брыжеечных артерий у животных с дисфункцией почек была в среднем в 2 раза меньше, чем у контрольных крыс (рис. 5б).

Нефрэктомия также вызывала ослабление дилатации брыжеечных артерий в ответ на действие NP (рис. 4б). Введение NP в омывающий раствор приводило к вазодилатации, при этом амплитуда релаксации артерий крыс после нефрэктомии была в среднем на 42.2% меньше, чем у SO животных.

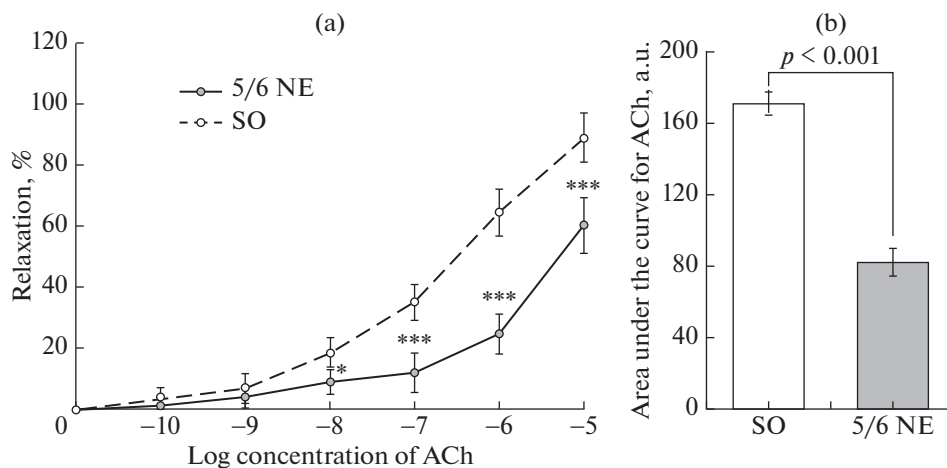
Сравнение двух характеристик реактивности сосудов: амплитуды AX-индуцированной дилатации брыжеечной артерии и степени увеличения показателя перфузии кожи после ионофореза AX, полученных для каждой крысы, не выявило значимых корреляционных зависимостей ( $r = -0.38$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что через 2 мес. после удаления 5/6 массы почек у крыс развивалась уремия, сопровождающаяся изменениями сосудистой



**Рис. 4.** Влияние нефрэктомии на реактивность брыжеечных артерий крыс. Амплитуда дилатации предварительно сокращенных фенилэфрином ( $1 \times 10^{-6}$  моль/л) брыжеечных артерий при введении в омывающий раствор: ацетилхолина (ACh,  $1 \times 10^{-5}$  моль/л) и нитропруссид натрия (NP,  $1 \times 10^{-6}$  моль/л). По оси ординат – амплитуда релаксации, выраженная в процентах от амплитуды констрикции сосуда при действии фенилэфрина. Экспериментальные группы: SO – ложнооперированные крысы, 5/6 NE – крысы после удаления 5/6 массы действующих нефронов. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка.  $p$  – значимость различий между группами.



**Рис. 5.** Влияние нефрэктомии на АХ-индуцированную реактивность брыжеечных артерий крыс, кумулятивный эффект. (а): амплитуда дилатации предварительно сокращенных фенилэфрином ( $1 \times 10^{-6}$  моль/л) брыжеечных артерий при введении в омывающий раствор ацетилхолина в ступенчато повышающейся концентрации (ACh от  $1 \times 10^{-10}$  до  $1 \times 10^{-5}$  моль/л). По оси ординат – амплитуда релаксации, выраженная в процентах от амплитуды констрикции сосуда при действии фенилэфрина. (б): площадь под кривой доза-эффект для ацетилхолина. По оси ординат – площадь под кривой зависимой от концентрации ацетилхолина амплитуды дилатации, усл. ед. Экспериментальные группы: SO – ложнооперированные крысы, 5/6 NE – крысы после удаления 5/6 массы действующих нефронов. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. Значимость различий между группами: \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

системы, в частности, подъемом уровня АД, нарушением функционального состояния микрососудов кожи и брыжеечных артерий. Развитие артериальной гипертензии является частым осложнением ХБП у людей [34]. Наши исследования также показали подъем АД у крыс после NE. Однако, несмотря на разницу в уровне АД, средние показатели перфузии в коже между NE- и SO-группами не отличались, то есть микрососуды кожи крыс с экспериментальным уменьшением количества функционирующих нефронов на данном сроке наблюдения поддерживали нормальный уровень перфузии. При этом нефрэктомия приводила к снижению эффективности регуляторных влияний на сосуды МЦР кожи, о чем свидетельствует, в частности, статистически значимое уменьшение коэффициента вариации показателя перфузии ( $K_v$ ).

Следует отметить, что кроме показателей  $M$  и  $K_v$ , характеризующих общее состояние микроциркуляции, интерес представляет оценка отдельных механизмов регуляции перфузии. Такую возможность дает вейвлет-анализ ЛДФ-граммы, который позволяет рассмотреть параметры различных компонентов спектра, отражающих генез соответствующих флуктуаций показателя МЦР [35]. Результаты наших исследований показали, что у крыс с дисфункцией почек происходит подавление колебаний микроциркуляции в трех диапазонах: эндотелиальном, нейрогенном и миогенном. Поскольку существует обратная зависимость между амплитудой колебаний показателя микроциркуляции и величиной тонууса в каждом спектральном диапазоне, то, соответственно, после нефрэктомии наблюдалось увеличение расчетной величины ЭТ, НТ и МТ.

Принято считать, что флуктуации показателя МЦР в эндотелиальном диапазоне отражают в основном состояние артерий и артериол [36] и связаны с влиянием на тонус сосудов продуцируемых эндотелием вазоактивных веществ, в основном NO [37]. Вероятно, отмеченное в данном исследовании уменьшение амплитуды колебаний показателя перфузии в эндотелиальном диапазоне указывает на нарушение NO-зависимой регуляции тонуса микрососудов кожи крыс, подвергнутых нефрэктомии.

Величина НТ во многом определяется симпатическими влияниями на сосуды МЦР [38]. В настоящее время также имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что при нарушениях функции почек определенным вклад в повышение уровня АД может вносить симпатикотония [39]. В связи с этим можно предположить, что рост НТ отражает повышение симпатических регуляторных влияний на микрососуды кожи крыс после нефрэктомии.

Механизм формирования миогенных колебаний показателя перфузии связывают с синусоидальными колебаниями просвета артериол вследствие флуктуации потоков  $Ca^{2+}$  через мембраны гладкомышечных клеток (ГМК), опосредованной функционированием локальных пейсмеккеров [40]. Уменьшение максимальной амплитуды в миогенном частотном диапазоне  $\alpha$ , следовательно, повышение МТ в покое у крыс с дисфункцией почек свидетельствует о исходно сниженной дилатации микрососудов кожи по сравнению с ложнооперированными животными.

Для оценки реактивности сосудов МЦР кожи крыс было выполнено исследование изменения показателей перфузии кожи после ионофореза ACh и NP. Проведение функциональных проб с вазоактивными агентами дает возможность оценить эффективность механизмов, модулирующих интенсивность кровотока [41]. Наши исследования показали сниженную реакцию на вазодилататорные агонисты у животных после нефрэктомии: величина перфузии в коже NE-крыс после ионофореза ACh увеличилась лишь на  $37.7 \pm 8.2\%$ , тогда как у SO – на  $58.9 \pm 6.7\%$  ( $p < 0.01$ ), после ионофореза NP – на  $49.4 \pm 4.5\%$  по сравнению с  $62.7 \pm 5.1\%$  – у SO ( $p < 0.05$ ). Эти результаты свидетельствуют о нарушениях функционального состояния сосудов МЦР кожи крыс уже через 8 нед. после 5/6 NE и согласуются с клиническими

исследованиями, показавшими снижение реактивности сосудов МЦР кожи на ионофорез АСh и NP у людей с дисфункцией почек [42].

Уменьшение реактивности кожного кровотока крыс NE-группы на NP свидетельствует о снижении чувствительности ГМК к NO, что ухудшает возможность МЦР адекватно реагировать на изменение физиологических условий или действие вазодилататоров. И действительно, в данном исследовании отмечено подавление реакции кожных микрососудов на АСh после NE. Известно, что вазодилатация микрососудов кожи при действии АСh осуществляется теми же путями, которые существуют и в крупных сосудах, и опосредованы NO, простагландинами и эндотелиальной гиперполяризацией [43, 44]. Учитывая полученные в исследовании результаты об изменении интенсивности кожной микроциркуляции после действия NP, можно предположить, что одной из причин уменьшения реакции на АСh может быть снижение чувствительности ГМК к NO. Однако наши предыдущие эксперименты на сегментах верхней брыжеечной артерии *in vitro* показали менее выраженное снижение амплитуды АСh-индуцированной дилатации сосудов после инкубации с блокатором NO-синтазы L-NAME у животных с дисфункцией почек по сравнению с SO-группой [32]. Данные клинических исследований также демонстрируют, что инфузия L-NAME перед проведением функциональной пробы снижает NO-зависимую вазодилатацию у людей с ХБП [34]. Вероятно, в нашем исследовании подавление реакции кожных микрососудов на АСh также частично может быть обусловлено снижением продукции NO эндотелием. Учитывая наши предыдущие исследования *in vitro*, выявившие снижение эффективности механизма эндотелиальной гиперполяризации в верхней брыжеечной артерии у крыс после нефрэктомии [32], нельзя исключать возможность подавления данного механизма релаксации и для микрососудов кожи.

Таким образом, результаты исследования кожного кровотока методом ЛДФ показали, что уменьшение количества функционирующих нефронов на данном сроке наблюдения не вызывает изменения базового уровня перфузии в коже крыс, однако приводит к подавлению реактивности сосудов МЦР кожи на вазодилаторные воздействия.

У экспериментальных животных также была проведена оценка реактивности более крупных резистивных сосудов на вазодилаторные стимулы. Результаты показали, что, несмотря на рост АД, нефрэктомия не изменяла реактивность брыжеечных артерий к вазоконстрикторным стимулам: амплитуда вызванных PE сокращений сосудов крыс NE- и SO-групп не различались. В то же время у крыс с дисфункцией почек наблюдались изменения в реакциях брыжеечных артерий *in vivo* на вазодилаторные агонисты. Так, у животных, подвергнутых нефрэктомии, была значительно подавлена реакция артерий на действие NP и АСh. Учитывая, что NP-индуцированная дилатация не зависит от синтеза NO эндотелием, а концентрация введенного в ванночку с сосудом NP была одинаковой в обеих группах, то снижение реакции на NP сосудов крыс после нефрэктомии может быть связано с нарушением процессов внутриклеточной сигнализации в ГМК, отвечающей за дилаторное действие NO. Возможность влияния нефрэктомии на связанный с растворимой гуанилатциклазой (pГЦ) путь была показана в экспериментах *in vivo*, где авторы выявили инверсию ответа мелких пиальных артерий на АСh (с вазодилатации на вазоконстрикцию) у NE-крыс после блокады pГЦ метиленовым синим [45]. В нашем исследовании уменьшение почечной массы приводило к подавлению АСh-индуцированной дилатации брыжеечных артерий, при этом амплитуда релаксации при действии АСh в концентрации  $10^{-5}$  моль/л у животных NE-группы была на 25.2% меньше, чем у SO-крыс.

Известно, что эндотелий-зависимая АСh-индуцированная вазодилатация опосредуется взаимодействием трех основных механизмов: связанных с NO, проста-



гладинами и эндотелиальным гиперполяризующим фактором [46]. Наши предыдущие исследования на сосудах в условиях *in vitro* показали, что снижение вызванной АХ релаксации верхней брыжеечной артерии происходило вследствие нарушения биодоступности NO (уменьшения синтеза NO-синтазой и снижения чувствительности ГМК к NO), а также меньшей эффективностью механизма эндотелиальной гиперполяризации [32]. Сходные изменения в реактивности сосудов в условиях *in vivo* и *in vitro* позволяют предположить, что нефрэктомия приводит к угнетению АСh-индуцированной вазодилатации брыжеечных артерий 2–3-го порядка вследствие повреждения как NO-зависимого механизма, так и механизма эндотелиальной гиперполяризации. Тонус более мелких сосудов МЦР кожи регулируется теми же механизмами, которые характерны для крупных артерий, но выраженность этих влияний может варьировать в зависимости от величины сосуда и его расположения. Вероятно, что различия в выраженности реакции на АСh между более крупными сосудами и микрососудами кожи определяются отличием в эффективности отдельных механизмов вазодилатации в ответ на действие агонистов. Следует подчеркнуть, что функциональное состояние сосудов МЦР крыс после нефрэктомии позволяет поддерживать нормальный уровень перфузии в коже в покое, однако при проведении функциональных и фармакологических проб признаки эндотелиальной дисфункции становятся очевидными.

Причина развития эндотелиальной дисфункции после нефрэктомии может быть связана с действием на эндотелий и ГМК образующихся при ХБП метаболитов, уремических токсинов, активных форм кислорода [34]. В частности, показано, что у пациентов с ХБП продукция эндотелием NO значительно снижается при повышении уровня АДМА [16, 18], а также гомоцистеина [47]. Кроме того, у людей с нарушением функции почек значительно усиливается окислительный стресс, приводящий к избыточному образованию активных форм кислорода и дефициту антиоксидантов [34], что считается одним из факторов риска развития нарушений сердечно-сосудистой системы.

К сожалению, нам не удалось подтвердить предположение о том, что реактивность сосудов МЦР в количественном отношении отражает функциональное состояние более крупных резистивных сосудов. Сравнение амплитуды АСh-индуцированной вазодилатации брыжеечных артерий и степени повышения показателя МЦР кожи после ионофореза NR или АСh не выявило значимой корреляционной зависимости. Причиной различной выраженности реакции на АСh крупных и мелких сосудов могут быть как индивидуальные особенности в строении сосудистого русла кожи и исходном диаметре взятых в исследование брыжеечных артерий, так и степени участия различных механизмов вазодилатации в сосудах разных типов. Так, показано, что в крупных артериях эндотелий-зависимая вазодилатация осуществляется в основном NO-зависимым путем, а при уменьшении диаметра сосуда возрастает роль механизма эндотелиальной гиперполяризации [48].

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что удаление 5/6 массы ткани почек у крыс Wistar через 2 месяца приводит к уремии и росту АД. Уменьшение количества функционирующих нефронов на данном сроке эксперимента не оказывает влияния на среднюю величину фоновой перфузии в коже крыс, однако изменяет структуру частотного диапазона спектра колебаний показателя микроциркуляции, что отражает повышение эндотелиального, нейрогенного и миогенного тонуса сосудов МЦР кожи. Нефрэктомия приводит к развитию эндотелиальной дисфункции брыжеечных артерий и сосудов микроциркуляторного русла кожи, выражающейся в снижении их реактивности на действие эндотелий-зависимого и независимого от эндотелия вазодилататоров. Отсутствие прямой корреляции величины ацетилхолин-индуцированной вазодилатации между брыжеечной артерией и сосудами микроциркуляторного русла кожи можно объяснить индивидуальными раз-

личиями в исходном диаметре сосудов и архитектуре сосудистой сети, а, следовательно, в степени участия отдельных механизмов в вазодилатации сосудов разных типов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении этической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 06/03). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0003.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

И.Г.Т. — идея работы, планирование и проведение экспериментов, обработка данных, написание статьи; Б.О.Н. — идея работы, планирование и проведение экспериментов, написание статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2017) Chronic kidney disease. *Lancet* 389: 1238–1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
2. Di Angelantonio E, Danesh J, Eiriksdottir G, Gudnason V (2007) Renal function and risk of coronary heart disease in general populations: new prospective study and systematic review. *PLoS Med* 4: e270. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040270>
3. Tyralla K, Amann K (2003) Morphology of the heart and arteries in renal failure. *Kidney Int* 63(Suppl. 84): 80–85. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.1.x>
4. Düsing P, Zietzer A, Goody PR, Hosen MR, Kurts C, Nickenig G, Jansen F (2021) Vascular pathologies in chronic kidney disease: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches. *J Mol Med* 99(3): 335–348. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02037-7>
5. Seliger SL, Salimi S, Pierre V, Giffuni J, Katzel L, Parsa A (2016) Microvascular endothelial dysfunction is associated with albuminuria and CKD in older adults. *BMC Nephrol* 17: 82. <https://doi.org/10.1186/s12882-016-0303-x>
6. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, James MT, Hemmelgarn BR (2012) Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet* 380: 807–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60572-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60572-8)
7. Jankowski J, Floege J, Fliser D, Böhm M, Marx N (2021) Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation* 143(11): 1157–1172. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686>
8. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE (2007) Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116: 85–97. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342>
9. Zoccali C, Vanholder R, Massy ZA, Ortiz A, Sarafidis P, Dekker FW, Fliser D, Fouque D, Heine GH, Jager KJ, Kanbay M, Mallamaci F, Parati G, Rossignol P, Wiecek A, London G (2017) The systemic nature of CKD. *Nat Rev Nephrol* 13: 344–358. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.52>
10. Batra G, Ghukasyan L, Lakic T, Lindbäck J, Held C, White HD, Stewart RAH, Koenig W, Cannon CP, Budaj A, Hagström E, Siegbahn A, Wallentin L (2021) STABILITY Investigators Interleukin 6 and

- Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease and Chronic Coronary Syndrome. *JAMA Cardiol* 6(12): 1440–1445.  
<https://doi.org/10.1001/jamacardio.2021.3079>
11. *Martens CR, Edwards DG* (2011) Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. *Cardiol Res Pract* 2011: 1–9.  
<https://doi.org/10.4061/2011/267257>
  12. *Düsing P, Zietzer A, Goody PR, Hosen MR, Kurts C, Nickenig G, Jansen F* (2021) Vascular pathologies in chronic kidney disease: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 22(17): 9221.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22179221>
  13. *Schmidt RJ, Baylis C* (2000) Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 58: 1261–1266.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00281.x>
  14. *Bencheitrit S, Green J, Katz D, Bernheim J, Rathaus M* (2003) Early endothelial dysfunction, following renal mass reduction in rats. *Eur J Clin Invest* 33(1): 26–31.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2003.01102>
  15. *Amador-Martínez I, Pérez-Villalva R, Uribe N, Cortés-González C, Bobadilla NA, Barrera-Chimal J* (2019) Reduced endothelial nitric oxide synthase activation contributes to cardiovascular injury during chronic kidney disease progression. *Am J Physiol Renal Physiol* 317: F275–F285.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00020.2019>
  16. *Fliser D, Kielstein JT, Haller H, Bode-Borger SM* (2003) Asymmetric dimethylarginine: A cardiovascular risk factor in renal disease? *Kidney Int* 63(Suppl.84): 37–43.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.11.x>
  17. *Mangiaccapra F, Conte M, Demartini C, Muller O, Delrue L, Dierickx K, di Sciascio G, Trimarco B, de Bruyne B, Wijns W, Bartunek J, Barbato E* (2016) Relationship of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with extent and functional severity of coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol* 220: 629–633.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.254>
  18. *Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G* (2003) Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int* 63(Suppl 85): 105–111.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s85.25.x>
  19. *Annik M, Zilmer M, Fellstrom B* (2003) Endothelium-dependent vasodilatation and oxidative stress in chronic renal failure: Impact on cardiovascular disease. *Kidney Int* 63(suppl 84): 50–54.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.2.x>
  20. *Zannad F, Rossignol P* (2018) Cardiorenal Syndrome Revisited *Circulation* 138(9): 929–944.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028814>
  21. *Martens RJH, Stehouwer CDA* (2017) Assessing microvascular function in humans from a chronic disease perspective. *J Am Soc Nephrol* 28(12): 3461–3472.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2017020157>
  22. *Williams J, Gilchrist M, Strain D, Fraser D, Shore A* (2020) The systemic microcirculation in dialysis populations. *Microcirculation* 27(5): e12613.  
<https://doi.org/10.1111/micc.12613>
  23. *Roustit M, Cracowski JL* (2012) Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 19: 47–64  
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x>
  24. *Wei Y, Chen H, Chi Q, He Y, Mu L, Liu C, Lu Y* (2021) Synchronized research on endothelial dysfunction and microcirculation structure in dorsal skin of rats with type 2 diabetes mellitus. *Med Biol Eng Comput* 59(5): 1151–1166.  
<https://doi.org/10.1007/s11517-021-02363-5>
  25. *Izerman RG, de Jongh RT, Beijik MA, vanWeissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, Stehouwer CD* (2016) Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest* 33: 536–542.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2003.01179.x>
  26. *Cracowski JL, Roustit M* (2016) Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques. *Microcirculation* 23: 337–344.  
<https://doi.org/10.1111/micc.12257>
  27. *Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adlers, Garrick R, Goligorsky MS* (2004) Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2687–H2696.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00287.2004>
  28. *Lindstedt IH, Edvinsson ML, Edvinsson L* (2006) Reduced responsiveness of cutaneous microcirculation in essential hypertension—a pilot study. *Blood Pressure* 15: 275–280.  
<https://doi.org/10.1080/08037050600996586>
  29. *Wei Y, Chen H, Chi Q, He Y, Mu L, Liu C, Lu Y* (2021) Synchronized research on endothelial dysfunction and microcirculation structure in dorsal skin of rats with type 2 diabetes mellitus.

- Med Biol Eng Comput 59(5): 1151–1166.  
<https://doi.org/10.1007/s11517-021-02363-5>
30. *Smogorzewski MJ* (2017) Skin Blood Flow and Vascular Endothelium Function in Uremia. *J Ren Nutr* 27(6): 465–469. PMID:  
<https://doi.org/10.1053/j.jrn.2017.04.01229056167>
  31. *Paisley KE, Beaman M, Tooke JE, Mohamed-Ali V, Lowe GD, Shore AC* (2003) Endothelial dysfunction and inflammation in asymptomatic proteinuria. *Kidney Int* 63(2): 624–633.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00768.x12631127>
  32. *Иванова ГТ, Лобов ГИ, Береснева ОН, Парастаева ММ* (2019) Изменение реактивности сосудов крыс с экспериментальным уменьшением массы функционирующих нефронов. *Нефрология* 23(4): 88–95. [*Ivanova GT, Lobov GI, Beresneva ON, Parastaeva MM* (2019) Changes in the reactivity of vessels of rats with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons *Nephrology* (Saint-Petersburg) 23(4): 88–95. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.24884/1561-6274-2019-23-4-88-95>
  33. *Rossi M, Carpi A, Galetta F, Franzoni F, Santoro G* (2006) The investigation of skin blood flow-motion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed Pharmacother* 60: 437–442.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.012>
  34. *DuPont JJ, Ramick MG, Farquhar WB, Townsend RR, Edwards DG* (2014) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species contribute to impaired cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 306(12): F1499–F1506.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00058.2014>
  35. *Houben A, Martens RJH, Stehouwer CDA* (2017) Assessing microvascular function in humans from a chronic disease perspective. *J Am Soc Nephrol* 28: 3461–3472.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2017020157>
  36. *Sriram K, Salazar Vázquez BY, Tsai AG, Cabrales P, Intaglietta M, Tartakovsky DM* (2012) Autoregulation and mechanotransduction control the arteriolar response to small changes in hematocrit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(9): H1096–H1106.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00438.2012>
  37. *Kvandal P, Stefanovska A, Veber M, Kvernmo HD, Kirkeboen KA* (2003) Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. *Microvasc Res* 65(3): 160–171.  
[https://doi.org/10.1016/s0026-2862\(03\)00006-2](https://doi.org/10.1016/s0026-2862(03)00006-2)
  38. *Крупаткин АИ, Сидоров ВВ* (2005) Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. М. Медицина. [*Krupatkin AI, Sidorov VV* (2005) Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation. М. Medicine-press. (In Russ)].
  39. *Drábková N, Hojná S, Zicha J, Vaněčková I* (2020) Contribution of selected vasoactive systems to blood pressure regulation in two models of chronic kidney disease. *Physiol Res* 69(3): 405–414.  
<https://doi.org/10.33549/physiolres.934392>
  40. *Stefanovska A., Bravik M* (1999) Physics of human cardiovascular system. *Contemporary Physics* 40(1): 31–35.
  41. *Houben A, Martens RJH, Stehouwer CDA* (2017) Assessing microvascular function in humans from a chronic disease perspective. *J Am Soc Nephrol* 28: 3461–3472.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2017020157>
  42. *Stewart JM, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R, Goligorsky MS* (2004) Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2687–H2696.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00287.2004>
  43. *Kellogg DL Jr, Zhao JL, Coey U, Green JV* (2005) Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol* 98: 629–632.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00728.2004>
  44. *Gaubert ML, Sigaudou-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B* (2007) Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol* 585(Pt 2): 617–626.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143750>
  45. *Лобов ГИ, Соколова ИБ* (2020) Роль NO и H<sub>2</sub>S в регуляции тонуса церебральных сосудов при хронической болезни почек. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(8): 1002–1015. [*Lobov GI, Sokolova IB* (2020) Role of NO and H<sub>2</sub>S in the Regulation of the Tone of Cerebral Vessels in Chronic Kidney Disease. *Russ J Physiol* 106(8): 1002–1015. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813920080063>
  46. *Freed JK, Gutterman DD* (2017) Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* 69(5): 264–272.  
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000463>
  47. *Chen CH, Huang SC, Yeh EL, Lin PC, Tsai SF, Huang YC* (2022) Indoxyl sulfate, homocysteine, and antioxidant capacities in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nutr Res*

- Pract 16(4): 464–475.  
<https://doi.org/10.4162/nrp.2022.16.4.464>
48. Brunt VE, Fujii N, Minson CT (2015) Endothelial-derived hyperpolarization contributes to acetylcholine-mediated vasodilation in human skin in a dose-dependent manner. *J Appl Physiol* 119: 1015–1022.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00201.201>

### Functional State of the Mesenteric Arteries and Vessels of the Skin Microcirculation Bed in Rats with Experimental Kidney Dysfunction

G. T. Ivanova<sup>a, \*</sup> and O. N. Beresneva<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup>*First Pavlov Saint-Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia*

\*e-mail: [ivanovagt@infran.ru](mailto:ivanovagt@infran.ru)

Chronic kidney disease is accompanied by cardiovascular complications, including endothelial dysfunction, arterial hypertension, and atherosclerosis. The aim of this work is to compare the reactivity of the vessels of the microcirculatory bed (MCR) of the skin, assessed by laser Doppler flowmetry (LDF) and mesenteric arteries in rats with resection of 5/6 of the mass of the kidneys, and to evaluate the possibility of using LDF analysis as a method that reflects the functional state of large resistive vessels. Wistar rats were divided into two groups: animals of the NE-group ( $n = 15$ ) had 5/6 of the mass of kidney tissue removed, control animals of the SO-group ( $n = 15$ ) underwent a sham operation. After 8 weeks, the reactivity of rat skin microvessels to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (NP) iontophoresis was assessed. A week later, in rats, the effect of NE on the reactivity of mesenteric arteries precontracted with phenylephrine was evaluated *in vivo* using microphotographic and video recording of the diameter. It has been shown that NE does not affect the average value of perfusion in the skin of rats at rest, however, it changes the structure of the frequency range of the spectrum of fluctuations in the MCR index, increasing the value of endothelial, neurogenic, and myogenic tone. NE led to the development of endothelial dysfunction of the mesenteric arteries and MCR vessels of the skin, which was expressed in a decrease in vascular reactivity to the action of endothelium-dependent (ACh) and endothelium-independent (NP) vasodilators. Thus, the development of experimental kidney dysfunction led to changes in the spectral components of fluctuations in the MCR index in the skin, indicating an increase in tonic effects of various genesis on the vessels. NE was accompanied by a decrease in the reactivity of microvessels of the skin and mesenteric arteries, however, there was no correlation between an increase in the MCR index and dilatation of the mesenteric arteries under the action of vasodilator agonists.

**Keywords:** chronic kidney disease, laser Doppler flowmetry, vasodilation, endothelium, mesenteric artery, skin microcirculation

**ЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ПОЛЕ СЕРДЦА НА ПОВЕРХНОСТИ ГРУДНОЙ КЛЕТКИ  
ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ  
В ПЕРИОД НАЧАЛЬНОЙ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ АКТИВНОСТИ**

© 2023 г. Н. И. Ивонина<sup>1</sup>, \*, И. М. Рощевская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

\*E-mail: bdr13@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 12.08.2023 г.

Статья посвящена исследованию электрического ремоделирования “спортивного сердца” с использованием многоканального ЭКГ-картирования для проведения более детального и информативного анализа процесса возбуждения миокарда, ремоделированного физическими нагрузками. Исследование электрической активности сердца проведено от 64 униполярных электродов на поверхности грудной клетки синхронно со стандартными отведениями от конечностей у высококвалифицированных лыжников-гонщиков ( $n = 15$ ) и молодых нетренированных мужчин ( $n = 19$ ) в состоянии покоя. Измеряли амплитудно-временные и пространственно-временные характеристики электрического поля сердца, по характерному типу распределения областей отрицательных и положительных потенциалов оценивали длительности деполяризации и ее отдельных фаз. На ЭКГ<sub>II</sub> определяли длительности интервалов R–R, PQ (PR), QRS, QT, QTc (по формуле Базетта), в грудном отведении V<sub>5</sub> – время внутреннего отклонения (ВВО<sub>V5</sub>). У спортсменов длительности интервалов PQ<sub>II</sub>, QT<sub>II</sub>, QTc<sub>II</sub> были статистически значимо больше, чем у нетренированных мужчин. Анализ электрического поля сердца показал различие соотношения фаз деполяризации желудочков сердца у спортсменов и нетренированных лиц в покое. Начало деполяризации желудочков сердца и первая инверсия областей кардиопотенциалов у спортсменов были статистически значимо раньше, чем у неспортсменов, тогда как завершение и общая длительность периода деполяризации желудочков не различалась. У лыжников длительность первой инверсии была значимо больше, чем у нетренированных лиц, также показана тенденция к укорочению второго периода стабильного расположения потенциалов на поверхности торса. Использование поверхностного ЭКГ-картирования позволило выявить различия в пространственно-временной организации деполяризации желудочков сердца между лыжниками-гонщиками и нетренированными мужчинами в покое. Результаты исследования могут быть полезны при анализе электрического ремоделирования сердца у спортсменов, тренирующих физическое качество выносливость.

*Ключевые слова:* сердце спортсмена, электрическое ремоделирование миокарда, деполяризация желудочков, ЭКГ-картирование

DOI: 10.31857/S0869813923090054, EDN: ORUDUO

**ВВЕДЕНИЕ**

В результате тренировочного процесса у спортсменов происходит комплекс морфофункциональных перестроек миокарда, обозначаемых термином “сердце

спортсмена” – “athlete’s heart”. Благодаря фундаментальным работам отечественных ученых (Г.Ф. Ланг, Ф.З. Меерсон, А.Г. Дембо, Л.А. Бутченко, Н.Д. Граевская и др.) были установлены физиологические основы ремоделирования “сердца спортсменов”, изучены основные механизмы стрессорной активации, воздействий эндогенного и экзогенного характера на миокард. На настоящий момент в теории “спортивного сердца” не теряет актуальности вопрос разделения физиологической адаптации сердца к нагрузкам (гипертрофия миокарда в сочетании с дилатацией полостей желудочков), позволяющей максимально эффективно использовать ресурсный потенциал сердца, и переходной формы, несбалансированного ремоделирования миокарда, ведущего впоследствии к дистрофическим изменениям (кардиомиопатия).

Ремоделирование сердца атлетов включает в себя изменение структурных компонентов (геометрических показателей, массы) и его электрофизиологических свойств [1, 2]. Процессы структурного и электрического ремоделирования идут параллельно, но изменение электрической активности сердца предшествует морфологическим перестройкам, поскольку физическая нагрузка предъявляет повышенные требования к энергообеспечению кардиомиоцитов, что достигается изменением чувствительности ионных каналов, их пропускной способностью, изменением количества структурных клеточных элементов, а затем уже изменением роста и количества клеток [3, 4]. Более того, электрическое ремоделирование у спортсменов напрямую не связано с анатомическими изменениями и подтверждается даже на структурно нормальном сердце [5–7].

Наиболее распространенным способом оценки электрического ремоделирования сердца служит рутинная электрокардиография (ЭКГ), которая входит в число обязательных инструментальных методов диагностики функционального состояния спортсменов и необходимым условием допуска к соревновательной деятельности [8, 9]. Критерии для оценки электрического ремоделирования “спортивного сердца” окончательно не сформированы, периодически пересматриваются, дополняются, разрабатываются новые [8, 10, 11]. В последнее время необходимость массового проведения рутинной ЭКГ оспаривается все чаще, поскольку нередко имеющиеся нарушения в работе сердца спортсменов не отражаются на электрокардиограмме, либо эти изменения малоспецифичны [12, 13]. Изменения, которые происходят в период реполяризации миокарда у спортсменов многочисленны, и в зависимости от физической нагрузки, используемой во время ЭКГ, имеют разную выраженность, а при исследовании периода деполяризации нередко получают ложноположительные результаты [9, 14], все это снижает диагностическую ценность стандартной ЭКГ в исследовании электрического ремоделирования “спортивного сердца”.

ЭКГ-картирование поверхности торса человека с использованием множества униполярных отведений является информативным неинвазивным методом изучения электрической активности сердца [15–17]. Его очевидным преимуществом является возможность оценить не только амплитудные и временные, но и пространственные характеристики процесса деполяризации миокарда, проследить последовательность прохождения волны возбуждения в миокарде желудочков [18, 19]. Ранее мы показали, что электрическое ремоделирование миокарда у спортсменов даже в покое отражается специфическими изменениями на электрическом поле сердца на поверхности грудной клетки [20–22]. Исследования электрического поля сердца на животных показали изменение длительностей отдельных фаз деполяризации при ремоделировании миокарда вследствие гипертонии [23], при экстремальных физических нагрузках [24], выявили высокую информативность многоканального картирования ЭКГ в диагностике нарушений начальной желудочковой активности. Мы предполагаем, что исследование периода деполяризации желу-

дочков при помощи многоканального ЭКГ-картирования позволит изучить электрическое ремоделирование сердца спортсменов в состоянии покоя и более полно оценить особенности электрофизиологических свойств миокарда атлетов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Характеристика объекта исследования*

В обследовании приняли добровольное участие высококвалифицированные (КМС России, МС России, МСМК России) лыжники-гонщики мужского пола ( $n = 15$ ) и молодые мужчины, не адаптированные к физической нагрузке ( $n = 19$ ). Согласно данным анамнеза, все участники на момент исследования не имели хронических и сердечно-сосудистых заболеваний, не принимали лекарственные препараты.

### *Эхокардиографическое исследование*

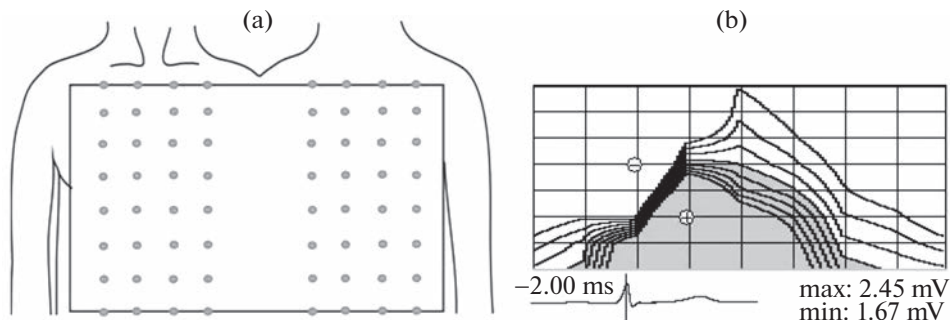
Двумерную эхокардиографию выполняли в положении лежа на левом боку с помощью сканера LOGIC P5 с датчиком 5 МГц (General Electric Co, США). Изображения сердца, полученные в М- и В-режимах в стандартном парастернальном положении по длинной оси и в четырехкамерном положении, в соответствии с международными рекомендациями [25], использовали для измерения конечно-диастолического размера левого желудочка (КДРЛЖ), конечно-диастолического размера правого желудочка (КДРПЖ), толщины стенки межжелудочковой перегородки (ТМЖП) и толщины задней стенки левого желудочка (ТЗСЛЖ), массы миокарда левого желудочка (ММЛЖ), индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

### *Регистрация и анализ электрической активности сердца*

Электрическую активность сердца у обследуемых лиц изучали при помощи многоканального ЭКГ-картирования на поверхности тела с использованием автоматизированной системы для синхронной многоканальной регистрации кардиоэлектрических потенциалов в период начальной желудочковой активности. Униполярные ЭКГ регистрировали в положении испытуемых сидя от 64 электродов, равномерно расположенных на вентральной и дорсальной сторонах торса от уровня ключиц до нижнего края грудной клетки. Электроды были расположены в 8 рядов по 8 электродов в каждом (рис. 1а). Синхронно с туловищными записывали ЭКГ в стандартных биполярных отведениях от конечностей, в качестве референсного электрода для униполярных отведений с поверхности торса использовали центральную терминаль Вильсона. Строили эквипотенциальные моментные карты (ЭМК), отражающие распределение потенциалов электрического поля сердца (ЭПС) в соответствующий момент начальной желудочковой активности на изображении поверхности торса в виде прямоугольника (рис. 1б).

По ЭМК анализировали пространственную локализацию и траектории смещения максимальных положительных и отрицательных кардиоэлектрических потенциалов — экстремумов (максимум и минимум соответственно), а также их максимальную амплитуду в период начальной желудочковой активности. При анализе пространственно-временной динамики ЭПС на поверхности тела определяли время начала и завершения деполяризации желудочков (по характерному типу распределения кардиопотенциалов), время начала и завершения первой и второй инверсий областей кардиопотенциалов в период деполяризации желудочков. Под инверсией понимали изменение взаимного расположения зон положительного и отрицательного кардиопотенциалов на ЭМК на поверхности торса. Временные характеристики





**Рис. 1.** Схема расположения электродов на поверхности грудной клетки человека (а) и эквипотенциальная моментная карта распределения кардиоэлектрических потенциалов на поверхности грудной клетки в период деполяризации желудочков сердца (б).

Условные обозначения: закрашены области положительных потенциалов. Знаки “+” и “-” на карте обозначают локализацию положительного и отрицательного экстремумов соответственно. Под картой указано время в мс (ms) относительно пика зубца  $R_{II}$ , приведена ЭКГ с маркером времени (вертикальная черта), указаны максимальная амплитуда положительного (max) и отрицательного (min) кардиопотенциалов в милливольтх (mV). Левая сторона карты соответствует передней (вентральной), а правая сторона – задней (дорсальной) сторонам грудной клетки.

(в мс) указывали относительно пика  $R_{II}$ -зубца ЭКГ: до пика – цифры приведены со знаком “-”, после пика – без знака. Были рассчитаны длительности обеих инверсий и фаз стабильного положения кардиопотенциалов на поверхности тела, общая длительность деполяризации желудочков. Первая фаза стабильности кардиопотенциалов соответствовала периоду от начала деполяризации желудочков до начала первой инверсии, вторая фаза – периоду от завершения первой до начала второй инверсии, третья фаза – от завершения второй инверсии до окончания периода деполяризации желудочков сердца на ЭМК. Дополнительно рассчитывали время от начала деполяризации желудочков сердца до формирования нулевой линии, разграничивающей положительную и отрицательную области, выемки в форме “седла”, что, согласно более ранним работам [26, 27], соответствовало периоду времени от начала активации миокарда желудочков до прорыва волны возбуждения на субэпикард, и обозначается в литературе как “время эпикардиального прорыва”.

На ЭКГ во втором отведении от конечностей (ЭКГ<sub>II</sub>) определяли длительности интервалов R–R, PQ (PR), QRS, QT, по формуле Базетта вычисляли длительность скорректированного интервала QT (QTc). Для детализации периода деполяризации левого желудочка от туловищного отведения ЭКГ, соответствующего отведению  $V_5$  традиционной ЭКГ, рассчитывали время внутреннего отклонения от начала комплекса QRS до пика  $R_{II}$  (ВВО) и сумму зубцов QRS комплекса в отведении  $V_5$  (соответствует основному вектору электродвижущей силы сердца).

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета Statistica (версия 10.0, StatSoft, США). Нормальность данных была проверена с использованием теста Шапиро–Уилка; антропометрические данные и эхокардиографические параметры исследуемых соответствовали нормальному распределению, показатели электрической активности сердца имели ненормальное распределение. При нормальном распределении анализ производили при помощи параметриче-

ского  $t$ -теста для независимых выборок, результаты представлены в виде средней арифметической  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). При распределении данных, отличных от нормального, анализ проводили по непараметрическому критерию Манна–Уитни, результаты представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q1; Q3)). Различия между выборками считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованные лица были сопоставимы по антропометрическим показателям. У спортсменов и неспортсменов не выявлено значимых различий в возрасте –  $22.6 \pm 6.0$  и  $19.7 \pm 2.4$  лет ( $t = -1.92$ ,  $df = 32$ ,  $p = 0.06$ ), длине тела –  $176.5 \pm 3.8$  и  $177.0 \pm 4.9$  см ( $t = 0.28$ ,  $df = 32$ ,  $p = 0.77$ ), массе тела –  $74.7 \pm 6.9$  и  $69.7 \pm 8.4$  кг ( $t = -1.85$ ,  $df = 32$ ,  $p = 0.07$ ) соответственно. Частота сердечных сокращений у лыжников ( $62.2 \pm 9.3$  уд/мин) и нетренированных лиц ( $66.3 \pm 13.7$  уд/мин) в покое существенно не различалась ( $t = 1.22$ ,  $df = 32$ ,  $p = 0.22$ ).

Эхокардиографические измерения показали значимые различия между спортсменами и нетренированными лицами по морфометрическим параметрам сердца (табл. 1).

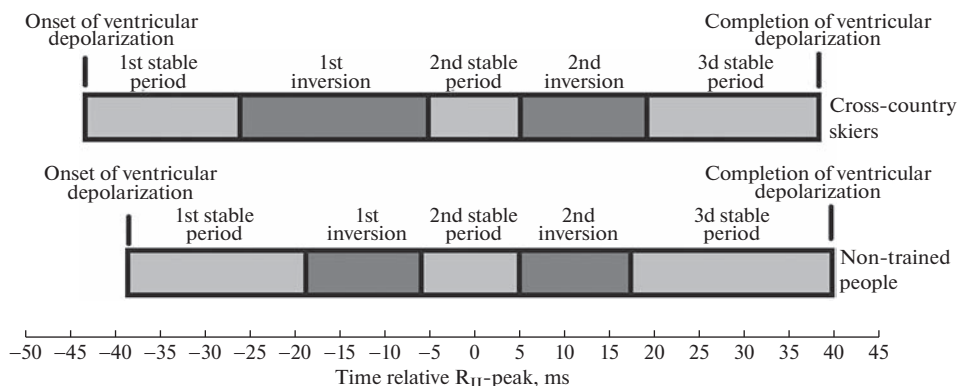
Анализ ЭКГ показал, что у лыжников-гонщиков длительности интервалов  $PQ_{II}$ ,  $QT_{II}$ ,  $QTc_{II}$  были статистически значимо больше, чем у нетренированных мужчин (табл. 2).

**Таблица 1.** Морфометрические показатели сердца у обследованных спортсменов и нетренированных лиц ( $M \pm SD$ )

Параметры	Спортсмены ( $n = 12$ )	Нетренированные лица ( $n = 14$ )	Значение $t$ -критерия Стьюдента и достигнутого уровня статистической значимости
КДРЛЖ (мм)	$57.4 \pm 0.4$	$51.3 \pm 0.3$	$t = 5.82$ , $df = 24$ , $p < 0.001$
ТМЖП (см)	$1.04 \pm 0.07$	$0.91 \pm 0.08$	$t = 1.74$ , $df = 24$ , $p < 0.001$
ТЗСЛЖ (см)	$0.95 \pm 0.08$	$0.84 \pm 0.11$	$t = 3.54$ , $df = 24$ , $p < 0.001$
ММЛЖ (г)	$241.0 \pm 16.0$	$160.0 \pm 28.2$	$t = 8.53$ , $df = 24$ , $p < 0.001$
ИММЛЖ (г/м <sup>2</sup> )	$128.25 \pm 9.05$	$84.91 \pm 13.9$	$t = 9.00$ , $df = 24$ , $p < 0.001$

**Таблица 2.** Длительности ЭКГ интервалов у обследованных спортсменов и нетренированных лиц (Me (Q1; Q3))

Параметры	Спортсмены ( $n = 15$ )	Нетренированные лица ( $n = 19$ )	Значение критерия Манна–Уитни и достигнутого уровня статистической значимости
$PQ_{II}$ , мс	188 (157; 201)	144 (136; 156)	$U = 0.00$ , $Z = 4.92$ , $p < 0.001$
$QRS_{II}$ , мс	85 (80; 89)	94 (86; 103)	$U = 142.5$ , $Z = -0.01$ , $p = 0.98$
$RR_{II}$ , мс	1020 (923; 1070)	934 (800; 1070)	$U = 117.0$ , $Z = 0.86$ , $p = 0.39$
$QT_{II}$ , мс	401 (382; 423)	369 (345; 396)	$U = 0.00$ , $Z = 4.92$ , $p < 0.001$
$QTc_{II}$ , мс	418 (397; 428)	388 (375; 404)	$U = 0.00$ , $Z = 4.92$ , $p < 0.001$
$VBO_{V5}$ , мс	32 (30; 36)	34 (31; 39)	$U = 109.5$ , $Z = -1.12$ , $p = 0.26$



**Рис. 2.** Соотношение длительностей фаз деполяризации желудочков по ЭМК у спортсменов и нетренированных лиц.

### *Пространственно-временные характеристики ЭПС*

Начало деполяризации желудочков сердца по ЭМК и изменение взаимного расположения зон (первая инверсия кардиопотенциалов) у спортсменов были статистически значимо раньше, чем у людей контрольной группы. Временные параметры второй инверсии областей кардиопотенциалов и завершение деполяризации желудочков у людей сравниваемых групп значимо не различались, хотя обнаружилась тенденция к более позднему началу второй инверсии у спортсменов (табл. 3).

Выявлено изменение соотношения длительностей фаз деполяризации желудочков сердца у спортсменов и нетренированных лиц в покое (рис. 2).

**Таблица 3.** Временные характеристики электрического поля сердца у обследованных спортсменов и нетренированных лиц (Me (Q1;Q3))

Параметры	Спортсмены (n = 15)	Нетренированные лица (n = 19)	Значение критерия Манна–Уитни и достигнутого уровня статистической значимости
Начало формирования ЭПС, типичного для деполяризации желудочков сердца, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	-44.0 (-47.8; -42.0)	-39.0 (-39.5; -38.0)	U = 42.0, Z = -3.46, p < 0.001
Начало первой инверсии, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	-26.0 (-29.5; -23.3)	-18.0 (-21.0; -16.8)	U = 35.5, Z = -3.69, p < 0.001
Конец первой инверсии, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	-5.0 (-9.3; 2.8)	-6.0 (-8.3; -4.0)	U = 128.0, Z = 0.48, p = 0.63
Начало второй инверсии, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	5.5 (-2.0; 7.0)	5.0 (4.3; 6.8)	U = 124.5, Z = -0.60, p = 0.54
Конец второй инверсии, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	19.0 (18.0; 22.0)	17.5 (17.3; 19.0)	U = 93.0, Z = 1.69, p = 0.86
Формирование паттерна “седло”, относительно начала активации миокарда, мс	38.5 (35.3; 41.5)	32.0 (31.0; 35.8)	U = 128.0, Z = 0.48, p < 0.01
Завершение ЭПС, относительно пика R <sub>II</sub> , мс	39.0 (34.5; 42.5)	40.0 (39.0; 43.0)	U = 106.0, Z = -1.24, p = 0.21

**Таблица 4.** Длительности деполяризации желудочков и ее отдельных фаз по эквипотенциальным моментным картам у обследованных спортсменов и нетренированных лиц (Me (Q1;Q3))

Параметры	Спортсмены (n = 15)	Нетренированные лица (n = 19)	Значение критерия Манна–Уитни и достигнутого уровня статистической значимости
1 период стабильности, мс	18.0 (15.0; 23.0)	20.5 (18.8; 22.0)	$U = 100.0, Z = -1.45, p = 0.14$
Первая инверсия, мс	21.5 (17.0; 24.3)	13.0 (10.8; 15.0)	$U = 65.0, Z = -2.67, p < 0.01$
2-й период стабильности, мс	6.0 (3.0; 11.2)	12.5 (9.5; 14.3)	$U = 88.0, Z = -1.87, p = 0.06$
Вторая инверсия, мс	15.0 (11.5; 19.5)	13.0 (11.0; 14.3)	$U = 103.00, Z = 1.35, p = 0.17$
3-й период стабильности, мс	20.0 (16.3; 21.8)	23.0 (22.0; 24.8)	$U = 65.5, Z = -2.65, p < 0.01$
Общая длительность деполяризации желудочков, мс	82.0 (77.3; 89.8)	80.5 (77.5; 81.3)	$U = 117.0, Z = 0.86, p = 0.23$

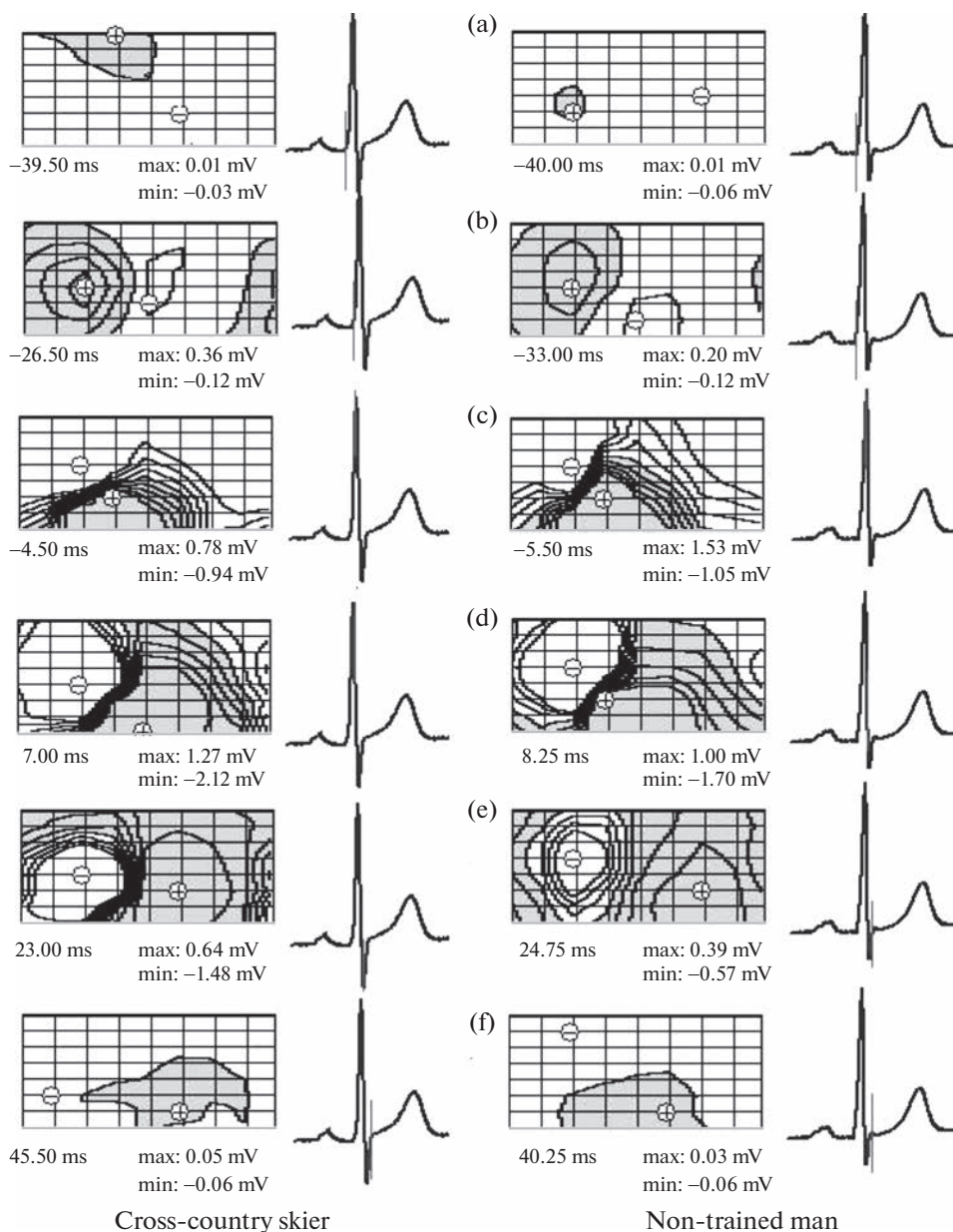
У спортсменов длительность первой инверсии значимо меньше, чем у нетренированных лиц, также показана тенденция ( $p = 0.06$ ) к укорочению второго периода стабильного расположения кардиоэлектрических потенциалов на поверхности торса (табл. 4).

#### *Пространственные характеристики ЭПС*

Расположение зон и экстремумов кардиоэлектрических потенциалов на ЭПС на поверхности грудной клетки в период деполяризации желудочков в покое у лыжников схоже с нетренированными лицами. Тип распределения потенциалов, характерный для начала деполяризации желудочков, формировался на поверхности тела до появления зубца Q (R) на ЭКГ<sub>II</sub>. При этом положительный экстремум небольшой амплитуды (0.01–0.03 мВ) регистрировали на вентральной поверхности в районе ключицы или грудины, отрицательный экстремум располагался преимущественно дорсально (рис. 3а).

Затем зона положительных кардиопотенциалов увеличивалась, занимая всю вентральную часть, а отрицательных потенциалов — дорсальную часть торса, при этом амплитуды экстремумов нарастали (рис. 3б). В период восходящей части R<sub>II</sub>-волны наблюдали первую инверсию областей кардиопотенциалов на ЭПС на поверхности тела — максимум смещался влево вниз по передней стороне торса, а минимум перемещался со спины под правую ключицу. Дальнейшее движение минимума вниз вдоль грудины к области мечевидного отростка привело к прогибу отрицательной зоны в виде “седла”, после формирования которого движение отрицательной зоны остановилось (рис. 3с), затем следовал недолговременный период стабильного положения кардиопотенциалов на поверхности торса.

В период нисходящей части R<sub>II</sub>-волны начиналась вторая инверсия положительной и отрицательной зон (рис. 3д) кардиоэлектрических потенциалов на ЭМК. Положительная зона перемещалась на спину и через плечо на верхнюю область груди, а зона отрицательных потенциалов распространялась по оставшейся перед-



**Рис. 3.** Репрезентативные эквипотенциальные моментные карты распределения кардиопотенциала на поверхности грудной клетки в период начальной желудочковой активности у лыжника-гонщика (К. Е.) и нетренированного человека (Л. А.) (а) – начало деполяризации желудочков; (б, с) – начало и завершение первой инверсии зон кардиопотенциалов соответственно; (д, е) – начало и завершение второй инверсии кардиопотенциалов соответственно; (ф) – завершение деполяризации желудочков. Обозначения те же, что и на рис. 1.

**Таблица 5.** Амплитудные характеристики периода деполяризации желудочков сердца ( $M \pm SD$ )

Параметры	Спортсмены ( $n = 15$ )	Нетренированные лица ( $n = 19$ )	Значение $t$ -критерия Стьюдента и достигнутого уровня статистической значимости
Амплитуда максимального положительного экстремума, мВ	$1.96 \pm 0.90$	$2.28 \pm 1.01$	$t = -0.98, df = 32, p = 0.19$
Амплитуда максимального отрицательного экстремума, мВ	$-2.58 \pm 0.95$	$-2.11 \pm 0.57$	$t = -1.82, df = 32, p = 0.78$
Сумма амплитуд экстремумов, мВ	$4.54 \pm 1.64$	$4.39 \pm 1.38$	$t = 0.29, df = 32, p = 0.77$
Сумма амплитуд зубцов комплекса $QRS_{V_5}$ , мВ	$2.20 \pm 0.69$	$2.10 \pm 0.90$	$t = 0.35, df = 32, p = 0.73$

ней части торса. Остановка смещения областей обозначала завершение второй инверсии кардиопотенциалов (рис. 3е), за которой следовал третий период стабильного положения кардиопотенциалов, продолжающийся вплоть до завершения деполяризации миокарда желудочков. К концу деполяризации миокарда (восходящая фаза  $S_{II}$ -зубца) характер пространственного распределения потенциалов уже не изменялся (рис. 3ф), но существенно уменьшились амплитуды экстремумов.

#### *Амплитудные характеристики ЭПС*

Суммарная величина амплитуд Q, R, S в отведении  $V_5$  не показала статистически значимых различий между спортсменами и людьми контрольной группы (табл. 5).

Амплитуды максимальных положительного и отрицательного экстремумов сердца, а также сумма этих показателей у лыжников существенно не различались по сравнению с таковыми у нетренированных лиц (табл. 5).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день выявлены основные закономерности активации рабочего миокарда у человека [19, 28], изучено отображение этих процессов на поверхности грудной клетки [15, 18, 29]. Начало активации в левом желудочке происходит синхронно в трех областях субэндокарда, которые разрастаются и через 15–20 мс после начала активации сливаются в одну зону, которая распространяется по межжелудочковой перегородке в направлении к верхушке сердца и от эндо- к эпикарду [28, 29]. На поверхности тела началу активации желудочков соответствует формирование положительной зоны небольшой площади в прекардиальной области, а отрицательной – в области лопатки или левой подмышки [30]. Затем максимум медленно смещается левее и ниже, минимум быстро переходит к правому плечу, откуда спускается ниже, в область мечевидного отростка. Теперь область отрицательных потенциалов формирует “седло”, продавливая область положительных потенциалов в виде ниши. У одних людей его появление совпадает с восходящей фазой R-волны на ЭКГ<sub>II</sub>, у других – с ее пиком. К моменту появления “седла” практически весь субэндокард деполяризован [18]. После этого непродолжительное время отмечают стабильное расположение зон, которое соответствует деполяризации основной массы рабочего миокарда желудочков. Затем расположение областей кардиопотенциалов на поверхности грудной клетки вновь начинает меняться – максимум смещается влево, переходя на спину, а минимум остается спереди. Эти процессы объясняют изменением направления волны возбуждения с области межжелудочковой

перегородки и верхушки сердца на свободные стенки к основаниям желудочков [28, 30]. На ЭКГ в стандартных отведениях данный процесс соответствует нисходящей фазе RS комплекса. За окончанием второй инверсии областей кардиопотенциалов следует третий период стабильного расположения областей потенциалов на поверхности тела. К концу деполяризации, когда амплитуда потенциалов уменьшается, у одних людей на поверхности торса основным максимумом остается экстремум на спине, у других – подключичный положительный экстремум. В нашем исследовании динамика распределения экстремумов и областей кардиопотенциалов в течение деполяризации желудочков на поверхности торса у спортсменов была сходной с нетренированными людьми, и у лиц обеих групп соответствовало описанию для здорового человека.

Одними из самых показательных временных точек при оценке эквипотенциальных карт является момент изменения вектора электродвижущей силы сердца, которое проявляется на поверхности грудной клетки появлением отрицательного экстремума на вентральной части в районе правой ключицы или плеча и формированием прогиба нулевой изолинии в виде “седла” [18, 30]. Период от начала активации миокарда до появления феномена “седла” на ЭМК, соответствующий прорыву волны возбуждения на эпикард желудочков, этот показатель у спортсменов значимо превышал таковой у нетренированных лиц. В исследованиях Segenoia и Laski-Zachog и соавт. у практически здорового человека эпикардиальный прорыв по данным многоканального ЭКГ происходит на 32–37-й мс от начала активации миокарда [26, 27]. В этот временной диапазон укладываются значения формирования нулевой линией “седла” на поверхности грудной клетки у обследованных нами лыжников и нетренированных лиц. Это позволяет заключить, что у спортсменов основные закономерности прохождения фронтом волны возбуждения в миокарде желудочков сохраняются.

В настоящем исследовании мы впервые показали, что в покое на фоне практически сходной продолжительности периода возбуждения желудочков соотношение ее отдельных фаз у спортсменов и неадаптированных к физнагрузке лиц различалось. Так, начало формирования ЭПС, характерного для деполяризации желудочков, и начало первой инверсии зон кардиопотенциалов у лыжников происходит раньше, а длительность первой инверсии была продолжительнее, чем у нетренированных лиц. Также у спортсменов отметили укорочение второго (тенденция,  $p = 0.06$ ) и третьего ( $p < 0.01$ ) периодов стабильного расположения кардиопотенциалов на поверхности торса в период активации миокарда желудочков. Укорочение двух вышеупомянутых фаз деполяризации желудочков у обследованных лыжников компенсировалось значимым удлинением первой инверсии кардиопотенциалов, поэтому в результате общая длительность возбуждения желудочков существенно не различалась у спортсменов и нетренированных лиц. Согласно результатам прямых исследований на сердце и соотношению их с распределением кардиопотенциалов на поверхности торса [15, 19, 28], первая инверсия кардиопотенциалов соответствует проведению возбуждения по проводящей системе сердца – возбуждение основной массы миокарда желудочков согласуется со вторым периодом стабильного положения кардиопотенциалов, а возбуждение основания желудочков – с третьим периодом стабильного положения кардиопотенциалов. Можно предположить, что у лыжников удлинение второго и третьего периодов стабильности обусловлено структурным ремоделированием миокарда, которое проявилось в увеличенных размерах полостей правого и левого желудочков, величинах ММЛЖ и ИММЛЖ по сравнению с людьми контрольной группы. Сравнительное эхокардиографическое исследование у представителей различных спортивных дисциплин, развивающих физическое качество выносливость, показало, что у лыжников-гонщиков процесс гипертрофии миокарда идет параллельно с дилатацией полостей желудочков, по-

этому увеличение размеров сердца влечет за собой рост массы миокарда и индекса массы миокарда левого желудочка, достигающих у лыжников рекордных показателей среди других видов спорта [31]. Сумма амплитуд комплекса QRS лежит в основе ЭКГ-критериев при оценке гипертрофии миокарда желудочков, и у спортсменов, развивающих выносливость, показаны наибольшие значения этого показателя среди спортивной популяции [32]. Сумма амплитуд экстремумов электрического поля сердца также рассчитывается для оценки вольтажного размаха фронта волны деполяризации и используется как критерий оценки функционального состояния миокарда при физической нагрузке [33]. Наше исследование показало, что, несмотря на значимо большие морфометрические показатели левого желудочка сердца, амплитуды зубцов QRS комплекса и амплитуды экстремумов электрического поля сердца существенно не различались между спортсменами и нетренированными людьми. Вероятно, увеличение размеров сердца на фоне сохранения толщин стенок и межжелудочковой перегородки в диапазоне значений для здорового человека [25] у обследованных лыжников отразилось в изменении преимущественно временных, а не амплитудных характеристик электрического поля сердца.

При анализе стандартной ЭКГ в период деполяризации желудочков не выявлено различий в длительности  $QRS_{II}$  комплекса и периода деполяризации желудочков по ЭМК между атлетами и неспортсменами. Также не различались между группами значения  $BVO_{V_5}$ , которые у всех участников нашего исследования находились в пределах референсных значений для здорового человека [34]. Поскольку увеличение продолжительности  $BVO_{V_6}$  характеризует замедление прохождения волны возбуждения в левом желудочке [35], можно заключить, что по данным традиционной ЭКГ временная структура периода деполяризации желудочков у обследованных спортсменов и неспортсменов не различалась. Таким образом, использование общепринятых критериев оценки процесса деполяризации при помощи традиционной ЭКГ не показало различий длительности отдельных фаз периода возбуждения желудочков между тренированными и нетренированными лицами

Итак, в представленной работе впервые показан электрокардиотопографический анализ электрического поля сердца у лыжников-гонщиков и нетренированных людей в покое. Выявленное изменение пространственно-временной структуры процесса деполяризации желудочков сердца у спортсменов подтверждает электрическое ремоделирование миокарда, не выявленное традиционным методом анализа электрической активности сердца.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Письменное согласие после подробного инструктажа и разъяснения исследовательских целей было получено от каждого участника. Исследование проводили в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации WMA (1964 г., ред. 2013 г.) и при одобрении биоэтического комитета Отдела сравнительной кардиологии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук” (протокол № 1 от 06.04.2022).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122040600069-6.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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



## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Н.И.И., И.М.Р.), получение экспериментальных данных (Н.И.И.), обработка результатов, написание рукописи статьи (Н.И.И.), доработка рукописи статьи на предмет интеллектуального содержания (И.М.Р.).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят С.В. Стрельникову за всестороннюю помощь в получении данных, врача функциональной диагностики ГУ РК “Клинический кардиологический диспансер” И.Н. Каневу за ультразвуковое исследование сердца участников исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Augustine DX, Howard L* (2018) Left ventricular hypertrophy in athletes: differentiating physiology from pathology. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 20(12): 96.  
<https://doi.org/10.1007/s11936-018-0691-230367318>
2. *Palmisano A, Darvizeh F, Cundari G, Rovere G, Ferrandino G, Nicoletti V, Cilia F, De Vizio S, Palumbo R, Esposito A, Francone M* (2021) Advanced cardiac imaging in athlete's heart: unravelling the grey zone between physiologic adaptation and pathology. *Radiol Med* 126(12): 1518–1531.  
<https://doi.org/10.1007/s11547-021-01411-2>
3. *Minina EN, Stepura EE* (2022) Aspects of myocardial heterogeneity in assessment its remodeling. *RUDN J Med* 26(4): 451–460.  
<https://doi.org/10.22363/2313-0245-2022-26-4-451-460>
4. *Vakhnenko YV, Dorovskikh IE, Gordienko EN, Chernykh MA* (2020) Some topical aspects of the problem of “sports heart” (review). Part I. *Bull Physiol Pathol Respirat* (78): 147–160.  
<https://doi.org/10.36604/1998-5029-2020-78-147-160>
5. *Eijsvogels TM, Fernandez AB, Thompson PD* (2016) Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiol Rev* 96(1): 99–125.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.201426607287>
6. *Задворьев СФ, Крысюк ОБ, Обрезан АГ* (2017) Показатели перегрузки сердца и его ремоделирования у представителей различных видов спорта. Спорт мед: наука и практика 7(2): 12–18. [*Zadvor'ev SF, Krysjuk OB, Obrezan AG* (2017) Markers of cardiac overload and its remodeling in athletes representing different sports. *Sport Med: nauka i praktika* 7(2): 12–18. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.17238/ISSN2223-2524.2017.2.12>
7. *Garganeeva NP, Taminova IF, Kalyuzhin VV, Kalyuzhina E, Smirnova IN* (2021) Predictive factors of cardiovascular changes depending on the type and intensity of physical activity in professional athletes. *Rus J Cardiol* 26(10): 4647.  
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4647>
8. *Drezner JA, Sharma S, Baggish A, Papadakis M, Wilson MG, Prutkin JM, Gerche A, Ackerman MJ, Borjesson M, Salerno JC, Asif IM, Owens DS, Chung EH, Emery MS, Froelicher VF, Heidbuchel H, Adamuz C, Asplund CA, Cohen G, Harmon KG, Marek JC, Molossi S, Niebauer J, Pelto HF, Perez MV, Riding NR, Saarel T, Schmied CM, Shipon DM, Stein R, Vetter VL, Pelliccia A, Corrado D* (2017) International criteria for electrocardiographic interpretation in athletes: consensus statement. *Br J Sports Med* 51(9): 704–731.  
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2016-097331>
9. *Basu J, Malhotra A* (2018) Interpreting the Athlete's ECG: Current State and Future Perspectives. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 20(12): 104.  
<https://doi.org/10.1007/s11936-018-0693-0>
10. *Maron BJ, Zipes DP* (2005) 36th Bethesda Conference: eligibility recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 45: 1312–1375.
11. *Drezner JA, Ackerman MJ, Anderson J, Ashley E, Asplund CA, Baggish AL, Börjesson M, Cannon BC, Corrado D, DiFiori JP, Fischbach P, Froelicher V, Harmon KG, Heidbuchel H, Marek J, Owens DS, Paul S, Pelliccia A, Prutkin JM, Salerno JC, Wilson MG* (2013) Electrocardiographic interpretation in athletes: the “Seattle criteria”. *Br J Sports Med* 47(3): 122–124.  
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2012-092067>
12. *Van der Wall EE* (2015) ECG screening in athletes: optional or mandatory? *Neth Heart J* 23(7–8): 353–355.  
<https://doi.org/10.1007/s12471-015-0724-3>
13. *Горбенко АВ, Скирденко ЮП, Николаев НА, Замахина ОВ, Шерстюк СА, Еришов АВ* (2020) Спортивное сердце: норма или патология. Патология кровообращения и кардиохирургия 24(2): 16–25 [*Gorbenko AV, Skirdenko JuP, Nikolaev NA, Zamahina OV, Sherstjuk SA, Ershov AV* (2020) Sports heart: norm or pathology. *Circulat pathol and cardiac surgery* 24(2): 16–25. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.21688/1681-3472-2020-2-16-25>

14. *Calore C, Melacini P, Pelliccia A, Cianfrocca C, Schiavon M, Di Paolo FM, Bovolato F, Quattrini FM, Basso C, Thiene G, Illiceto S, Corrado D* (2013) Prevalence and clinical meaning of isolated increase of QRS voltages in hypertrophic cardiomyopathy versus athlete's heart: relevance to athletic screening. *Int J Cardiol* 168(4): 4494–4497.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.123>
15. *Рощевская ИМ* (2008) Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека. СПб. Наука. [*Roshhevskaya IM* (2008) Cardioelectric field of warm-blooded animals and humans. SPb. Nauka. (In Russ)].
16. *Bond RR, Finlay DD, Nugent CD, Moore G, Guldenring D* (2013) Methods for presenting and visualising electrocardiographic data: From temporal signals to spatial imaging. *J Electrocardiol* 46(3): 182–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2013.01.008>
17. *Bergquist J, Rupp L, Zenger B, Brundage J, Busatto A, MacLeod RS* (2021) Body surface potential mapping: contemporary applications and future perspectives. *Hearts* 2(4): 514–542.  
<https://doi.org/10.3390/hearts2040040>
18. *Medvegy M, Duray G, Pintér A, Préda I* (2002) Body surface potential mapping: historical background, present possibilities, diagnostic challenges. *Ann Noninvas Electrocardiol* 7(2): 139–151.  
<https://doi.org/10.1111/j.1542-474x.2002.tb00155.x>
19. *Ophof T, Remme CA, Jorge E, Noriega F, Wiegerinck RF, Tasiam A, Beekman L, Alvarez-Garcia J, Munoz-Guijosa C, Coronel R, Cinca J* (2016) Cardiac activation-repolarization patterns and ion channel expression mapping in intact isolated normal human hearts. *Heart Rhythm* 14(2): 265–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.10.010>
20. *Strelnikova SV, Panteleeva NI, Roshchevskaia IM* (2014) Spatiotemporal characteristics, of the heart electrical field at the period of ventricular depolarization in athletes training endurance and strength. *Human Physiol* 40(5): 87–92.
21. *Panteleeva NI, Zamenina EV, Roshchevskaia IM, Kaneva IN* (2019) The heart electrical activity during ventricular repolarization and types of the remodeling of the athlete's heart. *Int J Biomed* 9 (4): 297–299.  
[https://doi.org/10.21103/Article9\(4\)\\_OA4](https://doi.org/10.21103/Article9(4)_OA4)
22. *Ivonina NI, Fokin AA, Roshchevskaia IM* (2021) Body surface potential mapping during heart ventricular repolarization in male swimmers and untrained persons under hypoxic and hypercapnic hypoxia. *High Alt Med Biol* 22(3): 308–316.  
<https://doi.org/10.1089/ham.2020.0103>
23. *Suslonova OV, Smirnova SL, Roshchevskaia IM* (2016) Cardiac body surface potentials in rats with experimental pulmonary hypertension during ventricular depolarization. *Bull Exp Biol Med* 162(1): 7–10.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3531-y>
24. *Ivonin AG, Smirnova SL, Roshchevskaia IM* (2022) Body surface potential mapping during ventricular depolarization in rats after acute exhaustive exercise. *Arquiv Brasil Cardiol* 119(5): 766–775.  
<https://doi.org/10.36660/abc.20211058>
25. *Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W; American Society of Echocardiography's Nomenclature and Standards Committee; Task Force on Chamber Quantification; American College of Cardiology Echocardiography Committee; American Heart Association; European Association of Echocardiography, European Society of Cardiology* (2006) Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 7(2): 79–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.euje.2005.12.014>
26. *Sugenoya J* (1978) Interpretation of the body surface isopotential maps of patients with right bundle branch block. Determination of the region of the delayed activation within the right ventricle. *Jpn Heart J* 19(1): 12–27.  
<https://doi.org/10.1536/ihj.19.12>
27. *Laszki-Szczachor K, Jagielski J, Rusiecki L, Sobieszczanska M, Janocha A* (2006) Changes of ventricular activation time in patients with left anterior fascicle block and bifascicular block. *Pol Arch Med Wewn* 116(6): 1162–1171.
28. *Ramanathan C, Jia P, Ghanem R, Ryu K, Rudy Y* (2006) Activation and repolarization of the normal human heart under complete physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6309–6314.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0601533103>
29. *Taccardi B, Punske BB, Lux RL, MacLeod RS, Ershler PR, Dustman TJ, Vyhmeister Y* (1998) Useful lessons from body surface mapping. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9(7): 773–786.  
<https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1998.tb00965.x>
30. *De Ambroggi L, Corlan A. Body Surface Potential Mapping. In: Macfarlane P, van Oosterom A, Pahlm O, Klügfield P, Janse M, Camm J (eds)* (2011) *Comprehensive Electrocardiology*. London. Springer Verlag London Limited.

31. *Талибов АХ, Фадейкин МА, Дмитриева ЕС* (2015) Критерии оценки эхокардиографических показателей у спортсменов. Учен записки унив Лесгафта 3(121): 142–146. [*Talibov AH, Fadejkin MA, Dmitrieva ES* (2015) Criteria for evaluating echocardiographic parameters in athletes. Uchen zapiski univ Lesgafta. (In Russ)].
32. *Павлов ВИ, Орджоникидзе ЗГ, Резепов АС* (2019) Регистрация электрокардиограммы спортсмена – практические аспекты. Практ мед 17(2): 71–73. [*Pavlov VI, Ordzhonikidze ZG, Rezepov AS* (2019) Registration of an athlete's electrocardiogram – practical aspects. Prakt Med 17(2): 71–73. (In Russ)].
33. *Takala P, Hänninen H, Montone J, Mäkijärvi M, Nenonen J, Oikarinen L, Simeliu K, Toivonen L, Katil T* (2001) Magnetocardiographic and electrocardiographic exercise mapping in healthy subjects. Ann Biomed Eng 29: 501–509. <https://doi.org/10.1114/1.1376388>
34. *Macfarlane P, Lawrie T* (2011) The normal electrocardiogram and vectorcardiogram. In: *Macfarlane P, van Oosterom A, Pahlm O, Kligfield P, Janse M, Camm J* (eds) Comprehensive Electrocardiology. London. Springer Verlag London Limited.
35. *Pérez-Riera AR, de Abreu LC, Barbosa-Barros R, Nikus KC, Baranchuk A* (2016) R–peak time: An electrocardiographic parameter with multiple clinical applications. Ann Noninvasiv Electrocardiol 21(1): 10–19. <https://doi.org/10.1111/anec.12323>

### **Electric Field of the Heart on the Thorax Surface in Highly Trained Athletes during Initial Ventricular Activity**

**N. I. Ivonina<sup>a, \*</sup> and I. M. Roshchevskaya<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, Russia*

*\*e-mail: bdr13@mail.ru*

The article is focused on the study of the electrical remodeling of the “sports heart” using multichannel ECG mapping to make a more detailed and informative analysis of the excitation of the myocardium remodeled by sport activity. The study of the heart electrical activity was carried out from 64 unipolar electrodes on the thorax surface synchronously with standard limb leads in highly trained cross-country skiers ( $n = 15$ ) and young non-trained men ( $n = 19$ ) at rest. The amplitude-temporal and spatiotemporal characteristics of the electric field of the heart were measured. By the typical distribution of areas of the negative and positive cardiac potentials the durations of depolarization and its individual phases were estimated. ECG<sub>II</sub> was used to determine the duration of the R-R, PQ (PR), QRS, QT, QTc intervals; in the unipolar lead V<sub>5</sub> the R-wave peak time (RWPT<sub>V5</sub>) was measured. In athletes, the duration of PQ<sub>II</sub>, QT<sub>II</sub>, QTc<sub>II</sub>, RWPT<sub>V5</sub> intervals were statistically significantly longer than in non-trained men. Analysis of the electrical field of the heart showed a difference in the ratio of the phases of ventricular depolarization in athletes and non-trained individuals at rest. The onset of ventricular depolarization and the first inversion of cardiac potential in athletes were significantly earlier than in non-trained people, while the completion and total duration of the period of ventricular depolarization did not differ. In skiers, the duration of the first inversion was significantly longer than in non-trained individuals; a tendency to shortening of the second period of stable location of potentials on the thorax surface was also shown. The use of surface ECG mapping made it possible to reveal differences in the spatiotemporal organization of heart ventricular depolarization between cross-country skiers and non-trained men at rest. The results of the study may be useful in the analysis of the electrical remodeling of the heart in athletes training the physical quality of endurance.

*Keywords:* athlete's heart, electrical remodeling of the myocardium, ventricular depolarization, body surface potential mapping

**ИНГИБИТОР  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФАЗЫ УАБАИН ПО-РАЗНОМУ ВЛИЯЕТ  
НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУЖДАЮЩИХ  
И ТОРМОЗНЫХ НЕЙРОНОВ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ**

© 2023 г. Е. Ю. Проскурина<sup>1, 2, \*</sup>, Д. С. Синяк<sup>2</sup>, А. В. Зайцев<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2022 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принята к публикации 08.08.2023 г.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза обеспечивает поддержание потенциала покоя в нейроне и трансмембранного градиента катионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , воздействуя таким образом на ионный транспорт и регулируя клеточный объем. Мутации генов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, ослабляющие ее функционирование, если не являются летальными, могут приводить к существенным нарушениям функционирования нервной системы, в том числе к развитию эпилепсии. В разных классах нейронов экспрессируются различные формы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, различающиеся по своим характеристикам. Поэтому ослабление функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы может по-разному сказываться на функционировании тормозных и возбуждающих нейронов. В данной работе мы исследовали, какие электрофизиологические характеристики пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов изменяются под действием антагониста  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы уабаина и как он влияет на синаптическую передачу. Мы выявили, что 5 мкМ уабаина деполяризует мембранный потенциал покоя обоих типов нейронов, уменьшает амплитуду и увеличивает длительность потенциала действия пирамидных нейронов. У быстроразряжающихся интернейронов уабаин уменьшал амплитуду следовой гиперполяризации. У обоих типов нейронов понижался порог генерации потенциала действия и ток, при котором возникает деполяризационный блок. Прочие электрофизиологические характеристики нейронов не менялись при добавлении уабаина. Кроме того, уабаин приводил к быстрому ослаблению ГАМКергической передачи, при этом на возбуждающую синаптическую передачу он не оказывал влияния. Эти новые данные об эффектах действия уабаина на возбуждающие пирамидные нейроны и тормозные интернейроны помогают лучше понять механизм изменения баланса возбуждения и торможения в нервных сетях при ослаблении функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

*Ключевые слова:* уабаин,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, энторинальная кора, пирамидные клетки, быстроразряжающиеся интернейроны, потенциал действия

DOI: 10.31857/S086981392309008X, EDN: OROECO

## ВВЕДЕНИЕ

В клетках животных, в том числе нейронах, экспрессируется  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, обеспечивающая градиент ионов натрия и калия внутри и снаружи клетки. Разница кон-

центраций этих моновалентных ионов необходима для поддержания мембранного потенциала покоя и реализации таких функций нейрона, как генерация потенциала действия, поддержание ионного гомеостаза, регуляция метаболизма, осмоса, объема клетки и жизненного цикла [1, 2].  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза является и энзимом, АТФазой, и ионной помпой. Она состоит из трех субъединиц –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [3, 4]. Субъединица  $\alpha$  ответственна за ионный транспорт, содержит сайт связывания молекулы АТФ и сайт фосфорилирования. Внеклеточный домен и переходная область содержат сайты связывания специфического антагониста  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы убаина и других кардиогликозидов, которые тормозят работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Субъединица  $\beta$  усиливает эффективность трансляции и стабильность  $\alpha$ -субъединицы, а  $\gamma$ -субъединица влияет на аффинность для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и молекулы АТФ, на кинетику и транспорт, а также стабилизирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу [3, 4]. В нейронах млекопитающих экспрессируются  $\alpha 1$ -,  $\alpha 3$ - и  $\beta 2$ -субъединицы, тогда как в глии –  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - и  $\beta 1$ -субъединицы. Показано, что  $\alpha$ -субъединицы различаются по сродству к ионам  $\text{Na}^+$  и к убаину. У крыс  $\alpha 1$ -изоформа  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы обладает необычно низким сродством к убаину по сравнению с  $\alpha 2$ - или  $\alpha 3$ -изоформами [5, 6]. Рассчитанные значения  $\text{IC}_{50}$  составляет  $>10$  мкМ для  $\alpha 1$ - и только 10–500 нМ для  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -изоформ [5]. Повышение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Na}^+$  увеличивает активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, однако  $\alpha 3$ -изоформа имеет более низкую аффинность к ионам  $\text{Na}^+$  –  $K_{0,5} = 25$ –50 мМ, для других изоформ  $K_{0,5} = 10$  мМ [4, 7, 8]. Таким образом,  $\alpha 3$ -изоформа будет подключаться при высокой активности нейронов, наблюдаемой, например, при эпилептической активности. Предполагается, что  $\alpha 3$ -изоформа может преобладать в нейронах, которые могут поддерживать высокую частоту разрядов [9, 10].

Нарушение функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в результате мутаций может приводить к существенным нарушениям функций нервной системы и в том числе возникновению эпилепсии у человека [11–13]. У мышей линии *Myc/+* мутация I810N, которая делает неактивной  $\alpha 3$ -АТФазу, наблюдаются сложные парциальные и вторично-генерализованные припадки, значительное снижение порога гиппокампальных судорог *in vitro*, посттетаническая возбудимость гиппокампального пути СА3–СА1 и дегенерация нейронов в гиппокампе [14]. Однако конкретные молекулярные и клеточные механизмы гипервозбудимости нейронных сетей при ослаблении функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы требуют дальнейшего изучения.

Один из часто применяемых фармакологических подходов для изучения роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы – это использование ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В срезах сенсомоторной коры ювенильных крыс было показано, что как пирамидные клетки, так и быстроразряжающиеся интернейроны деполяризуются на 3–10 мВ в ответ на 30-секундную перфузию дигидроубаина (100 мкМ), частичного блокатора  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [15]. Было выявлено, что ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с помощью дигидроубаина не влияет на входное сопротивление нейронов. Основным же открытием было то, что в состоянии покоя плотность тока, характеризующая активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, быстроразряжающихся интернейронов была в 3–7 раз выше, чем пирамидных нейронов. Плотность тока рассчитывалась как отношение деполяризации, вызванной дигидроубаином, к входному сопротивлению и емкости мембраны [15].

На первичной культуре нейронов коры крысы было показано, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза в основном колокализирована с возбуждающими постсинапсами [16]. Было определено наличие связи между  $\alpha 1$ -изоформой  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и GluA2-субъединицей AMPA-рецептора. Также было показано, что спустя 1 ч после аппликации 50 мкМ

уабаина уменьшается количество GluA1 на 56% и GluA2/3 на 80%. Уабаин приводит также к долговременной депрессии АМРА-синаптической передачи.

Однако в настоящее время эффекты антагониста  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы уабаина на многие электрофизиологические свойства возбуждающих и тормозных нейронов до сих пор не описаны. Поэтому в данной работе мы изучили эффект уабаина на электрофизиологические свойства пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры, а также на синаптическую передачу.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Приготовление переживающих срезов энторинальной коры и гиппокампа*

В эксперименте использовали взрослых мышей C57BL/6 ( $n = 16$ ), а для оценки коэффициента парных импульсов – 21-дневных крыс Вистар ( $n = 6$ ). Животных содержали в стандартных условиях (соотношение день/ночь составило 12 ч/12 ч, температура  $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ) со свободным доступом к корму и воде. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН, разработанными на основе международных рекомендаций European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС).

Метод приготовления горизонтальных срезов энторинальной коры и гиппокампа подробно описан ранее [17]. Кратко: после анестезии мышей (крыс) декапитировали, затем быстро извлекали головной мозг и помещали его в охлажденную до  $0^\circ\text{C}$  низконатриевую искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ), аэрируемую газовой смесью 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ , следующего состава (в мМ): 110 *N*-метил-D-глюкамин, 2.5 KCl, 1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\text{MgSO}_4$ , 0.5  $\text{CaCl}_2$ , 25  $\text{NaHCO}_3$ , 25 D-глюкозы. Срезы мозга толщиной 300 мкм нарезали на вибротоме MicromHM 650V (ThermoFisher Scientific, США) и помещали в аэрируемую ИСМЖ при  $35^\circ\text{C}$ . ИСМЖ содержала следующие компоненты (в мМ): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\text{MgSO}_4$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 10 D-глюкозы.

### *Регистрация ответов нейрона методом патч-кламп “целая клетка”*

Изготовленные срезы перемещали в перфузируемую камеру, нейроны глубоких слоев энторинальной коры визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse FN1 (Nikon, Япония), оснащенного водно-иммерсионным объективом (40×), оптическим блоком для дифференциального контраста и цифровой камерой Grasshopper3 GS3-U3-23S6M-C (FLIR, США). Электрофизиологическую регистрацию проводили с помощью усилителя НЕКА ЕРС-10 USB (НЕКА Electronic, Германия) и программного обеспечения PatchMaster v2x90.4 (НЕКА Electronic).

Запись активности нейрона энторинальной коры производили методом патч-кламп “целая клетка” в режиме фиксации тока, постсинаптические токи записывали методом патч-кламп “целая клетка” в режиме фиксации потенциала на  $-77$  или  $+3$  мВ. Для записей в режиме фиксации тока использовался внутриклеточный калий-глюконатный раствор следующего состава (в мМ): 135 К-глюконат, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 4 АТР-Mg и 0.3 GTP (рН был доведен до 7.25 с помощью КОН). Для записей в режиме фиксации потенциала использовался цезий-метансульфонатный раствор (в мМ): 127 CsMeS, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 АТР-Mg и 0.3 GTP (рН был доведен до 7.25 с помощью CsOH).

### *Критерии поиска пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов*

Пирамидные клетки в глубоких слоях коры выбирали по следующим критериям: тело нейрона пирамидальной формы, хорошо различим апикальный дендрит

нейрона, а на ступеньку тока нейрон отвечает регулярными пачками потенциалов действия с выраженной частотной адаптацией. Коэффициент адаптации (Cad), рассчитываемый как отношение последнего межспайкового интервала в ответе на ступеньку тока к первому, всех пирамидных нейронов в группе составлял не менее 1.6. Быстроразряжающиеся интернейроны отбирали по следующим критериям: тело нейрона круглое или в виде вертикального овала, расположено преимущественно в слоях 2–3 коры, дендритное дерево мультиполярное, а на ступеньку тока нейрон дает высокочастотный спайковый ответ без адаптации. Ширина спайка быстроразряжающегося интернейрона на полувысоте была не более 0.7 мс.

#### *Электрофизиологические характеристики нейрона*

Электрофизиологические свойства нейрона изучали с помощью протокола, согласно которому подавали ступеньки гиперполяризующего и деполяризующего тока нарастающей амплитуды и длительностью 1.5–2 с. Мембранный потенциал покоя (RMP) измеряли как средний мембранный потенциал нейрона при нулевой ступеньке тока сразу после прорыва мембраны. Реобазы (Rb) — это минимальная амплитуда тока, при которой генерируется потенциал действия, деполяризационный блок (DB) — это минимальный ток, при котором происходит срыв генерации потенциалов действия. Входное сопротивление (Rin) рассчитывали как коэффициент наклона вольт-амперной характеристики в интервале от –60 до 0 пА. Стационарная частота спайков определялась как число спайков за последнюю секунду ответа на ступеньку тока, FRmax — это максимальная стационарная частота для нейрона. Коэффициент адаптации спайков CAAd рассчитывался как отношение последнего межспайкового интервала к первому в записи с максимальной частотой спайков. Порог генерации потенциала действия (VT) определялся как точка, где прирост потенциала превышал значение 10 мВ/мс. Амплитуда, ширина и следовая гиперполяризация измерялись для первого спайка при токе реобазы. Амплитуда спайка (APA) определялась как разница между пиком и порогом, ширина спайка (APD) измерялась на полувысоте, следовая гиперполяризация (АНР) рассчитывалась как разница между порогом и минимальным потенциалом после спайка.

#### *Тест парных импульсов*

Два электрических импульса с амплитудой тока 50–150 мкА длительностью 100 мкс с интервалом 50 мс подавались посредством внеклеточного биполярного нихромового электрода, установленного в глубоких слоях энторинальной коры. В радиусе 100–200 мкм от стимулирующего электрода осуществлялась регистрация постсинаптических токов пирамидного нейрона методом патч-кламп в конфигурации “целая клетка” в режиме фиксации потенциала. Для анализа возбуждающих постсинаптических токов потенциал удерживался на –77 мВ, для анализа тормозных — на +3 мВ. Амплитуда первого ответа измерялась как разница между базовой линией и максимальным значением. Базовая линия определялась как среднее значение за последние 5 мс перед импульсом. В завершении рассчитывался коэффициент парных импульсов (КПИ) как отношение средней амплитуды второго ответа к средней амплитуде первого ответа.

#### *Реактивы*

Все реактивы, использованные в работе, были произведены компанией Sigma-Aldrich (США). Для блокады  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы использовался убаин (5 мкМ).

*Статистическая обработка данных*

Анализ первичных электрофизиологических данных производился с использованием программы Clampfit 10.5.2.6 (MolecularDevices, США). Для статистической обработки данных использовалась среда R-Studio2022.02.2 (R-ToolsTechnology, Канада). Нормальность распределения данных оценивалась по критерию Колмогорова–Смирнова. Эффект действия блокатора оценивался с помощью парного  $t$ -теста. Все значения приведены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*1. Влияние уабаина на электрофизиологические характеристики пирамидных нейронов и быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры мыши*

Для того чтобы определить эффект ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы на электрофизиологические свойства нейронов, были записаны ответы нейрона энторинальной коры в срезах мозга взрослой мыши на ступеньки тока разной амплитуды длительностью 2 с методом патч-кламп “целая клетка” в контрольных условиях (раствор Рингера) и после аппликации уабаина (5 мкМ). Мы сравнили действие ингибитора  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы на возбуждающие и тормозные интернейроны. В группу возбуждающих нейронов были включены пирамидные клетки с регулярной спайковой активностью (Pyr), а в группу тормозных нейронов – быстроразряжающиеся интернейроны (FS).

*1.1. Уабаин деполяризует мембранный потенциал нейронов, но не влияет на входное сопротивление мембраны*

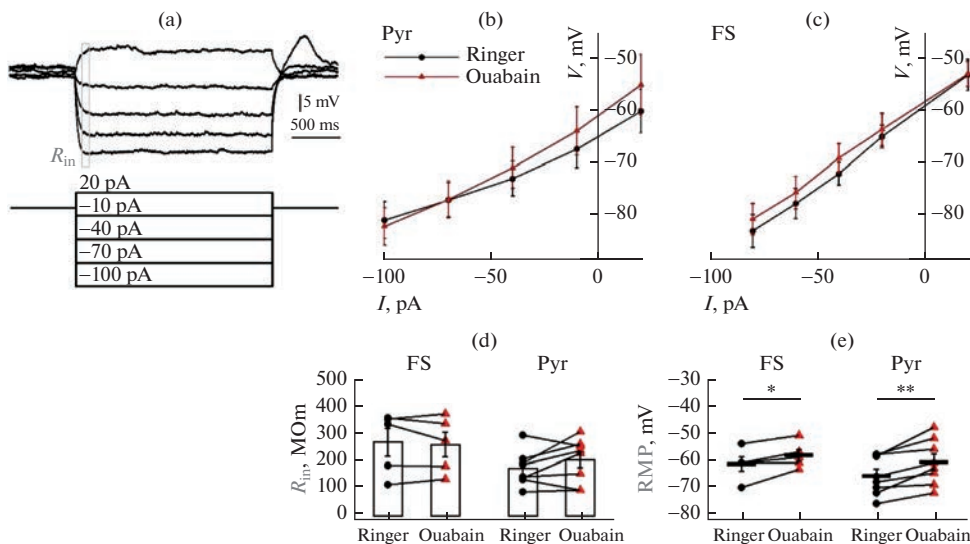
Входное сопротивление, определяемое как угол наклона вольт-амперной характеристики (рис. 1), в контрольных условиях составило  $175 \pm 22$  МОм ( $n = 8$ ) для пирамидных клеток и  $271 \pm 50$  МОм ( $n = 5$ ) для быстроразряжающихся интернейронов. Уабаин 5 мкМ не повлиял на входное сопротивление обоих типов клеток (парный  $t$ -тест, Pур:  $p = 0.16$ ,  $n = 8$ ; FS:  $p = 0.6$ ,  $n = 5$ ). Мембранный потенциал покоя (RMP) пирамидных нейронов повысился на 5 мВ ( $p < 0.01$ ), а FS интернейронов на 3 мВ ( $p < 0.05$ ) под действием уабаина.

*1.2. Характеристики паттерна потенциалов действия нейронов*

Репрезентативные примеры спайковой активности нейронов в ответ на ступеньку тока приведены на рис. 2а, в. На рис. 2с, d отражены частотно-токовые кривые этих нейронов соответственно. Пирамидные клетки энторинальной коры по своим электрофизиологическим свойствам подразделялись на два класса, как было показано ранее [18]: классические регулярно разряжающиеся нейроны с высоким коэффициентом адаптации и нейроны с длительной задержкой потенциалов действия. В среднем коэффициент адаптации (IS<sub>last</sub>/IS<sub>1</sub>) для пирамидных клеток составил  $2.1 \pm 0.3$  ( $n = 7$ ), а максимальная стационарная частота спайков  $19 \pm 4$  Гц ( $n = 8$ ). Быстроразряжающиеся интернейроны обладали высокой частотой спайков  $98 \pm 15$  Гц ( $n = 15$ ) и слабой адаптацией  $1.42 \pm 0.05$  ( $n = 7$ ). Уабаин не изменил коэффициент адаптации нейронов (парный  $t$ -тест, Pур:  $p = 0.2$ ,  $n = 7$ ; FS:  $p = 0.14$ ,  $n = 4$ , рис. 2е), а максимальную частоту разрядов уменьшил у пирамидных клеток (Pур:  $p < 0.05$ ; FS:  $p = 0.14$ , рис. 2f).

Ток, достаточный для генерации потенциала действия (ток реобазы, Rb), в контрольных условиях был  $91 \pm 11$  пА ( $n = 8$ ) для пирамидных клеток и  $73 \pm 23$  пА ( $n = 4$ ) для FS. Уабаин уменьшил ток реобазы быстроразряжающихся интернейронов, но не изменил его для пирамидных клеток (рис. 2g, парный  $t$ -тест, Pур:  $p = 0.2$ ; FS:  $p < 0.05$ ).





**Рис. 1.** Влияние убаина (5 мкМ) на пассивные мембранные свойства пирамидных нейронов (Pyr) и быстроразряжающихся интернейронов (FS) энторинальной коры. (a) – мембранный потенциал для заданного значения тока определялся в начале действия тока, как показано на репрезентативном примере. (b–c) – вольт-амперные характеристики пирамидных клеток (b) и быстроразряжающихся интернейронов (c) в контроле (Ringer, кружок) и после добавления убаина (Ouabain, треугольник). Данные приведены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. (d–e) – статистические данные для входного сопротивления мембраны ( $R_{in}$ ) и мембранного потенциала покоя (RMP), парный  $t$ -тест, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

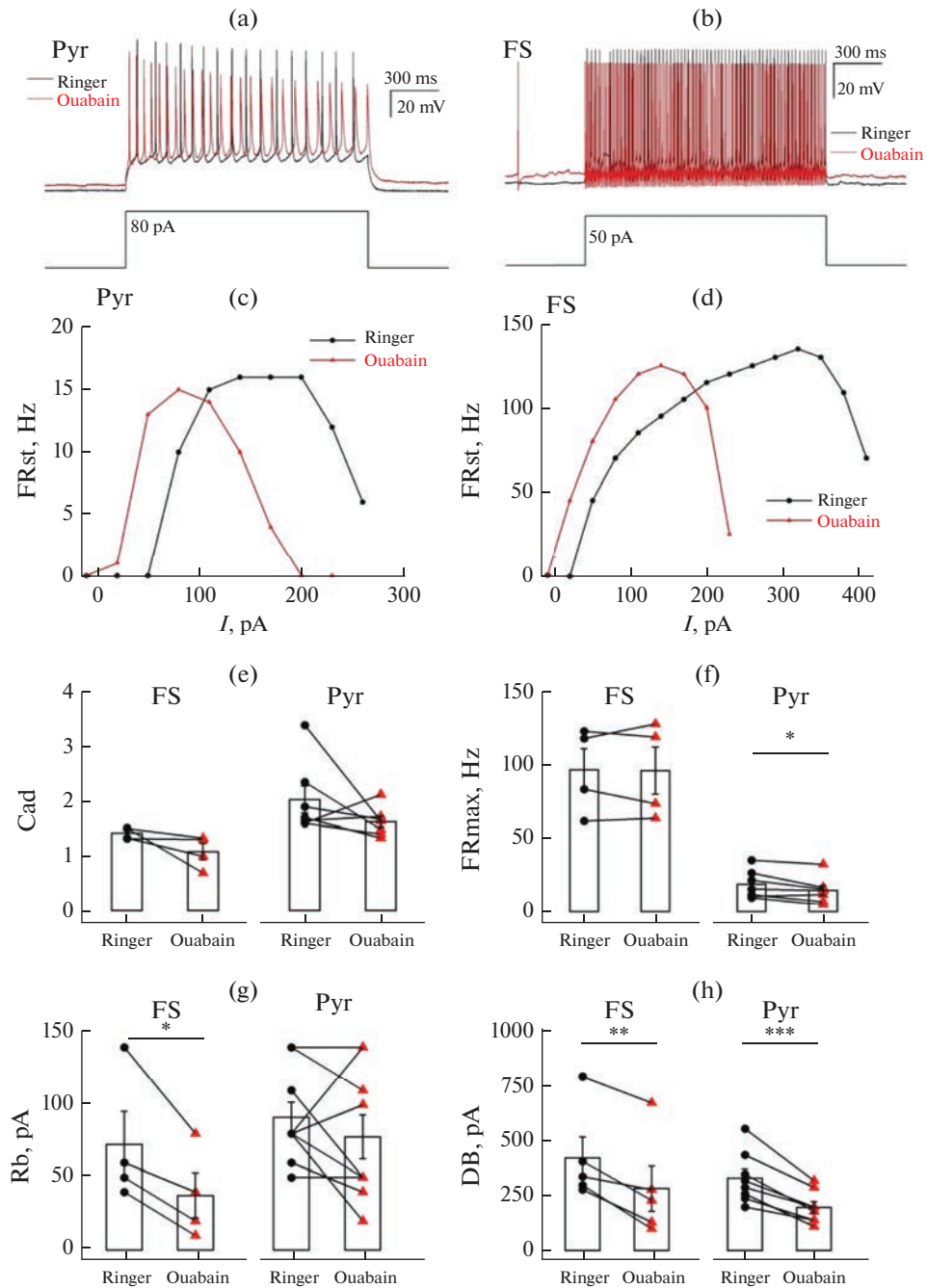
При этом деполяризационный блок (DB) возникал при существенно меньшем токе после ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы у обоих типов клеток (Pyr:  $p < 0.001$ ; FS:  $p < 0.01$ , рис. 2h). Таким образом, убаин действовал схожим образом на входные-выходные функции возбуждающих и тормозных нейронов, а именно сократил диапазон передаточной функции.

### 1.3. Убаин дифференциально изменяет форму потенциала действия у пирамидных клеток и интернейронов

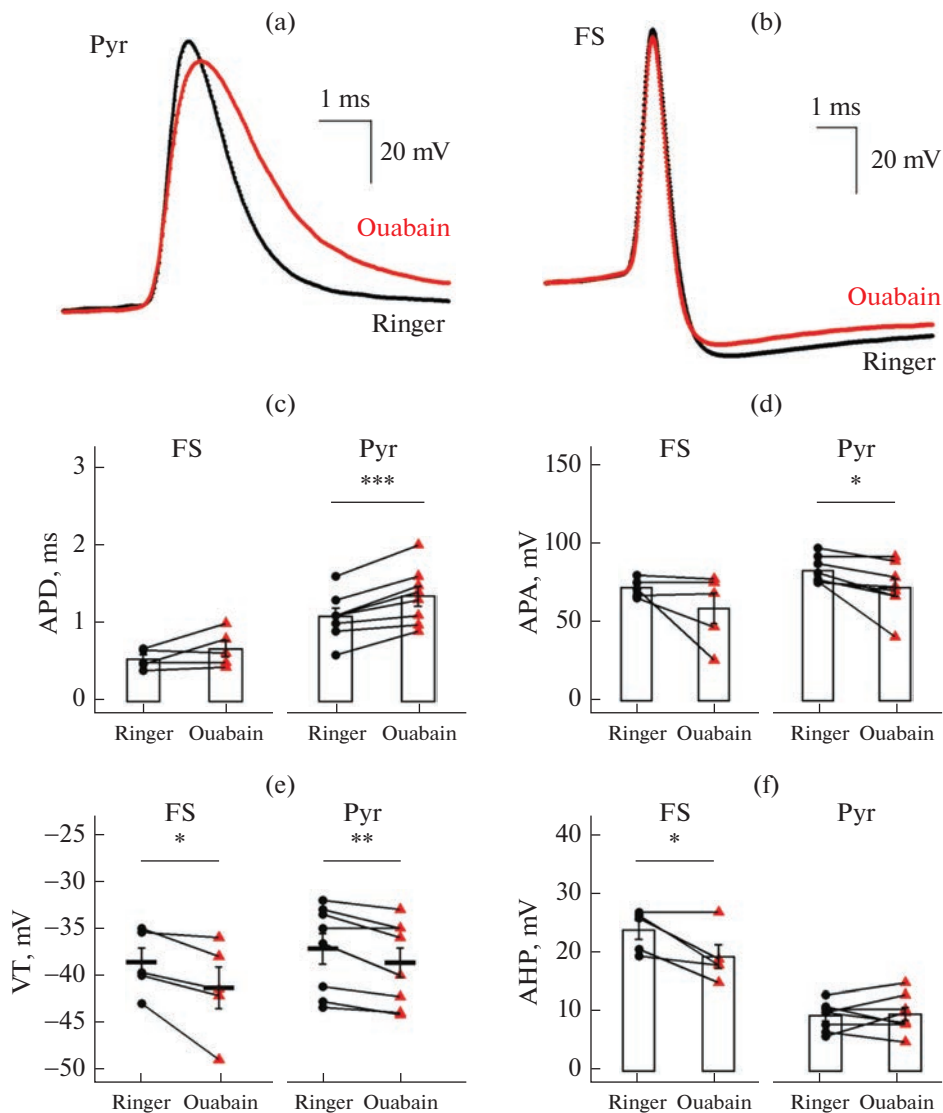
После применения убаина, форма потенциала действия у пирамидных нейронов существенно изменилась: полуширина увеличилась на 20% (парный  $t$ -тест,  $p < 0.001$ ,  $n = 8$ , рис. 3a, c), амплитуда уменьшилась на 15% (рис. 3d), порог генерации потенциала действия понизился после добавления убаина на 1.5 мВ (рис. 3e), однако следовая гиперполяризация не изменилась (рис. 3f). У быстроразряжающихся интернейронов ( $n = 5$ ) мы не выявили значимых изменений полуширины и амплитуды (рис. 3c–d), однако порог генерации потенциала действия понизился на 2.7 мВ (рис. 3e), а следовая гиперполяризация уменьшилась на 5 мВ (рис. 3f). Таким образом, убаин существенно изменяет форму спайков как пирамидного, так и быстроразряжающегося нейронов.

### 1.4. Влияние убаина на синаптическую передачу

Для оценки влияния убаина на синаптическую передачу мы применили метод парной стимуляции. Сначала мы зарегистрировали вызванные синаптические то-

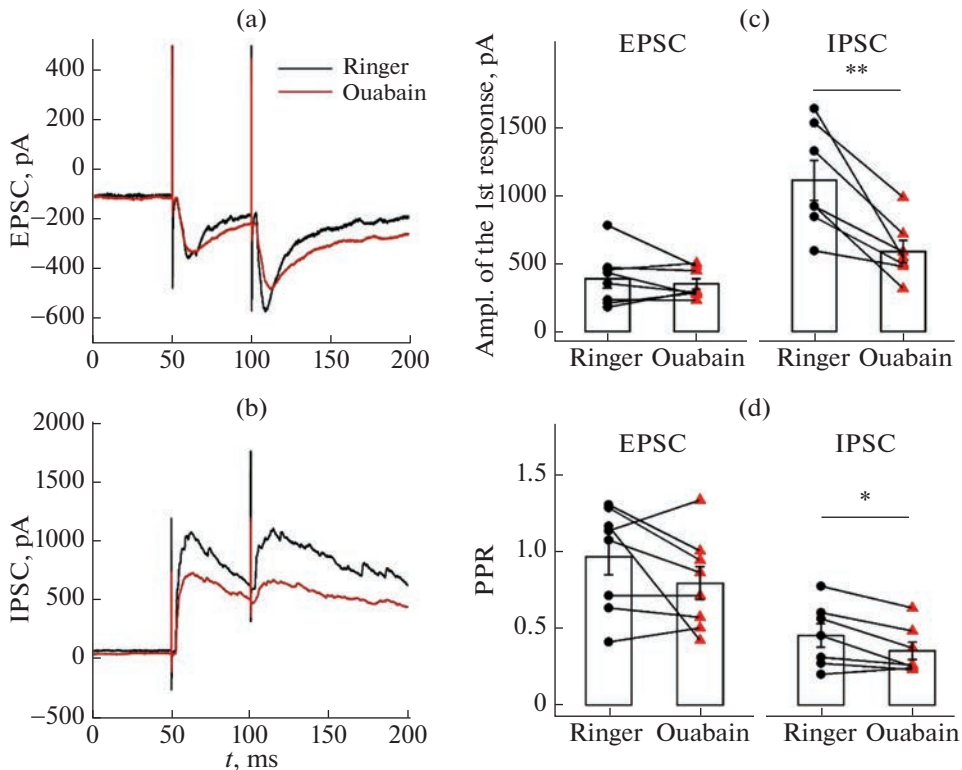


**Рис. 2.** Эффект убаина на спайковую активность нейронов. (a–b) – репрезентативные примеры ответов пирамидного (a) и быстроразряжающегося (b) нейронов на ступеньку тока в контрольных условиях (Ringer) и после добавления убаина. (c–d) – частотно-токовые кривые соответствующих нейронов. (e–h) – статистические данные для коэффициента адаптации (CA<sub>d</sub>), максимальной стационарной частоты разрядов нейрона (FR<sub>max</sub>), тока реобазы (R<sub>b</sub>) и деполяризационного блока (DB), парный *t*-тест, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Рис. 3.** Уабаин изменяет форму спайка пирамидного (Pyr) и быстроразряжающегося (FS) нейронов. (a) – пример первого спайка пирамидной клетки при токе реобазы в контроле (Ringer) и после добавления уабаина (Ouabain); (b) – для FS интернейрона аналогично (a); (c–f) – статистические данные для электрофизиологических характеристик быстроразряжающихся интернейронов и пирамидных клеток до и после добавления уабаина, длительность (APD) и амплитуда (APA) потенциала действия, порог генерации потенциала действия (VT) и следовая гиперполяризация (AHP) соответственно. Парный *t*-тест \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

ки в ответ на парную внеклеточную стимуляцию до и спустя 10 мин после аппликации уабаина (5 мкМ) в перфузирующий раствор. Регистрацию ответов проводили при потенциале  $-77$  мВ, что примерно соответствует потенциалу реверсии токов через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, и при потенциале  $+3$  мВ, что примерно соответствует потенциалу реверсии токов через ионотропные глутаматные рецепторы. Это позволило нам



**Рис. 4.** Тест парных импульсов указал на депрессию тормозной синаптической передачи под действием убаина. (а) – примеры токов, вызванных двумя электрическими ступеньками, репрезентативного нейрона при фиксации потенциала на уровне  $-77$  мВ (EPSC) в контрольных условиях (Ringer) и после добавления убаина; (б) – аналогично для тормозных постсинаптических токов (IPSC) при фиксации потенциала на  $+3$  мВ. (с–д) – статистические данные для амплитуды первого ответа и коэффициента парных импульсов (КПИ, PPR) соответственно. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

проанализировать действие убаина отдельно на возбуждающую и тормозную синаптическую передачу.

Мы не выявили значимого влияния убаина на возбуждающую синаптическую передачу при анализе вызванных ответов при  $-77$  мВ, не было изменений амплитуды 1-го ответа (парный  $t$ -тест,  $n = 8$ ,  $p = 0.4$ ) или КПИ ( $p = 0.14$ , рис. 4). Однако применение убаина привело к уменьшению амплитуды первого ответа на 47% ( $p < 0.01$ ,  $n = 7$ ), когда регистрация осуществлялась при  $+3$  мВ. КПИ уменьшился на 22% ( $p < 0.05$ ). Эти данные показывают, что ГАМКергическая синаптическая передача ослабляется при ингибировании  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе с помощью антагониста  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы убаина был выявлен ряд изменений в электрофизиологических характеристиках возбуждающих и тормозных нейронов, а также обнаружено ослабление ГАМКергической, но не глутаматергической синаптической передачи. Эти данные могут помочь лучше понять механизмы нарушений баланса возбуждения и торможения в нейронных сетях,

выявленные при ослаблении функции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в результате мутаций. Следует, однако, подчеркнуть, что данное исследование имеет определенное ограничение, которое необходимо учитывать при интерпретации полученных результатов. Описанные в данной работе изменения относятся к быстро развивающимся реакциям нейронов на блокаду  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, все они были зарегистрированы в течение 10–15 мин после воздействия убаина. Так как убаин может влиять на внутриклеточный сигналинг, регулируя различные клеточные функции [19, 20], мы не можем уверенно говорить о том, что эти изменения являются стабильными во времени.

В данной работе мы сравнили эффекты убаина на быстроразряжающиеся интернейроны и пирамидные клетки. Убаин обладает разной аффинностью к  $\alpha 1$ - и  $\alpha 3$ -изоформам  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [5, 6]. Ранее также было показано, что  $\alpha 1$ - и  $\alpha 3$ -изоформы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы неравномерно распределены между различными классами нейронов в разных отделах нервной системы [6, 21–23]. Например, в гиппокампе и коре основной  $\alpha 3$ -экспрессирующей популяцией являются парвальбумин-содержащие интернейроны [9, 23]. Так, Murata и соавт. изучили распределение изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в разных типах клеток, оценив экспрессию матричной РНК генов *Atp1a1*, *Atp1a2*, и *Atp1a3*. В парвальбумин-положительных интернейронах гиппокампа и соматосенсорной коры авторы зарегистрировали низкий уровень экспрессии гена  $\alpha 1$ -субъединицы и высокий уровень  $\alpha 3$ -субъединицы [23]. Richards и соавт. использовали убаин в разных концентрациях, чтобы определить распределение  $\alpha$ -изоформ по разным типам клеток субикулума. Авторы показали с помощью фармакологических и иммуногистохимических методов, что  $\alpha 1$ -изоформа чаще присутствует в пирамидных клетках субикулума, а  $\alpha 3$ -изоформа – в GAD-65 интернейронах [22]. Большинство парвальбумин-содержащих интернейронов коры головного мозга относится к быстроразряжающимся интернейронам, а быстроразряжающиеся интернейроны обычно являются парвальбумин-позитивными [24–26].

В этой работе мы использовали концентрацию убаина 5 мкМ, которая полностью подавляла активность  $\alpha 2$ - или  $\alpha 3$ -изоформ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, но, вероятно, относительно слабо воздействовала на  $\alpha 1$ -изоформу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [5]. Учитывая это, мы предполагали, что эффект убаина на электрофизиологические свойства быстроразряжающихся интернейронов будет более выраженным по сравнению с его действием на пирамидные клетки. Наши предположения, однако, получили лишь частичное подтверждение. Согласно полученным данным, убаин не влияет на входное сопротивление ни пирамидных нейронов, ни быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры взрослой мыши. К такому же выводу пришли Anderson и соавт. [15], изучив эффект дигидроубаина на пирамидные клетки и быстроразряжающиеся интернейроны сенсомоторной коры ювенильных крыс. Однако в другом исследовании отмечалось, что кардиогликозиды строфандин и дигидроубаин увеличивали входное сопротивление пирамидных нейронов CA1 гиппокампа на 12% [27]. В этой же работе авторы определили, что кардиогликозиды деполяризовали мембранный потенциал покоя пирамидных нейронов на 6 мВ. Согласно нашим данным, убаин деполяризует пирамидные нейроны энторинальной коры на 5 мВ, а быстроразряжающиеся интернейроны на 3 мВ, что, вероятно, отражает электрогенную составляющую мембранного потенциала покоя. Согласно расчетам Dobretsov и Stimers от 9 до 45% значения мембранного потенциала покоя обусловлено электрогенной активностью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [10].

При действии убаина уменьшился ток реобазы интернейронов и максимальная частота спайков пирамидных клеток, а также уменьшилось значение тока, при котором происходит деполяризационный блок у обоих типов клеток. Порог генерации потенциала действия также понизился у обоих типов клеток. Кроме того, уба-

ин уменьшал амплитуду и увеличивал ширину спайка пирамидного нейрона, а также уменьшал следовую гиперполяризацию быстроразряжающегося интернейрона. В целом, уабаин сильнее повлиял на форму спайка пирамидной клетки, чем быстроразряжающихся интернейронов. Эти изменения электрофизиологических характеристик нейронов могут быть обусловлены несколькими причинами. Помимо частичной деполяризации мембраны, блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы ведет к изменению активности других ионных каналов и транспортеров в нейронах коры головного мозга и гиппокампа. Например, было показано, что блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы может нарушать активность  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника по следующему механизму. Ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы приводит к повышению уровня  $\text{Na}^+$  в цитоплазме, что реверсирует работу  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных кальциевых депо, что приводит к дальнейшему увеличению уровня этого катиона в цитоплазме [28, 29].

Так как используемая нами концентрация уабаина подавляла в большей степени  $\alpha 3$ -изоформу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы по сравнению с  $\alpha 1$ -изоформой, то и эффект уабаина должен проявляться в условиях, когда преобладает активность  $\alpha 3$ -изоформы. Так как  $\alpha 3$ -изоформа имеет низкую аффинность к ионам  $\text{Na}^+ - \text{K}_{0,5} = 25-50 \text{ мМ}$  [4, 7, 8], то эта изоформа  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эффективно работает при высокой активности нейронов. Поэтому при пачечной активности нейронов в условиях частичной блокады  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы повышение внутриклеточного кальция может оказаться более существенным, и нарушения кальций-зависимых механизмов в нейроне могут быть более выраженными. Эти причины могут обуславливать более раннее возникновение деполяризационного блока у нейронов при действии уабаина. Аналогичный механизм может лежать в основе изменений синаптических функций, так как выделение медиатора – это кальций-зависимый процесс [30]. Кроме того, описан еще один интересный механизм взаимодействия  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и ионотропных глутаматных рецепторов. Так как активация АМРА- и NMDA-рецепторов приводит ко входу в клетку катионов  $\text{Na}^+$ , то это может усиливать работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Логично предположить наличие взаимодействия между этими рецепторами и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой. Интересно, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза в избытке присутствует в синаптических участках и локализована с АМРА-рецепторами [16]. Уабаин может нарушать это взаимодействие, что скорее всего будет особенно сильно проявляться при пачечной активности нейронов. Однако в данной работе эти изменения экспериментально не изучались.

Ослабление функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы может сопровождаться развитием эпилепсии у человека [11–13], тогда как положительная модуляция функциональной активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, согласно численным расчетам на математической модели Эпилептор-2 [31], может оказывать противозепилептический эффект. Наша экспериментальная работа показывает, что частичная блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы действительно вызывает существенное изменение электрофизиологических характеристик, приводящих к повышению возбудимости нейронов в энторинальной коре и смещающих баланс возбуждения и торможения в нейронных сетях. Эти данные позволяют лучше понять механизмы эпилептизации мозга при ослаблении функций  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

выми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-315-60016.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Ю.П. — планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи, Д.С.С. — сбор данных и редактирование статьи, А.В.З. — обсуждение результатов и редактирование статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pietrini G, Matteoli M, Banker G, Caplan MJ (1992) Isoforms of the Na,K-ATPase are present in both axons and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8414–8418.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8414>
2. Boldyrev AA (1993) Functional activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump in normal and pathological tissues. *Mol Chem Neurobiol* 19: 83–93.  
<https://doi.org/10.1007/BF03160170>
3. Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71: 511–535.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218>
4. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H (2017) The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front Physiol* 8.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371>
5. Juhászová M, Blaustein MP (1997) Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity  $\alpha$  subunit isoforms are differentially distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1800–1805.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1800>
6. Berrebi-Bertrand I, Maixent JM, Christe G, Lelièvre LG (1990) Two active Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim Biophys Acta* 1021: 148–156.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90027-1)
7. Zahler R, Zhang Z-T, Manor M, Boron WF (1997) Sodium Kinetics of Na,K-ATPase  $\alpha$  Isoforms in Intact Transfected HeLa Cells. *J Gen Physiol* 110: 201–213.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.110.2.201>
8. Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. *J Biol Chem* 275: 1976–1986.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1976>
9. Dobretsov M, Hayar A, Kockara NT, Kozhemyakin M, Light KE, Patyal P, Pierce DR, Wight PA (2019) A Transgenic Mouse Model to Selectively Identify  $\alpha 3$  Na,K-ATPase Expressing Cells in the Nervous System. *Neuroscience* 398: 274–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.018>
10. Dobretsov M, Stimers JR (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci* 10: 2373–2396.  
<https://doi.org/10.2741/1704>
11. Vanmolkot KRJ, Kors EE, Hottenga J-J, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WAJ, Black DF, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD, Ferrari MD, Van den Maagdenberg AMJM (2003) Novel mutations in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 54: 360–366.  
<https://doi.org/10.1002/ana.10674>
12. Ishihara N, Inagaki H, Miyake M, Kawamura Y, Yoshikawa T, Kurahashi H (2019) A case of early onset life-threatening epilepsy associated with a novel ATP1A3 gene variant. *Brain Dev* 41: 285–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.10.008>
13. de Lores Arnaiz GR, Ordieres MGL (2014) Brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10: 85–102.

14. *Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Schack VR, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Vilsen B, Roder JC* (2009) Mutation I810N in the  $\alpha 3$  isoform of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14085–14090.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904817106>
15. *Anderson TR, Huguenard JR, Prince DA* (2010) Differential effects of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase blockade on cortical layer V neurons. *J Physiol* 588: 4401–4414.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191858>
16. *Zhang D, Hou Q, Wang M, Lin A, Jarzylo L, Navis A, Raissi A, Liu F, Man H-Y* (2009)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *J Neurosci* 29: 4498–4511.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6094-08.2009>
17. *Proskurina EY, Zaitsev AV* (2021) Photostimulation activates fast-spiking interneurons and pyramidal cells in the entorhinal cortex of Thy1-ChR2-YFP line 18 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 580: 87–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.002>
18. *Smirnova EY, Amakhin DV, Malkin SL, Chizhov AV, Zaitsev AV* (2018) Acute Changes in Electrophysiological Properties of Cortical Regular-Spiking Cells Following Seizures in a Rat Lithium–Pilocarpine Model. *Neuroscience* 379: 202–215.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.020>
19. *Therien AG, Blostein R* (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.c541>
20. *Silva E, Soares-da-Silva P* (2012) New insights into the regulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by ouabain. *Int Rev Cell Mol Biol* 294: 99–132.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394305-7.00002-1>
21. *Jiao S, Johnson K, Moreno C, Yano S, Holmgren M* (2022) Comparative description of the mRNA expression profile of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase isoforms in adult mouse nervous system. *J Compar Neurol* 530: 627–647.  
<https://doi.org/10.1002/cne.25234>
22. *Richards KS, Bommert K, Szabo G, Miles R* (2007) Differential expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells. *J Physiol* 585: 491–505.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144733>
23. *Murata K, Kinoshita T, Ishikawa T, Kuroda K, Hoshi M, Fukazawa Y* (2020) Region- and neuronal-subtype-specific expression of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain. *J Comp Neurol* 528: 2654–2678.  
<https://doi.org/10.1002/cne.24924>
24. *Hu H, Gan J, Jonas P* (2014) Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin<sup>+</sup> GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345: 1255263.  
<https://doi.org/10.1126/science.1255263>
25. *Zaitsev AV, Povyshева NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, Lewis DA* (2009) Interneuron Diversity in Layers 2–3 of Monkey Prefrontal Cortex. *Cerebr Cortex* 19: 1597–1615.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn198>
26. *Proskurina EY, Chizhov AV, Zaitsev AV* (2022) Optogenetic Low-Frequency Stimulation of Principal Neurons, but Not Parvalbumin-Positive Interneurons, Prevents Generation of Ictal Discharges in Rodent Entorhinal Cortex in an In Vitro 4-Aminopyridine Model. *Int J Mol Sci* 24: 195.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24010195>
27. *McCarren M, Alger BE* (1987) Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: Role of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conductance. *J Neurophysiol* 57: 496–509.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.2.496>
28. *Pivovarov AS, Calahorra F, Walker RJ* (2018)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci* 19: 1.  
<https://doi.org/10.1007/s10158-018-0221-7>
29. *Blaustein MP, Juhaszova M, Golovina VA, Church PJ, Stanley EF* (2002)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 976: 356–366.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04762.x>
30. *Sudhof TC* (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509–547.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
31. *Chizhov AV, Zefirov AV, Amakhin DV, Smirnova EYu, Zaitsev AV* (2018) Minimal model of interictal and ictal discharges “Epileptor-2.” *PLoS Comput Biol* 14: e1006186.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006186>



## The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Inhibitor Ouabain Has Different Effects on the Electrophysiological Properties of Excitatory and Inhibitory Neurons in the Entorhinal Cortex E

E. Yu. Proskurina<sup>a, b, \*</sup>, D. S. Sinyak<sup>b</sup>, and A. V. Zaitsev<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia*

*\*e-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com*

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase maintains the neuron's resting potential and the transmembrane gradient of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> cations, thus regulating ion transport and cellular volume. Mutations in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase genes that impair its function can cause significant impairments in the nervous system function, including the development of epilepsy, if not lethal. Different forms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are expressed in various classes of neurons and exhibit different characteristics. Thus, the impaired function of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase may differentially affect the functioning of inhibitory and excitatory neurons. This study aims to determine the effects of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase antagonist ouabain on the electrophysiological characteristics of pyramidal cells and fast-spiking interneurons, as well as its impact on synaptic transmission. The results indicate that exposure to 5 μM ouabain results in depolarization of the resting membrane potential by 5 mV, as well as decreased amplitude and increased duration of the action potential of pyramidal neurons. Furthermore, ouabain caused a decrease in the amplitude of afterhyperpolarization in fast-spiking interneurons. Moreover, both types of neurons exhibited a decrease in the threshold of action potential generation and the current at which depolarization block occurs. The addition of ouabain did not alter other electrophysiological characteristics of neurons. Furthermore, ouabain rapidly attenuates GABAergic transmission without affecting excitatory synaptic transmission. These new findings on the effects of ouabain on excitatory pyramidal neurons and inhibitory interneurons contribute to the understanding of the mechanism underlying changes in the balance of excitation and inhibition in neural networks under Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase function impairment.

*Keywords:* ouabain, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, entorhinal cortex, pyramidal neurons, fast-spiking interneurons, action potential

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ НЕЙРОГИПОФИЗА  
НА ЭКСКРЕЦИЮ БЕЛКОВ ПОЧКАМИ

© 2023 г. Т. А. Каравашкина<sup>1</sup>, Е. В. Балботкина<sup>1</sup>, Т. В. Ковалева<sup>1</sup>, А. В. Кутина<sup>1</sup>, \*

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

\*E-mail: kutina\_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 14.08.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 24.08.2023 г.

Вазопрессин (ВП) — один из основных факторов, влияющих на внутриклубочковую гемодинамику, фильтрационное давление и состояние мезангиальных клеток и способствующих прогрессированию протеинурии. Цель работы — изучение действия гормонов нейрогипофиза (ВП и окситоцин) на экскрецию белков почками. Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар, здоровых и с микроальбуминурией, вызванной минимальными повреждениями гломерулярного фильтра. Микроальбуминурию моделировали введением метилового эфира D-нитроаргинина (D-NAME, 50 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). ВП (0.05 и 1.5 нмоль/кг) и окситоцин (0.15 нмоль/кг) вводили крысам внутримышечно, V<sub>2</sub>-антагонист (15 нмоль/кг) и V<sub>1a</sub>-антагонист (20 нмоль/кг) — внутривнутрибрюшинно. Для снижения уровня эндогенного ВП животных напоявали водой (10 мл/кг), собирали мочу в течение 2 ч, анализировали уровень общего белка, альбумина, β<sub>2</sub>-микроглобулина и иммуноглобулина G (IgG). У здоровых крыс ВП в дозе 0.05 нмоль/кг и окситоцин не повлияли на экскрецию альбумина, а ВП в дозе 1.5 нмоль/кг спровоцировал микроальбуминурию. На модели нарушения свойств гломерулярного фильтра, вызванного введением D-NAME, ВП в дозе 0.05 нмоль/кг и окситоцин привели к нормализации экскреции альбумина, а ВП в дозе 1.5 нмоль/кг вызвал выраженную протеинурию (экскреция альбумина возросла в 100 раз, IgG — в 10 раз). Блокада V<sub>2</sub>-рецепторов усугубила потерю белка, вызванную D-NAME и ВП (1.5 нмоль/кг), а блокада V<sub>1a</sub>-рецепторов ее предотвратила. Таким образом, ВП при высокой концентрации в крови усиливает фильтрацию белков в почке. Этот эффект опосредован V<sub>1a</sub>-рецепторами и, в зависимости от барьерных свойств гломерулярного фильтра, приводит к развитию микроальбуминурии или выраженной протеинурии. Окситоцин и ВП в дозе, при которой он преимущественно активирует V<sub>2</sub>-рецепторы, оказывают антипротеинурическое действие. Выявленные эффекты нейрогипофизарных гормонов на экскрецию альбумина открывают новые перспективные терапевтические мишени для коррекции гломерулярных дисфункций.

*Ключевые слова:* почка, вазопрессин, окситоцин, микроальбуминурия, протеинурия, D-NAME

DOI: 10.31857/S0869813923090066, EDN: OTNDTY

ВВЕДЕНИЕ

Гломерулярный фильтр является эффективным барьером, предотвращающим потерю белков плазмы крови почками. Различные нарушения структуры гликока-

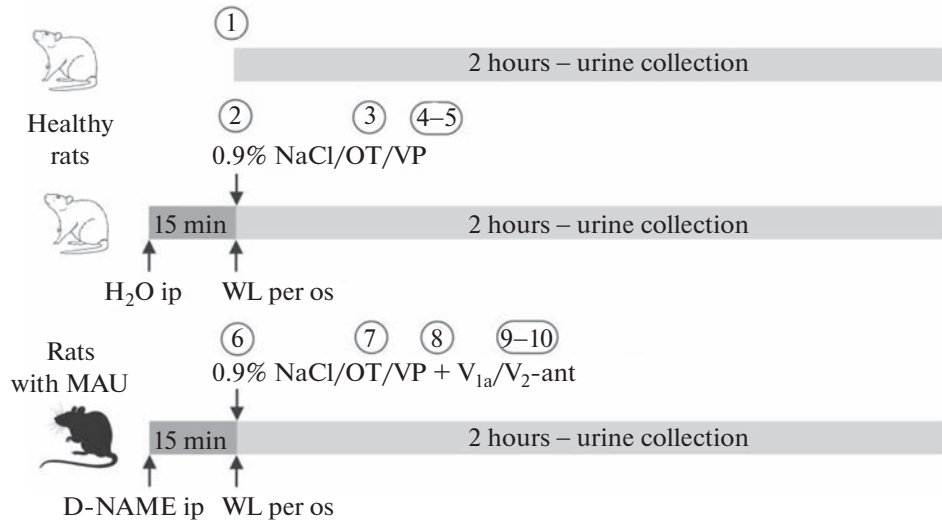
ликса эндотелия или гломерулярной базальной мембраны, дисфункции подоцитов и мезангиальных клеток, а также изменения почечной гемодинамики (повышение внутриклубочкового давления, гиперфльтрация) снижают барьерные свойства почечного фильтра и приводят к повышению экскреции белков с мочой (от микроальбуминурии до протеинурии нефротического уровня) [1, 2]. Показано, что уровень экскреции альбумина является прогностическим маркером прогрессирования почечной патологии при сахарном диабете, метаболическом синдроме, артериальной гипертензии и др. [3, 4]. При этом в качестве основного фактора, способствующего развитию микроальбуминурии, рассматривается повышенный уровень гормона нейрогипофиза вазопрессина (ВП) [5]. Продемонстрировано, что у крыс с генетическим дефектом синтеза ВП (линия Brattleboro) при стрептозотоциновом сахарном диабете существенно меньше альбуминурия и скорость прогрессирования диабетической нефропатии по сравнению с крысами линии Long-Evans [6]. Аналогичные данные были получены в отношении прогрессирования протеинурии при хронической почечной недостаточности [7]. Выявлен повышенный уровень ВП в крови у пациентов с сахарным диабетом и 1-го и 2-го типа [8]. Доминирует гипотеза, что действие гормона на экскрецию альбумина опосредовано  $V_2$ -рецепторами, так как у здоровых животных и добровольцев агонист  $V_2$ -рецепторов (десмопрессин) способствует микроальбуминурии, а селективный антагонист  $V_2$ -рецепторов препятствует повышению альбуминурии у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом [8]. В наших работах ранее было показано, что у здоровых крыс аналоги ВП с антидиуретической активностью снижают экскрецию белка с мочой, в то время как протеинурия и микроальбуминурия возрастают при действии аналогов ВП с выраженной  $V_{1a}$ -активностью [9]. Таким образом, вопрос о механизме действия ВП на фильтрацию альбумина и прогрессирование альбуминурии остается открытым и нуждается в отдельном детальном исследовании, а влияние второго гормона нейрогипофиза, окситоцина (ОТ), на протеинурию ранее не изучалось.

Цель работы – изучение влияния гормонов нейрогипофиза на экскрецию белков почками. В задачи входило исследование эффектов ВП и ОТ на выведение общего белка, альбумина,  $\beta_2$ -микроглобулина и иммуноглобулина G почками у здоровых животных, а также на модели микроальбуминурии.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы аутбредные крысы Вистар в возрасте 2–4 мес., популяция которых поддерживается в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Эксперименты выполнены на самках крыс, так как у самцов в норме в моче более высокий и вариабельный уровень белка внепочечного происхождения (спермальные и простатические белки) [10]. В виварии животные получали воду и сухой гранулированный полнорационный корм *ad libitum*. В связи с необходимостью проведения экспериментов натощак, крыс лишали корма за 10 ч до опыта при сохранении свободного доступа к воде. Массу тела животных регистрировали в утренние часы – в день рандомизации и в каждый из дней проведения экспериментов для расчета объемов введения препаратов. Перед экспериментами все животные были адаптированы к экспериментальным процедурам и клеткам для сбора мочи. После опытов со сбором мочи животных возвращали обратно в клетки вивария и повторно использовали не ранее, чем через неделю.

ВП (Sigma-Aldrich, США) и ОТ (Sigma-Aldrich, США) вводили крысам внутримышечно. Дозы гормонов были подобраны ранее [11]: введение ВП в дозе 0.05 нмоль/кг вызывает антидиуретический эффект (активирует преимущественно  $V_2$ -рецепторы), а в дозе 1.5 нмоль/кг – приводит к повышению уровня гормона в

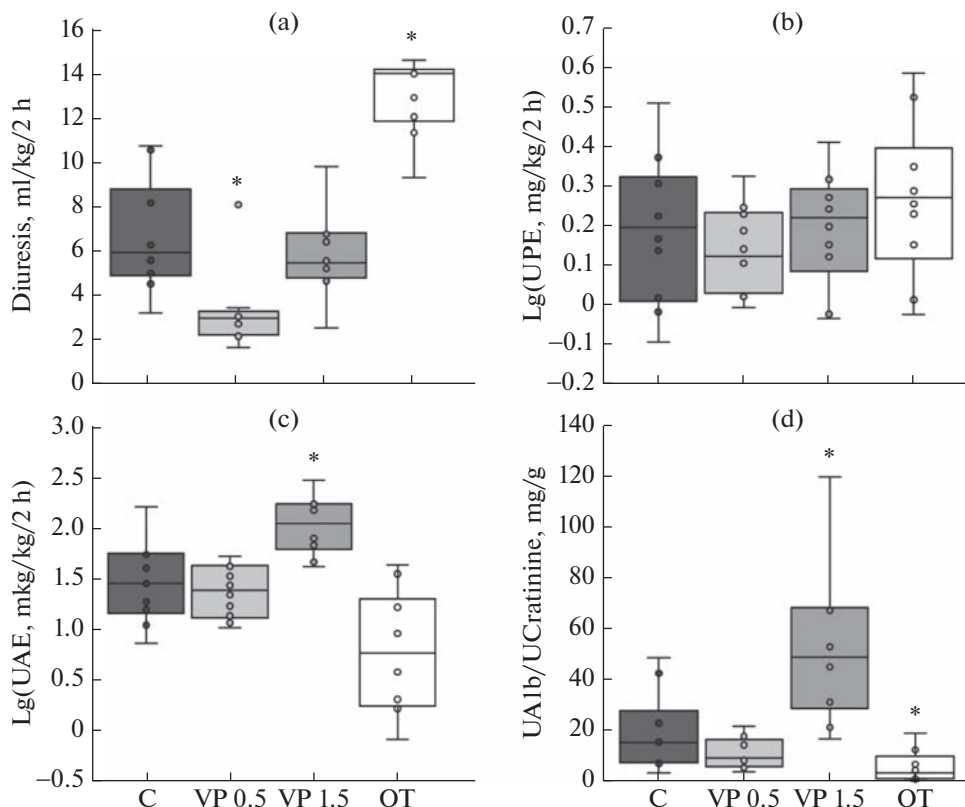


**Рис. 1.** Дизайн экспериментов. OT – окситоцин, VP – вазопрессин, V<sub>1a</sub>/V<sub>2</sub>-ant – антагонисты V<sub>1a</sub> или V<sub>2</sub>-рецепторов, WL – напавание крыс водой (10 мл/кг, ВН), номера в кружочках (1–10) – серии экспериментов.

крови, соответствующему таковому при сильном обезвоживании или гиперосмии, и обеспечивающему активацию как V<sub>2</sub>, так и V<sub>1a</sub>-подтипов вазопрессиновых рецепторов. OT в дозе 0.15 нмоль/кг оказывает специфическое действие, опосредуемое окситоциновыми рецепторами, но не влияет на рецепторы VP [12]. Антагонисты V<sub>1a</sub>-рецепторов (Pmp<sup>1</sup>-Tyr(Me)<sup>2</sup>-вазопрессин, Bachem, Швейцария, 20 нмоль/кг) и V<sub>2</sub>-рецепторов (Pmp<sup>1</sup>-D-Ile<sup>2</sup>-Ile<sup>4</sup>-вазопрессин, Bachem, Швейцария, 15 нмоль/кг) вводили внутривентриально одновременно с VP. Непосредственно перед введением гормонов нейрогипофиза животных напавали водой (10 мл/кг, ВН) через резиновый зонд для снижения уровня эндогенного VP и стандартизации условий водного баланса у экспериментальных животных. Микроальбуминурию у крыс моделировали внутривентриальным введением D-NAME (50 мг/кг) в 1 мл/кг деионизованной воды за 15 мин до основного воздействия [13].

На здоровых животных были выполнены следующие серии опытов: 1) интактный контроль ( $n = 10$ ), 2) ВН ( $n = 10$ ), 3) ВН + OT ( $n = 10$ ), 4) ВН + VP в дозе 0.05 нмоль/кг ( $n = 10$ ), 5) ВН + VP в дозе 1.5 нмоль/кг ( $n = 10$ ). На крысах с D-NAME-индуцированной микроальбуминурией проведены эксперименты: 6) ВН ( $n = 10$ ), 7) ВН + OT ( $n = 10$ ), 8) ВН + VP в дозе 1.5 нмоль/кг ( $n = 10$ ), 9) ВН + VP в дозе 1.5 нмоль/кг + антагонист V<sub>1a</sub>-рецепторов ( $n = 10$ ), 10) ВН + VP в дозе 1.5 нмоль/кг + антагонист V<sub>2</sub>-рецепторов ( $n = 10$ ). Дизайн экспериментов представлен на рис. 1.

Крыс помещали в индивидуальные клетки для сбора мочи в течение 2 ч. Аликвоты проб для дальнейших анализов на отдельные белки замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию альбумина,  $\beta$ 2-микроглобулина и иммуноглобулина G измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов (Cloud-Clone, КНР) с использованием ридера для микропланшет ELx808 (Bio-Tek Instruments, США). Общий белок мочи определяли с помощью пирогаллолового реактива, концентрацию креатинина – кинетическим методом по реакции Яффе на автоматическом биохимическом анализаторе XL-200 (Erba Lahema, Чехия).



**Рис. 2.** Диурез (а), экскреция общего белка (б) и альбумина (с), альбумин-креатининовое соотношение в моче (д) у здоровых крыс после введения гормонов нейрогипофиза.

Всех крыс напавали водой в объеме 10 мл/кг. VP 0.05 и VP 1.5 – вазопрессин в дозах 0.05 и 1.5 нмоль/кг, OT – окситоцин, С – контроль (1 мл/кг 0.9%-ного раствора NaCl). \* – значимость различий с контролем ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни (а, д) или  $t$ -критерий Уэлча (б, с) с поправками Бонферрони на 3 сравнения).

Диурез, экскрецию общего белка, альбумина,  $\beta 2$ -микроглобулина, иммуноглобулина G рассчитывали по стандартным формулам и нормировали на кг массы тела животных. Определяли отношение концентрации альбумина в пробах мочи к содержанию креатинина (альбумин-креатининовое соотношение в мг/г). Обработку и анализ данных проводили в программе Microsoft 365 Excel и с помощью библиотек Pandas и Scipy для Python. Данные представлены в виде медианы и квартилей Me (Q1; Q3). Проверку нормальности распределения осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. При соответствии нормальному распределению для сравнения групп использовали  $t$ -критерий Уэлча, при несоответствии – критерий Манна–Уитни. При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВП в дозе 0.05 нмоль/кг вызвал снижение диуреза по сравнению с контрольной группой, в дозе 1.5 нмоль/кг не оказал существенного влияния на мочеотделение, а OT повысил диурез (рис. 2а). Экскреция общего белка при действии гормонов ней-

**Таблица 1.** Диурез и экскреция белка почками при действии гормонов нейрогипофиза у крыс с микроальбуминурией, индуцированной D-NAME

Серия	Объем мочи, мл/кг	Экскреция общего белка с мочой, мг/кг	Альбумин-креатининовое соотношение, мг/г
ВН	12.7 (10.7; 16.6)	2.0 (1.3; 2.6)	78 (51; 132)
ВН + ОТ	16.5 (14.1; 20.5)	1.6 (1.3; 2.2)	18 (7; 25)
ВН + ВП	10.4 (9.3; 11.6)	9.8 (5.2; 15.6)*	1034 (203; 1756)*
ВН + ВП + V <sub>1a</sub> -антагонист	3.5 (4.1; 6.2)*.&	1.9 (1.2; 2.2)&	41 (25; 54)&
ВН + ВП + V <sub>2</sub> -антагонист	17.0 (13.8; 18.7)&	20.1 (15.4; 34.3)*	1563 (944; 3062)*

Всех крыс паивали водой в объеме 10 мл/кг (ВН). ВП вводили в дозе 1.5 нмоль/кг. Все показатели приведены за 2 ч эксперимента. Величины указаны в виде Ме (Q1; Q3),  $n = 10$  во всех группах. Значимость различий ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на 10 сравнений): \* – с группой “ВН”, & – с группой “ВН + ВП”.

рогипофиза существенно не изменилась (рис. 2b). Анализ альбумина мочи выявил рост его экскреции (рис. 2с) и повышение альбумин-креатининового соотношения (рис. 2d) до уровня микроальбуминурии (диапазон 30–300 мг/г) у крыс после инъекции ВП в дозе 1.5 нмоль/кг. ОТ и ВП в дозе 0.05 моль/кг не оказали влияния на выведение альбумина почками (рис. 2с, d).

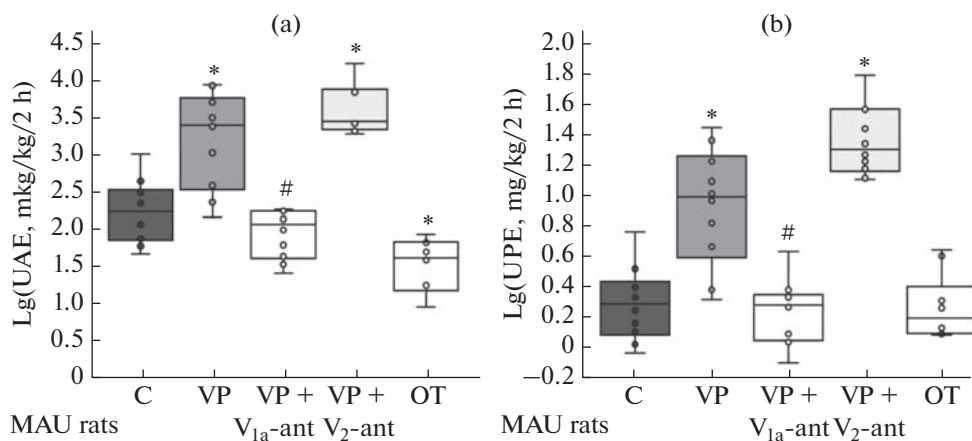
У крыс после внутрибрюшинной инъекции D-NAME (50 мг/кг) альбумин-креатининовое соотношение находилось на уровне, соответствующем микроальбуминурии, при нормальном уровне экскреции общего белка (табл. 1). Введение этим крысам ВП в дозе 1.5 нмоль/кг вызвало появление выраженной альбуминурии (рис. 3а) и протеинурии (рис. 3b, табл. 1), альбумин-креатининовое соотношение возросло в 70 раз по сравнению со здоровыми животными, уровень диуреза при этом не изменился (табл. 1). Введение ОТ крысам с D-NAME-индуцированной микроальбуминурией снизило экскрецию альбумина почками (рис. 3а) до нормальных значений.

Рост экскреции альбумина при действии ВП у крыс, получивших D-NAME, сопровождался повышением выведения высокомолекулярного белка иммуноглобулина G (табл. 2). Экскреция  $\beta_2$ -микроглобулина (табл. 2) увеличилась в меньшей степени, что указывает на клубочковый характер протеинурии.

Для анализа механизма действия ВП на экскрецию белка были использованы селективные антагонисты вазопрессинового рецепторов. V<sub>1a</sub>-антагонист снизил экскрецию альбумина (рис. 3а, табл. 2) и альбумин-креатининовое соотношение (табл. 1) до уровня микроальбуминурии, устранил протеинурию (рис. 3b) и нормализовал экскрецию иммуноглобулина G и  $\beta_2$ -микроглобулина почками (табл. 2) при действии ВП у крыс с предварительным введением D-NAME. V<sub>2</sub>-антагонист такого эффекта не оказал, он существенно не повлиял на потерю альбумина (рис. 3а) и величину протеинурии (рис. 3b). Таким образом, у здоровых крыс ВП провоцирует появление микроальбуминурии, а у крыс с D-NAME-индуцированной микроальбуминурией резко усиливает потерю альбумина с мочой и приводит к развитию протеинурии. Этот эффект опосредуется V<sub>1a</sub>-рецепторами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВП высвобождается из нейрогипофиза главным образом в ответ на повышение осмоляльности плазмы и уменьшение объема крови [14]. ВП оказывает антидиуретическое, сосудосуживающее и тромбоцитарно-агрегирующее действие, влияет на



**Рис. 3.** Влияние ВП, антагонистов вазопрессиновых рецепторов и ОТ на экскрецию альбумина (а) и общего белка (б) у крыс с микроальбуминурией.

Всех крыс паивали водой в объеме 10 мл/кг. VP – вазопрессин в дозе 1.5 нмоль/кг, V<sub>1a</sub>/V<sub>2</sub>-ant – антагонисты V<sub>1a</sub> или V<sub>2</sub>-рецепторов, ОТ – окситоцин, С – контроль (1 мл/кг 0.9%-ного раствора NaCl). Значимость различий ( $p < 0.05$ ,  $t$ -критерий Уэлча с поправкой Бонферрони на 10 сравнений): \* – с группой “С” (крысы с микроальбуминурией (MAU rats), не получавшими гормоны нейрогипофиза), # – с группой “VP”.

глюконеогенез и гликогенолиз в печени, высвобождение инсулина и глюкагона поджелудочной железой и адренокортикотропного гормона передней долей гипофиза [15, 16]. ВП в последние годы рассматривается как важный независимый фактор риска прогрессирования почечной недостаточности и протеинурии при различных заболеваниях [17, 18]. В нескольких крупных когортных проспективных исследованиях (DESIR во Франции ( $n = 5047$ ), MDCS-CC в Швеции ( $n = 3\ 643$ ), PREVEND в Нидерландах ( $n = 7684$ )) показана связь между уровнем потребления воды в сутки, уровнем ВП в крови (оцениваемого по концентрации копептина) и

**Таблица 2.** Селективность протеинурии при действии ВП у здоровых крыс и у крыс с микроальбуминурией

Серия	Экскреция альбумина, мкг/кг	Экскреция иммуноглобулина G, мкг/кг	Экскреция β2-микроглобулина, мкг/кг
Опыты на здоровых крысах			
ВН	30 (17; 53)	0.9 (0.8; 1.0)	2.0 (1.2; 2.9)
ВН + ВП	122 (74; 176)*	1.4 (0.8; 1.8)	8.0 (7.4; 11.6)*
Опыты на крысах с микроальбуминурией, индуцированной D-NAME			
ВН	181 (88; 298)&	2.7 (2.0; 3.6)&	7.0 (5.0; 8.9)&
ВН + ВП	2543 (563; 4610)*	27.3 (21.0; 72.7)*	17.7 (15.1; 20.1)*
ВН + ВП + V <sub>1a</sub> -антагонист	121 (49; 176)&	1.8 (1.1; 2.5)&	5.1 (2.6; 6.2)&

Всех крыс паивали водой в объеме 10 мл/кг (ВН). ВП вводили в дозе 1.5 нмоль/кг. Все показатели приведены за 2 ч эксперимента. Величины указаны в виде Ме (Q1; Q3),  $n = 10$  во всех группах. Значимость различий ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни, в серии опытов на крысах с микроальбуминурией введена поправка Бонферрони на 3 сравнения): \* – с соответствующей группой “ВН”, & – с группой крыс “ВН + ВП” с микроальбуминурией.

развитием хронической болезни почек в общей популяции [15, 16, 19]. Данные этих исследований свидетельствуют о том, что субоптимальное потребление жидкости сопровождается патофизиологически значимым высвобождением ВП, что, в свою очередь, может способствовать развитию ряда клинических расстройств: метаболический синдром с абдоминальным ожирением, сахарный диабет 2-го типа, гипертензия, микроальбуминурия, хроническая болезнь почек, заболевания коронарных сосудов и т.д. При этом микроальбуминурия может быть, по крайней мере частично, напрямую зависима от ВП, а не опосредована другими связанными с ним кардиометаболическими факторами риска [15]. В то же время экспериментальное клиническое исследование с увеличением на 1–1.5 л суточного потребления воды в течение года не выявило существенных различий альбуминурии и скорости снижения функции почек с группой пациентов, потреблявших обычное количество жидкости (около 2 л в сутки) [20].

Изучение изменений фильтрации альбумина по его экскреции имеет существенные ограничения, связанные с тем, что альбумин реабсорбируется в проксимальном канальце, экскретируется лишь небольшая часть профильтровавшегося белка. Поэтому данные, полученные на здоровых животных или на моделях патологий, осложняющихся микроальбуминурией, бывает сложно интерпретировать. В данном исследовании влияние ОТ, ВП и антагонистов его рецепторов на величину протеинурии и альбуминурии изучено на модели микроальбуминурии, вызванной введением D-NAME, который нейтрализует отрицательные заряды в структурах гломерулярного фильтра и снижает его барьерные свойства [13]. В этих условиях детектировать изменения фильтрации альбумина проще, и изменения в структурах клубочков у отдельных животных более единообразны, чем на моделях патологий, например, сахарного диабета. В работе показано, что активация  $V_{1a}$ -рецепторов ВП способствует протеинурии, а блокада этого подтипа рецепторов предотвращает потерю белка у крыс с D-NAME-индуцированной микроальбуминурией. Эффект ВП при активации  $V_2$ -рецепторов, напротив, оказался протективным, как и влияние ОТ. Это хорошо согласуется с приведенными выше данными о влиянии уровня потребления жидкости и прогрессированием почечной патологии. Низкие концентрации ВП в нашем исследовании действительно не усугубляют протеинурию. Кроме того, ранее было показано, что питье воды способствует усилению секреции ОТ [21]. А при длительном недостаточном потреблении воды, приводящему к гипервазопрессинемии, уровень гормона, вероятно, достаточно высок для того, чтобы активировать  $V_{1a}$ -рецепторы. Интересно, что при длительной гипервазопрессинемии при сахарном диабете выявлено снижение экспрессии  $V_{1a}$ -рецепторов, но не  $V_2$ -рецепторов, в почках [22], что может быть проявлением компенсаторных реакций. Имеются данные, свидетельствующие о том, что активация  $V_{1a}$ -рецепторов может способствовать повреждению клубочков, индуцируя сокращение мезангиальных клеток и вазоконстрикцию эфферентных артериол, а это, в свою очередь, увеличивает капиллярное давление в клубочках [23, 24]. В ряде работ выявлен ренопротекторный эффект блокады вазопрессиновых  $V_{1a}$ -рецепторов: снижение альбуминурии у пациентов с инсулин-независимым сахарным диабетом [25], снижение протеинурии у спонтанно гипертензивных крыс с частичной нефрэктомией и солевой нагрузкой [26] и при адриамициновой нефропатии [27]. При хронической болезни почек у крыс показана эффективность монотерапии  $V_1/V_2$ -антагонистом и комбинации с ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента или антагонистами рецепторов ангиотензина II в отношении протеинурии [28]. С другой стороны, у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом показана эффективность антагониста  $V_2$ -рецепторов, который препятствовал прогрессированию альбуминурии в течение 9 недель наблюдения [29].



В работах этого коллектива [6–8, 30] также выявлено протеинурическое действие агониста  $V_2$ -рецепторов, десмопрессина, у крыс и человека. Однако  $V_2$ -рецепторы или их мРНК не были обнаружены в гломерулах или почечных проксимальных канальцах [31].  $V_2$ -рецепторы представлены во всех отделах собирательных трубок и, в меньшей степени, в тонком отделе и толстом восходящем отделе петли Генле [31]. Предполагается опосредованное действие десмопрессина на фильтрацию белка через изменение уровня системного артериального давления (эндотелиальные  $V_2$ -рецепторы могут опосредовать дилатацию внепочечных сосудов [32]) и активности ренин-ангиотензиновой системы [30]. Еще один предполагаемый механизм – опосредованное  $V_2$ -рецепторами ингибирование канальцево-клубочковой обратной связи в результате снижения концентрации соли в плотном пятне, что приводит к повышению внутриклубочкового капиллярного давления и, в конечном итоге, к повреждению гломерул [28]. Выявленное в нашем исследовании усиление потери белка при действии ВП, вероятно, обусловлено непосредственным вовлечением почечных  $V_{1a}$ -рецепторов. Этот подтип рецепторов широко представлен в почках: методом полимеразной цепной реакции мРНК  $V_{1a}$ -рецептора выявляются в значительном количестве в клубочках, в собирательных трубках и дуговых артериях [31], в меньшем количестве – в проксимальных извитых и прямых канальцах, тонком отделе и толстом восходящем отделе петли Генле. Также показано, что  $V_1$ -рецепторы присутствуют на гломерулярных мезангиальных клетках, а в культуре эти клетки отвечают на ВП сокращением и повышением синтеза простагландинов [24].

Известно влияние ОТ на почечную гемодинамику, экскрецию воды и электролитов (рост натрийуреза). При этом ОТ оказывает констрикторное влияние на гладкомышечные клетки сосудов и мезангиальные клетки только в высоких дозах, и эффект обусловлен стимуляцией  $V_{1a}$ -рецепторов [24, 33]. Исследований влияния ОТ на прогрессирование почечной патологии у человека не проводилось. На животных ранее было показано, что ОТ защищает крыс от цисплатин-индуцированной нефропатии [34]. Механизм защиты авторы связывают, по крайней мере частично, с антиоксидантным действием гормона. Возможно, что ОТ действует непосредственно на уровне клубочков. Показано, что рецептор к ОТ выявляется в корковом веществе почки методом автордиографии [35], преимущественно в области *macula densa* [36], но его функциональная роль там не изучена. Выявлено усиление продукции цГМФ в почке при действии ОТ [37]. Антипротеинурическое действие ОТ нами было выявлено впервые и его механизм нуждается в отдельном изучении.

Таким образом, ВП при высокой концентрации в крови усиливает фильтрацию белков в почке, этот эффект опосредован  $V_{1a}$ -рецепторами и, в зависимости от барьерных свойств гломерулярного фильтра, приводит к развитию микроальбуминурии или выраженной протеинурии. ОТ и ВП в дозе, при которой он преимущественно активизирует  $V_2$ -рецепторы, оказывают антипротеинурическое действие. Выявленные эффекты нейрогипофизарных гормонов на экскрецию альбумина открывают новые перспективные терапевтические мишени для коррекции гломерулярных дисфункций.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требованиям Регламента использования лабораторных животных в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Се-

ченова РАН. План исследований одобрен комиссией по биоэтике, утвержденной Приказом Директора Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 6 от 20.01.2022 г. (протокол № 1-15/2022 от 27.01.2022).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00640).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.К.), сбор данных (Е.В.Б., Т.А.К., Т.В.К., А.В.К.), обработка данных (Е.В.Б., А.В.К.), написание и редактирование рукописи (Е.В.Б., Т.А.К., Т.В.К., А.В.К.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ballermann BJ, Nystrom J, Haraldsson B* (2021) The glomerular endothelium restricts albumin filtration. *Front Med (Lausanne)* 8: 766689. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.766689>
2. *Daehn IS, Duffield JS* (2021) The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. *Nat Rev Drug Discov* 20(10): 770–788. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00242-0>
3. *Добронравов ВА, Смирнов АВ, Каюков ИГ* (2009) Многогранная альбуминурия: аспекты клинического значения. *Нефрология* 13(3): 33–39. [*Dobronravov VA, Smirnov AV, Kayukov IG* (2009) Many-sided albuminuria: aspects of clinical value. *Nefrologiya* 13(3): 33–39. (In Russ)].
4. *Шишкин АН, Лындина МЛ* (2009) Эндотелиальная дисфункция, метаболический синдром и микроальбуминурия. *Нефрология* 13(3): 24–32. [*Shishkin AN, Lyndina ML* (2009) Endothelial dysfunction, metabolic syndrome and microalbuminuria. *Nefrologiya* 13(3): 24–32. (In Russ)].
5. *Velho G, Bouby N, Hadjadj S, Matallah N, Mohammedi K, Fumeron F, Potier L, Bellili-Munoz N, Taveau C, Alhenc-Gelas F, Bankir L, Marre M, Rousset R* (2013) Plasma copeptin and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabetes Care* 36(11): 3639–3645. <https://doi.org/10.2337/dc13-0683>
6. *Bardoux P, Martin H, Ahloulay M, Schmitt F, Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, Bankir L* (1999) Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10397–10402. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10397>
7. *Bouby N, Hassler C, Bankir L* (1999) Contribution of vasopressin to progression of chronic renal failure: study in Brattleboro rats. *Life Sci* 65(10): 991–1004. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00330-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00330-6)
8. *Bankir L, Bardoux P, Ahloulay M* (2001) Vasopressin and diabetes mellitus. *Nephron* 87(1): 8–18. <https://doi.org/10.1159/000045879>
9. *Кутина АВ, Наточин ЮВ* (2008) Аналоги вазотоцина усиливают экскрецию белков почкой крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 94(11): 1325–1334. [*Kutina AV, Natochin IuV* (2008) Vasotocin analogues increase protein excretion by the rat kidney. *Russ J Physiol* 94(11): 1325–1334. (In Russ)].
10. *Сивак КВ, Забродская ЯА, Добровольская ОА* (2019) Апробация метода электрофоретического разделения и идентификации некоторых белков мочи у крыс при токсической нефропатии. *Мед академ журн* 19(3): 71–82. [*Sivak KV, Zabrodskaya YA, Dobrovolskaya OA* (2019) Approval of the method of electrophoretic separation and identification of some urine proteins in rats with toxic nephropathy. *Med akad zhurn* 19(3): 71–82. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ19371-82>
11. *Kutina AV, Golosova DV, Marina AS, Shakhmatova EI, Natochin YV* (2016) Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1. *J Neuro-*

- endocrinol 28(4): 1–8.  
<https://doi.org/10.1111/jne.12367>
12. *Kutina AV, Makashov AA, Balbotkina EV, Karavashkina TA, Natochin YV* (2020) Subtypes of neurohypophyseal nonapeptide receptors and their functions in rat kidneys. *Acta Naturae* 12(1): 73–83.  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.10943>
  13. *Kutina AV, Shakhmatova EI, Natochin YuV* (2010) Effect of a blocker of nitric oxide production on albumin excretion by rat kidney. *Bull Exp Biol Med* 150(6): 693–695.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1225-z>
  14. *Ivanova LN* (2012) Vasopressin: molecular mechanisms of its antidiuretic effect. *Neurosci Behav Physiol* 42(7): 661–677.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-012-9618-7>
  15. *Enhörning S, Bankir L, Bouby N, Struck J, Hedblad B, Persson M, Morgenthaler NG, Nilsson PM, Melander O* (2013) Copeptin, a marker of vasopressin, in abdominal obesity, diabetes and microalbuminuria: the prospective Malmö Diet and Cancer Study cardiovascular cohort. *Int J Obes (Lond)* 37(4): 598–603.  
<https://doi.org/10.1038/ijo.2012.88>
  16. *Lang F, Guelinckx I, Lemétais G, Melander O* (2017) Two liters a day keep the doctor away? Considerations on the pathophysiology of suboptimal fluid intake in the common population. *Kidney Blood Press Res* 42(3): 483–494.  
<https://doi.org/10.1159/000479640>
  17. *Meijer E, Bakker SJ, Halbesma N, de Jong PE, Struck J, Gansevoort RT* (2010) Copeptin, a surrogate marker of vasopressin, is associated with microalbuminuria in a large population cohort. *Kidney Int* 77(1): 29–36.  
<https://doi.org/10.1038/ki.2009.397>
  18. *Student J, Sowers J, Lockette W* (2022) Thirsty for fructose: arginine vasopressin, fructose, and the pathogenesis of metabolic and renal disease. *Front Cardiovasc Med* 9: 883365.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.883365>
  19. *El Boustany R, Tasevska I, Meijer E, Kieneker LM, Enhörning S, Lefevre G, Mohammadi K, Marre M, Fumeron F, Balkau B, Bouby N, Bankir L, Bakker SJ, Rousset R, Melander O, Gansevoort RT, Velho G* (2018) Plasma copeptin and chronic kidney disease risk in 3 European cohorts from the general population. *JCI Insight* 3(13): e121479.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.121479>
  20. *Clark WF, Sontrop JM, Huang SH, Gallo K, Moist L, House AA, Cuerden MS, Weir MA, Bagga A, Brimble S, Burke A, Muirhead N, Pandeya S, Garg AX* (2018) Effect of coaching to increase water intake on kidney function decline in adults with chronic kidney disease: The CKD WIT randomized clinical trial. *JAMA* 319(18): 1870–1879.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.4930>
  21. *Natochin YV, Golosova DV, Shakhmatova EI* (2018) A new functional role of oxytocin: participation in osmoregulation. *Dokl Biol Sci* 479(1): 60–63.  
<https://doi.org/10.1134/S0012496618020096>
  22. *Trinder D, Phillips PA, Stephenson JM, Risvanis J, Aminian A, Adam W, Cooper M, Johnston CI* (1994) Vasopressin V1 and V2 receptors in diabetes mellitus. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1): E217–E223.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.266.2.E217>
  23. *Edwards RM, Trizna W, Kinter LB* (1989) Renal microvascular effects of vasopressin and vasopressin antagonists. *Am J Physiol* 256(2 Pt 2): F274–F278.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1989.256.2.F274>
  24. *Briner VA, Tsai P, Choong HL, Schrier RW* (1992) Comparative effects of arginine vasopressin and oxytocin in cell culture systems. *Am J Physiol* 263(2 Pt 2): F222–F227.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.263.2.F222>
  25. *Nishikawa T, Omura M, Iizuka T, Saito I, Yoshida S* (1996) Short-term clinical trial of 1-(1-[4-(3-acetylaminopropoxy)-benzoyl]-4-piperidyl)-3, 4-dihydro-2(1H)-quinolinone in patients with diabetic nephropathy. Possible effectiveness of the specific vasopressin V1 receptor antagonist for reducing albuminuria in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arzneimittelforschung* 46(9): 875–878.
  26. *Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Saruta T* (1995) Effects of novel, nonpeptide vasopressin antagonists on progressive nephrosclerosis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 25(5): 847–852.  
<https://doi.org/10.1097/00005344-199505000-00023>
  27. *Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Saruta T* (1996) Evidence for the involvement of vasopressin in the pathophysiology of adriamycin-induced nephropathy in rats. *Nephron* 72(4): 667–672.  
<https://doi.org/10.1159/000188957>

28. *Perico N, Zoja C, Corna D, Rottoli D, Gaspari F, Haskell L, Remuzzi G* (2009) V1/V2 Vasopressin receptor antagonism potentiates the renoprotection of renin-angiotensin system inhibition in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 76(9): 960–967.  
<https://doi.org/10.1038/ki.2009.267>
29. *Bardoux P, Bichet DG, Martin H, Gallois Y, Marre M, Arthus MF, Lonergan M, Ruel N, Bouby N, Bankir L* (2003) Vasopressin increases urinary albumin excretion in rats and humans: involvement of V2 receptors and the renin-angiotensin system. *Nephrol Dial Transplant* 18(3): 497–506.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/18.3.497>
30. *Bardoux P, Bruneval P, Heudes D, Bouby N, Bankir L* (2003) Diabetes-induced albuminuria: role of antidiuretic hormone as revealed by chronic V<sub>2</sub> receptor antagonism in rats. *Nephrol Dial Transplant* 18(9): 1755–1763.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/fgf277>
31. *Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F* (1993) Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 92(5): 2339–2345.  
<https://doi.org/10.1172/JCI116838>
32. *Tagawa T, Imaizumi T, Shiramoto M, Endo T, Hironaga K, Takeshita A* (1995) V<sub>2</sub> receptor-mediated vasodilation in healthy humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 25(3): 387–392.  
<https://doi.org/10.1097/00005344-199503000-00006>
33. *Loichot C, Krieger JP, De Jong W, Nisato D, Imbs JL, Barthelmebs M* (2001) High concentrations of oxytocin cause vasoconstriction by activating vasopressin V<sub>1A</sub> receptors in the isolated perfused rat kidney. *Nannyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363(4): 369–375.  
<https://doi.org/10.1007/s002100000372>
34. *Elberry AA, Refaie SM, Kamel M, Ali T, Darwish H, Ashour O* (2013) Oxytocin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Ann Saudi Med* 33(1): 57–62.  
<https://doi.org/10.5144/0256-4947.2013.57>
35. *Tribollet E, Barberis C, Dreifuss JJ, Jard S* (1988) Autoradiographic localization of vasopressin and oxytocin binding sites in rat kidney. *Kidney Int* 33(5): 959–965.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1988.94>
36. *Arpin-Bott MP, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME* (1997) Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *J Endocrinol* 153(1): 49–59.  
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1530049>
37. *Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J* (1999) Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 278–283.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.278>

### Effect of Neurohypophyseal Hormones on Excretion of Proteins by the Kidneys

T. A. Karavashkina<sup>a</sup>, E. V. Balbotkina<sup>a</sup>, T. V. Kovaleva<sup>a</sup>, and A. V. Kutina<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: kutina\_anna@mail.ru*

Vasopressin (VP) is one of the main factors affecting intraglomerular hemodynamics, filtration pressure and the state of mesangial cells and contributing to the progression of proteinuria. The aim of this work was to study the effect of neurohypophyseal hormones (VP and oxytocin) on urinary protein excretion. Experiments were performed on Wistar rats, healthy and with microalbuminuria caused by minimal damage to the glomerular filter. Microalbuminuria was modeled by administration of D-nitroarginine methyl ester (D-NAME, 50 mg/kg, intraperitoneally). VP (0.05 and 1.5 nmol/kg) and oxytocin (0.15 nmol/kg) were administered to rats intramuscularly, V<sub>2</sub>-antagonist (15 nmol/kg) and V<sub>1a</sub>-antagonist (20 nmol/kg) intraperitoneally. To reduce the level of endogenous VP, animals were given water to drink (10 ml/kg), urine was collected for 2 h, and the levels of total protein, albumin, β<sub>2</sub>-microglobulin, and immunoglobulin G (IgG) were analyzed. In healthy rats, VP at a dose of 0.05 nmol/kg and oxytocin did not affect albumin excretion, but VP at a dose of 1.5 nmol/kg provoked microalbuminuria. In a model

of impaired properties of the glomerular filter caused by the D-NAME administration, VP at a dose of 0.05 nmol/kg and oxytocin led to the normalization of albumin excretion, and VP at a dose of 1.5 nmol/kg caused pronounced proteinuria, albumin excretion increased by 100 times, IgG – by 10 times. Blockade of  $V_2$  receptors aggravated protein loss caused by D-NAME and VP (1.5 nmol/kg), while blockade of  $V_{1a}$  receptors prevented it. Thus, at high concentrations in the blood, VP enhances protein filtration in the kidney. This effect is mediated by  $V_{1a}$  receptors and, depending on the barrier properties of the glomerular filter, leads to the development of microalbuminuria or severe proteinuria. Oxytocin and VP at a dose at which it predominantly activates  $V_2$  receptors have an antiproteinuric effect. The revealed effects of neurohypophyseal hormones on albumin excretion open up new promising therapeutic targets for the correction of glomerular dysfunctions.

*Keywords:* kidney, vasopressin, oxytocin, microalbuminuria, proteinuria, D-NAME

ОЦЕНКА ЗАВИСИМОСТИ “ДОЗА–ОТВЕТ” ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКОМ  
ВОЗДЕЙСТВИИ МИТОМИЦИНА С НА ПРИМЕРЕ  
ApoE-НОКАУТНЫХ МЫШЕЙ

© 2023 г. М. А. Асанов<sup>1</sup>\*, Д. К. Шишкова<sup>1</sup>, А. О. Поддубняк<sup>1</sup>, М. Ю. Синицкий<sup>1</sup>,  
А. В. Синицкая<sup>1</sup>, М. В. Хуторная<sup>1</sup>, А. В. Понасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,  
Кемерово, Россия

\*E-mail: asmaks988@gmail.com

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 25.08.2023 г.

Принята к публикации 25.08.2023 г.

Полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) являются подходящей мишенью для оценки уровня острого и хронического генотоксического стресса в моделях *in vivo*. Для индукции генотоксического стресса в эксперименте широко применяется митомицин С (ММС) – алкилирующий агент, приводящий к образованию поперечных сшивок молекулы ДНК. Микроядерный тест в полихромных эритроцитах хорошо зарекомендовал себя в качестве стандартного анализа для оценки генотоксических эффектов на хромосомном уровне у мышей. Вместе с тем большинство имеющихся исследований направлено на изучение острого генотоксического стресса, обусловленного высокими дозами мутагенов, в то время как исследований, направленных на изучение хронического воздействия ММС, крайне мало. Цель данного исследования – определение генотоксического потенциала ММС без цитотоксического эффекта при хроническом воздействии на мышей, нокаутных по гену аполипопротеина Е (ApoE<sup>-/-</sup>). В исследование были включены четыре группы ApoE-нокаутных мышей, получавших инъекции двух различных доз ММС (0.1 и 0.5 мг/кг) в хвостовую вену один и три раза в неделю, а также две контрольные группы. Каждая группа состояла из четырех самок и одного самца. Для оценки генотоксических эффектов готовили препараты костного мозга, на каждом образце подсчитывали 1000 ПХЭ, выявляли ПХЭ с микроядрами и рассчитывали долю ретикулоцитов. Доза 0.5 мг/кг показала явный цитотоксический эффект, выраженный в нарушении эритропоэза, а именно в уменьшении доли ретикулоцитов. Доза 0.1 мг/кг вызывала выраженный генотоксический, но не цитотоксический эффект. Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут быть полезны при выборе дозы ММС для проведения экспериментов, требующих моделирования хронического генотоксического стресса у лабораторных животных.

**Ключевые слова:** микроядра, генотоксические эффекты, эритроциты, ретикулоциты, митомицин С

DOI: 10.31857/S0869813923090029, EDN: OSJMIA

## ВВЕДЕНИЕ

Митомицин С (ММС) – противоопухолевый антибиотик, обнаруженный в 1950-х годах в ферментированных культурах *Streptomyces caespitosus* и широко используемый при лечении онкологических заболеваний [1]. Как алкилирующий

агент ММС оказывает цитотоксическое и генотоксическое воздействие на клетки млекопитающих. На молекулярном уровне восстановительная активация ММС приводит к образованию его производного, митозена, который посредством реакции N-алкилирования взаимодействует с молекулой ДНК, приводя к образованию поперечных сшивок между ее нитями. Кроме того, ММС может инициировать образование активных форм кислорода и азота, вызывающих окислительный и нитрозивный стресс [2–4]. Кроме того, ММС в низких дозах является причиной преждевременного клеточного старения [5]. Следует отметить, что большинство имеющихся исследований направлено на изучение острого генотоксического стресса, обусловленного высокими дозами ММС [6, 7], в то время как исследований, направленных на изучение хронического воздействия ММС, крайне мало.

Микроядерный тест *in vivo* хорошо зарекомендовал в качестве стандартного анализа для оценки генотоксических эффектов на хромосомном уровне у различных лабораторных животных, при этом мыши являются наиболее широко используемыми в подобных экспериментах видами грызунов [8], а полихроматофильные эритроциты (ПХЭ) являются подходящей мишенью для оценки уровня острого и хронического генотоксического стресса [9]. Особый интерес представляет изучение уровня генотоксического стресса у гиперлипидемических мышей, нокаутных по гену аполипопротеина Е (ApoE<sup>-/-</sup>), используемых при изучении патогенеза различных сердечно-сосудистых заболеваний [10, 11]. Ряд проведенных ранее экспериментов показал, что ММС-индуцированный генотоксический стресс может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции (являющейся триггером атеросклероза) в экспериментах *in vitro* [12, 13], при этом остается неизученным вопрос, будет ли ММС вызвать схожие эффекты у лабораторных животных.

Целью данного исследования явилось определение генотоксического потенциала ММС без цитотоксического эффекта при хроническом воздействии на ApoE-нокаутных мышах.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

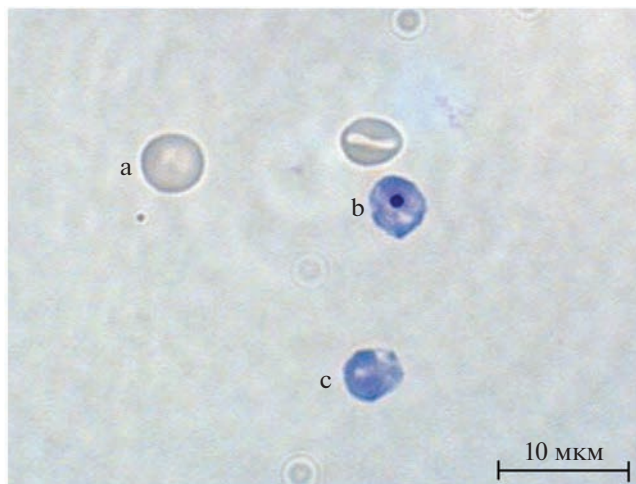
### *Моделирование генотоксического стресса*

В исследование были использованы ApoE-нокаутные мыши в возрасте 1.5 года, полученные из вивария отдела экспериментальной медицины НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия). Были сформированы четыре экспериментальные группы, включавшие по пять мышей (четыре самки и один самец), получавших инъекции двух различных доз ММС (AppliChem, Испания, 0.1 и 0.5 мг/кг) в хвостовую вену один и три раза в неделю в течение месяца, а также две контрольные группы (получавшие инъекции 0.9%-ного раствора NaCl один и три раза в неделю на протяжении всего эксперимента). Раствор ММС готовили непосредственно перед использованием (*ex tempore*). Дозы ММС определяли эмпирически с учетом литературных данных [14, 15]. Дозу препарата, рассчитанную для каждого животного, разводили в 0.9%-ном растворе NaCl. В ходе эксперимента животных перед введением препарата взвешивали и корректировали дозы препарата. Еда и вода были доступны на протяжении всего эксперимента.

Преимущество в количестве самок в исследуемых группах было обосновано тем, что самки данной линии характеризуются более медленным развитием атеросклероза.

### *Извлечение костного мозга*

Эвтаназия животных осуществлялась с применением двуокси углерода. Вскрытие проводили через семь дней от последнего введения ММС. После выделения



**Рис. 1.** Препарат смыва костного мозга из бедренной кости мышей (а – нормохроматофильный эритроцит; b – полихроматофильный эритроцит с микроядром; c – полихроматофильный эритроцит без аномалий).

бедренной кости и ее полного очищения от мышечной ткани, удаляли эпифизы, проводили смыв костного мозга 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Полученную суспензию центрифугировали при 1000 об./мин на протяжении 5 мин, надосадочную жидкость удаляли и добавляли 500 мкл свежей сыворотки, после чего снова центрифугировали и частично удаляли надосадочную жидкость, оставляя примерно 50–100 мкл.

#### *Подготовка цитогенетических препаратов*

Небольшую каплю полученной суспензии с помощью дозатора помещали на край обезжиренного предметного стекла и растягивали каплю по всей его поверхности с помощью другого предметного стекла. После высушивания на воздухе препараты фиксировали метанолом в течение 5 мин. Препараты окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза в течение 10 мин, промывали проточной водой и высушивали на воздухе.

#### *Анализ цитогенетических препаратов*

Препараты анализировали на микроскопе Axiostar Plus (Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз. На каждом препарате подсчитывали 200 эритроцитов, определяли количество нормохроматофильных эритроцитов и ПХЭ, после чего рассчитывали долю ПХЭ. Для оценки уровня генотоксического стресса на каждом препарате подсчитывали еще 1000 ПХЭ и отмечали ПХЭ с микроядрами (МЯ) (рис. 1).

#### *Статистический анализ*

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения StatSoft STATISTICA 10.0. Оценка нормальности распределения по методу Колмогорова–Смирнова показало, что распределение данных по всем изученным показателям не соответствует нормальному. Следовательно, для сравнения групп



применяли Н-критерий Краскела–Уоллиса. Различия между группами считали значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

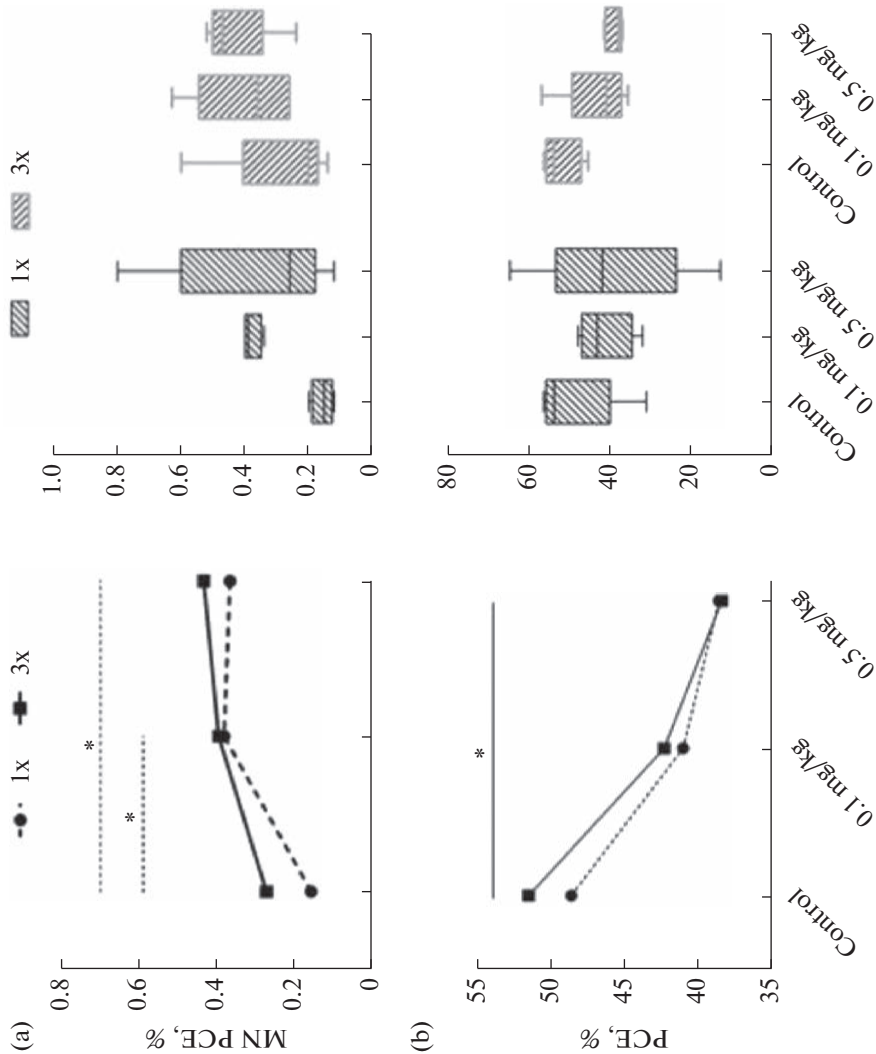
В результате проведенного исследования было показано несколько достоверных различий по уровню ПХЭ с МЯ между экспериментальными и контрольными группами (рис. 2а). При однократном введении ММС ПХЭ с хромосомными повреждениями более чем в два раза чаще встречались в группах мышей, экспонированных обеими дозами ММС (0.1 и 0.5 мг/кг) по сравнению с контрольными группами. Экспериментальные группы как при однократном, так и при трехкратном введении ММС не имели статистически подтвержденные различия ( $p > 0.05$ ) по количеству клеток с цитогенетическими аномалиями.

Для понимания изменения гемопоэза, а именно эритропоэза, в ответ на ММС-индуцированный генотоксический стресс, дополнительно было проанализировано 200 эритроцитов и подсчитана доля ПХЭ от общего числа эритроцитов. Было установлено, что у мышей из экспериментальных групп доля ПХЭ была на 10% и более ниже, чем у мышей из контрольных групп, однако статистически значимые различия с контролем были отмечены только у животных, получавших трехкратную инъекцию ММС в дозировке 0.5 мг/кг (рис. 2б). Следует отметить, что доля ПХЭ в контрольных группах составляла примерно 50%.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генотоксический стресс приводит к серьезным последствиям для здоровья человека, связанным с тератогенными, мутагенными и канцерогенными эффектами, возникающими в результате хромосомных нарушений в соответствующих тканях. При анализе способности того или иного агента инициировать повреждение ДНК, или при оценке существующих повреждений, могут быть использованы различные цитогенетические тесты. Они применимы как к клеткам в эксперименте *in vitro*, так и к моделям *in vivo* с участием мелких млекопитающих. Преимущество цитогенетических тестов заключается в возможности учета генетических повреждений на уровне отдельной клетки, что позволяет определять клеточную кинетику кластогена и устанавливать зависимость “доза–эффект”. Оценка “доза–эффект” является одним из этапов в оценке рисков, связанных с воздействием химических веществ и факторов окружающей среды, индуцирующих обратимые и необратимые изменения в организме [16].

Микроядерный тест широко используется в генетической токсикологии и применяется, в том числе, при разработке и тестировании лекарственных препаратов. Микроядерный тест и FISH метод (флуоресцентная гибридизация *in situ*) остаются одними из основных методов оценки влияния мутагенных факторов на геномную нестабильность [15]. Такие цитогенетические аномалии, как микроядро, протрузия и нуклеоплазматный мост учитываются в анализе эритроцитов рыб и птиц для обнаружения генотоксических факторов в окружающей среде [22, 23]. *In vivo* анализ уровня МЯ в эритроцитах млекопитающих (главным образом крыс и мышей), полученных из периферической крови или костного мозга, широко используется для выявления повреждений хромосом или митотического аппарата эритробластов, вызванных исследуемым химическим веществом [17], в основном определяя частоту встречаемости микроядер [24, 25]. В процессе превращения эритробласта костного мозга в незрелый эритроцит (иногда также называемый ПХЭ или ретикулоцитом) в цитоплазме возможно появление МЯ, являющихся маркерами повреждения генетического аппарата клетки [17, 18]. Визуализация МЯ в таких клетках облегчается тем, что у них отсутствует основное ядро.



**Рис. 2.** Кривая доза–эффект: (а) – процентное содержание полихроматофильных эритроцитов с микроядром, (б) – доля полихроматофильных эритроцитов на 200 клеток (\* – достоверное различие между группами при однократном введении митомцина С); Control – контрольная группа; MN – micronuclei – микроядро; PCE – polychromatic erythrocyte – полихроматофильный эритроцит.

Различные по своему типу и механизму действия мутагенные агенты по разному влияют на образование МЯ в ПХЭ. Повреждения ДНК, вызванные различными экзогенными и эндогенными факторами, накапливаются в клетке до тех пор, пока не привьются возможности систем репарации повреждений ДНК. В этом контексте важно понимать механизмы и последствия генотоксического стресса, вызванного хроническим низкодозовым воздействием различных мутагенных агентов на живые организмы. В нашем исследовании было показано, что ММС в концентрации 0.1 мг/кг вызывает выраженный генотоксический, но не цитотоксический эффект у гиперлипидемических мышей (что выражается в значимом увеличении частоты ПХЭ с МЯ, с одновременным отсутствием изменения доли ПХЭ). В то же самое время доза 0.5 мг/кг обладала выраженными цитотоксическими эффектами, вызывая нарушение эритропоэза (а именно снижение доли ретикулоцитов), при этом уровень ПХЭ с МЯ статистически значимо не различался с данным показателем для дозы 0.1 мг/кг. Полученные нами результаты отличаются от данных, полученных в ходе экспериментов по моделированию острого генотоксического стресса, выполненных рядом исследователей. В частности, был изучен уровень ПХЭ с МЯ у крыс линии Wistar, получавших инъекции ММС в концентрации 0.5, 1 и 2 мг/кг внутривентриально, с периодичностью один раз в сутки (всего было выполнено две инъекции). Было показано, что только концентрации 1 и 2 мг/кг вызвали значимое повышение уровня повреждения ДНК по сравнению с неэкспонируемым контролем, в то время как концентрации 0.5 мг/кг при двукратном внутривентриальном введении не вызвала развития генотоксического стресса у животных. Более того, ежедневные (на протяжении 13 дней) внутривентриальные инъекции ММС в концентрации 0.1 мг/кг (с забором периферической крови каждые 24 ч) также не приводили к изменению как уровня ПХЭ с МЯ, так и доли ПХЭ [19].

Morales-Ramírez и соавт. [20] в своем обзоре сравнивали различия в кинетике и механизмах образования ПХЭ с МЯ и цитотоксичности различных противоопухолевых и генотоксических агентов в периферической крови мышей *in vivo*. Минимальной дозой ММС, при которой наблюдалось максимальное снижение доли ПХЭ, явилась концентрация 1.5 мкг/кг, а также была показана корреляция между генотоксическим и цитотоксическим действием ММС. Также установлено, что внутривентриальные инъекции ММС в концентрации 1 мг/кг (пять инъекций в течение недели) не вызывают изменений в биохимических и цитологических показателях периферической крови  $NQO1^{-/-}$ ,  $NQO1^{+/-}$  и  $NQO2^{-/-}$  мышей, а также гистологической характеристики их костного мозга [21].

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что дозировка ММС в концентрации 0.1 мг/кг является оптимальной для моделирования хронического генотоксического стресса у мышей. Высоких доз (более 0.5 мг/кг) следует, по видимому, избегать, так как они могут вызвать цитотоксические эффекты и нарушение эритропоэза. Сверхнизкие дозы (менее 0.1 мг/кг), вероятно, даже безопаснее, и их эффект в контексте моделирования генотоксического эффекта следует изучить в будущих исследованиях. Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут быть полезны при выборе дозы ММС для проведения экспериментов, требующих моделирования хронического генотоксического стресса у лабораторных животных.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и принципами гуманности, изложенными в Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных. Протокол исследования одобрен

локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 “Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов”.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.Ю.С.), проведение эксперимента (Д.К.Ш., А.В.С., А.О.П., М.В.Х.), обработка данных (М.А.А.), написание манускрипта (М.А.А.), редактирование манускрипта (А.В.П.).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sassi A, Boubaker J, Loussaief A, Jomaa K, Ghedira K, Chekir-Ghedira L* (2021) Protective effect of chrysin, a dietary flavone against genotoxic and oxidative damage induced by Mitomycin C in Balb/C mice. *Nutr Cancer* 73(2): 329–338.  
<https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1749289>
2. *Mokdad Bzeouich I, Mustapha N, Maatouk M, Ghedira K, Ghouli M, Chekir-Ghedira L* (2016) Genotoxic and anti-genotoxic effects of esculin and its oligomer fractions against mitomycin C-induced DNA damages in mice. *Regul Toxicol Pharm* 82: 48–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.002>
3. *Timocin T, Arslan M, Basri Ila H* (2021) Evaluation of in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of Rhus coriaria. *Drug Chem Toxicol* 44(4): 409–417.  
<https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1593433>
4. *Yuzbasioglu D, Mamur S, Avuloglu-Yilmaz E, Erikel E, Celebi-Keskin A, Unal F* (2021) Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 870–871: 503391.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503391>
5. *Lin LT, Chen JT, Lu DW, Tai MC, Liang CM, Chen CL, Pao SI, Hsu CK, Chen YH* (2020) Antifibrotic role of low-dose mitomycin-c-induced cellular senescence in trabeculectomy models. *PLoS One* 15(6): e0234706.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234706>
6. *Itoh K, Masumori S, Mukai D, Sakakibara H, Yasuda M, Shimoi K* (2019) Dosage time affects alkylating agents induced micronuclei in mouse peripheral blood reticulocytes through the function of erythropoietin. *J Toxicol Sci* 44(4): 273–282.  
<https://doi.org/10.2131/jts.44.273>
7. *Digkas EN, Chrisafi S, Passadaki T, Tsalikidis A, Hatzimichail A, Vargemezis V, Lialiaris TS* (2010) *In vitro* and *in vivo* cytogenetic effects of recombinant human erythropoietin on the frequency of sister chromatid exchanges alone or in combination with mitomycin C. *Chemotherapy* 56(3): 239–247.  
<https://doi.org/10.1159/000316849>
8. *Díez-Quijada L, Llana-Ruiz-Cabello M, Cătuțescu GM, Puerto M, Moyano R, Jos A, Cameán AM* (2019) *In vivo* genotoxicity evaluation of cylindrospermopsin in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food Chem Toxicol* 132: 110664.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110664>
9. *Jain AK, Pandey AK* (2019) *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods Mol Biol* 2031: 135–146.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7)

10. *Roque CR, Sampaio LR, Ito MN, Pinto DV, Caminha JSR, Nunes PIG, Raposo RS, Santos FA, Windmüller CC, Crespo-Lopez ME, Alvarez-Leite JI, Oriá RB, Pinheiro RF* (2021) Methylmercury chronic exposure affects the expression of DNA single-strand break repair genes, induces oxidative stress, and chromosomal abnormalities in young dyslipidemic ApoE knockout mice. *Toxicology* 464: 152992.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152992>
11. *Jacobsen NR, Møller P, Jensen KA, Vogel U, Ladefoged O, Loft S, Wallin H* (2009) Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Part Fibre Toxicol* 6: 2.  
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-2>
12. *Кутихин АГ, Сеницкий МЮ, Понасенко АВ* (2017) Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний 1: 92–101. [*Kutikhin AG, Sinititsky MY, Ponasenko AV* (2017) The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues Cardiovasc Diseases* 1: 92–101. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-92-101>
13. *Sinititsky MY, Tsepokina AV, Kutikhin AG, Shishkova DK, Ponasenko AV* (2021) The gene expression profile in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biochemistry (Moscow) Series B: Biomed Chem* 15(3): 255–261.  
<https://doi.org/10.1134/S1990750821030100>
14. *Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK* (2007) In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472>
15. *Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W* (2007) In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626(1–2): 26–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
16. *Chen Q, Riviere JE, Lin Z* (2022) Toxicokinetics, dose-response, and risk assessment of nanomaterials: Methodology, challenges, and future perspectives. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 14(6): e1808.  
<https://doi.org/10.1002/wnan.1808>
17. ГОСТ 34660-2020. Микроядерный анализ на эритроцитах млекопитающих.
18. *Quezada-Vidal J, Ortíz-Muñiz R, Cervantes-Ríos E, Cruz-Vallejo V, Morales-Ramírez P* (2020) In vivo kinetics of the genotoxic and cytotoxic activities of cladribine and clofarabine. *Environ Mol Mutagen* 61(9): 922–927.  
<https://doi.org/10.1002/em.22394>
19. *Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W* (2006) In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626(1–2): 26–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
20. *Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V* (2014) Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents *in vivo*. *Toxicol Lett* 224(3): 319–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.012>
21. *Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK* (2007) In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4480>
22. *Anbumani S, Mohankumar MN* (2015) Nucleoplasmic bridges and tailed nuclei are signatures of radiation exposure in *Oreochromis mossambicus* using erythrocyte micronucleus cytome assay (EMNCA). *Environ Sci Pollut Res* 22: 18425–18436.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5107-1>
23. *Mendez SE, Quero AAM, Gorla NBM* (2022) Erythrocyte micronucleus cytome assay in *Passer domesticus* and environmental remote sensing for inferring the quality of wild, rural, and urban areas. *Environ Monit Assess* 194: 852.  
<https://doi.org/10.1007/s10661-022-10488-9>
24. *El-Alfy NZ, Alqosaibi AI, Mahmoud MF, El-Ashry SR* (2016) An analysis of micronuclei and DNA damage induced by metotrexate treatment of male albino mice. *Egypt J Hospit Med* 65: 504–514.
25. *Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, Berg A, Torous DK* (2016) Mouse Pig-a and micronucleus assays respond to N-ethyl- N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and ethyl carbamate, but not pyrene or methyl carbamate. *Environment Mol Mutagen* 57(1): 28–40.  
<https://doi.org/10.1002/em.21965>

**Dose-Response of the Mitomycin C Genotoxic Effect on the ApoE Knockout Mice****M. A. Asanov<sup>a,\*</sup>, D. K. Shishkova<sup>a</sup>, A. O. Poddubnyak<sup>a</sup>, M. Y. Sinitsky<sup>a</sup>, A. V. Sinitskaya<sup>a</sup>,  
M. V. Khutornaya<sup>a</sup>, and A. V. Ponasenko<sup>a</sup>**<sup>a</sup>*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia**\*e-mail: asmaks988@gmail.com*

Polychromic erythrocytes have been accepted as a suitable target for micronucleus (MN) evaluation in both acute and cumulative injury. Mitomycin C (MMC) also has a wide range of genotoxicity, including inhibition of DNA synthesis, clastogenesis and mutagenesis. As an immediate clastogen requiring exclusively intracellular reductive activation, MMC initiates efficient DNA crosslinking. The *in vivo* micronucleus assay has established itself as a standard assay for evaluating chromosomal genotoxicity in mouse erythrocytes. Most of the studies are focused on the study of acute effects, which is caused by high doses of the mutagen. In turn, there are no or very few studies aimed at studying the chronic effects of MMC. The aim of the study is to create a chronic genotoxic effect of MMC without lethal outcome in ApoE<sup>-/-</sup> mice when selecting the optimal dose of MMC. The design of the study included 6 groups of ApoE<sup>-/-</sup> mice, two doses of MMC at a concentration of 0.1 and 0.5 mg/kg, single and three doses. Each group consisted of four females and one male. To assess genotoxicity, 1000 polychromic erythrocytes (PChE) extracted from the femoral bone marrow were counted on each sample, PChE with micronuclei were detected, and the proportion of reticulocytes was counted. A dose of 0.5 mg/kg showed a clear cytotoxic effect, expressed in a violation of erythropoiesis, and more precisely in a decrease in the proportion of reticulocytes. In our study, the concentration of the mutagen, namely 0.1 mg/kg, was shown to cause a clear genotoxic effect without reaching the threshold of cytotoxicity. Dose-response studies in rodents can provide useful information on the mechanisms of toxicity and dose selection for long-term toxicity studies.

*Keywords:* micronucleus, genotoxicity, erythrocyte, mitomycin, reticulocyte

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗЫ NO НА ВЫБРОС СЕРОТОНИНА В МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ В ХОДЕ ФОРМИРОВАНИЯ И ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ СТРАХА У КРЫС

© 2023 г. Н. Б. Саульская<sup>1</sup>, \*, М. А. Сусорова<sup>1</sup>, Н. А. Трофимова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: saulskayanb@infran.ru*

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 01.09.2023 г.

Серотониновая и нитергическая системы медиальной префронтальной коры (мПК) вовлечены в контроль генерализации страха, но их локальное взаимодействие в ходе обеспечения этой функции исследовано мало. Целью работы было изучить влияние блокады эндогенных нитергических сигналов на выброс серотонина в мПК во время формирования условной реакции страха (УРС – модель страха) и на динамику ее генерализации. В исследованиях на самцах крыс линии Спрег-Доули методами прижизненного внутримозгового микродиализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией было установлено, что введения в мПК через диализную канюлю ингибитора NO-синтазы *N*- $\omega$ -нитро-*L*-аргинина (NA, 0.5 мМ) и селективного ингибитора нейронной NO-синтазы *N*- $\omega$ -пропил-*L*-аргинина (NPLA, 2мМ) уменьшают базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК и снижают функциональный подъем этого показателя, вызываемый выработкой УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежным болевым раздражением). Введения NA и NPLA увеличивали замирание животных на дифференцировочный сигнал (CS–), не ассоциируемый с болевым раздражением, при первом тестировании, проводимом через 70 мин после выработки УРС на фоне введения этих препаратов, но уменьшали этот показатель при повторном тестировании через сутки после введения, не изменяя замирание тех же животных на потенциально опасный CS+. Полученные данные свидетельствуют об участии эндогенного NO в активации выброса серотонина в мПК, вызываемого формированием реакции страха. Кроме того, они показывают, что блокада эндогенных нитергических сигналов мПК, усиливающая первоначальную генерализацию реакции страха, способствует угасанию генерализованного страха, возможно, за счет торможения выброса серотонина в мПК.

*Ключевые слова:* медиальная префронтальная кора, прижизненный внутримозговой микродиализ, выброс серотонина, NO-серотониновое взаимодействие, генерализация реакции страха

DOI: 10.31857/S0869813923090108, EDN: ORFYAG

### ВВЕДЕНИЕ

Нейромедиатор серотонин является одной из древнейших сигнальных молекул [см. 1], продуцируемых животными разных биологических типов [2]. В мозге лабораторных грызунов серотониновая система представлена девятью группами серо-

тонинергических нейронов ствола мозга, иннервирующих многие, если не все, отделы ЦНС [3]. Такая широкая иннервация, а также анатомическое, нейрохимическое и электрофизиологическое разнообразие серотониновых нейронов [4, 5] объясняют участие серотониновых сигналов в регуляции большого числа физиологических функций [6]. Важное место среди них занимают реакции на стресс и контроль различных аспектов страха [5, 7], включая генерализованный страх (страх в безопасных обстоятельствах) [8, 9] гипертрофированно усиливающийся при посттравматических стрессовых расстройствах [10]. Данные литературы и наши результаты свидетельствуют, что медиальная префронтальная кора (мПК) и ее серотониновая система, образуемая волокнами из дорсального и медианного ядер шва [7], участвуют в контроле генерализации страха [9, 11]. А именно, мы показали, что функциональный выброс серотонина в мПК, наблюдаемый во время выработки условной реакции страха (УРС – сочетание условного звукового сигнала (CS+) с неизбежным электрокожным раздражением, модель страха), является фактором, влияющим на генерализацию страха, поскольку его фармакологическое усиление селективно усиливает замиранья крыс (показатель страха) на безопасные дифференцировочные сигналы (CS–) через сутки после выработки УРС [9].

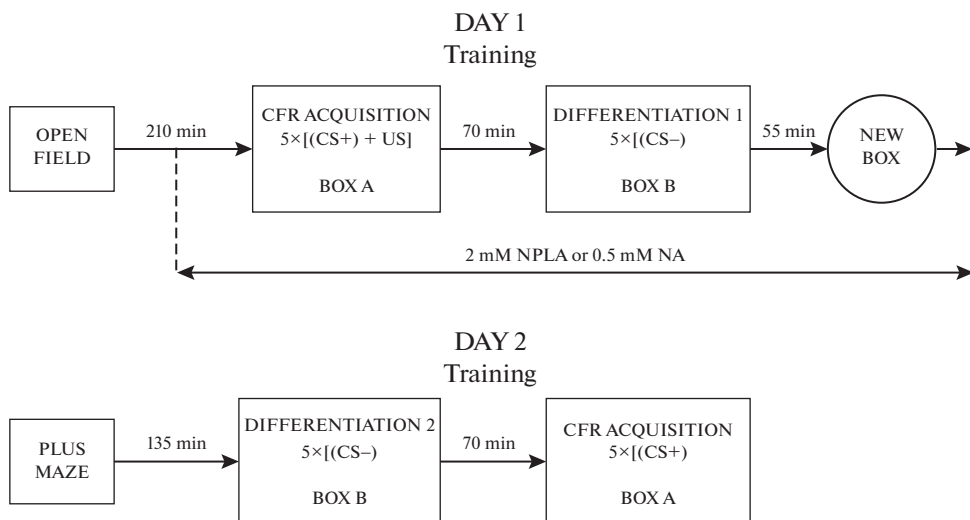
Одним из возможных путей регуляции такого функционального выброса серотонина в мПК являются локальные нитрергические влияния, поскольку накапливаются сведения, что оксид азота (NO), регулирующий серотониновую нейротрансмиссию в разных отделах ЦНС [12, 13], в том числе и в мПК [14], может влиять на процессы генерализации страха в норме [15] и при психопатологии [16] через воздействие на активность серотониновой системы. В частности, по нашим данным, длительная (210 мин) инфузия в мПК во время выработки УРС донора NO диэтиламин ноноата (DEA, 1 мМ), приводящая в начале введения к кратковременному увеличению уровня внеклеточного серотонина в мПК с постепенным снижением этого показателя, тормозит функциональный выброс серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС, и через сутки уменьшает замирание животных на безопасный CS–, но не на потенциально опасный CS+ [15]. Эти результаты свидетельствуют о тормозном влиянии длительной экзогенной нитрергической стимуляции мПК на формирование и/или консолидацию генерализованного страха, происходящем на фоне торможения функционального выброса серотонина в мПК. Вместе с тем неизвестно, насколько такие закономерности действия донора NO являются физиологически релевантными, и может ли эндогенный NO, продукция которого, по нашим данным, увеличивается в мПК при формировании УРС [17], оказывать похожие влияния. Настоящее исследование посвящено выяснению этих вопросов.

Цель работы заключалась в изучении эффектов блокады эндогенных нитрергических сигналов на выброс серотонина в мПК в ходе формирования УРС и на генерализацию этой условнорефлекторной реакции. Для этого было исследовано, как введения в мПК в ходе выработки УРС ингибитора NO-синтазы (NOS) *N*- $\omega$ -нитро-*L*-аргинина (NA, 0.5 мМ) и селективного ингибитора нейронной NO-синтазы (nNOS) *N*- $\omega$ -пропил-*L*-аргинина (NPLA, 2 мМ) сказываются на выбросе серотонина в мПК, вызываемом выработкой УРС, а также на формировании УРС и на ее генерализации. Таких сведений в литературе нет.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы крысы-самцы линии Спрег-Доули массой 305–420 г из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург). Живот-





**Рис. 1.** Схема экспериментов. (CS+) – условный сигнал; (CS–) – дифференцировочный сигнал; US – безусловный стимул (электрокожное раздражение лап).

ных, взятых в эксперимент, содержали индивидуально в условиях свободного доступа к воде и сухому лабораторному корму.

Крысам под наркозом (рометар, Spofha, Чешская Республика, 1.4 мг/100 г и зо-летил, Virbac Sante Animale, Франция, 5 мг/100 г, внутримышечно) унилатерально в мПК вживляли микродиализные канюли концентрического типа, как описано ранее [17]. Схема экспериментов представлена на рис. 1. Через сутки (экспериментальный день 1) крыс тестировали в установке “Открытое поле” в течение 10 мин для оценки исследовательской активности животных перед экспериментами. Регистрировали амбуляцию, оцениваемую по числу пересечений границ секторов, на которые разбита установка, и вертикальную двигательную активность (по числу стоек). Далее начинали микродиализные эксперименты, сочетавшиеся с поведенческим тестированием. Детали экспериментов и используемое оборудование описаны нами ранее [9]. Вкратце, крысу помещали в дневной бокс со слоем опилок из домашней клетки и начинали диализную перфузию мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ, 1 мкл/мин). Состав ИСМЖ (мМ): 147 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0). Спустя 1 ч начинали собирать фоновые образцы диализата (5 образцов по 15 мин). Затем крыс разделяли на 3 группы: “NA” ( $n = 10$ ), “NPLA” ( $n = 7$ ) и “Без введения” ( $n = 10$ ). Крысам группы “NA” в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли ингибитор NOS *N*-ω-нитро-*L*-аргинин (NA, 0.5 мМ, MP Biomedicals, США), а крысам группы “NPLA” – селективный ингибитор nNOS *N*-ω-пропил-*L*-аргинин (NPLA, 2 мМ, Tocris, Великобритания) и собирали по 5 образцов диализата (15 мин каждый). С учетом эффективности диализных канюль (20%) при скорости перфузии 1 мкл/мин реальная концентрация NA в мПК, создаваемая введением этого препарата, составляла 0.1 мМ, а реальная концентрация NPLA – 0.4 мМ. Затем у животных этих групп проводили выработку УРС с дискриминационным компонентом, которая включала 2 этапа. На первом этапе (выработка УРС) каждую крысу переносили в условнорефлекторную камеру А (желтые стены, решетчатой пол) на 5 мин, где предъявляли звуковой условный сигнал – непрерывный тон частотой 1000 Гц (CS+, 10 с, 5 раз, интервал 50 с), который сочетали с не-

избегаемым электрокожным раздражением лап (0.5 мА, 1 с). Регистрировали длительность замирания на CS+ (с), отражающую ожидание болевого раздражения, а также амбуляцию по числу пересечений границ секторов установки, и стойки, отражающие активные попытки избежать болевого раздражения. После этого крысу возвращали в дневной бокс и через 70 мин проводили второй этап обучения – дифференцировку 1. Крысу помещали в дифференцировочную камеру В (белый пол, белые стены) на 5 мин и предъявляли звуковой дифференцировочный сигнал – прерывистый тон частотой 1000 Гц (CS–, 10 с, 5 раз, интервал 50 с) без электрокожного раздражения. Регистрировали время замирания на CS– (с), отражающее первоначальную генерализацию УРС. Затем животное возвращали в дневной бокс и спустя 55 мин помещали в новую круглую камеру (диаметр 30 см, высота 24 см) на 10 мин и определяли уровень исследовательской активности на фоне введения препаратов – амбуляцию (по числу пересечений границ секторов) и число стоек. После этого животное возвращали в дневной бокс и проводили “отмывку” канюли от фармакологических препаратов, как ранее описано [9]. Животные группы “Без введения” были подвергнуты таким же процедурам, но без добавления ингибиторов NO-синтазы в ИСМЖ для перфузии мПК.

На следующий день (экспериментальный день 2) животных всех групп тестировали в течение 5 мин в приподнятом крестообразном лабиринте [9], регистрируя амбуляцию (по числу пересечений границ секторов) и время пребывания (с) в закрытых и открытых рукавах. Затем возобновляли диализную перфузию мПК ИСМЖ. Через 2 ч всех крыс тестировали сначала на проявления генерализованного страха, оцениваемого по длительности замирания на CS– (с) в дифференцировочной камере В в ходе дифференцировки 2, которую проводили так же, как дифференцировку 1. Спустя 70 мин крыс тестировали на проявления условнорефлекторного страха, оцениваемого по замиранию на CS+ (с) в условнорефлекторной камере А во время реализации УРС, которую проводили так же, как выработку УРС, но без электрокожного раздражения.

Определение уровня серотонина в диализате мПК осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Shimadzu, Германия) [9]. Использовали хроматографическую колонку для обращенно-фазной хроматографии Luna “Phenomenex”, США (150 × 2 мм, 3 мкм, C<sub>18</sub>) с предколонкой 2 × 4 мм, 3 мкм, C<sub>18</sub>, “Phenomenex”, США. Напряжение на рабочем электроде – +0.61 В. Подвижная фаза содержала: 0.1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 2 мМ KCl; 0.5 мМ ЭДТА (Sigma, США); 0.26 мМ октилсульфоната натрия (“Sigma”, США); 13.5% карбинола; pH 5. Поток – 0.18 мл/мин, давление около 190 бар при температуре 35 градусов. В качестве внешнего стандарта использовали гидрохлорид серотонина (Sigma, США), в качестве внутреннего стандарта – 3,4-дигидроксibenзиламин (Sigma, США). Хроматограммы регистрировали и обрабатывали в режиме реального времени (МультиХром 1.72, Амперсенд, Россия). Концентрацию серотонина в образцах диализата выражали в нМ, а после этого – в процентах к собственному среднему фону. Процедуру эвтаназии животных проводили так же, как опубликовано ранее [15]. Мозг извлекали и помещали в 10%-ный раствор формалина на неделю. Затем изготавливали фронтальные срезы мозга (40 мкм) для проведения морфологического контроля попаданий. В статистическую обработку отбирали крыс с локализацией канюль в мПК.

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние введений в мПК NA и NPLA на чувствительность крыс к электрокожному раздражению. Животным с вживленными в мПК диализными канюлями в течение 75 мин вводили 0.5 мМ NA ( $n = 6$ ) и 2 мМ NPLA ( $n = 6$ ), добавляемых в перфузионный раствор. Части животных ( $n = 7$ ) перфузию мПК проводили ИСМЖ без добавления фармакологических

препаратов. Каждую крысу помещали в бокс с решетчатым полом и определяли порог возникновения реакции на ток (мкА) [9].

Для статистической обработки применяли статистический пакет SigmaStat (3.0). Данные представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Сравнимые выборки проверяли на соответствие нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова). Использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ ( $F$  критерий, факторы время и/или группа) и  $t$ -критерий Бонферрони для множественного апостериорного сравнения. Парное сравнение поведенческих параметров животных осуществляли с помощью  $U$  критерия Манна–Уитни, если данные не соответствовали критерию нормальности распределения, и с использованием  $t$  критерия Стьюдента, если соответствовали. Использовали уровень достоверности  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

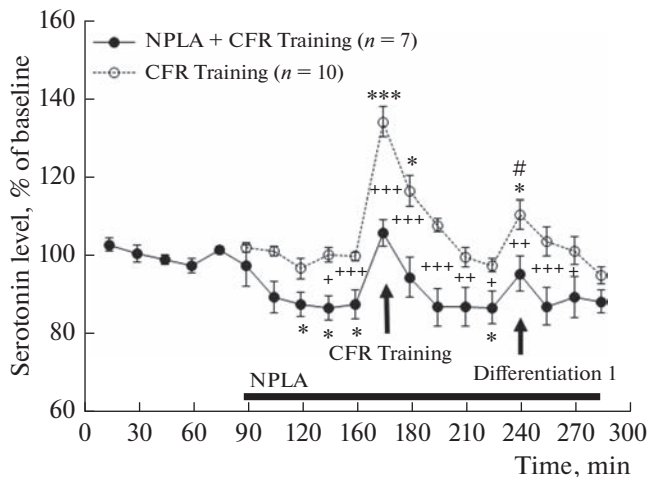
Содержание серотонина в фоновых образцах диализата мПК составляло в этих экспериментах  $0.22 \pm 0.01$  нМ ( $n = 27$ ).

В тесте “Открытое поле” перед началом микродиализных экспериментов крысы групп “Без введения”, “NA” и “NPLA” не различались между собой по величине амбуляции ( $F_{(2, 24)} = 0.2, p = 0.8$ ; число пересечений соответственно  $49 \pm 12, 44 \pm 10, 53 \pm 12$ ) и по числу стоек ( $F_{(2, 24)} = 0.9, p = 0.4$ ; значения соответственно  $5 \pm 2, 9 \pm 3, 9 \pm 2$ ).

Выработка УРС с дискриминационным компонентом, включающая тесты “выработка УРС” и “дифференцировка 1”, приводила у животных группы “Без введения” к подъемам уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе обоих тестов относительно фона (рис. 2;  $F_{(13, 117)} = 17.3, p < 0.001$ ), что соответствует нашим прежним результатам [9].

Введение в мПК животных группы “NPLA” ингибитора nNOS NPLA (2 мМ) снижало базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя перед введением препарата (рис. 2;  $F_{(9, 54)} = 6.4, p < 0.001$ ) и на этом фоне уменьшало подъемы уровня серотонина, вызываемые выработкой УРС и дифференцировкой 1 (рис. 2;  $F_{(13, 210)} = 1.8, p = 0.04$ , при сравнении с группой “Без введения” и  $F_{(18, 108)} = 4.7, p < 0.001$  при сравнении с собственным фоновым уровнем). А именно, у животных группы “NPLA” наблюдался рост уровня серотонина в мПК во время выработки УРС относительно уровня серотонина перед тестом, сниженным введением NPLA ( $t = 4.3, p = 0.006$ ), но не относительно фона перед введением NPLA ( $t = 1.9, p = 1.00$ ). Вместе с тем у крыс группы NPLA во время дифференцировки 1 не было выявлено достоверных изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фона перед введением NPLA ( $t = 0.47, p = 1.00$ ), а также относительно уровня серотонина непосредственно перед тестом ( $t = 2.04, p = 1.00$ ).

Введение крысам группы “NA” ингибитора NOS NA (0.5 мМ) в мПК тоже сопровождалось снижением базального уровня внеклеточного серотонина в этой области (рис. 3;  $F_{(9, 81)} = 17.2, p < 0.001$ ), что подтверждает результаты, полученные нами ранее [14]. Уровень серотонина в мПК крыс группы “NA” оставался сниженным относительно собственного фона в ходе большей части дальнейшего эксперимента по выработке УРС с дискриминационным компонентом, за исключением временных периодов, приходящихся на сами тесты (рис. 3;  $F_{(18, 162)} = 13.7, p < 0.001$ ). А именно, во время выработки УРС и дифференцировки 1 уровень серотонина в мПК животных группы “NA” не отличался от фонового уровня перед введением NA ( $t = 2.2, p = 1.00$ ;  $t = 2.6, p = 1.00$  соответственно), но был выше уровня



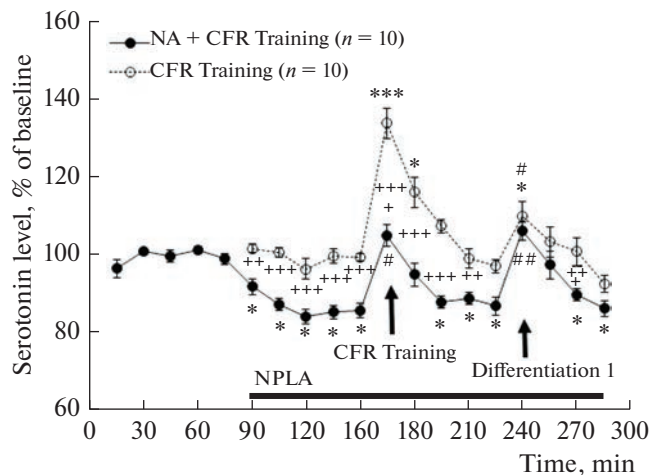
**Рис. 2.** Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением (NPLA + CFR Training) в мПК 2мМ NPLA и без введения (CFR Training). По оси X – время, мин; по оси Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс на графике – стандартная ошибка среднего; черные стрелки – поведенческие тесты; горизонтальная линия – период введения NPLA. \* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$  – при сравнении с фоном; + –  $p < 0.05$ ; ++ –  $p < 0.01$ ; +++ –  $p < 0.001$  – при межгрупповом сравнении; # –  $p < 0.05$  – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом. Однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ ( $F$  критерий) и  $t$  критерий Бонферрони.

серотонина перед тестами, измененного введением NA ( $t = 7.0$ ,  $p < 0.001$ ;  $t = 7.0$ ,  $p < 0.001$  соответственно). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что уровень внеклеточного серотонина в мПК животных группы “NA” был ниже относительно этого показателя крыс группы “Без введения” при сравнении во время и после выработки УРС, но не во время дифференцировки 1 (рис. 3;  $F_{(13, 252)} = 3.6$ ,  $p < 0.001$ ).

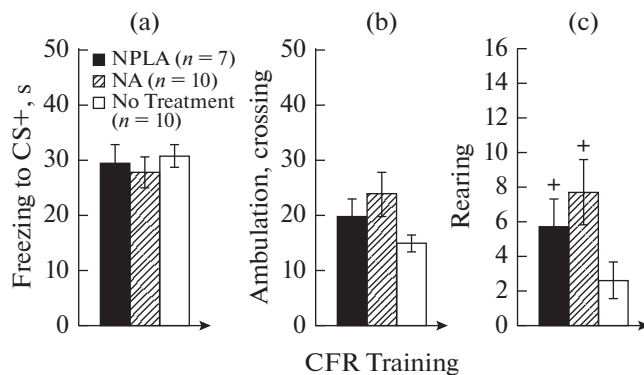
Межгрупповое сравнение не выявило различий в динамике изменений уровней внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 между крысами групп “NPLA” и “NA” ( $F_{(18, 285)} = 1.2$ ,  $p = 0.3$ ).

Во время выработки УРС крысы групп “NA” и “NPLA” не различались между собой (рис. 4а;  $t = 0.4$ ,  $p = 0.7$ ) и не отличались от крыс группы “Без введения” (рис. 4а; соответственно  $t = 0.9$ ,  $p = 0.4$  и  $t = 0.3$ ,  $p = 0.7$ ) по длительности замирания на CS+ (показатель ожидания болевого раздражения). Также не было выявлено различий между крысами с введениями в мПК NA и NPLA и животными без введения препаратов по величине горизонтальной двигательной активности в ходе этого теста (рис. 4б; соответственно  $U = 74.5$ ,  $p = 0.07$  и  $t = 0.9$ ,  $p = 0.4$ ). Вместе с тем крысы, подвергнутые введениям NA и NPLA в мПК, совершали в ходе выработки УРС большее количество стоек (рис. 4с;  $U = 77.5$ ,  $p = 0.04$  и  $U = 14.0$ ,  $p = 0.04$  соответственно) по сравнению с крысами группы “Без введения” и не различались между собой по этому показателю ( $t = 0.75$ ,  $p = 0.47$ ).

Во время дифференцировки 1 (тест на первоначальную генерализацию УРС) крысы групп “NA” и “NPLA” демонстрировали больший уровень замирания на CS– (рис. 5а) по сравнению с животными группы “Без введения” (соответственно  $U = 77.0$ ,  $p = 0.045$  и  $U = 11.0$ ,  $p = 0.02$ ), но не различались между собой по величине этого параметра ( $t = 0.7$ ,  $p = 0.5$ ).



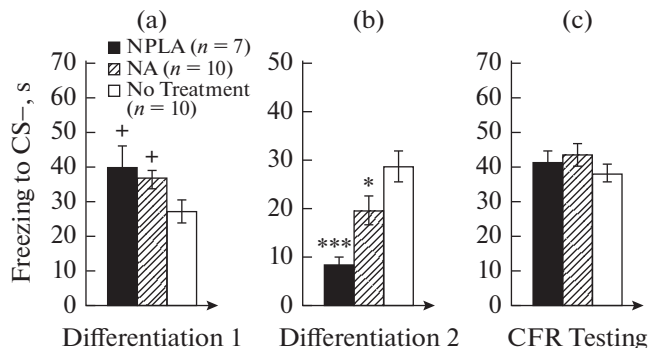
**Рис. 3.** Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки UPC (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением (NA + CFR Training) в мПК 0.5 мМ NA и без введения (CFR Training). ## –  $p < 0.001$  – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом. Остальные обозначения, как на рис. 1. Однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ ( $F$  критерий) и  $t$  критерий Бонфферони.



**Рис. 4.** (a) – длительность замирения на CS+, с; (b) – амбуляция (Ambulation), пересечения; (c) – число стоек (Rearing) во время выработки UPC (CFR Training) у крыс с введениями в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0.5 мМ NA (NA) и у животных, не подвергавшихся введениям препаратов (No Treatment). (c) + –  $p < 0.05$ , – при сравнении с животными без введения препаратов ( $U$  критерий Манна–Уитни).

В ходе тестирования животных на проявления генерализованного страха через сутки после выработки UPC (дифференцировка 2, экспериментальный день 2) животные групп “NA” и “NPLA” демонстрировали меньшую длительность замирения на CS– по сравнению с крысами группы “Без введения” (рис. 5b; соответственно  $t = 2.1$ ,  $p = 0.049$  и  $t = 4.8$ ,  $p < 0.001$ ). Не было выявлено достоверных различий между группами “NA” и “NPLA” по этому показателю ( $t = 1.9$ ,  $p = 0.07$ ).

При тестировании на проявления страха во время реализации UPC (экспериментальный день 2) животные групп “NA” и “NPLA” не различались между собой



**Рис. 5.** Длительность замирания на CS– (а) – во время дифференцировки 1 (Differentiation 1) и (б) – во время дифференцировки 2 (Differentiation 2), а также (с) – длительность замирания на CS+ в ходе реализации УРС (CFR Testing) у крыс, подвергавшихся в первый день экспериментов введениям в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0.5 мМ NA (NA) и у животных без введений препаратов (No Treatment). (а) + –  $p < 0.05$  – при сравнении с животными без введения препаратов,  $U$  критерий Манна–Уитни; (б)\* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$  при сравнении с животными без введения препаратов,  $t$  критерий Стьюдента.

по длительности замирания на CS+ ( $U = 43.0$ ,  $p = 0.5$ ) и не отличались по этому показателю от крыс группы “Без введения” (рис. 5с; соответственно  $t = 1.2$ ,  $p = 0.2$  и  $t = 0.7$ ,  $p = 0.5$ ).

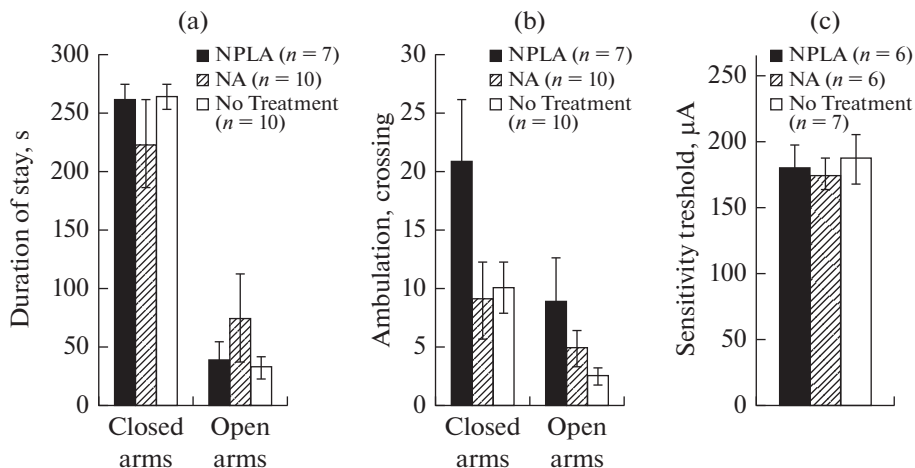
Тестирование исследовательского поведения в новой круглой камере в конце экспериментального дня 1 показало, что животные групп “Без введения”, “NA” и “NPLA” не различаются между собой по величине амбуляции, выражаемой в числе пересечений границ секторов установки ( $F_{(2, 24)} = 1.1$ ,  $p = 0.3$ ; значения соответственно  $11 \pm 2$ ,  $15 \pm 4$ ,  $16 \pm 2$ ) и по числу стоек ( $F_{(2, 24)} = 0.3$ ,  $p = 0.8$ ; значения соответственно  $2.7 \pm 1.2$ ,  $4.2 \pm 1.8$ ,  $3.1 \pm 1.1$ ).

Сравнение поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте через сутки после выработки УРС (экспериментальный день 2) тоже не выявило достоверных различий между крысами групп “NA”, “NPLA” и “Без введения” по времени пребывания (рис. 6а) в открытых ( $F_{(2, 24)} = 0.81$ ,  $p = 0.45$ ) и закрытых ( $F_{(2, 24)} = 0.82$ ,  $p = 0.46$ ) рукавах лабиринта, а также по величине амбуляции (рис. 6б) в открытых ( $F_{(2, 24)} = 2.5$ ,  $p = 0.1$ ) и закрытых ( $F_{(2, 24)} = 2.9$ ,  $p = 0.08$ ) рукавах лабиринта.

Не было обнаружено различий в порогах чувствительности к электрокожному раздражению крыс, не подвергавшихся (группа “Без введения”) и подвергавшихся (группы “NA” и “NPLA”) в течение 75 мин введениям в мПК 0.5 мМ NA и 2 мМ NPLA (рис. 6с;  $F_{(2, 16)} = 0.14$ ,  $p = 0.9$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы, полученные на лабораторных грызунах, свидетельствуют, что стресс активирует нитрергическую нейротрансмиссию в ряде мозговых структур [18], включая дорсальное ядро шва [16] и мПК [17, 19, 20]. При этом сильные стрессовые воздействия, используемые в моделях тревожных и посттравматических стрессовых расстройств, приводят к долгосрочному усилению экспрессии nNOS и к увеличению базальной продукции NO в обоих этих отделах [16, 19, 20], а умеренный стресс характеризуется краткосрочной активацией нитрергической системы мПК [17]. Так, по нашим прежним данным, электрокожное раздражение в ходе выработки УРС вызывает кратковременный (25 мин) подъем продукции NO в



**Рис. 6.** (a) — время пребывания, с, (b) — амбуляция, пересечения, в закрытых и открытых рукавах крестообразного лабиринта, (c) — порог чувствительности к электрокожному раздражению, мкА, у крыс с введениями в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0,5 мМ NA (NA) и у животных без введений препаратов (No Treatment). *U* критерий Манна–Уитни и *t* критерий Стьюдента.

мПК, оцениваемый по NO-синтаза-зависимому увеличению уровня внеклеточного цитрулина (сопродукта синтеза NO) в этой области [17].

Роль такой функциональной нитрергической активации мПК, предположительно, связана с тормозной регуляцией нитрергическими сигналами мПК первоначальной генерализации УРС, поскольку ее величина отрицательно коррелировала с замиранием животного на дифференцировочный сигнал (CS–) при первом тестировании, проводимом через 120 мин после выработки УРС [17]. Результаты настоящей работы подтверждают это предположение, демонстрируя, что блокада нитрергической нейротрансмиссии в мПК во время выработки УРС локальными введениями ингибитора NOS NA (0,5 мМ) и ингибитора nNOS NPLA (2 мМ) усиливает первоначальную генерализацию УРС. Это проявляется в усилении замирания животных на CS– при первом тестировании, проводимом в день выработки УРС на фоне введения ингибиторов NOS и nNOS (рис. 5а; дифференцировка 1). Показанный эффект не является следствием изменения под действием NA и NPLA подвижности животных или чувствительности к болевым сигналам, поскольку крысы с введениями и без введений в мПК этих препаратов не различались по показателям двигательной активности в новой камере и по порогу чувствительности к электрокожному раздражению (рис. 6с). С учетом сведений об участии NO в синаптической пластичности в мПК [21], эти данные позволяют говорить о тормозном влиянии эндогенных нитрергических сигналов этой области коры на само формирование генерализованного страха, запускаемое в ЦНС во время выработки УРС и контролируемое мПК [см. 22].

В работе показано, что первоначальное усиление генерализации УРС, вызываемое блокадой нитрергической передачи в мПК, происходило на фоне снижения базального и функционального выброса серотонина в этой области (рис. 1–2). Этот факт, с учетом недавних литературных данных о том, что усиление генерализации страха обстановки в модели посттравматического стрессового расстройства сопровождается торможением базальной активности серотониновых нейронов ядер шва [16], позволяет предполагать возможный вклад серотониновых механиз-

мов мПК в показанную в работе NO-зависимую регуляцию первоначальной генерализации УРС.

Вместе с тем животные, подвергнутые во время выработки УРС введениям в мПК NA и NPLA, не только не сохраняли через сутки после введений высокий уровень генерализации УРС (замирание на безопасный CS—), но демонстрировали снижение данного показателя по сравнению с крысами, не подвергавшимися фармакологическим воздействиям (рис. 4b; дифференцировка 2). При этом показатели тревожности (рис. 6a) и двигательной активности (рис. 6b) в приподнятом крестообразном лабиринте, а также проявления условнорефлекторного страха (замирание на CS+) при реализации УРС (рис. 5c) у таких животных значимо не изменялись. Все это показывает, что отсроченные эффекты NA и NPLA связаны с ускоренным угасанием генерализованных проявлений УРС, что, возможно, вызвано нарушением консолидации памяти о генерализованном страхе под воздействием этих препаратов. Эта точка зрения опирается на данные литературы об участии NO в ЦНС в консолидации угасания памяти о страхе [см. 23] и о вовлечении мПК [24] и ее НМДА-рецепторов [25, 26] в эти процессы.

По нашему мнению, продемонстрированные в работе отсроченные тормозные эффекты локальной блокады нитрергической передачи в мПК во время выработки УРС на ее последующую генерализацию опосредованы торможением выброса серотонина в мПК под влиянием этих препаратов. Этот вывод поддерживают наши прежние данные, упомянутые во введении, показавшие, что активация серотониновой системы мПК во время выработки УРС является фактором, усиливающим через сутки проявления генерализованного страха [9], а также данные литературы о том, что крысы, нокаутные по гену транспортера серотонина (и, как следствие, обладающие повышенным уровнем серотонина в ЦНС) характеризуются дефицитом угасания памяти о страхе по сравнению с животными дикого типа [27]. Следует подчеркнуть, что в работе получены только косвенные подтверждения участия серотонина мПК в регуляции генерализации УРС нитрергическими сигналами этой области, и нужны дополнительные исследования, чтобы выявить точные мишени NO, вовлекаемые в эти процессы.

Значимый результат работы – в ней впервые продемонстрированы активационные влияния эндогенного NO нейронного происхождения на базальный и вызываемый выработкой УРС выброс серотонина в мПК. Об этом свидетельствует снижение обоих этих показателей при введении в мПК в ходе выработки УРС ингибитора nNOS NPLA (рис. 2). Ранее с использованием введений в мПК донора NO DEA (0.1–1 мМ) мы показали, что экзогенный NO тоже увеличивает базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК, но такие эффекты являются дозозависимыми только в самом начале введений [14]. А далее при введении 1 мМ DEA уровень серотонина в мПК постепенно снижается [15], что, возможно, связано с десенситизацией растворимой гуанилатциклазы [28], мишени NO. Причем на фоне такого снижения функциональный выброс серотонина в мПК, вызванный выработкой УРС, тоже снижается, и это приводит через сутки к торможению проявлений генерализованного страха [15], то есть происходят изменения, совпадающие по направленности с показанными в настоящей работе эффектами локальной блокады нитрергической нейротрансмиссии в мПК. Сопоставление этих данных показывает, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция мПК высокими концентрациями донора NO, видимо, не всегда может быть использована в качестве модели нитрергической активации, отражающей NO-серотониновое взаимодействие в мПК в непатологических условиях, характеризующихся кратковременной и умеренной активацией нитрергической нейротрансмиссии. Косвенно подтверждают такую точку зрения данные литературы о контрастных эффектах высоких и низких



концентраций доноров NO на выброс серотонина в ядрах шва [29], ключевой структуре серотониновой системы мозга.

В целом, полученные в работе новые данные свидетельствуют об активационных влияниях эндогенного NO нейронного происхождения на базальный и вызываемый выработкой УРС выброс серотонина в мПК. Кроме того, они показывают, что блокада эндогенных нитергических сигналов мПК во время выработки УРС, усиливающая первоначальную генерализацию этой условнорефлекторной реакции, способствует последующему угасанию проявлений генерализованного страха, возможно, за счет торможения выброса серотонина в мПК.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые с животными, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены комиссией по содержанию и использованию животных в Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН (протокол № 04/19 от 19.04.2021 г.).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0004.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов (Н.Б.С.), сбор данных (М.А.С., Н.А.Т., Н.Б.С.), статистическая обработка и анализ данных (Н.Б.С., М.А.С.), написание и редактирование статьи (Н.Б.С., М.А.С., Н.А.Т.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mercurio S, Bozzo M, Pennati A, Candiani S, Pennati R* (2023) Serotonin receptors and their involvement in melanization of sensory cells in *Ciona Intestinalis*. 12: 1150. <https://doi.org/10.3390/cells12081150>
2. *Rao STRB, Turek I, Irving HR* (2023) Phylogenetic analysis of 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptors in Metazoa. *PloS One* 18(3): e0281507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281507>
3. *Okaty BW, Commons KG, Dymecki SM* (2019) Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nature Reviews Neurosci* 20: 395–424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>
4. *Prouty EW, Chandler DJ, Waterhouse BD* (2017) Neurochemical differences between target-specific populations of rat dorsal raphe projection neurons. *Brain Res* 1675: 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.031>
5. *Ren J, Friedmann D, Xiong J, Liu CD, Ferguson BR, Weerakkody T, DeLoach KE, Ran C, Pun A, Sun Y, Weissbourd B, Neve RL, Huguenard J, Horowitz MA, Luo L* (2018) Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. *Cell* 175: 472–487.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>
6. *Vasudeva RK, Lin RCS, Simpson KL, Waterhouse BD* (2011) Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitergic cell groups. *J Chem Neuroanat* 41: 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.008>
7. *Bauer EP* (2015) Serotonin in fear conditioning processes. *Beh Brain Res* 277: 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.028>
8. *Asok A, Kandel ER, Rayman JB* (2019) The neurobiology of fear generalization. *Front Behav Neurosci* 12: 329. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>

9. *Saulskaya NB, Marchuk OE* (2020) Inhibition of serotonin reuptake in the medial prefrontal cortex during acquisition of a conditioned reflex fear reaction promotes formation of generalized fear. *Neurosci Behav Physiol* 50: 432–438.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00918-x>
10. *Morrey RA, Dunsmoor JE, Haswell CC, Brown VM, Vora A, Weiner J, Stjepanovic D, Wagner HR* (2015) Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorders. *Transl Psychiatry* 5: e700.  
<https://doi.org/10.1038/tp.2015.196>
11. *Xu W, Sudhof TC* (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339: 1290–1295.  
<https://doi.org/10.1126/science.1229534>
12. *Ghasemi M, Claunch J, Niu K* (2019) Pathologic role of nitrergic neurotransmission in mood disorders. *Prog Neurobiol* 173: 54–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.002>
13. *Sun N, Qin Y-J, Chu C, Xia T, Du Z-W, Zheng L-P, Li A-A, Meng F, Zhang Y, Zhang J, Liu X, Li T-Y, Zhu D-Y, Zhou Q-G* (2022) Design of fast-onset antidepressant by dissociating SERT from nNOS in the DRN. *Science* 378: 390–398.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>
14. *Saulskaya NB, Burmakina MA, Trofimova NA* (2022) Effect of activation and blockade of nitrergic neurotransmission on serotonin system activity of the rat medial prefrontal cortex. *J Evol Biochem Physiol* 58: 500–507.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020181>
15. *Saulskaya NB, Burmakina MA, Trofimova NA* (2021) Nitric oxide inhibits the functional activation of the medial prefrontal cortex serotonin system during fear formation and decreases fear generalization. *Neurochem J* 15: 266–272.  
<https://doi.org/10.1134/s1819712421030107>
16. *Sun N, You Y, Yang D, Jiang Z-X, Xia T, Zhou Q-G, Zhu D-Y* (2021) Neuronal nitric oxide synthase in dorsal raphe nucleus mediates PTSD-like behaviors induced by single-prolonged stress through inhibiting serotonergic neurons activity. *Biochem Biophys Res Communicat* 585: 139e145.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.048>
17. *Saul'skaya NB, Sudorgina PV* (2016) Activity of the nitrergic system of the medial prefrontal cortex in rats with high and low levels of generalization of a conditioned reflex fear reaction. *Neurosci Behav Physiol* 46: 964–970.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0338-2>
18. *Zhou QG, Zhu XH, Nemes AD, Zhu DY* (2018) Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. *IBRO Rep* 5: 116–132.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibror.2018.11.004>
19. *Campos AC, Piorino EM, Ferreira FR, Guimaraes FS* (2013) Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res* 256: 391–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.006>
20. *Villa-Verde C, Marinho ALZ, Lisboa SF, Guimaraes FS* (2016) Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Neuroscience* 320: 30–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.040>
21. *Noriega-Prieto JA, Maglio LE, Gallero-Salas Y, de Sevilla DF* (2019) Nitric oxide-dependent LTD at infralimbic cortex. *Neuroscience* 418: 149–156.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.029>
22. *Саульская НБ* (2018) Генерализация страха в моделях на животных: нейрофизиологические механизмы и возможные мишени коррекции. *Успехи физиол наук* 49: 12–29. [*Saulskaya NB* (2018) Fear generalization in animal models: neurophysiological mechanisms and possible targets for correction. *Uspekhi fiziol nauk* 49: 12–29. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.7868/S0301179818040021>
23. *Sadeghi MA, Hemmati S, Nassireslami E, Zoshk MY, Hosseini Y, Abbasian K, Chamanara M* (2022) Targeting neuronal nitric oxide synthase and the nitrergic system in post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology* 239: 3057–3082.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-022-06212-7>
24. *Bayer H, Bertoglio LJ* (2020) Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. *Scient Rep* 10: 15827.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72856-0>
25. *Vieira PA, Corches A, Lovelace JW, Westbrook KB, Mendoza M, Korzus E* (2015) Prefrontal NMDA receptors expressed in excitatory neurons control fear discrimination and fear extinction. *Neurobiol Learn and Memory* 119: 52–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.012>

26. *Vanvossen AC, Portes MAM, Scoz-Silva R, Reichmann HB, Stern CAJ, Bertoglio LJ* (2017) Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 137: 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.002>
27. *Brivio P, Gallo MT, Karel P, Cogi G, Fumagalli F, Homberg JR, Calabrese F* (2022) Alterations of mitochondrial dynamics in serotonin transporter knockout rats: A possible role in the fear extinction recall mechanisms. *Front Behav Neurosci* 16: 957702. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.957702>
28. *Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A.* (2007) Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12312–12317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703944104>
29. *Smith JCE, Whitton PS* (2000) Nitric oxide modulates N-methyl-d-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Letters* 29: 5–8.

### **Influence of NO Synthase Inhibitors on Serotonin Release in the Medial Prefrontal Cortex during the Formation and Generalization of the Conditioned Fear Response in Rats**

**N. B. Saulskaya<sup>a,\*</sup>, M. A. Susorova<sup>a</sup>, and N. A. Trofimova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

*\*e-mail: saulskayanb@infran.ru*

Serotonergic and nitrenergic systems of the medial prefrontal cortex (mPFC) are involved in the control of fear generalization, but their local interaction during this function has been little studied. The aim of the work was to study the effect of blockade of endogenous nitrenergic signals on serotonin release in the mPFC during the acquisition of a conditioned fear response (CFR – a fear model) and on the dynamics of its generalization. In male Sprague–Dawley rats using intracranial microdialysis *in vivo* and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, we found that the intra-mPFC infusion through the dialysis probe of the NO synthase inhibitor *N*- $\omega$ -nitro-*L*-arginine (NA, 0.5 mM) and selective neuronal NO synthase inhibitor *N*- $\omega$ -propyl-*L*-arginine (NPLA, 2mM) decreased the basal level of extracellular serotonin in the mPFC and reduced its rise, caused by the CFR acquisition (a paired presentation of a conditioned cue (CS+) and inescapable footshock). The intra-mPFC infusion of NA and NPLA increased animals' freezing to a differential cue (CS–) not associated with footshock, during the first test, carried out 70 minutes after the CFR acquisition, but reduced it during repeated testing a day after the infusion, without changing freezing of the same animals to the potentially dangerous CS+. The data obtained indicate the involvement of endogenous NO in the activation of serotonin release in the mPFC, caused by the CFR acquisition. In addition, they show that the blockade of endogenous nitrenergic signals of the mPFC, which enhances the initial generalization of the fear reaction, contributes to the extinction of the generalized fear, possibly due to inhibition of the serotonin release in the mPFC.

**Keywords:** medial prefrontal cortex, *in vivo* intracranial microdialysis, serotonin release, NO-serotonin interaction, fear generalization