

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 2
февраль
2024



НАУКА
— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные статьи

- Временная шкала адаптации при обработке звуковых последовательностей нейронами первичной слуховой коры бодрствующих мышей (*Mus musculus*)
М. А. Егорова, А. Г. Акимов, Г. Д. Хорунжий 157
- Влияние генно-инженерных препаратов на течение асептического некроза головки бедренной кости у крыс
Н. А. Шабалдин, А. В. Синицкая, Л. Н. Игишева, Л. А. Богданов, А. В. Шабалдин 169
- Обнаружение ломбардной речи дикторов разного пола при пространственном разделении источников целевого сигнала и шума
И. Г. Андреева, А. М. Луничкин, Е. А. Огородникова 185
- Продомен BDNF тормозит квантовую секрецию медиатора в моторных синапсах мышцы при участии сортилина и аденозиновых A1-рецепторов
А. И. Молчанова, О. П. Балезина, А. Е. Гайдуков 196
- Микроинъекции раствора хлорида кобальта в инфралимбическую кору подавляют реакции систем кровообращения и дыхания анестезированной крысы на микроэлектростимуляцию латеральной орбитальной коры
Е. А. Губаревич, Т. Н. Кокурина, Г. И. Рыбакова, Т. С. Туманова, В. Г. Александров 216
- Способы оценки диастолической упругости левого желудочка
В. И. Капелько, В. Л. Лакомкин, А. А. Абрамов, А. В. Просвирнин 230
- Влияние длительной социальной изоляции на поведение и дофаминовую систему мозга у мышей
Д. В. Базовкина, У. С. Устинова, С. Н. Адонина, П. Д. Комлева, А. Б. Арефьева, Е. А. Куликова 238
- Влияние приема фосфолипидов на формирование поведенческих характеристик у лабораторных мышей C57BL/6J
Л. В. Болдырева, М. В. Морозова, К. С. Павлов, Е. Н. Кожевникова 254
- Особенности реакций на стресс у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения после светового десинхроноза и физической нагрузки
Т. А. Томова, А. А. Гостюхина, Т. А. Замощина, М. В. Светлик, Н. Д. Блажко, Е. В. Медведева, С. А. Огородников, В. В. Ярцев, К. В. Зайцев 268
- Изменения состояния внеклеточного матрикса в скелетной мышце человека в условиях хронического нарушения сознания
К. А. Зарипова, С. А. Тыганов, О. В. Туртикова, Е. Н. Скитева, Ю. М. Забродская, С. А. Кондратьев, Е. А. Кондратьева, А. Н. Кондратьев, Б. С. Шенкман 283
-
-

CONTENTS

Reviews

Time Scale of Adaptation at the Tonal Sequence Processing in the Awake Mice Auditory Cortex Neurons <i>M. A. Egorova, A. G. Akimov, and G. D. Khorunzhii</i>	157
Effect of Genetically Engineered Drugs in Aseptic Necrosis of the Femoral Head in Rats <i>N. A. Shabaldin, A. V. Sinitskaya, L. N. Igisheva, L. A. Bogdanov, and A. V. Shabaldin</i>	169
Lombard Speech Detection in Case of Spatial Separation Between Noise Source and Talkers of Different Genders <i>I. G. Andreeva, A. M. Lunichkin, and E. A. Ogorodnikova</i>	185
BDNF Prodomain Inhibits Neurotransmitter Quantal Release in Mouse Motor Synapses with the Necessary Participation of Sortilin and Adenosine A1-Receptors <i>A. I. Molchanova, O. P. Balezina, and A. E. Gaydukov</i>	196
Cobalt Microinjections into the Infralimbic Cortex of the Anesthetized Rat Suppresses Circulatory and Respiratory Reactions to the Microelectrostimulation of the Lateral Orbital Cortex <i>E. A. Gubarevich, T. H. Kokurina, G. I. Rybakova, T. S. Tumanova, and V. G. Aleksandrov</i>	216
Methods for Assessing the Diastolic Distensibility of the Left Ventricle <i>V. I. Kapelko, V. L. Lakomkin, A. A. Abramov, and A. V. Prosvirnin</i>	230
Influence of Long-Term Social Isolation on the Behavior and Dopamine System of the Brain in Mice <i>D. V. Bazovkina, U. S. Ustinova, S. N. Adonina, P. D. Komleva, A. B. Arefieva, and E. A. Kulikova</i>	238
Effect of Dietary Phospholipid on the Behavior in C57BL/6J Mice <i>L. V. Boldyreva, M. V. Morozova, K. S. Pavlov, and E. N. Kozhevnikova</i>	254
Features of Reactions to Stress in Rats with Passive-Defense Behavior after Light Desynchronization and Physical Activity <i>T. A. Tomova, A. A. Gostyukhina, T. A. Zamoshchina, M. V. Svetlik, N. D. Blazhko, E. V. Medvedeva, S. A. Ogorodnikov, V. V. Yartsev, and K. V. Zaitsev</i>	268
Desmin Degradation in the Skeletal Muscle of Patients with Chronic Critical Illness <i>K. A. Zaripova, S. A. Tyganov, O. V. Turtikova, E. N. Skiteva, Y. M. Zabrodskaya, S. A. Kondratiev, E. A. Kondratieva, A. N. Kondratiev, and B. S. Shenkman</i>	283

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВРЕМЕННАЯ ШКАЛА АДАПТАЦИИ ПРИ ОБРАБОТКЕ
ЗВУКОВЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НЕЙРОНАМИ ПЕРВИЧНОЙ
СЛУХОВОЙ КОРЫ БОДРСТВУЮЩИХ МЫШЕЙ (*MUS MUSCULUS*)**

© 2024 г. М. А. Егорова^{1,*}, А. Г. Акимов¹, Г. Д. Хорунжий¹

*¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ema6913@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

Впервые исследовали постстимульную слуховую адаптацию нейронов первичных полей слуховой коры у бодрствующих домашних мышей к звуковым последовательностям, образованным четырьмя 100-миллисекундными тональными сигналами, частота которых соответствовала характеристической частоте нейрона, интервал между тональными составляющими одной последовательности был одинаков, а в разных последовательностях варьировал от 0 до 2000 мс. Анализ полученных результатов продемонстрировал эффект адаптации в ответах подавляющего большинства исследованных нейронов, выражавшийся в отсутствие активности или значительном снижении активности, вызванной следующими за первым компонентами серии звуков, при межстимульных интервалах 0–500 мс. Количественная оценка проявления адаптации в зависимости от величины межстимульных интервалов в последовательности тонов по всей популяции исследуемых нейронов выявила сходство временных шкал адаптации бодрствующих и наркотизированных мышей.

Ключевые слова: слух, первичная слуховая кора, бодрствующие мыши, стимул-специфическая слуховая адаптация, одиночные нейроны

DOI: 10.31857/S0869813924020016, **EDN:** DKEXFV

ВВЕДЕНИЕ

Первое описание явления адаптации в слуховой системе выполнено Adrian почти 100 лет назад [1]. В контексте нейрофизиологии слуха адаптацию принято рассматривать как свойство слуховых нейронов, которое в классическом понимании проявляется в уменьшении нейронального ответа или частоты разрядов при повторяющейся стимуляции идентичными звуками [2]. Несмотря на то, что физиологические исследования адаптации проводятся на протяжении более чем восьми десятилетий, известные на сегодняшний день сведения о ее нейрофизиологических механизмах и функциональной значимости не позволяют дать их систематическое и непротиворечивое описание. Одной из важнейших задач остается изучение роли слуховой адаптации в обработке звуковых последовательностей. Результаты нейрофизиологических исследований постстимульной адаптации, выполненных ранее [3–5], указывают на ее вовлеченность как в разделение, так и в связывание во времени слуховых событий [3–5]. Это

может относиться к анализу временных интервалов между звуковыми событиями, имеющими значение для восприятия речи у человека и видоспецифических вокализаций у животных. Известно, что восприятие временного контекста сигналов (группирование и разделение последовательных звуковых компонентов) облегчает их понимание и развитие специфических поведенческих ответов [6–9]. Исследование роли адаптации в группировании и разделении звуковых событий одиночными слуховыми нейронами было начато относительно недавно [10–16]. Для решения этой проблемы принципиальным представляется выполнение временного шкалирования нейрональной адаптации на различных иерархических уровнях слуховой системы – от ствола мозга до слуховой области коры включительно. Такие исследования выполнены нами на нейронах центрального ядра заднего холма среднего мозга [17–19] и первичных полей слуховой коры [20] наркотизированных мышей. Полученные данные показали, что нейрональная слуховая адаптация участвует во временном кодировании последовательностей акустических коммуникационных сигналов, т.е. в группировании звуковых последовательностей в единое слуховое событие и разделении их во времени [17, 20]. Обнаруженные нами различия во временных параметрах адаптации нейронов слухового центра среднего мозга и слуховой коры наркотизированных животных обосновали необходимость сравнения временных окон адаптации у наркотизированных и бодрствующих мышей. Особую актуальность приобрело изучение реакций корковых нейронов на последовательности звуков у бодрствующих животных в связи с показанным преимущественным влиянием анестезии на механизмы временной обработки звуков в слуховой коре [21, 22].

В настоящей работе впервые представлены данные о временных характеристиках постстимульной адаптации одиночных нейронов первичной слуховой области коры бодрствующей домово́й мыши (*Mus musculus*) при обработке моделей коммуникационного сигнала мышей – крика дискомфорта мышат.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе внеклеточно регистрировали импульсную активность одиночных нейронов первичного (A1) и переднего (AAF) полей слуховой коры у 13 домовых мышей *Mus musculus*, самок гибридов F1 линий СВА и С57BL/6 в возрасте 8–15 недель, находящихся в состоянии бодрствования. Для хирургического открытия доступа к слуховой области коры левого полушария перед началом операции животное наркотизировали внутривенной инъекцией смеси кетамина (кетавет, 35 мг/кг) и ксилазина (ромпун, 0.1 мг/кг). Мышь находилась в условиях поверхностной анестезии примерно 20–30 мин, в течение которых выполняли трепанацию черепа. Для жесткого крепления животного в головодержателе к фронтальным костям черепа прикрепляли металлический брусок длиной 1.5 см с помощью циано-акрилатного клея (UHU GmbH) и зубного цемента (Technovit 3040). Фиксацию головы в головодержателе всегда осуществляли таким образом, чтобы обеспечить горизонтальное расположение дорсальной поверхности мозга. Над областью мозга, соответствующей локализации слуховой коры левого полушария, удаляли кожу и мышцы и высверливали отверстие в теменной кости черепа. Твердую мозговую оболочку оставляли сохранной. На поверхность мозга наносили небольшое количество теплого силикона (несколько капель).

Мышь располагалась в узком цилиндре, ограничивающем движения животного. Он был изготовлен из пластиковой трубки длиной 11 см с внутренним диаметром 2 см. Изнутри цилиндр был выстлан мягкой тканью. Эксперименты начинали спустя час после введения наркоза, когда животное начинало активно двигать хвостом. Наступление бодрствующего состояния определяли также по повышению частоты спонтанной импульсации нейронов. Продолжительность экспериментов составляла 5–6 ч. По

окончании эксперимента на поверхность мозга наносили левомеколь и животное использовали в эксперименте повторно на следующий день.

В качестве стимулов использовали серии звуков, состоящие из четырех 100-миллисекундных тональных сигналов, включая время нарастания и спада по 5 мс. Частота тональных компонентов соответствовала характеристической частоте данного нейрона, а их уровень составлял 40 дБ над порогом ответа нейрона, будучи подобран таким образом, чтобы вызвать оптимальный ответ большинства нейронов слуховой коры [23]. Интервал между тональными компонентами одной серии был одинаков, а в различных сериях варьировал от 0 до 2000 мс. Ответы нейронов на тональные последовательности регистрировали при межстимульных интервалах, равных 0, 2, 4, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 700, 1000, 1500 и 2000 мс. Каждую серию предъявляли 20 раз с интервалом в 2 с. Подбор параметров серий стимулов и межстимульных интервалов был произведен с учетом результатов психофизического исследования взаимосвязи звукоизлучения и восприятия последовательностей коммуникационного сигнала мышей – крика дискомфорта мышат [9, 24]. В этих работах показано, что в естественных условиях мышата излучают крик дискомфорта преимущественно в виде серий из двух – пяти стимулов с межстимульными интервалами 100–400 мс, при этом мышаматери воспринимают естественный крик и его модели как значимые, если они следуют сериями из четырех сигналов с интервалами 100–400 мс.

Генерация серий звуковых сигналов осуществлялась при помощи цифро-аналогового преобразования D/A конвертером платы TMS320C30, встроенной в PC (тактовая частота 200 кГц, разрешение по амплитуде 16 бит, программа TMS2016, Германия). После усиления (усилитель Amphyton 25U-002C; PO Lorta) сигналы поступали на звукоизлучатель Sonotrack (Metris, Голландия). Неравномерность частотной характеристики излучателя составляла ± 5 дБ в диапазоне частот 3–65 кГц. Излучатель был расположен контралатерально стороне регистрации импульсной активности на уровне головы животного, на расстоянии 60 см под углом 45° справа относительно средне-сагиттальной плоскости. Уровни звукового давления сигналов (УЗД, дБ над 20 мкПа) измеряли в точке расположения ушной раковины животного с помощью системы Брюль & Кьер: 6.5 мм микрофона 4135, предусилителя 2633 и измерительного усилителя 2606. При максимальных значениях используемых сигналов (105 дБ УЗД) уровень основной частоты по крайней мере на 35 дБ (а, как правило, более чем на 50 дБ) превышал уровень продуктов искажений. Контроль частотных характеристик сигналов осуществлялся с помощью программы спектрального анализа акустических сигналов “Waterfall” и интерфейсной системы CED1401plus либо ЦАП-АЦП системой Ronald UA-55 Quad-Capture, программа «Cool Edit Pro 2.0».

Парные вольфрамовые изолированные лаком микроэлектроды с сопротивлением кончиков 2–3 МОм и расстоянием между ними 125 мкм (World precision instruments Inc., WPI, США) вводили ортогонально поверхности мозга в каудальную часть височной коры левого полушария, соответствующую расположению слуховой коры мыши [25]. Индифферентный вольфрамовый электрод жестко фиксировали на поверхности мозга животного при помощи зубного цемента (Technovit 3040), который наносили на кости черепа. Дифференциальную регистрацию ответов нейронов производили на глубине 300–600 мкм, что соответствовало расположению III–V слоев коры. Ответы нейронов усиливали в 10000 раз (усилитель биопотенциалов DAM80, WPI, Германия, полоса пропускания 0.3–10 кГц) и выводили параллельно на осциллограф (Tectronix 5A14N, США), громкоговоритель и оконный дискриминатор (model 120, WPI, Германия) для дальнейшей регистрации в форме стандартных импульсов и введения в компьютер для «on-line» и «off-line» анализа.

На протяжении эксперимента бодрствующее животное находилось в звукозаглушенной анэноидной камере. Эксперимент начинали с аудиовизуального определения характеристической частоты выделенного нейрона и порога его ответа на тон характе-

ристической частоты. В качестве поисковых стимулов использовали тональные сигналы длительностью 100 мс, временем нарастания и спада по 5 мс.

Для выделения активности одиночных нейронов и «off-line» анализа основных характеристик ответов нейронов (перистимульных гистограмм и величины ответов) импульсную активность нейронов оцифровывали с помощью интерфейса CED1401plus (Loughborough Sound Images Ltd, Великобритания) и записывали на PC (программа Spike2).

Ввиду выраженности у мышей индивидуальных топографических различий в локализации полей слуховой коры для определения их границ выполняли морфологическое картирование локализации первичных и вторичных полей. Оно осуществлялось под визуальным контролем расположения электрода на поверхности коры. Принадлежность нейронов к первичным или вторичным слуховым полям определялась также на основе специфики их импульсной активности, различающейся среди нейронов первичных и вторичных полей у всех исследованных млекопитающих. Основным критерием локализации полей A1 и AAF служило наличие в этих структурах тонопической организации с градиентом частот по rostro-каудальной оси, показанное в работе Stiebler и соавт. [25]. В поле A1 характеристические частоты нейронов убывали в rostro-каудальном направлении, в поле AAF порядок частот инвертировался, т.е. они возрастали в rostro-каудальном направлении.

Измерения производили во всем частотном диапазоне слуховой чувствительности мыши (3–60 кГц) и при уровнях сигнала от пороговых до 50 дБ над порогом ответа нейрона (что соответствует диапазону от 0 до 90 дБ УЗД).

При обработке данных подсчитывали число спайков во временном интервале действия каждого из четырех тональных сигналов, составляющих серию. Оценку временной динамики адаптации выполняли путем построения зависимости числа спайков в ответе нейрона от интервала между сигналами (кривые восстановления ответа). При статистической обработке данных использовали пакет программ Sigma Plot 11.0 (ANOVA on ranks, Dunn's test, $p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подавляющее большинство исследованных нейронов (80%) отличалось спонтанной активностью, частота которой существенно варьировала у разных нейронов (0.4–50 спайк/с). При предъявлении тональных звуковых стимулов характер спонтанной активности изменялся мало. Спонтанная активность в таком случае накладывалась на активность, вызванную звуковыми сигналами. Выраженная спонтанная импульсация нейронов делала весьма затруднительным точное определение их характеристических частот и порогов ответов. Точность определения характеристических частот не превышала единиц кГц, а точность порогов – 5 дБ. Оценка временных характеристик адаптации была выполнена для 46 нейронов с характеристическими частотами от 4 до 20 кГц. Пороги ответов на сигналы ХЧ располагались в диапазоне 0–50 дБ УЗД. Все исследованные нейроны имели фазный или пачечный паттерны ответа.

Эффект адаптации наблюдали в ответах 39 нейронов первичной слуховой коры из 46. Как правило, он был выражен в отсутствие активности или значительном снижении активности, вызванной следующими за первым компонентами серии звуков при интервалах между ними от 0 до 50 мс (рис. 1). В ответах семи нейронов проявлений адаптации не было. Нормированные функции восстановления от адаптации ответов на 2-й, 3-й и 4-й сигналы в серии возрастали с увеличением межстимульного интервала вплоть до полного восстановления ответа (рис. 1). Однако это возрастание не всегда было монотонным.

У разных нейронов восстановление ответов начиналось при различных межстимульных интервалах (10–50 мс; рис. 1). У большей части из них порог восстановления ответа составлял 20 мс, что продемонстрировано ответами нейрона на рис. 1а.

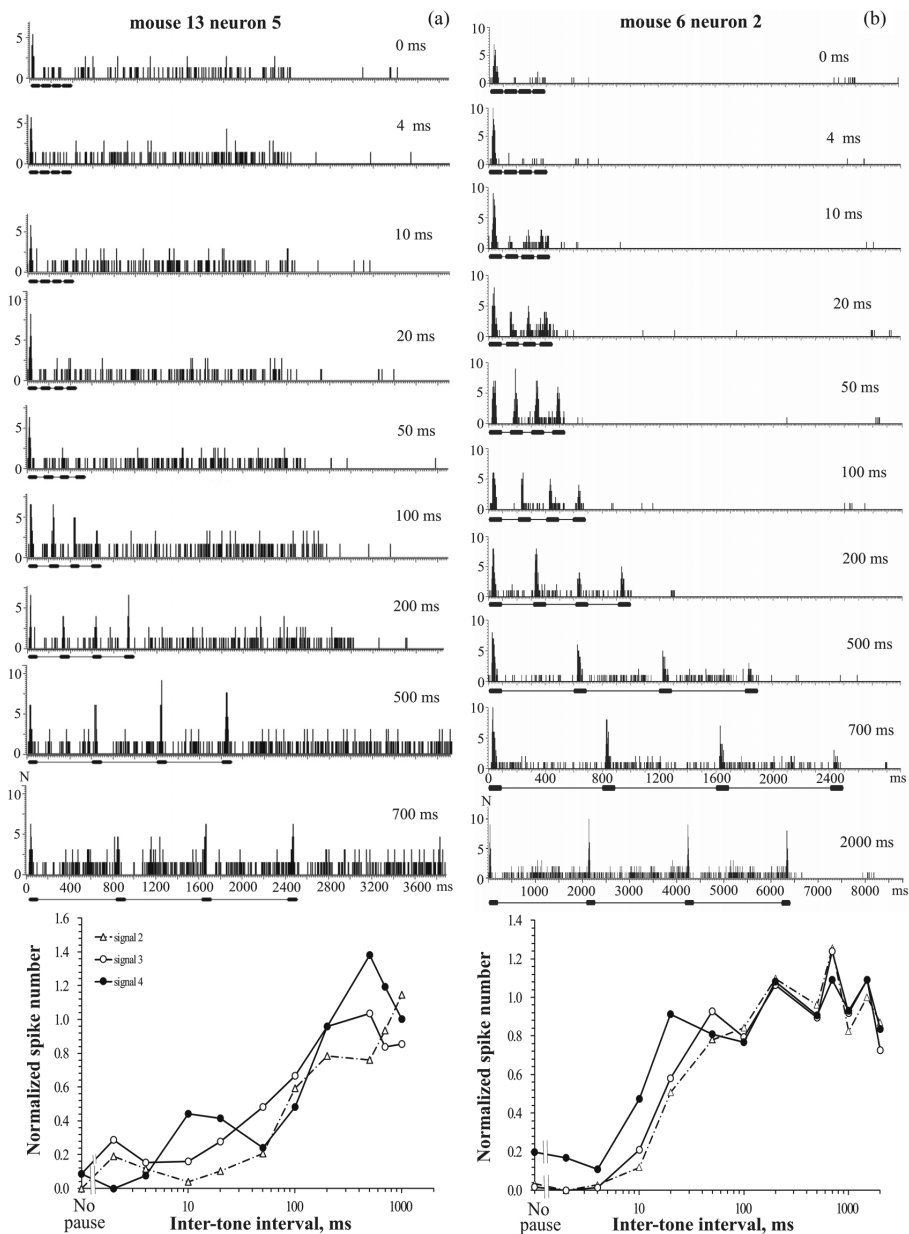


Рис. 1. Примеры активности двух нейронов слуховой коры бодрствующей мыши с различной временной динамикой адаптации (а, б). В верхней части рисунка – перистимульные гистограммы ответов нейронов, вызванных сериями тонов с различными межстимульными интервалами. Значение межстимульного интервала для каждой серии указано цифрами на диаграмме. Число повторения сигналов – 20. Величина бина – 2 мс. Абсцисса – время, мс. Ордината – число спайков, N. Под каждой гистограммой приведена отметка стимула, представляющего собой серию из 4 тонов длительностью 100 мс каждый. В нижней части рисунка – зависимость величины ответа этих же нейронов на 2-й, 3-й и 4-й сигналы серии от межимпульсного интервала (кривые восстановления ответов). Величина ответа нейрона на 2–4-й сигнал серии (число спайков) нормирована относительно его ответа на 1-й сигнал, т. е. равна отношению числа спайков в ответе нейрона на соответствующий сигнал к числу спайков в ответе на 1-й сигнал.

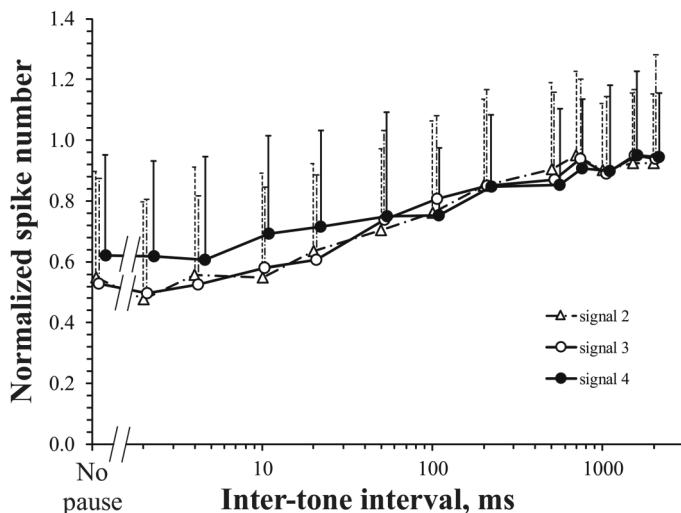


Рис. 2. Нормированные функции восстановления ответов на 2-й, 3-й и 4-й сигналы серии, усредненные по 39 нейронам. Указаны стандартные отклонения средних величин ответов нейронов на соответствующие тоны серии. Остальные обозначения – как на рис. 1.

Ответы нейрона, представленного на рис. 1b, на 2–4-й сигналы серии при межстимульных интервалах 0–4 мс были полностью подавлены. Порог восстановления ответа у этого нейрона составлял 10 мс. Полное восстановление ответов этих двух нейронов, когда их величина не отличалась от ответа на первый тон серии (т.е. на нормированных кривых не отличалась от 1), наблюдали при интервалах 200 мс между компонентами тестовой серии. При этом, ввиду возникновения небольшого тонического компонента в ответе нейрона на рис. 1b, на перистимульных гистограммах его ответов это не столь наглядно. В целом, у исследованных нейронов величина межстимульного интервала, при котором было отмечено полное восстановление ответов, составляла от 200 до 500 мс.

Усредненные по всем 39 нейронам кривые восстановления ответа были монотонными (рис. 2). Статистический анализ временной динамики адаптации исследованных нейронов показал, что с высокой степенью вероятности при межстимульных интервалах 0–100 мс их ответ на первый сигнал серии был больше ответов на 2-й, 3-й и 4-й сигналы (ANOVA on ranks, Dunn's test, $p < 0.01$). При возрастании интервала между тональными компонентами до 200 мс уровень значимости различий становился ниже ($p < 0.05$). По достижении межстимульного интервала 500 мс достоверные различия сохранялись только между ответами на первый сигнал в серии, с одной стороны, и третий и четвертый, с другой ($p < 0.05$). Начиная с межстимульного интервала 700 мс, ответы нейронов на все сигналы серии достоверно не различались. Таким образом, во временном интервале от 0 до 200–500 мс наблюдалось явление адаптации активности исследуемых нейронов к повторяющимся сигналам, выражающееся в снижении ответов нейрона на сигналы, следующие за первым сигналом в серии. Между собой ответы на 2-й, 3-й и 4-й сигналы в серии не различались. Однако наблюдалась тенденция к уменьшению глубины адаптации в ответах на четвертый сигнал в серии по сравнению с ответами на второй и третий сигналы при малых межстимульных интервалах (0–20 мс).

Ответы восьми нейронов на звуковые последовательности были зарегистрированы при околопороговых уровнях сигналов (5–10 дБ над порогом ответа; рис. 3). Нейро-

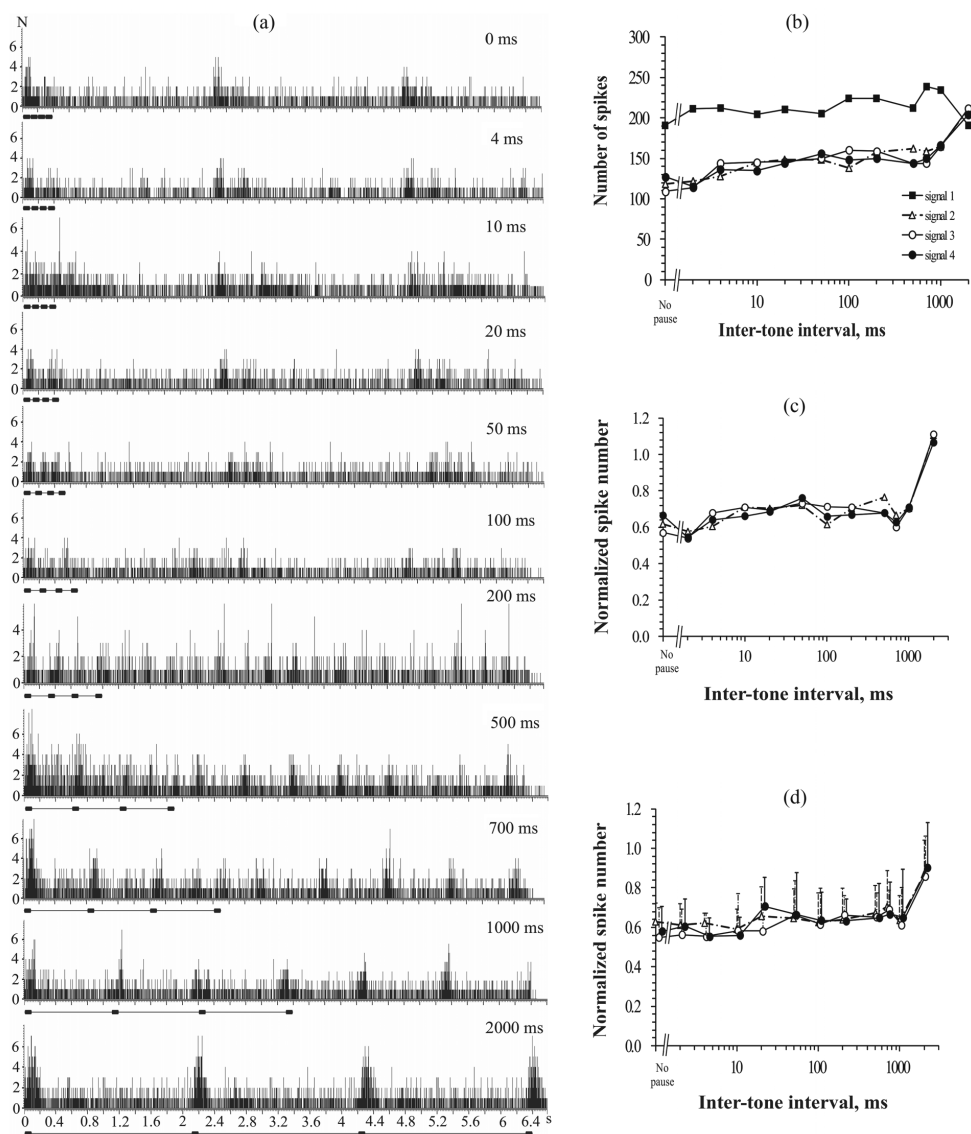


Рис. 3. Временная динамика адаптации к сериям сигналов околопороговых уровней. (а) – Перистимульные гистограммы ответов одиночного нейрона, вызванных сериями тонов с различными межстимульными интервалами. Значение межстимульного интервала для каждой серии указано цифрами на диаграмме. Число повторения сигналов – 20. Величина бина – 2 мс. Временное окно анализа данных – 6.4 с. Абсцисса – время, с. Ордината – число спайков, N. Под каждой гистограммой приведена отметка стимула, представляющего собой серию из 4 тонов длительностью 100 мс каждый. (б) – Зависимость числа спайков в ответе одиночного нейрона на 1-й, 2-й, 3-й и 4-й сигналы серии от межстимульного интервала. Абсцисса – время, мс. Ордината – число спайков, N. (с) – Нормированные функции восстановления ответов одиночного нейрона на 2-й, 3-й и 4-й сигналы серии; (д) – Нормированные функции восстановления ответов на 2-й, 3-й и 4-й сигналы серии, усредненные по 8 нейронам. Указаны стандартные отклонения средних величин ответов нейронов на соответствующие тоны серии. Остальные обозначения – как на рис. 1.

ны отличались высокой спонтанной активностью, что нашло отражение в перистимульных гистограммах ответов и в расположении кривых освобождения от адаптации высоко над осью абсцисс, т.е. в малой глубине адаптации. Адаптация была выражена в ответах всех нейронов. Примечательно, что порог восстановления и полное восстановление от адаптации были смещены в область больших межстимульных интервалов – более 1000 мс, что видно как на кривых восстановления от адаптации одиночного нейрона (рис. 3b–c), так и на усредненной кривой (рис. 3d). Статистический анализ показал, что ответ на первый сигнал серии достоверно превышал ответы на 2-й, 3-й и 4-й сигналы при межстимульных интервалах 0–1000 мс (ANOVA on ranks, Dunn's test, $p < 0.05$). При межстимульном интервале 2000 мс ответы полностью восстанавливались от адаптации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты продемонстрировали эффект адаптации в ответах на звуковые последовательности у подавляющего большинства исследованных нейронов (85%). Возможно, ее проявления нельзя было отследить у оставшихся семи нейронов в силу их высокой и нерегулярной (залповой) спонтанной активности. Опять же по причине высокой спонтанной активности функции восстановления ответа не всегда были монотонны. Спонтанная активность и ответы нейронов на последовательности стимулов носили конкурентный характер: нейрон либо генерировал залп спонтанной активности, либо отвечал на предъявляемый стимул.

Временной диапазон проявления адаптации к серии сигналов на уровне популяции нейронов первичной слуховой коры бодрствующей мыши (до 200–500 мс) соответствовал временному диапазону интервалов (100–400 мс) в серии криков дискомфорта мышат, важному для запуска материнского поведения [9], что мы рассматриваем как доказательство вклада нейрональной адаптации в обработку коммуникационных сигналов.

Как мы указывали ранее [20], выраженность эффекта адаптации практически у всех исследованных нейронов была обусловлена, по-видимому, особенностями разрядов корковых нейронов, имеющих только фазные компоненты ответов (фазные и пачечные разряды). Показанные нами ранее немонотонные функции восстановления ответа от адаптации у трети популяции нейронов слухового центра среднего мозга [17, 18] были непосредственно связаны с наличием поздних компонентов в их ответах (тонические, фазно-тонические, паузные, позднелатентные разряды). При коротких межимпульсных интервалах окончание позднего компонента ответа или off-ответ на предыдущий сигнал у таких нейронов суммировалось с on-ответом на последующий сигнал, маскируя таким образом проявление адаптации.

Полученные в нашей работе временные характеристики адаптации нейронов первичной слуховой коры у бодрствующих мышей демонстрируют сходство с результатами исследований наркотизированных мышей [20]. В отличие от наркотизированных, у бодрствующих мышей наблюдалась лишь тенденция к уменьшению диапазона проявления адаптации до 200 мс. В выполненной ранее работе [26] при сравнении эффектов стимул-специфической адаптации нейронов центрального ядра заднего холма среднего мозга у наркотизированных и бодрствующих мышей различий временных шкал также обнаружено не было. В то же время временной диапазон стимул-специфической адаптации нейронов слуховой коры наркотизированных и бодрствующих крыс различался. У наркотизированных крыс он достигал 100–200 мс [27], у бодрствующих крыс эта величина составляла 50 мс [28, 29].

Временные шкалы адаптации, определенные для нейронов центрального ядра задних холмов и первичной слуховой коры, были различны. У нейронов слухового центра среднего мозга анестезированных мышей восстановление ответа от адаптации

начиналось при межстимульных интервалах 4–50 мс [17, 18]. Восстановление ответа до уровня ответа на первый тон серии мы отмечали, как правило, при интервалах 200–700 мс, причем у 90% нейронов ответ восстанавливался при межстимульных интервалах до 500 мс включительно. Пороги освобождения от адаптации в реакциях корковых нейронов были сдвинуты в область больших межстимульных интервалов и составляли 10–50 мс. В то же время, в среднем, как в популяции нейронов центрального ядра заднего холма, так и в первичной слуховой коре диапазон проявления адаптации составлял 0–500 мс.

Обнаруженная нами вариативность индивидуальных временных шкал адаптации отдельных нейронов может быть принципиальным фактором для формирования оптимальных временных окон при анализе группирования и разделения звуковых событий, важных для восприятия не только биоакустических сигналов у животных, но и речи у человека.

Выполненное впервые в настоящей работе исследование ответов нейронов слуховой коры бодрствующих мышей на серии сигналов околопороговых уровней обнаружило интересный факт отсутствия восстановления от адаптации в широком диапазоне межстимульных интервалов (вплоть до 2000 мс). Иными словами, порог восстановления от адаптации был сдвинут в область больших межстимульных интервалов (1000 мс). При этом сам эффект адаптации был четко выражен и синхронен для 2- – 4-го сигналов в серии. Такой эффект может служить механизмом, направленным на обнаружение тихих звуковых последовательностей путем аккумуляции энергии компонентов последовательностей и восприятия их как единого акустического события. При этом различие компонентов последовательностей ухудшается. Очевидно, что этот феномен может лежать в основе ухудшения разборчивости тихой речи [30, 31]. В зрительной системе аналогичную задачу, по-видимому, выполняет темновая адаптация, при которой пороги обнаружения слабых зрительных стимулов понижаются ценой ухудшения пространственного разрешения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные демонстрируют проявления эффекта постстимульной адаптации в реакциях подавляющего большинства нейронов первичной слуховой коры бодрствующих мышей, вызванных сериями идентичных сигналов, имитирующих последовательности криков дискомфорта мышат. Временная динамика проявления адаптации к серии сигналов на уровне популяции нейронов первичной слуховой коры бодрствующих мышей и мышей в состоянии анестезии единообразна и в целом соответствует временному диапазону интервалов (100–400 мс) в серии криков дискомфорта мышат, важному для запуска оптимального материнского поведения, что является одним из доказательств участия нейрональной адаптации в обработке последовательностей коммуникационных сигналов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

М. А. Е. – идея работы, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование рукописи. Г. А. А. – проведение экспериментов, статистический анализ данных. Г. Д. Х. – первичная обработка результатов экспериментов, подготовка иллюстраций и оформление рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00074, <https://rscf.ru/project/23-25-00074/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол № 1-2 от 26.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет потенциальных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adrian ED* (1928) The basis of sensation. New York. W.W. Norton.
2. *Бибиков НГ* (2010) Нейрофизиологические механизмы слуховой адаптации. II. Эффекты последействия. Успехи физиол. наук 41(4): 77–92. [Bibikov NG (2010) Neurophysiological mechanisms of auditory adaptation. II. Aftereffects. *Advanc Physiol Sci* 41(4): 77–92. (In Russ)].
3. *Ulanovsky N, Las L, Farkas D, Nelken I* (2004) Multiple time scales of adaptation in auditory cortex neurons. *J Neurosci* 24(46): 10440–10453.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1905-04.2004>
4. *Malmierca MS, Sanchez-Vives MV, Escera C, Bendixen A* (2014) Neuronal adaptation, novelty detection and regularity encoding in audition. *Front Syst Neurosci* 8: 111.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00111>
5. *Valdés-Baizabal C, Carbajal GV, Pérez-González D, Malmierca MS* (2020) Dopamine modulates subcortical responses to surprising sounds. *PLoS Biol* 18(10): e3000744.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000984>
6. *Bregman AS* (1990) Auditory scene analysis. The Perceptual Organization of Sound. Cambridge. MA. MIT Press.
7. *MacDougall-Shackleton SA, Hulse SH, Gentner TQ, White W* (1998) Auditory scene analysis by European starlings (*Sturnus vulgaris*): Perceptual segregation of tone sequences. *J Acoust Soc Am* 103(6): 3581–3587.
<https://doi.org/10.1121/1.423063>
8. *Kanwal JS, Medvedev AV, Micheyl C* (2003) Neurodynamics for auditory stream segregation: tracking sounds in the mustached bat's natural environment. *Network* 14(3): 413–435.
https://doi.org/10.1088/0954-898X_14_3_303
9. *Gaub S, Ehret G* (2005) Grouping in auditory temporal perception and vocal production is mutually adapted: the case of wriggling calls of mice. *J Comp Physiol A* 191: 1131–1135.
<https://doi.org/10.1007/s00359-005-0036-y>
10. *Pérez-González D, Malmierca MS, Covey E* (2005) Novelty detector neurons in the mammalian auditory midbrain. *Europ J Neurosci* 22(11): 2879–2885.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04472.x>
11. *Pérez-González D, Hernández O, Covey E, Malmierca MS* (2012) GABAA-mediated inhibition modulates stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus. *PLoS One* 7(3): e34297.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034297>
12. *Anderson LA, Malmierca MS* (2012) The effect of auditory cortex deactivation on stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the rat. *Eur J Neurosci* 37(1): 52–62.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12018>
13. *Malmierca MS, Cristaudo S, Pérez-González D, Covey E* (2009) Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the anesthetized rat. *J Neurosci* 29(17): 5483–5493.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4153-08.2009>
14. *Valdés-Baizabal C, Casado-Román L, Bartlett EL, Malmierca MS* (2021) In vivo whole-cell recordings of stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus. *Hear Res* 399: 107978.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107978>
15. *Anderson LA, Christianson GB, Linden JF* (2009) Stimulus-specific adaptation occurs in the auditory thalamus. *J Neurosci* 29(22): 7359–7363.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0793-09.2009>
16. *Antunes FM, Malmierca MS* (2011) Effect of auditory cortex deactivation on stimulus-specific adaptation in the medial geniculate body. *J Neurosci* 31(47): 17306–17316.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1915-11.2011>
17. *Malinina ES, Egorova MA, Khorunzhi GD, Akimov AG* (2016) The time scale of adaptation in tonal sequence processing by the mouse auditory midbrain neurons. *Dokl Biol Sci* 470: 209–213.
<https://doi.org/10.1134/S001249661605001X>

18. Egorova MA, Malinina ES, Akimov AG, Khorunzhii GD (2018) Adaptation of different types of neurons in the midbrain auditory center to sound pulse sequences. *J Evol Biochem Physiol* 54(6): 482–486.
<https://doi.org/10.1134/S002209301806008X>
19. Egorova MA, Akimov AG (2020) Specialization of neurons with different response patterns in the mouse *Mus musculus* auditory midbrain and primary auditory cortex during communication call processing. *J Evol Biochem Physiol* 56: 406–414.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050038>
20. Egorova MA, Khorunzhii GD, Akimov AG (2019) The timescale of adaptation in tonal sequence processing by mouse primary auditory cortical neurons. *J Evol Biochem Physiol* 55: 497–501.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060085>
21. Joachimsthaler B, Uhlmann M, Miller F, Ehret G, Kurt S (2014) Quantitative analysis of neuronal response properties in primary and higher-order auditory cortical fields of awake house mice (*Mus musculus*). *Eur J Neurosci* 39(6): 904–918.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12478>
22. Joachimsthaler B, Brugger D, Skodras A, Schwarz C (2015) Spine loss in primary somatosensory cortex during trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 35(9): 3772–3781.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2043-14.2015>
23. Egorova MA (2005) Frequency selectivity of neurons of the primary auditory field (A1) and anterior auditory field (AAF) in the auditory cortex of the house mouse (*Mus musculus*). *J Evol Biochem Physiol* 41: 476–480.
<https://doi.org/10.1007/s10893-005-0085-4>
24. Ehret G, Riecke S (2002) Mice and humans perceive multiharmonic communication sounds in the same way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 479–482.
<https://doi.org/10.1073/pnas.012361999>
25. Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G (1997) The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol A* 181: 559–571.
<https://doi.org/10.1007/s003590050140>
26. Duque D, Malmierca MS (2015) Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the mouse: anesthesia and spontaneous activity effects. *Brain Struct Funct* 220: 3385–3398.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0862-1>
27. Nieto-Diego J, Malmierca MS (2016) Topographic distribution of stimulus-specific adaptation across auditory cortical fields in the anesthetized rat. *PLoS Biol* 14(3): e1002397.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002397>
28. Von der Behrens W, Bäuerle P, Kössl M, Gaese BH (2009) Correlating stimulus-specific adaptation of cortical neurons and local field potentials in the awake rat. *J Neurosci* 29(44): 13837–13849.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3475-09.2009>
29. Farley BJ, Quirk MC, Doherty JJ, Christian EP (2010) Stimulus-specific adaptation in auditory cortex is an NMDA-independent process distinct from the sensory novelty encoded by the mismatch negativity. *J Neurosci* 30(49): 16475–16484.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2793-10.2010>
30. Вартанян ИА (1978) Слуховой анализ сложных звуков. Л. Наука. [Vartanyan IA (1978) Auditory analysis of complex sounds. L. Nauka. (In Russ)].
31. Бобошко МЮ (2012) Речевая аудиометрия: учебное пособие. СПб: Изд-во СПбГМУ. [Boboshko MJ (2012) Speech audiometry: textbook. St. Petersburg: Publ House of St. Petersburg State Med Univer. (In Russ)].

Time Scale of Adaptation at the Tonal Sequence Processing in the Awake Mice Auditory Cortex Neurons

M. A. Egorova^{a, *}, A. G. Akimov^a, and G. D. Khorunzhii^a

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

*e-mail: ema6913@yandex.ru

The study was firstly carried out on stimulus-specific adaptation of neurons in the primary and anterior fields of the awake house mice auditory cortex to sound sequences of four

100-ms tonal signals, with frequency of tones corresponding to the neuronal characteristic frequency, and also with the inter-tone interval constant for one sequence and varying from 0 to 2000 ms in different sequences. The analysis of the data obtained showed the adaptation effect in the responses of all studied primary auditory cortex neurons, which was observed as the absence or significant decrease in activity evoked by the components of a series of tones following the 1st, at inter-stimulus intervals of 0–500 ms. A quantitative assessment of the adaptation effects as a function of inter-stimulus intervals within the tonal sequence, performed over whole population of studied neurons, showed that the individual time scales of adaptation of neurons varied significantly, which may be crucial for the formation of optimal time windows for the processing of grouping and separation of sound events, which are important both for perception of animal vocalizations and human speech.

Keywords: hearing, primary auditory cortex, awake mice, stimulus-specific auditory adaptation, single neurons

ВЛИЯНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ У КРЫС

© 2024 г. Н. А. Шабалдин^{1,*}, А. В. Сеницкая², Л. Н. Игишева^{1,2},

Л. А. Богданов², А. В. Шабалдин^{1,2}

¹Кемеровский государственный медицинский университет МЗ РФ, Кемерово, Россия

²НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

*E-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.08.2023 г.

После доработки 27.11.2023 г.

Принята к публикации 30.11.2023 г.

Костная ткань представляет собой динамическую структуру с метаболической функцией. Поддержание гомеостаза кости осуществляется за счет непрерывного процесса ее обновления, ремоделирования. При этом ряд патологических процессов, таких как ишемическая катастрофа, могут привести к нарушению баланса поддержания постоянства костной структуры. Одним из таких заболеваний является асептический некроз головки бедренной кости. В представленном исследовании выполнен анализ динамики экспрессии генов, участвующих в поддержании гомеостаза костной ткани, изменении гистологической картины при развитии асептического некроза головки бедренной кости у лабораторных крыс, не получавших генно-инженерных препаратов и на фоне применения ингибиторов биологического действия IL-6, TNF- α . После индукции асептического некроза в проксимальном эпифизе бедренной кости гистологическая картина у животных разных групп была неодинаковой. Более сохраняемая костная архитектура и больший объем костных пластинок зафиксированы у крыс, получавших генно-инженерные препараты по сравнению с животными без введения биологических агентов. У последних имела место и наиболее яркая картина остеодеструкции с усилением экспрессии генов провоспалительных цитокинов. У животных на фоне применения ингибиторов биологического действия IL-6, TNF- α второй недели после индукции асептического некроза мРНК профиль спонгиозной кости проксимального эпифиза бедра имел тенденцию усиления экспрессии генов остеорепарации. При этом наибольшее угнетение экспрессии генов остеокластогенеза получено у крыс после инъекции моноклонального антитела к рецептору IL-6.

Ключевые слова: асептический некроз, генно-инженерные препараты, моноклональный блокатор IL-6, ингибитор TNF- α , гены костного гомеостаза

DOI: 10.31857/S0869813924020022, **EDN:** DJWLWB

ВВЕДЕНИЕ

Костная ткань представляет собой динамическую структуру с метаболической функцией, а также является источником кальция, фосфора, большого количества факторов роста, цитокинов и тесно взаимосвязана с гемопoэтической системой [1]. Поддержание гомеостаза кости осуществляется за счет постоянного динамического процесса ремоделирования, который обеспечивает обновление структурной организации,

приспособление к воздействиям внешних факторов. При этом костное ремоделирование может быть физиологическим, постоянно протекающим и репаративным, которое возникает вследствие повреждений [2]. Физиологическое ремоделирование обеспечивается большим количеством внутриклеточных, межклеточных сигнальных путей, гормонами, а также другими регуляторными молекулами.

Цикл ремоделирования включает фазы покоя, резорбции, реверсии и неоостеогенеза. Поддержание внутреннего гомеостаза осуществляется вследствие баланса между процессами резорбции устаревших участков костной ткани и образования новых. При этом цикл ремоделирования осуществляется за счет взаимодействия основных клеток кости: остеобластов, остеоцитов, остеокластов. Ряд нозологических форм вызывает смещение баланса динамического поддержания постоянства костной структуры. Одним из таких заболеваний является асептический некроз головки бедренной кости.

Основной этиологической причиной манифестации асептического некроза является формирование зоны гипоперфузии головки бедренной кости. В молодом возрасте и у детей зона дефицита кровоснабжения проксимального эпифиза бедра (медиальная артерия, огибающая бедренную кость) возникает, как правило, вследствие травмы, однако существуют заболевания, при которых причины нарушений в сосудистом русле остаются до конца не изученными.

Патогенез аваскулярного некроза включает в себя сложные нарушения регуляции формирования и резорбции кости, развивающиеся как вторичные изменения метаболизма кости после дебюта ишемической катастрофы, с экспрессией большого количества молекулярных паттернов в зависимости от стадии заболевания. Вследствие кислородного голода в остеоцитах уже через 2–3 ч развиваются изменения в виде формирования ядерного пикноза, вакуолизации цитоплазмы, повреждения клеточной мембраны, в конечном итоге гибели клетки путем апоптоза [3]. Пикноз представляет собой необратимую конденсацию хроматиновой сети в клетке, за которой следует фрагментация ядра. Утилизация остеоцитов происходит за счет работы остеокластов. Процессы несколько отличаются от классического фагоцитоза. Благодаря адгезивным белковым рецепторам-интегринам происходит прикрепление активных остеокластов к костному матриксу. Зона резорбции герметична, межклеточное пространство закисляется с помощью экзоцитоза кислого содержимого вакуолей. Кислая среда разрушает минеральный компонент матрикса, органический компонент растворяется с помощью лизосомальных ферментов остеокластов. Продукты резорбции, а также апоптотические остеоциты удаляются из костных лакун по механизму транцитоза мембранных везикул остеокластов. [4].

Наряду с этим активируются процессы неспецифического воспаления, вопрос о роли которого в регуляции процессов остеодеструкции и репарации после манифестации асептического некроза остается крайне сложным. Центральную роль в воспалительном ответе играют макрофаги. При этом макрофаги могут быть классически активированные (M1) и иметь провоспалительный фенотип, либо альтернативно активированные (M2) и иметь противовоспалительный фенотип, что может определять разрушение либо восстановление тканей [5].

Субпопуляция макрофагов M1 первой обнаруживается в участках костного повреждения [6]. Добавление к клеточной культуре макрофагов некротизированной костной ткани (фракция супернатанта, фракция костного осадка) приводило к повышению экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α) и TLR4 [7]. При этом блокада TLR4 подавляла пролиферацию и миграцию провоспалительных цитокинов. Вероятно, TLR4 участвуют в механизмах распознавания некротизированных участков костной ткани. Гибель остеоцитов вследствие кислородного голода сопровождается экспрессией молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMP). В свою очередь взаимодействие DAMP с TLR4 приводит к усилению экспрессии провоспалительных цитокинов, преобладанию провоспалительного фенотипа, миграции и активации M1-макрофагов, клеточной пролиферации.

Как было указано выше, манифестация асептического некроза головки бедренной кости связана с гипоперфузией проксимального эпифиза, которая сопровождается усилением транскрипции гипоксически индуцированного фактора 1 α (HIF-1 α). Основное биологическое действие данной молекулы направлено на улучшение транспорта кислорода в клетки путем индукции ангиогенеза, эритропоэза. Однако в то же время сверхэкспрессия HIF-1 α способствует выработке ряда медиаторов воспаления, включая такие провоспалительные цитокины как IL-6, TNF α , IL1 β [8]. Большое количество исследовательских работ указывают на повышенную концентрацию провоспалительных цитокинов на 1–2 стадиях асептического некроза головки бедренной кости [9, 10]. Таким образом, сверхэкспрессия HIF-1 α , гибель остеоцитов вследствие гипоксического повреждения способствуют активации каскада синтеза медиаторов воспаления.

Основным сигнальным путем, направленным на индукцию остеокластогенеза, является система рецептора активатора ядерного фактора NF- κ B, его лиганда и остеопротегерина (RANK-RANKL-OPG) [11]. Связывание рецептора активатора NF- κ B (RANK) с его лигандом (RANKL) ведет к транслокации ядерного транскрипционного фактора NF- κ B в ядро прогениторных клеток остеокластов, их созреванию и активации. Провоспалительные цитокины способствуют усилению синтеза RANKL, индукции остеокластогенеза [12, 13]. По некоторым данным гистологические признаки активации остеокластов в виде визуализации лакун костной резорбции можно обнаружить уже через 72 ч после манифестации асептического некроза [14].

Биологическое действие провоспалительных цитокинов направлено не только на усиление остеорезорбции, но и на угнетение остеорепарации. Ряд исследователей связывает увеличение концентрации провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α (TNF- α) со снижением жизнеспособности и индукции апоптоза остеобластов [15, 16]. Кроме того, цитокиновая сеть играет важную роль в регуляции остеобластогенеза. Такие цитокины как интерлейкин-10 (IL-10), IL-11, IL-18, интерферон- γ (IFN- γ) способствуют усилению остеобластогенеза, в то время как TNF- α , TNF- β , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-13, IL-23, IFN- α , IFN- β выступают в качестве антиостеобластогенных факторов [17].

Остеобластогенез регулируется большим количеством сигнальных путей, включая канонический и неканонический wnt (wingless)/ β катенин сигнального пути, JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK (протеинкиназа, активируемая митогенами), процессы фосфорилирования. Наиболее изученным является Wnt/ β -катенин-зависимый путь, связанный с процессами регенерации костной ткани. Связывание лиганда Wnt со своим мембранным рецептором приводит к транслокации β -катенина в ядро прогениторных клеток, усилению экспрессии остеобластогенного гена-мишени. В неактивном состоянии β -катенин фосфорилируется белками комплекса разрушения β -катенина, включая актин. При этом одним из наиболее значимых медиаторов остеобластогенеза является связанный с Runt транскрипционный фактор 2 (RUNX2), который способствует дальнейшему усилению экспрессии остеобластогенных маркеров остеобластов: транскрипционного фактора или остерикса (OSX), щелочной фосфатазы (ALP), коллагена 1-го типа (COL1A1), костных морфогенетических белков (BMP). Провоспалительные цитокины, такие как TNF- α , IL-1 α , IL-6, ингибируют экспрессию остеобластогенных маркеров, включая RUNX2, OSX, ALP и COL1A1 в преостеобластогенных клетках, а также снижают интенсивность BMP-индуцированного остеобластогенеза [10, 18]. Так, цитокины могут выступать в качестве потенциальной терапевтической мишени при костно-деструктивных заболеваниях, хотя знания о взаимодействии цитокиновых цепей требуют большего изучения.

В то же время активация воспаления создает условия для дальнейшей регенерации. Исследования показали возможность перехода макрофагов из субпопуляции M1 в M2 при изменении фенотипа. При воздействии противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-13, макрофаги M1 могут преобразовываться в альтернативно активирован-

ные макрофаги M2 [19]. Тем самым подавление биологического действия медиаторов воспаления на ранних стадиях асептического некроза с целью изменения фенотипа, альтернативной активации макрофагов, субпопуляции M2 и индукции репаративных процессов представляется логичным.

Таким образом, развитие неспецифического воспаления при манифестации аваскулярного некроза с каскадом экспрессии локальных регуляторных факторов, в том числе провоспалительных цитокинов, способствует смещению баланса ремоделирования костной ткани с усилением остеорезорбции и ингибированием остеорепарации. Блокирование биологического действия провоспалительных цитокинов на ранних стадиях асептического некроза может способствовать нормализации функционирования сигналинга, регулирующего костный гомеостаз, угнетению остеодеструкции, сохранению костной ткани.

Цель исследования: сравнить влияние генно-инженерных препаратов ингибиторов биологического действия IL-6, TNF α на коррекцию мРНК профиля спонгиозной кости проксимального эпифиза бедра при развитии асептического некроза в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнено экспериментальное исследование на 27 самцах крыс линии Вистар массой 250 ± 25 г в возрасте 3-х месяцев. Всем животным проведено хирургическое вмешательство для индукции асептического некроза головки бедренной кости в виде наложения плотной лигатуры из рассасывающегося шовного материала – викрила вокруг шейки бедренной кости для создания зоны гипоперфузии, а также введения в полость сустава 1.5 мл 2%-ного раствора реополиглокина для увеличения внутрисуставного давления. Модель индукции асептического некроза головки бедренной кости защищена патентом Российской Федерации «Способ моделирования асептического некроза головки бедренной кости у лабораторных крыс» № 2773606 С1 от 06.06.2022. Животные были разделены на 3 группы: в первую группу вошли 9 животных, не получавших препараты (группа сравнения); вторую группу составили 9 животных, которым проводились инъекции сарилумаба (Кевзара, производитель – Санofi-Винтроп Индастри, Франция) – лечебного моноклонального антитела (подтип IgG1) к рецептору IL-6 (первая основная группа); третья группа состояла из 9 животных, получавших инъекции препаратом этанерцепт (Энбрел, производитель – Пфайзер Мануфэкчуриг Белджиум НВ, Бельгия) – конкурентным ингибитором связывания фактора некроза опухоли (TNF- α) с его рецепторами на поверхности клетки (вторая основная группа). Животные выводились из эксперимента путем декапитации по 3 особи из каждой группы на 4-й, 6-й и 8-й неделе после хирургической индукции аваскулярного некроза.

Схема введения препаратов для второй и третьей исследуемых групп была идентична, инъекции выполнялись каждые две недели с момента начала эксперимента, на 2-й, 4-й и 6-й неделе. Однократная доза препаратов рассчитывалась как 15 мг на 1 кг массы тела. Дозировка генно-инженерных препаратов рассчитывалась исходя из рекомендаций по применению при ювенильных идиопатических артритах в качестве противовоспалительной терапии, при этом несколько превышала максимально рекомендуемую. Данное превышение обусловлено малой массой животных и необходимостью большего подавления биологического действия провоспалительных цитокинов. Тем не менее во время выполнения экспериментальной работы ни у одного животного не наблюдалось нежелательных эффектов, побочных реакций на введение фармакологических препаратов. Представленные дозы лечебных моноклональных блокаторов провоспалительных цитокинов также были использованы в модельных экспериментах на малых животных при исследовании их влияния на патологические процессы [20, 21].

У крыс всех исследуемых групп после выведения из эксперимента проводилась экстирпация обеих бедренных костей, со стороны асептического некроза и условно

здоровой, с последующим отсечением проксимального эпифиза. Головка бедренной кости разделялась на две равные части. Одна часть использовалась для гистологического исследования, другая – для оценки мРНК профиля. Гистологический препарат подготавливался бескислотным способом в солях этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), окрашивался гематоксилин-эозином. Для оценки морфометрических показателей использовалась программа ImageJ. Объем костных пластинок определен как пиксельное значение окрашенных пластинок.

Часть головки бедренной кости как пораженной асептическим некрозом, так и условно здоровой использовалась для выделения суммарной РНК набором RNeasyMicroKit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Предварительно головка бедренной кости обрабатывалась в 0.9%-ном растворе NaCl для удаления попутных форменных элементов крови, РНК выделялась из спонгиозной кости. Качество и количество выделенной РНК определяли на спектрофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США).

Уровень экспрессии генов определяли методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с обратной транскрипцией, используя набор High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Праймеры были синтезированы на приборе ABI 3900 high-throughput DNA synthesiser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) компанией Евроген (Москва, Россия). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *actb*, *tbp*, *b2m* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу 2- $\Delta\Delta C_t$ и выражали в виде кратного изменения относительно экспрессии референсных генов, далее обозначенных как ΔC_t исследуемых генов. Особенности экспрессии исследуемых генов у животных основных групп и группы сравнения оценивали по коэффициенту отношения ΔC_t на условно здоровой и больной (некроз) конечностях. Исследовалась экспрессия генов: *il4*, *il6*, *il1b*, *tnfa*, *tgfb*, *sp7*, *runx2*, *opn/spp1*, *bmp2*, *bglap*, *ranks*, *alpl*, *hif1a*.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoftInc (США), версия 10.0 по правилам вариационной статистики. В исследовании были использованы крысы линии Вистар, содержащиеся в одинаковых оптимальных условиях, поэтому W теста Шапиро – Уилка показал нормальное распределение. Количественные данные представляли в виде средней и стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках проводили с помощью критерия Стьюдента. Вероятность ошибки первого уровня была принята за 5%, а второго уровня – за 20%, соответственно уровень статистической значимости выявлялся при $p < 0.05$, что соответствует стандартным требованиям.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологическое исследование продемонстрировало признаки развития остеодеструктивных процессов через 1 месяц после индукции асептического некроза у всех животных. Так, во всех исследуемых группах визуализировались пустые костные лакуны, активные остеокласты (рис. 1). Наблюдалась стратификация групп хондроцитов в гиалиновом хряще у животных группы сравнения, большая часть находилась в наружном слое, в то время как промежуточный характеризовался более низким соотношением клеток к аморфному веществу. У крыс первой и второй основных групп расположение хондроцитов в гиалиновом хряще было более упорядоченное. При этом статистической разницы по объему костной ткани у животных, получавших терапию генно-инженерными препаратами и группы сравнения получено не было.

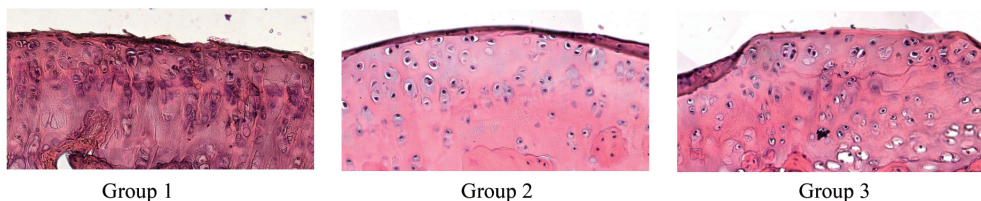


Рис. 1. Гистологические препараты через 4 недели после индукции асептического некроза. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х 400. Группа 1: стратификация хондроцитов, большая часть находится в наружном слое суставного хряща. Группа 2: равномерное расположение хондроцитов. Группа 3: равномерное расположение хондроцитов.



Рис. 2. Гистологические препараты через 6 недель после индукции асептического некроза. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х 800. Группа 1: стрелочкой указаны активные остеокласты в зоне остеорезорбции. Группа 2: стрелочкой указаны активные остеобласты. Группа 3: стрелочкой указаны активные остеобласты на фоне пустых костных лакун.

Спустя 6 недель эксперимента между группами наблюдались следующие различия. Проксимальный эпифиз бедренной кости у крыс группы сравнения терял сферическую форму, приобретал эллипсоидную. Потеря объема костных пластинок прогрессировала, визуализировалось большое количество пустых костных лакун, зон остеорезорбции, активных остеокластов. Часть губчатого вещества замещалась плотной фиброзной тканью. Головки бедренных костей у животных первой основной группы характеризовались большим сохранением объема костных пластинок, чем у крыс группы сравнения. Имелись единичные лакуны костной резорбции, активные остеокласты. Наряду с этим визуализировались активные остеобласты. Гистологические препараты животных второй основной группы отобрали больший объем костных пластинок, чем в группе сравнения. Значительная часть хондроцитов располагалась в промежуточном слое (рис. 2).

Через 2 месяца после манифестации аваскулярного некроза в препаратах головок бедренных костей животных группы сравнения определялись признаки не только остеодеструктивных, но и остеорепаративных процессов. Так, на фоне замещения части губчатого вещества фиброзной тканью определялись активные остеобласты и участки минерализации костной ткани. В препаратах животных первой основной группы визуализировались признаки продолжающейся остеорепарации, фиксировалось большое количество активных остеобластов, полнокровных сосудов, минерализации кости. Остеорезорбтивные процессы имели меньшую интенсивность, чем в группе сравнения, сохранялось большее количество костных пластинок, хондроциты в гиалиновом хряще располагались более равномерно, тем не менее у части хондроцитов визуализировались признаки деструкции ядер. Гистологическая картина в проксимальном эпифизе бедренных костей у крыс второй основной группы была схожа с первой основной группой. На фоне снижения объема костных пластинок определялись активные остеобласты, участки неоостеогенеза (рис. 3).

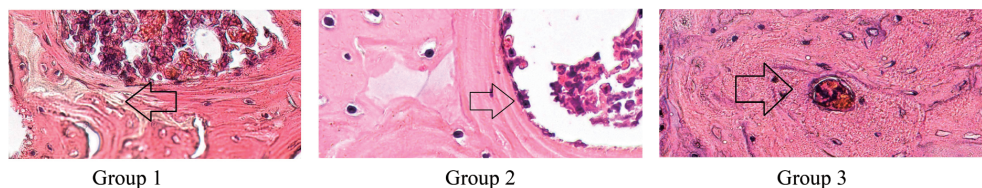


Рис. 3. Гистологические препараты через 8 недель после индукции асептического некроза. Окраска гематоксилин-эозин, ув. х 800. Группа 1: стрелочкой указан участок замещения костной ткани фиброзной. Группа 2: – стрелочкой указаны активные остеобласты, остеокиты в костных лакунах. Группа 3: стрелочкой указан полнокровный сосуд.

Таблица 1. Гистологические показатели объема костных пластинок (%)

Недели эксперимента	Группа сравнения	Первая основная группа	Вторая основная группа	<i>p</i> -value
4 недели	31.45 ± 1.03	33.67 ± 1.43	32.77 ± 1.23	> 0.05
6 недель	23.03 ± 1.23	30.78 ± 1.32	30.22 ± 1.21	0.02*
8 недель	24.43 ± 1.29	31.66 ± 1.36	31.19 ± 1.31	0.03*

* – $p < 0.05$.

Количественная оценка изменений объема костных пластинок отобразила следующее. В группе сравнения отмечалась прогрессирующая потеря объема костной ткани от 4 к 6 неделям после хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости, с незначительным увеличением на 8-й неделе. Тенденция к потере объема костных пластинок в течение 6 недель эксперимента наблюдалась как в первой, так и второй основных группах. Однако получены значимые отличия между группой сравнения и основными группами на 6-й и 8-й неделях. При этом значимых отличий по показателям объема костной ткани между животными, получавшими терапию моноклональным блокатором IL-6 и ингибитором TNF- α , получено не было (табл. 1).

В целом гистологическое исследование выявило наиболее ярко протекающие процессы остеодеструкции у крыс, не получавших биологические агенты. При этом остеорезорбтивные процессы прогрессирующе развивались от 4 к 6 неделям, первые признаки остеорепарации зафиксированы лишь на 8-й неделе. Гистологическая картина у крыс, получавших моноклональный блокатор IL-6 и ингибитор TNF- α , была схожа. Остеодеструктивные процессы характеризовались меньшей интенсивностью, хондроциты гиалинового хряща сохраняли в большей степени нормальное расположение, количество лакун костной резорбции было меньше, чем у крыс группы сравнения. При этом уже с 6-й недели после хирургической индукции аваскулярного некроза в первой и второй основных группах визуализировались признаки остеорепарации.

Изменение мРНК профиля генов, участвующих в регуляции костного гомеостаза, могло определять активность остеодеструктивных и остеорепаративных процессов при развитии асептического некроза головки бедренной кости. Первые четыре недели после индукции аваскулярного некроза у крыс, не получавших лечение (группа сравнения), сопровождались угнетением экспрессии гена щелочной фосфатазы (*alpl*) на фоне сверхэкспрессии гена секретлируемого фосфопротеина 1 (*spp1*). Белок, кодируемый геном *spp1*, обладает высокой аффинностью к гидроксиапатиту и мембранным белкам остеокластов, тем самым участвуя в адгезии активных остеокластов к костному матри-

Таблица 2. Изменение мРНК профиля проксимального эпифиза бедренных костей через 4 недели после индукции асептического некроза (кратность изменения относительно экспрессии референсных генов)

Ген	Группа сравнения	1-я основная группа	2-я основная группа
<i>bmp2</i>	1.097 ± 0.219	0.831 ± 0.137	0.704 ± 0.208
<i>alpl</i>	0.484 ± 0.095	2.445 ± 0.738*	1.001 ± 0.324
<i>hif1α</i>	1.031 ± 0.563	0.342 ± 0.059*	0.765 ± 0.249
<i>rankl</i>	1.216 ± 0.609	1.157 ± 0.583	0.887 ± 0.291
<i>runx2</i>	0.934 ± 0.319	0.891 ± 0.204	1.051 ± 0.318
<i>sp7</i>	1.051 ± 0.421	1.774 ± 0.538	3.056 ± 1.147*
<i>bglap</i>	0.684 ± 0.137	3.637 ± 0.926*	0.622 ± 0.237
<i>spp1</i>	7.691 ± 1.823	0.624 ± 0.137*	2.828 ± 0.957*
<i>tgfb</i>	0.964 ± 0.371	3.092 ± 0.957*	0.943 ± 0.326
<i>tnf-α</i>	1.142 ± 0.296	0.806 ± 0.172	1.367 ± 0.473
<i>il6</i>	1.125 ± 0.325	0.79 ± 0.148*	0.835 ± 0.285

* – значимое различие с группой сравнения, $p < 0.05$.

су в процессе остеорезорбции. У крыс первой основной группы экспрессия гена *alpl*, напротив, была повышена. Вместе с тем усиливалась активность генов, участвующих в остеорепаративных процессах, таких как гена трансформирующего фактора роста β (*tgfb*), гена остеокальцина (*bglap*). У крыс второй основной группы фиксировалось увеличение экспрессии гена *spp1*, а также гена транскрипционного фактора (*Sp7*) (табл. 2).

Через 6 недель после индукции асептического некроза у крыс группы сравнения становится очевидна роль неспецифического воспаления в патогенезе асептического некроза головки бедренной кости. Усиливалась экспрессия генов провоспалительных цитокинов (*il6*, *tnf-α*). Вместе с этим синергично увеличилась активность гена одной из ключевых молекул остеокластогенеза – лиганда рецептора активатора ядерного фактора κB (*rankl*). При этом также увеличилась экспрессия генов *runx2*, *alpl* на фоне угнетения *spp1*. В то же время профиль мРНК спонгиозной кости проксимального эпифиза со стороны асептического некроза у крыс, получавших инъекции моноклонального блокатора ИЛ-6 (первая основная группа), характеризовался увеличением активности генов, направленных на остеорепаративные процессы. Увеличивалась экспрессия генов остеиндукции, таких как *bmp2*, *alpl*, *sp7*, *tgfb*. Активность гена *il-6* значительно угнеталась. У крыс, получавших инъекции ингибитора TNF- α (вторая основная группа), в головках бедренных костей со стороны асептического некроза увеличивалась экспрессия как генов остеорезорбтивного, так и остеорепаративного действия. Кроме того, произошло избирательное подавление экспрессии *tnf-α* при значимо неизменной экспрессии *il6*. Выявлено снижение экспрессии регуляторной молекулы сигнального пути остеокластогенеза (*rankl*) при усилении экспрессии генов, кодирующих белки остеокластогенеза (*bmp2*, *runx2*, *sp7*) (табл. 3).

Через 8 недель после хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости у крыс группы сравнения оставалась повышенной активность генов провоспалительных цитокинов (*il6*, *tnf-α*). Также была увеличена экспрессия гена *spp1*. Наряду с этим увеличилась экспрессия генов индукции остеобластогенеза и усиления

Таблица 3. Изменение профиля мРНК проксимального эпифиза бедренных костей через 6 недель после индукции асептического некроза (кратность изменения относительно экспрессии референсных генов)

Ген	Группа сравнения	1-я основная группа	2-я основная группа
<i>bmp2</i>	1.613 ± 0.419	2.462 ± 0.816*	7.141 ± 1.918*
<i>alpl</i>	2.394 ± 0.751	2.936 ± 0.973	3.005 ± 1.018
<i>hif1α</i>	0.768 ± 0.143	1.287 ± 0.419	0.928 ± 0.316
<i>rankl</i>	11.076 ± 3.054	1.019 ± 0.326*	7.913 ± 2.168*
<i>runx2</i>	3.831 ± 0.904	0.501 ± 0.118*	9.086 ± 3.017*
<i>sp7</i>	1.998 ± 0.673	3.095 ± 1.008*	8.672 ± 2.735*
<i>bglap</i>	0.702 ± 0.179	1.043 ± 0.307	1.659 ± 0.548
<i>spp1</i>	0.447 ± 0.103	2.297 ± 0.713*	1.014 ± 0.351
<i>tgfb</i>	0.943 ± 0.319	2.331 ± 0.784*	1.637 ± 0.486
<i>tnf-α</i>	14.471 ± 4.107	1.918 ± 0.607*	2.321 ± 0.769*
<i>il6</i>	3.844 ± 0.916	0.054 ± 0.014*	3.962 ± 1.253

* – значимое различие с группой сравнения, $p < 0.05$.

метаболизма кости (*bmp2*, *alpl*). У крыс первой основной группы наиболее активны были гены остеобластогенеза (*bmp2*, *runx2*, *sp7*). При этом профиль мРНК со стороны асептического некроза наиболее соответствовал условно-здоровой стороне из всех исследуемых групп. У животных из второй основной группы значительно усиливалась экспрессия генов остеиндукции (*bmp2*, *alpl*, *sp7*, *bglap*, *tgfb*). Однако наряду с этим усиливалась экспрессия гена *rankl* (табл. 4). Необходимо отметить, что через 2 месяца эксперимента у животных, получавших ингибитор как IL-6, так и TNF- α , значительно снизилась экспрессия генов *tnf-α* и *il6*. Тем самым оба лечебных моноклональных антитела в длительном временном промежутке блокируют несколько провоспалительных цитокинов (как IL-6, так и TNF- α), возможно, за счет плейотропного эффекта.

Эффективность применения лечебных моноклональных антител у животных можно связать со значительной схожестью генома лабораторных крыс и человека, которая составляет до 90% [22]. Кроме того, рекомбинантные лечебные моноклональные антитела представляют собой легкие и/или тяжелые участки фрагментов, распознающих эпитоп (fragment antibody – Fab) иммуноглобулинов, лишенных всех остальных участков, в том числе связывающих компоненты комплемента. Это снижает их видоспецифичность. Кроме того, многочисленные экспериментальные работы, посвященные исследованию терапевтического влияния ингибирования биологического действия провоспалительных цитокинов, выполненные на лабораторных крысах с использованием лечебных моноклональных антител, подтверждают рациональность использования данной группы препаратов [17, 20, 21].

В целом изменения гистологической картины и профиля мРНК по мере развития асептического некроза головки бедренной кости от 4 к 8 неделям свидетельствуют об активности неспецифического воспаления, прогрессивном усилении остеокластогенеза, остеорезорбтивных процессов у крыс группы сравнения от 4 к 6 неделям. Активация остеобластогенеза, начало остеорепарации зафиксировано лишь на 8-й неделе после индукции аваскулярного некроза, в то время как у животных, получавших инъ-

Таблица 4. Изменение профиля мРНК проксимального эпифиза бедренных костей через 8 недель после индукции асептического некроза (кратность изменения относительно экспрессии референсных генов)

Ген	Группа сравнения	1-я основная группа	2-я основная группа
<i>bmp2</i>	2.602 ± 0.803	2.373 ± 0.805	3.852 ± 1.243*
<i>alpl</i>	2.087 ± 0.657	1.457 ± 0.432*	4.206 ± 1.917*
<i>hif1α</i>	0.549 ± 0.153	0.989 ± 0.328	1.551 ± 0.527
<i>rankl</i>	1.804 ± 0.604	1.884 ± 0.579	3.119 ± 1.036*
<i>runx2</i>	1.276 ± 0.428	2.145 ± 0.692*	1.835 ± 0.672
<i>sp7</i>	1.491 ± 0.501	2.087 ± 0.713*	4.457 ± 1.035
<i>bglap</i>	1.695 ± 0.539	1.868 ± 0.617	8.023 ± 2.907*
<i>spp1</i>	3.127 ± 1.012	0.962 ± 0.329*	0.518 ± 0.174
<i>tgfb</i>	1.013 ± 0.326	1.464 ± 0.507	8.331 ± 2.841*
<i>tnf-α</i>	13.62 ± 4.084	1.316 ± 0.436*	1.766 ± 0.724*
<i>il6</i>	15.927 ± 5.247	1.458 ± 0.519*	0.218 ± 0.086*

* – значимое различие с группой сравнения, $p < 0.05$.

екции генно-инженерными препаратами блокаторов биологического действия провоспалительных цитокинов, наблюдалось менее значительное развитие воспаления и наряду с этим менее интенсивные процессы остеодеструкции. Остеорепарация на фоне сверхэкспрессии генов остеоиндуктивного действия зафиксирована на 6-й и 8-й неделях патогенеза аваскулярного некроза как у крыс первой, так и второй основной групп. Профиль мРНК наиболее соответствовал условно-здоровой конечности у крыс, получавших инъекции моноклональным блокатором IL-6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Коррекция нарушений сигналинга регуляции костного гомеостаза при развитии аваскулярного некроза головки бедренной кости занимает ведущую роль в разработке таргетной терапии, направленной на угнетение остеорезорбции и усиление остеорепарации [20, 21, 23]. Разработка биоинженерных стратегий терапии костной деструкции включает в себя применение генно-инженерных препаратов, направленных на нормализацию функционирования сигнальных путей остеогенеза путем ингибирования тех или иных патологических молекулярных паттернов [3].

Изменения профиля мРНК спонгиозной кости проксимального эпифиза бедра по мере развития асептического некроза напрямую влияло на активность остеорезорбции и остеорепарации в представленном исследовании. Течение асептического некроза головки бедренной кости у крыс, не получавших лечение, сопровождалось прогрессирующим развитием остеодеструктивных процессов с усилением экспрессии генов провоспалительных цитокинов, остеокластогенеза от 4 к 8 неделям. При этом признаки остеорепаративных процессов с увеличением активности генов остеогенеза отмечались лишь на 8-й неделе. Терапия генно-инженерными препаратами способствовала ингибированию воспаления, угнетению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, остеокластогенеза, усилению остеорепаративных процессов, активности

генов остеиндукции. Однако профили мРНК головок бедренных костей у крыс первой и второй основных групп имели отличия.

Первые 4 недели после индукции асептического некроза сопровождались наименее выраженными изменениями в профиле мРНК. У крыс, не получавших лечение, усиливалась активность гена *spp1*, кодирующего белок адгезии остеокластов к костному матриксу. Увеличение экспрессии представленного гена может свидетельствовать об усилении активности остеорезорбции. При этом других значительных изменений в профиле мРНК не было обнаружено.

Терапия моноклональным блокатором IL-6 у крыс первой основной группы способствовала ингибированию экспрессии гена *il6* на весь период эксперимента. мРНК-профиль головки бедренной кости отличался от группы сравнения в первую очередь большей активацией генов остеиндукции. Так, уже первые 4 недели эксперимента сопровождались усилением экспрессии генов *alpl*, *bglap*, *tgfb*, кодирующих белки остеогенеза, ангиогенеза, метаболизма костной ткани. При этом стоит отметить ингибирование активности гена *hif-1a*. Белок HIF-1 α рассматривается рядом авторов как один из наиболее важных пусковых факторов каскада развития остеодеструктивных процессов [8, 24]. Так, ранее выполненное исследование отобразило сверхэкспрессию данного гена при манифестации аваскулярного некроза головки бедренной кости у крыс линии Вистар [25].

У крыс, получавших инъекции ингибиторов активности TNF- α , активность гена *spp1* была повышена так же, как у животных, не получавших терапии. Однако наряду с этим усиливалась экспрессия гена медиатора остеобластогенеза *sp7*. Представленные результаты могут свидетельствовать о влиянии ингибирования воспаления не только на интенсивность остеокластогенеза, но и остеиндуктивные процессы.

Последующие 6 недель наиболее очевидно продемонстрировали значимость неспецифического воспаления в процессах регуляции костного гомеостаза. Сверхэкспрессия генов провоспалительных цитокинов (*il6*, *tnf- α*) у крыс группы сравнения сопровождалась значительным повышением активности гена *rankl*. Известно, что провоспалительные цитокины обладают прорезорбтивным эффектом. При этом биологическое действие таких цитокинов, как IL-6, TNF- α обладает синергизмом. Увеличение концентрации IL-6, TNF- α стимулирует выработку RANKL стромальными клетками и остеокластами, что, в свою очередь, приводит к активации сигнального пути RANK-RANKL-OPG и усилению остеокластогенеза. Усиление остеодеструкции подтверждается данными гистологического морфометрического исследования. Наряду с этим усиливалась экспрессия гена *runx2*, кодирующего один из ключевых медиаторов остеобластогенеза. Однако остеорепаративных процессов по данным гистологии не было зафиксировано, что может говорить о недостаточной активности лишь одного из медиаторов остеиндукции.

У крыс первой основной группы сохранялась сверхэкспрессия генов, направленных на усиление остеорепарации, так, увеличивалась экспрессия генов основных медиаторов остеобластогенеза *bmp2*, *sp7*, гена трансформирующего фактора роста (*tgfb*), кодирующего протеин ангиогенеза, гена щелочной фосфатазы (*alpl*), способствующего усилению метаболических процессов в костной ткани. Экспрессия гена *il6* была значительно угнетена, хотя отмечалось увеличение экспрессии гена другого провоспалительного цитокина *tnf- α* . Тем не менее экспрессия гена *rankl* не отличалась от условно-здоровой конечности. Особенности мРНК-профиля соответствовали гистологической картине в препаратах головок бедренных костей. Остеодеструктивные процессы носили значительно менее выраженный характер, чем у крыс, не получавших терапию, при этом уже на 6-й неделе визуализировались признаки остеорепарации.

Усиление экспрессии генов, направленных на усиление остеогенеза (*bmp2*, *alpl*, *runx2*, *sp7*), отмечалось также у животных второй основной группы. При этом интенсивность активности представленных генов была выше, чем у животных первой

основной группы. Однако наряду с этим экспрессия генов провоспалительных цитокинов (*il-6*, *tnf- α*), а также гена *rankl* была также повышена. Гистологическая картина отличалась от группы сравнения менее выраженными процессами остеодеструкции, в то же время изменения в головках бедренных костей у крыс первой и второй основных групп не имели ярких отличий.

Через 2 месяца после манифестации асептического некроза в препаратах головок бедренных костей у животных группы сравнения визуализировались признаки костной регенерации. При этом мРНК-профиль характеризовался усилением экспрессии гена *bmp2*, кодирующего ключевой медиатор остеобластогенеза, *alpl*, увеличение концентрации щелочной фосфатазы может свидетельствовать об усилении интенсивности процессов минерализации кости. Кроме того, незначительно усилилась активность генов *sp7*, *bglap*, которые также могут выступать в качестве маркеров остеобластогенеза. Однако сохранение увеличенной экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*tnf- α* , *il6*) подтверждает пролонгированное влияние воспаления на регуляцию костного гомеостаза.

Профиль мРНК у крыс первой основной группы сохранял признаки преобладания экспрессии генов остеоиндукции. К сохраняющим повышенную активность генам *bmp2*, *sp7* добавилась сверхэкспрессия гена *runx2*. Так, экспрессия всех из исследуемых генов, кодирующих белки остеобластогенеза, через 2 месяца после индукции асептического некроза головки бедренной кости была повышена на фоне приема моноклонального блокатора IL-6. При этом гистологическая картина характеризовалась большим сохранением объема костных пластин, чем у крыс, не получавших лечение, наличием признаков активной реваскуляризации, остеорепарации.

Сверхэкспрессия генов остеоиндуктивной направленности (*bmp2*, *alpl*, *runx2*, *sp7*) сохранялась через 8 недель после индукции асептического некроза у животных, получавших терапию ингибитором активности TNF- α . В то же время увеличенная активность гена *rankl* может свидетельствовать об интенсивном остеокластогенезе. Тем не менее гистологическая картина препаратов головок бедренных костей указывала на активные остеорепаративные процессы на фоне слабо выраженной остеодеструкции. Логично предположить, что на уровне межклеточных взаимодействий более интенсивный остеобластогенез может подавлять активность остеокластогенеза.

Таким образом, разработка таргетной терапии асептического некроза головки бедренной кости позволит значительно улучшить результаты лечения. Применение генно-инженерных препаратов ингибиторов биологического действия провоспалительных цитокинов на ранних стадиях асептического некроза с целью угнетения остеодеструктивных процессов, усиления остеорепарации является перспективным направлением дальнейшего изучения. Экономическая составляющая клинического применения генно-инженерных препаратов сопряжена с высокой стоимостью данной группы лекарственных средств. Тем не менее затраты на хирургическое лечение, реабилитацию пациентов, а в некоторых случаях повторные оперативные вмешательства могут в несколько раз превышать затраты на использование патогенетически обоснованной терапии.

Выполненное исследование отобразило, что наиболее яркая картина остеодеструкции с усилением экспрессии генов провоспалительных цитокинов, остеокластогенеза от 4-й к 8-й неделям эксперимента наблюдалась у животных, не получавших лечения. Большее сохранение костной архитектоники и объема костных пластин зафиксированы у крыс, получавших терапию генно-инженерными препаратами ингибирования биологического действия провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α . мРНК-профиль головок бедренных костей у животных первой и второй основных групп имел тенденцию усиления экспрессии генов остеорепарации по сравнению с группой сравнения. Однако активность генов остеогенеза у животных с применением разных вариантов терапии имела отличия. Наибольшее угнетение экспрессии генов провоспалительных

цитокинов, остеокластогенеза получено у крыс, получавших инъекции моноклональным блокатром IL-6. Тем не менее следует учитывать, что особенности регуляции процессов остеорезорбции, остеорепарации на молекулярно-клеточном уровне не определяются изолированными изменениями в экспрессии генов медиаторов сигнальных путей остеокластогенеза, остеобластогенеза. Синтез некоторых регуляторных протеинов кодируется на посттрансляционном уровне с задействованием альтернативного сплайсинга. Так, эффективность применения различных групп генно-инженерных препаратов, особенности взаимодействия цитокинов сетей, способы коррекции нарушений регуляции костного гомеостаза при развитии асептического некроза требуют дальнейшего изучения.

Вывод: Применение генно-инженерных препаратов ингибиторов биологического действия провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α способствовало снижению активности процессов остеодеструкции, усилению остеорепарации при развитии асептического некроза головки бедренной кости. Наиболее эффективно угнетал активность экспрессии генов провоспалительных цитокинов, остеокластогенеза препарат моноклонального блокатора IL-6.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, хирургические манипуляции, написание статьи – Н. А. Ш., выделение, анализ экспрессии генов – А. В. С., разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных – Л. Н. И., подготовка гистологических препаратов, выполнение гистологических исследований, этапное редактирование статьи – Л. А. Б., обработка данных, редактирование статьи – А. В. Ш.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта «Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук», МК-4132.2022.3. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями и были одобрены Комиссией по этике Кемеровского государственного медицинского университета МЗ РФ, протокол №1 от 9.02.2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Смирнов АВ, Румянцев АИШ* (2014) Строение и функции костной ткани в норме и при патологии. Сообщение I. Нефрология 18(6): 9–25. [*Smirnov AV, Rumyantsev ASH* (2014) The structure and functions of bone tissue in normal and pathological conditions. Message I. Nephrology 18(6): 9–25. (In Russ)].
2. *Миromanov AM, Гусев КА* (2021). Гормональная регуляция остеогенеза: обзор литературы. Травматол и ортопед России 27 (4): 120–130. [*Miromanov AM, Gusev KA* (2021). Hormonal regulation of osteogenesis: a literature review. Traumatol and Orthoped of Russia 27 (4): 120–130. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21823/2311-2905-1609>
3. *Murab S, Hawk T, Snyder A, Herold S, Totapally M, Whitlock PW* (2021) Tissue Engineering Strategies for Treating Avascular Necrosis of the Femoral Head. Bioengineering 8(12): 200. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8120200>

4. Камиллов ФХ, Фаршатовая ЕР, Еникеев ДА (2014) Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция. *Фундамент исследований* 7 (4): 836–842. [Kamilov FH, Farshatova ER, Enikeev DA (2014) Cellular-molecular mechanisms of bone tissue remodeling and its regulation. *Fundamene Res* 7(4): 836–842. (In Russ)].
5. Batoon L, Millard SM, Raggatt LJ, Pettit AR (2017) Osteomacs and bone regeneration. *Current Osteopor Rep* 15: 385–395.
<https://doi.org/10.1007/s11914-017-0384-x>
6. Иванюк ЕЭ, Надеждин СВ, Покровская ЛА, Шуплецова ВВ, Хазиахметова ОГ, Юрова КА, Малащенко ВВ, Литвинова ЛС, Хлусов ИА (2018) Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани. *Цитология* 60(4): 252–261. [Ivaniuk EE, Nadezhdin SV, Pokrovskaya LA, Shupletsova VV, Haziakhmetova OG, Ogyurova KA, Malashchenko VV, Litvinova LS, Khlusov AA (2018) Macrophage subpopulations and mesenchymal stem cells in the regulation of bone remodeling. *Cytology* 60(4): 252–261. (In Russ)].
7. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW (2016) Necrotic bone stimulates proinflammatory responses in macrophages through the activation of toll-like receptor 4. *Am J Pathol* 186(11): 2987–2999.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
8. Yellowley CE, Genetos DC (2019) Hypoxia signaling in the skeleton: implications for bone health. *Current Osteopor Rep* 17: 26–35.
<https://doi.org/10.1007/s11914-019-00500-6>
9. Ren Y, Deng Z, Gokani V, Kutschke M, Mitchell TW, Aruwajoye O, Kim HK (2021) Anti-Interleukin-6 Therapy Decreases Hip Synovitis and Bone Resorption and Increases Bone Formation Following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Bone Mineral Res* 36(2): 357–368.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.4191>
10. Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK (2015) Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Current Rev Musculoskel Med* 8: 201–209.
<https://doi.org/10.1007/s12178-015-9277-8>
11. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Tsuda E (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Mineral Metabol* 39: 19–26.
<https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
12. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J (2018) Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw* 18(1).
<https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>
13. Zhu J, Tang Y, Wu Q, Ji YC, Feng ZF, Kang FW (2019) HIF-1 α facilitates osteocyte-mediated osteoclastogenesis by activating JAK2/STAT3 pathway in vitro. *J Cell Physiol* 234(11): 21182–21192.
<https://doi.org/10.1002/jcp.28721>
14. Sun M, Yang J, Wang J, Hao T, Jiang D, Bao G, Liu G (2016) TNF- α is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells in vitro in the presence of high glucose. *Cytokine* 80: 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.011>
15. Zheng LW, Wang WC, Mao XZ, Luo YH, Tong ZY, Li D (2020) TNF- α regulates the early development of avascular necrosis of the femoral head by mediating osteoblast autophagy and apoptosis via the p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Cell Biol Int* 44(9): 1881–1889.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11394>
16. Amarasekara DS, Kim S, Rho J (2021) Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int J Mol Sci* 22(6): 2851.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062851>
17. Zuo C, Zhao X, Shi Y, Wu W, Zhang N, Xu J, Wang C, Hu G, Zhang X (2017) TNF- α inhibits SATB2 expression and osteoblast differentiation through NF- κ B and MAPK pathways. *Oncotarget* 9: 4833–4850.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23373>
18. Guo C, Yang XG, Wang F, Ma XY (2016) IL-1 α induces apoptosis and inhibits the osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells through the JNK and p38 MAPK pathways. *Int J Mol Med* 38: 319–327.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2606>
19. Gu Q, Yang H, Shi Q (2017) Activation of macrophages in response to biomaterials. *JOT* 10: 86–93.
20. Ibrahim YF, Moussa RA, Bayoumi AM, Ahmed ASF (2020) Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK: a possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology* 28: 215–230.
<https://doi.org/10.1007/s10787-019-00628-y>
21. Leo A, Nesci V, Tallarico M, Amodio N, Gallo Cantafio EM, De Sarro G, Citraro R (2020) IL-6 receptor blockade by tocilizumab has anti-absence and anti-epileptogenic effects in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neurotherapeutics* 17: 2004–2014.

- <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00893-8>
22. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE, Okwuonu G, Hines S, Lewis L, DeRamo C, Delgado O, Dugan-Rocha S, Miner G, Morgan M, Hawes A, Gill R, Celera, Holt RA, Adams MD, Amanatides PG, Baden-Tillson H, Barnstead M, Chin S, Evans CA, Ferriera S, Fosler C, Glodek A, Gu Z, Jennings D, Kraft CL, Nguyen T, Pfannkoch CM, Sitter C, Sutton GG, Venter JC, Woodage T, Smith D, Lee HM, Gustafson E, Cahill P, Kana A, Doucette-Stamm L, Weinstock K, Fechtel K, Weiss RB, Dunn DM, Green ED, Blakesley RW, Bouffard GG, De Jong PJ, Osoegawa K, Zhu B, Marra M, Schein J, Bosdet I, Fjell C, Jones S, Krzywinski M, Mathewson C, Siddiqui A, Wye N, McPherson J, Zhao S, Fraser CM, Shetty J, Shatsman S, Geer K, Chen Y, Abramzon S, Nierman WC, Havlak PH, Chen R, Durbin KJ, Egan A, Ren Y, Song XZ, Li B, Liu Y, Qin X, Cawley S, Worley KC, Cooney AJ, D'Souza LM, Martin K, Wu JQ, Gonzalez-Garay ML, Jackson AR, Kalafus KJ, McLeod MP, Milosavljevic A, Virk D, Volkov A, Wheeler DA, Zhang Z, Bailey JA, Eichler EE, Tuzun E, Birney E, Mongin E, Ureta-Vidal A, Woodwark C, Zdobnov E, Bork P, Suyama M, Torrents D, Alexandersson M, Trask BJ, Young JM, Huang H, Wang H, Xing H, Daniels S, Gietzen D, Schmidt J, Stevens K, Vitt U, Wingrove J, Camara F, Mar Albà M, Abril JF, Guigo R, Smit A, Dubchak I, Rubin EM, Couronne O, Poliakov A, Hübner N, Ganten D, Goesele C, Hummel O, Kreitler T, Lee YA, Monti J, Schulz H, Zimdahl H, Himmelbauer H, Lehrach H, Jacob HJ, Bromberg S, Gullings-Handley J, Jensen-Seaman MI, Kwitek AE, Lazar J, Pasko D, Tonellato PJ, Twigger S, Ponting CP, Duarte JM, Rice S, Goodstadt L, Beaton SA, Emes RD, Winter EE, Webber C, Brandt P, Nyakatura G, Adetobi M, Chiaromonte F, Elnitski L, Eswara P, Hardison RC, Hou M, Kolbe D, Makova K, Miller W, Nekrutenko A, Riemer C, Schwartz S, Taylor J, Yang S, Zhang Y, Lindpaintner K, Andrews TD, Caccamo M, Clamp M, Clarke L, Curwen V, Durbin R, Eyraas E, Searle SM, Cooper GM, Batzoglou S, Brudno M, Sidow A, Stone EA, Venter JC, Payseur BA, Bourque G, López-Otín C, Puente XS, Chakrabarti K, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Bray N, Yap VB, Caspi A, Tesler G, Pevzner PA, Haussler D, Roskin KM, Baertsch R, Clawson H, Furey TS, Himrichs AS, Karolchik D, Kent WJ, Rosenbloom KR, Trumbower H, Weirauch M, Cooper DN, Stenson PD, Ma B, Brent M, Arumugam M, Shteynberg D, Copley RR, Taylor MS, Riethman H, Mudumuri U, Peterson J, Guyer M, Felsenfeld A, Old S, Mockrin S, Collins F (2004) Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428(6982): 493–521.
<https://doi.org/10.1038/nature02426>
 23. *Adapala NS, Kim HKW* (2016) Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets. *PLoS One* 11(4): e0153174.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>
 24. *Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HKW* (2016) HIF-1-dependent IL-6 activation in articular chondrocytes initiating synovitis in femoral head ischemic osteonecrosis. *J Bone Joint Surgery* 98: 1122–1131.
<https://doi.org/10.2106/JBJS.15.01209>
 25. *Шабалдин НА, Синицкая АВ, Шабалдин АВ, Мухамадияров РА* (2023) Динамика экспрессии генов костного гомеостаза при развитии асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(1): 94–108. [*Shabaldin NA, Sinitzkaya AV, Shabaldin AV, Mukhamadiyarov RA* (2023) Dynamics of expression of bone homeostasis genes in the development of aseptic necrosis of the femoral head in an experiment. *Russ J Physiol* 109(1): 94–108. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923010107>

Effect of Genetically Engineered Drugs in Aseptic Necrosis of the Femoral Head in Rats

N. A. Shabaldin^{a,*}, A. V. Sinitskaya^b, L. N. Igisheva^{a,b}, L. A. Bogdanov^b,
and A. V. Shabaldin^{a,b}

^aKemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

^bResearch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

*e-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

Bone tissue is a dynamic structure with a metabolic function. The maintenance of bone homeostasis is carried out due to the continuous process of its renewal, remodeling. At

the same time, a number of pathological processes, such as ischemic catastrophe, can lead to a violation of the balance of maintaining the constancy of the bone structure. One of these diseases is aseptic necrosis of the femoral head. The presented study analyzes the dynamics of expression of genes involved in maintaining bone tissue homeostasis, changes in the histological picture during the development of aseptic necrosis of the femoral head in laboratory rats that did not receive genetically engineered drugs and against the background of the use of inhibitors of biological action IL-6, TNF- α . After induction of aseptic necrosis in the proximal epiphysis of the femur, the histological picture in animals of different groups was not the same. More preserved bone architectonics and a larger volume of bone plates were recorded in rats receiving genetically engineered drugs compared to animals without the introduction of biological agents. The latter also had the most vivid picture of osteodestruction with increased expression of proinflammatory cytokine genes. In animals, against the background of the use of drugs of inhibitors of the biological action of IL-6, TNF- α , from the second week after induction of aseptic necrosis of the mRNA, the profile of the spongiose bone of the proximal epiphysis of the femur tended to increase the expression of osteoreparation genes. At the same time, the greatest inhibition of osteoclastogenesis gene expression was obtained in rats after injection of a monoclonal antibody to the IL-6 receptor.

Keywords: aseptic necrosis, genetically engineered drugs, IL-6 monoclonal blocker, TNF- α inhibitor, bone homeostasis genes

ОБНАРУЖЕНИЕ ЛОМБАРДНОЙ РЕЧИ ДИКТОРОВ РАЗНОГО ПОЛА ПРИ ПРОСТРАНСТВЕННОМ РАЗДЕЛЕНИИ ИСТОЧНИКОВ ЦЕЛЕВОГО СИГНАЛА И ШУМА

© 2024 г. И. Г. Андреева^{1, *}, А. М. Луничкин¹, Е. А. Огородникова^{1, 2}

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

²*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: ig-andreeva@mail.ru*

Поступила в редакцию

После доработки

Принята к публикации

Изучали пространственную избирательность слуха к речевым сигналам при разделении целевого сигнала и помехи по расстоянию между их источниками и слушателем. В работе проверяли гипотезу о том, что смещение спектра голоса диктора в сторону высоких частот, которое возникает при говорении в шуме, может улучшить избирательность слуха за счет более активного включения высокочастотного механизма пространственного слуха. Пороги обнаружения целевого сигнала – двухсложного слова, произнесенного мужским или женским голосом, оценивали в задаче двухальтернативного двухинтервального вынужденного выбора в 4 сериях, которые различались типом целевого сигнала (обычная или ломбардная речь) и расположением источников целевого и маскирующего (шум многоголосия) сигналов. Источники сигналов находились на расстоянии 1 и 4 м напротив испытуемого на уровне его головы. Порог обнаружения определяли через пороговое отношение уровней сигнала и шума в месте расположения слушателя (С/Ш). Результаты показали, что порог обнаружения целевого сигнала (мужской и женский голоса диктора совместно) был одинаков для обычной и ломбардной речи и составил -11 дБ С/Ш. Он не зависел от того, какой из источников – целевого сигнала или помехи, находился ближе к слушателю. При обычной речи пороги обнаружения по средним данным различались для мужского и женского голоса, но различие было недостоверным. При ломбардной речи эти пороги достоверно различались: для мужского голоса порог на уровне обнаружения 0.67 был равен -10 дБ, а для женского – -12.5 дБ.

Ключевые слова: речь, голос, эффект Ломбарда, бинауральный слух, пространственная избирательность слуха, расстояние между диктором и слушателем, обнаружение речевого сигнала

DOI: 10.31857/S0869813924020031, **EDN:** DJSPNE

ВВЕДЕНИЕ

Успешная речевая коммуникация в условиях большой группы людей реализуется благодаря пространственной избирательности слуха. Бинауральные механизмы обеспечивают настройку слухового внимания на определенную область пространства,

в которой находится целевой диктор [1–3]. Слушатель способен различать источники, разделенные по азимутальному углу в семь и более градусов, и при необходимости переключать внимание между ними [4]. Бинауральные механизмы участвуют также и в локализации источника звука по расстоянию при удаленности источника звука от слушателя менее 4–5 м [5, 6]. Показано, что для локализации источника звука на таких расстояниях важны высокочастотные составляющие звукового сигнала [7, 8]. Был обнаружен эффект пространственной избирательности по расстоянию. Он состоит в том, что при одинаковых уровнях интенсивности в месте прослушивания, разделение помехи и целевого сигнала вызывает одинаковое освобождение от маскировки независимо от того, какой из источников – целевого сигнала или помехи – расположен ближе к слушателю [9].

Речь как звуковой сигнал имеет широкий диапазон частот. Вместе с тем основные характеристики голоса дикторов, включающие формантную структуру звуков речи, расположены в более узких областях спектра. Эти области соответствуют рабочему диапазону низкочастотных бинауральных механизмов и границе спектральных диапазонов, в которых реализуются низкочастотные и высокочастотные бинауральные механизмы. Первый диапазон включает частоты основного тона голоса (F0) у взрослого человека (100–250 Гц) и первую форманту гласных звуков речи (300–1300 Гц). Второй диапазон находится в пределах 2–4 кГц и содержит спектральные области второй и последующих формант гласных звуков. Роль этих механизмов в обнаружении голоса диктора при разделении источников целевого сигнала и помехи по расстоянию практически не исследована [3]. Однако были получены предварительные данные, указывающие на влияние спектральных характеристик голоса диктора на пространственную избирательность слуха по расстоянию при обнаружении его сигнала на фоне речеподобного шума [10].

При обнаружении и распознавании целевого голоса диктора на фоне шума наиболее эффективной помехой является шум толпы, который обладает спектральными и временными характеристиками, близкими к целевому сигналу [11], что вызывает максимальную величину маскирования [12]. Вместе с тем именно такая ситуация – выделение целевого речевого сигнала при пребывании в общественных местах – на улице, в магазине, на вокзале, в аэропорту и т.д. является наиболее экологически и социально значимой.

Пространственная избирательность слуха по отношению к речевым сигналам в мировой научной литературе изучается без учета изменений характеристик голоса при произнесении слов в шуме, так называемого эффекта Ломбарда. В шуме диктор испытывает затруднения в восприятии собственной речи. Такое нарушение работы слуховой обратной связи вызывает непроизвольное усиление голоса, которое создается в результате повышения тонуса мышц, участвующих в голосообразовании. Повышение мышечного тонуса приводит как к повышению уровня голоса, так и к повышению F0, частоты основного тона голоса, частот основных спектральных компонентов гласных, сонорных согласных [13, 14] и спектрального центроида мощности (ЦМ) речевого сигнала [15–17].

Смещение спектра голоса диктора в сторону высоких частот может улучшить пространственную избирательность речевого слуха по расстоянию за счет более активного включения высокочастотного механизма пространственного слуха. Целью данной работы являлась проверка этой гипотезы. Поскольку типичные мужские и женские голоса значительно различаются по спектру, то дополнительной задачей исследования было выполнить сравнительный анализ пространственной избирательности для дикторов разного пола, которые имеют типичные гендерные характеристики голоса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании принимали участие 36 испытуемых (16 мужчин, 20 женщин, возраст 18–35 лет, средний возраст 23 ± 6 года) с нормальным слухом по результатам

тональной пороговой аудиометрии и теста обнаружения паузы [18]. Запись речевых стимулов и их последующее прослушивание выполняли в анэхоидной звукоизолированной камере объемом 62.5 м³, ослабление уровня внешних шумов составляло не менее 40 дБ на частотах 0.5–16 кГц. Речевые стимулы представляли собой записи восьми двусложных слов русской речи: «кредит», «набор», «рубеш», «строка», «выпуск», «плата», «почва», «ручка». Эти записи были выполнены при участии двух дикторов – носителей русского языка, которые не входили в число испытуемых, участвовавших в экспериментах по обнаружению речи. Первым диктором был мужчина 30 лет (обычная речь F₀: 113 ± 4 Гц, ЦМ: 899 Гц; ломбардная речь 130 ± 2 Гц, ЦМ: 1186 Гц), вторым – женщина 28 лет (F₀: обычная речь 198 ± 16 Гц, ЦМ: 1021 Гц; ломбардная речь 214 ± 17 Гц; ЦМ: 1108 Гц). Речь записывали при надетых головных телефонах в тишине (обычная речь) и при диотической подаче дикторам в наушники шума многоголосия уровнем 60 дБ (ломбардная речь). Для снижения влияния заглушающего эффекта наушников на восприятие дикторами собственного голоса использовали обратную связь: сигнал с микрофона, при помощи которого велась запись голоса, в режиме реального времени подавали диктору в наушники с таким усилением, при котором воспринимаемая им громкость собственного голоса соответствовала таковой без головных телефонов.

В качестве маскирующих сигналов применяли отрезки шума многоголосия продолжительностью 2 с, имевшие линейные фронты нарастания и убывания амплитуды продолжительностью по 0.1 с каждый. Шум многоголосия включал записи речи четырех дикторов (двух мужчин и двух женщин). Он был создан в результате микширования 32 аудиофайлов (4 диктора × 8 слов) длительностью 10 с, в каждом из которых один и тот же речевой стимул повторялся несколько раз подряд без пауз. Спектральные характеристики шума многоголосия представлены на рис. 1. Амплитудно-частотный спектр имеет характерный для речевого сигнала наклон и по своим характеристикам близок к розовому шуму. На спектрограмме видны фрагменты формантной структуры отдельных гласных звуков, типичные для шума многоголосия и демонстрирующие сходство шума с речевым сигналом по ритмической структуре. При прослушивании этого речевого маскира испытуемый слышал шум многоголосия, когда одновременно говорят много людей. Создание такого шума подробно описано в работе [19]. Из полученного в результате микширования аудиофайла были вырезаны десять случайных фрагментов продолжительностью 2 с.

Для воспроизведения шумовых и речевых стимулов использовали ноутбук с внешней звуковой картой Tascam US-16x08 (44100 Гц, 16 бит) и усилитель мощности Neva Audio SA-3004 с подключенными к нему динамическими громкоговорителями Klipsch R-3800-C. Громкоговорители располагались внутри анэхоидной камеры, на расстоянии 1 и 4 м напротив сидящего испытуемого на уровне его головы. Акустический контроль параметров шумовых и речевых стимулов в месте расположения испытуемого осуществляли при помощи набора калиброванного измерительного оборудования фирмы Bruel & Kjaer (микрофон 4145, предусилитель 2639, усилитель 2606) в режиме усреднения среднеквадратичной мощности на интервале времени 1 с. Акустический контроль при записи речи выполняли с помощью комплекта измерительного оборудования для поля звукового давления фирмы CrySound (искусственное ухо CRY318 и анализатор спектра CRY651B).

В первой части исследования 20 испытуемым (10 мужчин и 10 женщин) предлагали выполнить перцептивную задачу обнаружения речевого сигнала в четырех экспериментальных сериях. Пороги обнаружения оценивали методом двухальтернативного двухинтервального вынужденного выбора в 4 сериях, которые различались типом целевого сигнала и расположением источников целевого и маскирующего сигналов. Порядок прослушивания серий для всех испытуемых был одинаковым: 1) обычная речь, конфигурация «речь 1 м – шум 4 м»; 2) обычная речь, «речь 4 м – шум 1 м»; 3) лом-

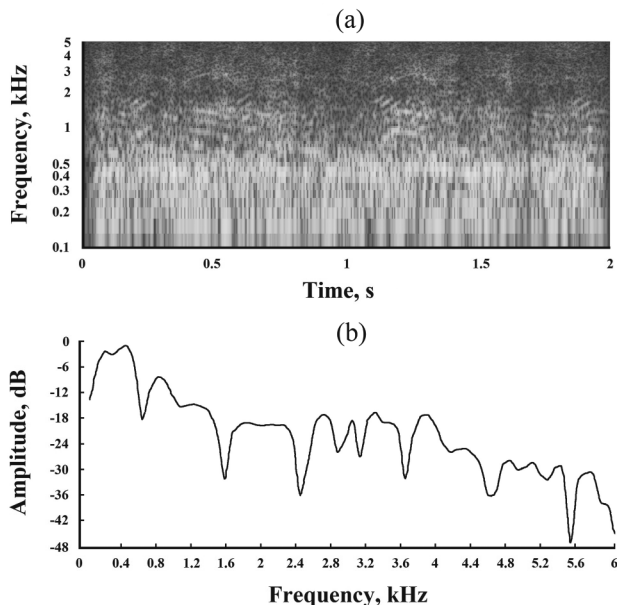


Рис. 1. Спектральные характеристики шума многоголосия. (а) – спектрограмма, (б) – амплитудно-частотный спектр.

бардная речь, «речь 1 м – шум 4 м»; 4) ломбардная речь, «речь 4 м – шум 1 м». Пороги определяли, меняя соотношение сигнал/шум (С/Ш) с шагом в 3 дБ: -8, -11, -14, -17 дБ. Во всех сериях уровень целевого сигнала был равен 60 дБ УЗД в месте прослушивания. В каждой из них количество целевых сигналов составляло 16 (2 диктора × 8 слов) при каждом из отношений С/Ш. В квазислучайных последовательностях серии половину целевых стимулов предъявляли в первом интервале шума, а другую половину – во втором. Рандомизация экспериментальных серий, их воспроизведение и регистрация ответов испытуемых выполнялись с использованием оригинального программного обеспечения, созданного в среде Matlab.

Во второй части экспериментов все 36 человек участвовали в определении порогов обнаружения при определенном положении источников: целевой сигнал прослушивали с расстояния 1 м, а шум многоголосия подавали с расстояния 4 м (серии 1 и 3). Эта часть работы позволила оценить влияние эффекта Ломбарда у дикторов разного пола на пространственную избирательность слуха.

Анализ данных выполняли, вычисляя индивидуальные и среднегрупповые вероятности обнаружения речевых стимулов при разных отношениях С/Ш. Сравнение вероятностей обнаружения речевых стимулов при одинаковых отношениях С/Ш в сериях выполняли с использованием биномиального теста в пакете программ Statistica. Порог обнаружения целевого речевого сигнала оценивали на уровне вероятности обнаружения 0.67.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой части исследования оценивали вероятность обнаружения целевого речевого сигнала независимо от пола диктора. По результатам всех экспериментальных серий получили снижение вероятности обнаружения речевого стимула при уменьшении отношения С/Ш до -14 дБ ($p < 0.01$) (рис. 2). Достоверных различий между обнаруже-

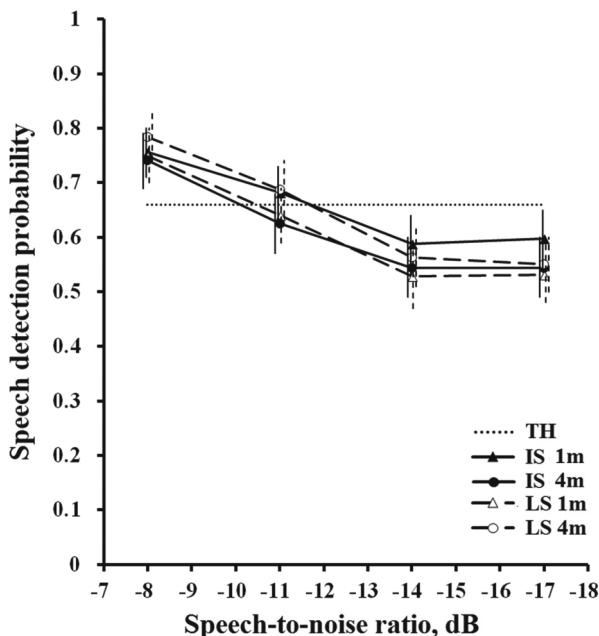


Рис. 2. Обнаружение обычного и ломбардного речевого сигнала при разных положениях источника целевого сигнала и шума многоголосия. По абсциссе – соотношение сигнал/шум (дБ); по ординате – вероятность обнаружения речевого стимула на фоне шума многоголосия; TH – порог обнаружения стимула; IS – стимул с обычной речью; LS – стимул с ломбардной речью; 1 м – источник целевого сигнала расположен на расстоянии 1 м от слушателя; 4 м – источник целевого сигнала расположен на расстоянии 4 м от слушателя. Вертикальные линии – доверительный интервал ($n = 320$).

нием речевого стимула при отношениях С/Ш -14 и -17 дБ не было выявлено ($p > 0.05$), а вероятность обнаружения при этих уровнях зашумления находилась в диапазоне от 0.60 до 0.53 и была ниже пороговой. Сравнение результатов серий с разным положением целевого и шумового источников, а также с обычным и ломбардным целевым речевым сигналом не показало достоверных различий ни при одном из отношений С/Ш. Порог на уровне вероятности обнаружения 0.67 был достигнут при обнаружении стимула во всех сериях при отношении С/Ш равном -11 дБ. Таким образом, пространственная избирательность для целевого сигнала при ломбардной речи оказалась такой же, что и при обычной речи в задаче обнаружения голосов дикторов обоего пола.

Во второй части работы проверяли предположение о том, что с учетом пола диктора ломбардная речь будет обнаруживаться лучше при одинаковых уровнях интенсивности целевых сигналов. Целевой речевой сигнал, источник которого находился на расстоянии 1 м от слушателя, обнаруживали 18 мужчин и 18 женщин на фоне источника шума, удаленного на 4 м от слушателя. Были сопоставлены результаты по обнаружению обычной и ломбардной речи для речевых стимулов, произнесенных мужским и женским голосами. Стимулы, содержащие обычную и ломбардную речь одного и того же диктора мужчины, имели одинаковую вероятность обнаружения при всех отношениях С/Ш ($p > 0.05$) (рис. 3). Такой же результат получили для стимулов, произнесенных женским голосом. Обычная и ломбардная речь диктора женщины обнаруживались с одинаковыми вероятностями при всех отношениях С/Ш ($p > 0.05$). Сравнение обнаружения на фоне шума двусложных слов, произнесенных женским и мужским голосами в обычной речи, не показало достоверных различий ни при одном из соотно-

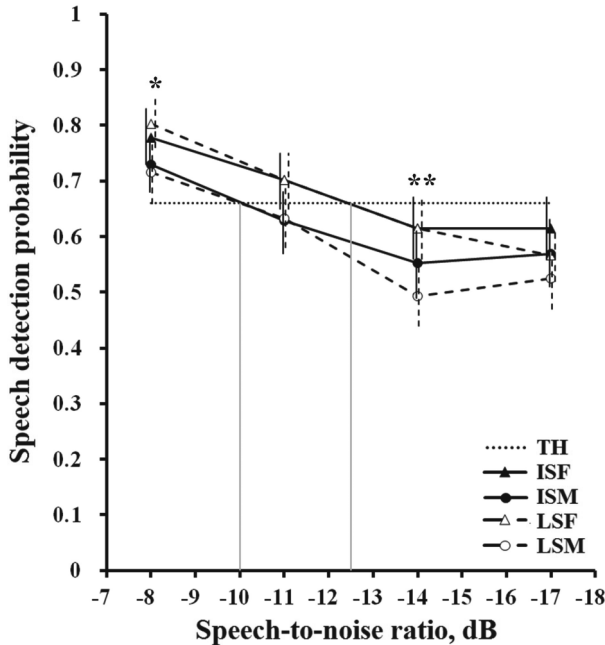


Рис. 3. Обнаружение мужского и женского голоса при обычной и ломбардной речи (источник удален на 1 м от слушателя) на фоне шума многоголосия (источник удален на 4 м от слушателя). По абсциссе – соотношение сигнал/шум (дБ); по ординате – вероятность обнаружения речевого стимула на фоне шума многоголосия; TH – порог обнаружения стимула; ISF – стимул с женской обычной речью; ISM – стимул с мужской обычной речью; LSF – стимул с женской ломбардной речью; LSM – стимул с мужской ломбардной речью. Маркерами показаны достоверные различия вероятности обнаружения женской и мужской ломбардной речи; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ (биномиальный тест, $n = 288$). Вертикальные линии – доверительный интервал ($n = 288$).

шений С/Ш ($p > 0.05$). При С/Ш равном -11 дБ различия выявлялись в виде тенденции ($p = 0.06$).

При ломбардной речи женский голос обнаруживался достоверно лучше мужского при отношении С/Ш = -8 и -14 дБ ($p = 0.014$ и $p = 0.003$ соответственно), а при С/Ш = -11 дБ различия были на уровне тенденции ($p = 0.076$). Таким образом, вблизи порога обнаружения получили тенденцию к лучшему обнаружению двусложных слов, произнесенных женским голосом, причем при ломбардной речи эти различия были статистически достоверны. Этот результат позволил оценить различия в порогах обнаружения мужского и женского голоса. Для мужского голоса порог составил -10 дБ, а для женского – -12.5 дБ.

Таким образом, для обычной речи пороги обнаружения мужского и женского голоса на уровне 0.67 достоверно не различались, а для ломбардной речи со смещенным в сторону высоких частот спектром пороги были различны.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вероятность обнаружения голоса при пространственном разделении целевого источника и помехи по расстоянию в 3 м была выполнена в диапазоне соотношения С/Ш - 8 – -17 дБ. По сравнению с предыдущим исследованием [9], в котором применяли только обычную речь, дизайн эксперимента был изменен. Этот диапазон был сдвинут на 3 дБ в направлении снижения соотношения С/Ш. Целью такого изменения

было достижение порога обнаружения, поскольку даже при самом низком соотношении С/Ш вероятность распознавания в предыдущем исследовании составляла выше 70%. В результате более высокий уровень неопределенности при обнаружении целевого голоса в измененном диапазоне повлиял на вероятность обнаружения таким образом, что уже для соотношения С/Ш -8 дБ получили значения ниже 0.8 по сравнению со средним значением 0.9, полученным в аналогичной ситуации в предыдущей работе. Поэтому при оценке порога применили критерий 0.67 вероятности обнаружения целевого сигнала. С учетом высокого уровня неопределенности получили такую же величину порога обнаружения целевого сигнала для обычной речи на фоне речеподобного шума (шума многоголосия), что и в предыдущем нашем исследовании. Пороговое соотношение С/Ш составило -11 дБ, а после -14 дБ достоверных изменений вероятности обнаружения не выявлено, т.е. характер ответов испытуемых был случайным.

В представленной работе получили подтверждение полученные ранее данные по положению целевого сигнала и помехи [9]. При равных соотношениях их уровней интенсивности в месте расположения слушателя освобождение от маскировки не зависело от того, какой из источников – целевого сигнала или помехи – находился ближе к слушателю. Достоверных различий в вероятности обнаружения при разном положении целевого сигнала и помехи не было выявлено во всем исследованном диапазоне С/Ш. В упомянутой выше работе освобождение от маскировки при пространственном разделении, по сравнению с пространственным совпадением целевого сигнала и шума многоголосия, составила 2–3 дБ (шум многоголосия). В другом исследовании разница в уровне маскировки при синфазной и противофазной подаче целевого речевого сигнала на фоне непрерывного бинаурального шума равнялась 7 дБ по средним данным в группе испытуемых той же возрастной группы, что и в нашем исследовании [20]. Заметим, что последний результат был получен при максимальном разделении по фазе целевого сигнала и помехи, соответствующем 180° , тогда как освобождение от маскировки в случае пространственного разделения по расстоянию было достигнуто при околупороговых различиях в азимутальных углах, приходящихся на левое и правое ухо – около 2° .

Применение в качестве целевого сигнала ломбардной речи не привело к значимым изменениям обнаружения сигнала по сравнению с обычной речью при совместном рассмотрении данных для мужского и женского голоса. Вместе с тем, как показано в разделе «Методы исследования», F_0 при ломбардной речи увеличивается на фоне шума по средним данным на 16–17 Гц, а спектральный центроид – на 87 и 287 Гц. Заметим, что голоса дикторов были подобраны нами определенным образом – разница в F_0 составила около 100 Гц и была близка к октавному повышению высоты, что характерно для типичных мужских и женских голосов [21]. Таким образом, увеличение доли высоких частот в ломбардной речи оказывается существенным при его сравнении с гендерными различиями голосов дикторов. Оно менее выражено, чем различие типичного мужского и женского голосов, поэтому раздельное рассмотрение предполагаемого эффекта ломбардной речи на обнаружение мужского и женского голосов было обоснованным.

В случае ломбардной речи, то есть при смещении спектральных областей голосов в высокочастотную область по сравнению с обычной речью, достоверные различия были выявлены между результатами обнаружения мужского и женского голосов. Различия в пороге обнаружения для мужского и женского голосов были определены в 2.5 дБ, тогда как для обычной речи пороги различались по средним данным, но достоверных различий выявлено не было. Полученная разница была сопоставима с различием в уровне маскировки при пространственном разделении целевого сигнала и речеподобного шума, она составляла 2–3 дБ (шум многоголосия) [9]. Полученный результат позволяет считать, что найденное различие в величине порогов для мужского и женского голосов при ломбардной речи с пространственным освобождением от маскировки является следствием смещения в высокочастотную область спектра речи этого типа.

Уровень шума многоголосия, при котором выполняли записи речи дикторов, составлял 60 дБ. Известно, что при более высоких уровнях шума эффект сильнее выражен [13, 22, 23]. Использование уровней около 80 дБ, вероятно, привело бы к более существенным различиям в обнаружении обычной и ломбардной речи, однако продолжительное воздействие шума высокого уровня интенсивности при оценке порогов противоречит этическим требованиям безопасности. В качестве косвенного подтверждения усиления эффекта и отличий от обычной речи можно рассматривать данные, полученные в психоакустических опытах и в модельных экспериментах при обнаружении «кричащей» речи [14]. Однако целью нашего исследования было сравнение вероятностей обнаружения обычной и ломбардной речи при уровне шума многоголосия, более характерного для повседневного общения и не вызывающего перцептивного дискомфорта.

В нашей работе были использованы голоса дикторов, которые имеют типичные гендерные различия F_0 вблизи одной октавы. Влияние высоты голоса в околопороговых условиях проявилось при сходной схеме расположения источников обычной речи и шума многоголосия [10]. Эти результаты обнаружения обычной речи показали улучшение и значимые различия ($p < 0.05$) для женского голоса с наиболее высокой средней $F_0 - 226 \pm 12$ Гц по сравнению с тремя другими (два мужских и низкий женский голос) в случае локализации источника шума на расстоянии 1 м, а источника речи – 4 м от слушателя и соотношения С/Ш -14 дБ [10].

Полученные нами данные существенно дополняют представления об избирательности механизмов выделения речевого сигнала в шуме. Они могут быть использованы для моделирования процессов распознавания речи в шуме, развития технологий слухопротезирования с целью повышения эффективности выделения целевого речевого сигнала в условиях сложных коммуникативных сцен. Вместе с тем исследования голоса последних десятилетий демонстрируют снижение различий по данному признаку и тенденцию к сближению гендерных диапазонов F_0 , в частности, понижению женских голосов в среднем на 20–22 Гц [25]. На гендерные проявления эффекта Ломбарда может оказывать влияние и возрастной фактор, который определяет изменения в органах речеобразования и, в первую очередь, в голосовых связках пожилого человека [25, 26]. При этом, как правило, диапазоны высоты голоса также сближаются: у мужчин F_0 смещается в сторону повышения, у женщин, наоборот, в сторону понижения [26]. В настоящем исследовании это направление сравнительной оценки не рассматривалось, но оно будет включено в дальнейшее изучение проблемы избирательности речевого слуха. Представляется существенным проанализировать возможные гендерные различия в группе аудиторов, т. к. согласно данным Похилайнен и соавт., они наблюдали значительное преимущество в обнаружении «кричащей» речи у аудиторов-мужчин относительно аудиторов-женщин [24].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А. П. Гвоздеву за подготовку программного обеспечения для выполнения процедуры эксперимента и акустические измерения при подготовке методики.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А. И. Г. – разработка идеи и дизайна работы, написание рукописи; Л. А. М. – выполнение записей речи, проведение экспериментов, анализ данных, работа над текстом рукописи; Е. А. О. – анализ литературных данных, редактирование рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00068). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (протокол № 01-10 от 18 октября 2022 г.)

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bronkhorst AW* (2015) The cocktail-party problem revisited: early processing and selection of multi-talker speech. *Atten Percept Psychophys* 77(5): 1465–1487.
<https://doi.org/10.3758/s13414-015-0882-9>
2. *Andreeva IG* (2018) Spatial selectivity of hearing in speech recognition in speech-shaped noise environment. *Hum Physiol* 44: 226–236.
<https://doi.org/10.1134/S0362119718020020>
3. *Andreeva IG, Ogorodnikova EA* (2022). Auditory Adaptation to Speech Signal Characteristics. *J Evol Biochem Physiol* 58(5): 1293–1309.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050027>
4. *Marrone N, Mason CR, Kidd G* (2008) Tuning in the spatial dimension: Evidence from a masked speech identification task. *J Acoust Soc Am* 124(2): 1146–1158.
<https://doi.org/10.1121/1.2945710>
5. *Haustein BG* (1969) Hypothesen über die einhörige Entfernungswahrnehmung des menschlichen Gehörs. *Hochfrequenztechnik und Elektroakustik* 78(2): 45–57.
6. *Mershon DH, Bowers JN* (1979) Absolute and relative cues for the auditory perception of egocentric distance. *Perception* 8(3): 311–322.
<https://doi.org/10.1068/p080>
7. *Kolarik AJ, Moore BC, Zahorik P, Cirstea S, Pardhan S* (2016) Auditory distance perception in humans: a review of cues, development, neuronal bases, and effects of sensory loss. *Atten Percept Psychophys* 78: 373–395.
<https://doi.org/10.3758/s13414-015-1015-1>
8. *Андреева ИГ, Бахтина АВ, Гвоздева АП* (2014) Разрешающая способность слуха человека по расстоянию при приближении и удалении источников звука разного спектрального состава. *Сенс сист* 28(4): 3–12. [*Andreeva IG, Bahtina AV, Gvozdeva AP* (2014) Human's hearing resolution in case of localizing of approaching and withdrawing sound images with various spectral structures. *Sensory Systems* 28(4): 3–12. (In Russ)].
<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22741084>
9. *Andreeva IG, Dymnikova M, Gvozdeva AP, Ogorodnikova EA, Pak SP* (2019). Spatial separation benefit for speech detection in multi-talker babble-noise with different egocentric distances. *Acta Acust United Acust* 105(3): 484–491.
<https://doi.org/10.3813/AAA.919330>
10. *Огородникова ЕА, Лабутина ОВ, Андреева ИГ, Гвоздева АП, Баулин ЮА* (2020) Фактор просодики в восприятии коммуникативной сцены с пространственным разделением источников речи и речеподобной помехи. *Лингвистический форум 2020: Язык и искусственный интеллект*. Москва, 12–14 ноября: 127–128. [*Ogorodnikova EA, Labutina OV, Andreeva IG, Gvozdeva AP, Baulin YA* (2020) Faktor prosodiki v vospriyatii kommunikativnoj sceny s prostanstvennym razdeleniem istochnikov rechi i rechepodobnoj pomekhi [The prosody factor in the perception of a communicative scene with spatially separate sources of speech and speech-like interference. *Linguistic Forum 2020: Language and artificial intelligence*. Moscow, November 12-14: 127–128. (In Russ)].
11. *Kleczkowski P, Żak A, Król-Nowak A* (2017) Lombard effect in Polish speech and its comparison in English speech. *Arch Acoust* 42(4): 561–569.
<https://doi.org/10.1515/aoa-2017-0060>.

12. *Brungart DS, Simpson BD, Ericson MA, Scott KR* (2001) Informational and energetic masking effects in the perception of multiple simultaneous talkers. *J Acoust Soc Am* 110(5 Pt 1): 2527–2538. <https://doi.org/10.1121/1.1408946>.
13. *Van Ngo T, Kubo R, Morikawa D, Akagi M* (2017) Acoustical analyses of tendencies of intelligibility in lombard speech with different background noise levels. *J Signal Process Syst* 21(4): 171–174. <https://doi.org/10.2299/jsp.21.171>
14. *Tang P, Xu Rattanasone N, Yuen I, Demuth K* (2017) Phonetic enhancement of Mandarin vowels and tones: Infant-directed speech and Lombard speech. *J Acoust Soc Am* 142(2): 493–503. <https://doi.org/10.1121/1.4995998>
15. *Lu Y, Cooke M* (2008) Speech production modifications produced by competing talkers, babble, and stationary noise. *J Acoust Soc Am* 124(5): 3261–3275. <https://doi.org/10.1121/1.2990705>
16. *Lu Y, Cooke M* (2009) Speech production modifications produced in the presence of low-pass and high-pass filtered noise. *J Acoust Soc Am* 126(3): 1495–1499. <https://doi.org/10.1121/1.3179668>
17. *Garnier M, Henrich N* (2014) Speaking in noise: How does the Lombard effect improve acoustic contrasts between speech and ambient noise? *Comput Speech Lang* 28(2): 580–597. <https://doi.org/10.1016/j.csl.2013.07.005>
18. *Keith RW* (2000) Random Gap Detection Test. St Louis: Auditec St Louis 2000.
19. *Gvozdeva AP, Lunichkin AM, Zaytseva LG, Ogorodnikova EA, Andreeva IG* (2022) Joint Changes in First and Second Formants of /a/, /i/, /u/ Vowels in Babble Noise—a New Statistical Approach. In International Conference on Speech and Computer. Cham: Springer Int Publ. 252–264. https://doi.org/10.1007/978-3-031-20980-2_22
20. *Strouse A, Ashmead DH, Ohde RN, Grantham DW* (1998) Temporal processing in the aging auditory system. *J Acoust Soc Am* 104(4): 2385–2399. <https://doi.org/10.1121/1.423748>
21. *Puts DA, Gaulin SJC, Verdolini K* (2006) Dominance and the evolution of sexual dimorphism in human voice pitch. *Evol Hum Behav* 27(4): 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2005.11.003>
22. *Stowe LM, Golob EJ* (2013) Evidence that the Lombard effect is frequency-specific in humans. *J Acoust Soc Am* 134(1): 640–647. <https://doi.org/10.1121/1.4807645>
23. *Bottalico P, Passione II, Graetzer S, Hunter EJ* (2017) Evaluation of the starting point of the Lombard effect. *Acta Acust United Acust* 103(1): 169–172. <https://doi.org/10.3813/AAA.919043>
24. *Pohjalainen J, Raitio T, Yrttiaho S, Alku P* (2013) Detection of shouted speech in noise: Human and machine. *J Acoust Soc Am* 133(4): 2377–2389. <https://doi.org/10.1121/1.4794394>
25. *Berg M, Fuchs M, Wirkner K, Loeffler M, Engel C, Berger T* (2017) The Speaking Voice in the General Population: Normative Data and Associations to Sociodemographic and Lifestyle Factors. *J Voice* 31(2): 257.e13–257.e24. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2016.06.001>
26. *Шиленкова ВВ, Бестолкова ОС* (2013) Пресбифония. Возрастные изменения акустических параметров голоса. *Вестн оториноларингол* 78(6): 24–27. [*Shilenkova VV, Bestolkova OS* (2013) Age-related changes in the acoustic voice characteristics. *Vestn Otorinolaringol* 8(6): 24–27. (In Russ)]. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=21074035>

Lombard speech detection in case of spatial separation between noise source and talkers of different genders

I. G. Andreeva^{a,*}, A. M. Lunichkin^a, and E. A. Ogorodnikova^{a,b}

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

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

*e-mail: ig-andreeva@mail.ru

The spatial selectivity of hearing to speech signals was studied when the target signal and interference were separated by distance between their sources and the listener. In the work, the hypothesis about the improvement of hearing selectivity due to more intensive activation of the high-frequency binaural mechanism due to the shift of the speaker's voice spectrum occurs in noisy environment towards high frequencies, was tested. The thresholds for detecting the target signal – a two-syllable word uttered by male or female, were evaluated in the two-alternative two-interval forced choice paradigm in 4 series. Series differed by the type of target signal (ordinary or Lombard speech) and the location of target source and noise (multi-talker noise) one. The both sources were located at a distance of 1 and 4 m opposite the subject at the level of his head. The detection threshold was defined as the ratio of signal and noise levels at the listener's place (S/N). The threshold for detecting the target signal (male and female speaker voices together) was -11 dB S/N for ordinary as well as Lombard speech. It did not depend on which of the sources - the target signal or noise, was closer to the listener. In normal speech, the detection thresholds on average differed for male and female voices, but the difference was not significant. In Lombard speech, these thresholds were significantly different: for a male voice, the threshold at a detection level of 0.67 was -10 dB S/N, and for a female voice – -12.5 dB S/N.

Keywords: speech, spectral characteristics of voice, Lombard effect, binaural hearing, spatial hearing selectivity, talker-to-listener distance, speech detection

ПРОДОМЕН BDNF ТОРМОЗИТ КВАНТОВУЮ СЕКРЕЦИЮ МЕДИАТОРА В МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ ПРИ УЧАСТИИ СОРТИЛИНА И АДЕНОЗИНОВЫХ A₁-РЕЦЕПТОРОВ

© 2024 г. А. И. Молчанова¹, О. П. Балезина¹, А. Е. Гайдуков^{1,*}

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

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2023 г.

После доработки 29.11.2023 г.

Принята к публикации 05.12.2023 г.

Нейротрофин мозга (BDNF) синтезируется в результате протеолиза пронеиротрофина с образованием зрелого BDNF и продомена. Регуляторное влияние последнего на нервно-мышечную передачу только начинает изучаться. В моторных синапсах продомен BDNF оказывает тормозное действие, стимулируя за счет активации рецепторов р75 калиевые каналы GIRK. Целью данной работы стало продолжение исследования механизма тормозного действия продомена BDNF в зрелых моторных синапсах диафрагмы мыши. С помощью микроэлектродов регистрировали спонтанные (миниатюрные) и вызванные стимуляцией моторных аксонов многоквантовые потенциалы концевой пластинки – МПКП и ПКП соответственно. Используя селективные антагонисты, выявили, что тормозное действие продомена на синаптическую передачу требует участия сортилина, но не TrkB-рецепторов. Стимулирование GIRK, индуцированное продоменом, требует участия синаптических метаболитных рецепторов, обеспечивающих действие на GIRK βγ-субъединиц G_i-белков. При помощи селективных ингибиторов установили, что M2-холинорецепторы и P2Y₁₃-пуринорецепторы негативно регулируют пресинаптические кальциевые каналы L-типа, при этом оба типа рецепторов функционально не связаны с действием продомена BDNF. Оказалось, что для торможения квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах под влиянием продомена BDNF необходима активность только аденозиновых A₁-рецепторов. Кроме того, в условиях фармакологического блокирования паннексина 1 пробеницидом продомен BDNF утрачивал свое тормозное действие на нервно-мышечную передачу. Таким образом, для осуществления торможения квантовой секреции медиатора под действием продомена BDNF в моторных синапсах мыши требуется участие сортилина и эндогенной активации аденозиновых A₁-рецепторов аденозина, для которой необходимо функционирование паннексина 1, обеспечивающих, вероятнее всего, дополнительный к везикулярному источник синаптической АТФ.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, продомен BDNF, сортилин, аденозин, A₁-рецепторы, паннексин 1

DOI: 10.31857/S0869813924020045, **EDN:** DJQTRN

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофин мозга (brain-derived neurotrophic factor – BDNF) – один из самых изученных представителей семейства нейротрофинов с широким спектром долговре-

менных и кратковременных (острых) регуляторных функций. Показана его ключевая роль в ходе развития нервной системы, установления, созревания и поддержания синаптических контактов как в центральной нервной системе (ЦНС), так и периферической. Кроме того, BDNF хорошо известен как модулятор нейротрансмиссии в синапсах ЦНС [1]. В последние годы представления о спектре активности этого нейротрофина расширились, когда обнаружилась способность BDNF высвобождаться не только из пресинаптических нервных окончаний и перисинаптических шванновских клеток, но и из волокон скелетной мускулатуры, то есть выступать в роли миокина, ретроградно регулирующего квантовую секрецию ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах [2, 3]. Присутствие зрелого BDNF и его рецепторов (TrkB и p75), способных запускать целый комплекс сигнальных путей, было выявлено во всех компонентах моторных синапсов млекопитающих [4]. При этом трактовка синаптических модуляторных воздействий эндогенного BDNF *in vivo* требует учета возможного одновременного действия побочного продукта его созревания из проBDNF – продомена BDNF. Его сигнальная функция только начала изучаться в моторных синапсах [5]. В ЦНС продомен BDNF может играть независимую регуляторную роль, влияя на проявления долговременной синаптической пластичности [6]. Недавно мы установили, что продомен BDNF в наномолярной концентрации оказывает на синаптическую передачу в нервно-мышечных синапсах действие, полностью противоположное эффектам зрелого нейротрофина – снижает частоту одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и уменьшает амплитуду постсинаптических потенциалов, как миниатюрных, так и многоквантовых ПКП, возникающих в результате быстрой синхронной секреции квантов АХ при приходе пресинаптического потенциала действия. Наряду со снижением амплитуд МПКП и ПКП действие продомена BDNF сопровождается уменьшением квантового состава ПКП [5]. Негативное влияние на частоту МПКП и квантовый состав ПКП, во-первых, свидетельствует о наличии пресинаптической компоненты у тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ, а, во-вторых, могло быть связано с уменьшением пресинаптического входа ионов Ca^{2+} за счет возрастания активности пресинаптических K^+ -каналов и снижения вероятности открывания потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Мы установили, что тормозное действие продомена BDNF на квантовую секрецию АХ реализуется посредством рецепторов p75 и запуска сигнального каскада, направленного на стимулирование G-белок-сцепленных калиевых каналов входящего выпрямления (GIRK) [5]. Рецепторы p75 могут образовывать рецепторные комплексы с сортилином или рецепторами TrkB, обеспечивая развитие сигналинга проBDNF [7, 8]. При этом ничего неизвестно, требуется ли образование таких функциональных комплексов при рецепторном действии продомена BDNF в моторных синапсах. Остается неизученным и другой вопрос – о характере регуляции GIRK в нервно-мышечных синапсах млекопитающих. Дело в том, что GIRK требуют дуальной активации. Во-первых, необходимо взаимодействие GIRK с мембранным фосфолипидом фосфоинозитол-(4,5)-бисфосфатом (PIP_2) – на увеличение его уровня, вероятно, направлен запускаемый продоменом BDNF сигнальный путь с участием ROCK. Во-вторых, с GIRK должны взаимодействовать $\beta\gamma$ -субъединицы G_i-белков [9]. В моторных синапсах млекопитающих наличествует целый ансамбль пресинаптических метаботропных рецепторов, сопряженных с G_i-белками. К числу наиболее вероятных кандидатов на роль регуляторов GIRK можно отнести мускариновые M2-холинорецепторы [10, 11], аденозиновые A₁-рецепторы и P2Y₁₃-пуринорецепторы [12–14]. Необходимо было установить, какие именно из этих метаботропных рецепторов могут быть вовлечены в GIRK-опосредованное тормозное действие продомена BDNF на нервно-мышечную синаптическую передачу. На решение вышеперечисленных вопросов и было направлено настоящее исследование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Эксперименты были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы взрослых мышей (8–10 недель, масса тела 30–35 г) линии C57BL/6 обоих полов. Мыши были получены из вивария факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ (Москва, Россия). Эвтаназия мышей обеспечивалась быстрой декапитацией. В исследовании было использовано 39 животных.

Электрофизиология. Все эксперименты проводили при температуре 20–22°C. Нервно-мышечный препарат левой половины диафрагмы с диафрагмальным нервом помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл и проводили перфузию оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли (pH 7.2–7.4), содержащим (в mM): NaCl – 135, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 0.9, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, NaHCO₃ – 16.3, глюкоза – 11 [15]. Регистрацию постсинаптических потенциалов осуществляли с использованием заполненных 2.5 M KCl стеклянных микроэлектродов, изготавливаемых с помощью пуллера MP-500 (RWD Life Sciences, Китай). Сопротивление кончиков микроэлектродов составляло 15–20 МОм. Сигналы регистрировали при помощи усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) и записывали с частотой регистрации 10 кГц с использованием аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 3.3.8 (ДИСофт, Россия). Для предотвращения сокращения мышцы при стимуляции диафрагмального нерва проводили поперечное рассечение мышечных волокон для стабилизации их мембранного потенциала на сниженном по сравнению с нерассеченными волокнами уровне (менее -50 мВ). Сразу после рассечения препарат промывали в растворе Лайли (> 150 мл) не менее 1 ч, что позволяло предотвратить возможную блокаду проведения потенциалов действия нерва. Далее в одних и тех же нервно-мышечных синапсах осуществляли регистрацию одноквантовых МПКП и вызванных стимуляцией нерва многоквантовых ПКП. Сначала производили регистрацию МПКП в течение 80–100 с, далее стимулировали диафрагмальный нерв короткими залпами сверхпороговых импульсов (50 стимулов длительностью 0.08–0.1 мс с частотой 50 Гц) и в том же синапсе регистрировали ПКП. Среднее значение амплитуд МПКП, зарегистрированных до залпа ПКП, затем использовали для вычисления квантового состава ПКП. У значений амплитуд МПКП, зарегистрированных до ритмической стимуляции нерва и сразу после нее, отсутствуют статистически значимые различия [16, 17]. Это позволяет исключить возможное влияние десенситизации постсинаптических никотиновых холинорецепторов в развитие изменений амплитуд и квантового состава ПКП по ходу коротких ритмических залпов. Для предотвращения истощения запаса доступных для высвобождения квантов АХ в моторных синапсах стимуляцию диафрагмального нерва проводили с перерывами не менее 5–6 мин. Первичный анализ параметров постсинаптических потенциалов осуществляли с использованием программы MiniAnalysis (Synaptosoft, США). В контроле регистрировали потенциалы минимум от 5 синапсов, затем в перфузионный раствор добавляли исследуемые вещества в определенном порядке и регистрировали активности разных синапсов таким же образом, как и в контроле, в течение 45–60 мин. Критерием включения синапса в выборку для дальнейшего анализа данных служило устойчивое значение мембранного потенциала в течение регистрации – допускались изменения этого параметра менее чем на 5 мВ, в противном случае регистрацию прекращали, а запись не включали в выборку. Среднее время нарастания и полуспада МПКП во всех сериях экспериментов составляло не более 1 и 2.2 мс соответственно, а значения этих временных параметров для ПКП – не более 1.7 и 2.7 мс соответственно (во всех сравниваемых выборках не было статистически значимых различий параметров временного хода постсинаптических потенциалов). В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали амплитуду и временные характеристики МПКП и ПКП, квантовый состав ПКП. Амплитуду ПКП корректировали на нелинейную сумму [5, 18], именно изменения скорректированной амплитуды ПКП отображены на всех рисунках. Квантовый состав ПКП вычисляли как отношение скорректированной амплитуды ПКП к средней в данном синапсе амплитуде МПКП.

Статистическую значимость различий между сравниваемыми выборками оценивали с использованием GraphPad Prism 8.4.3. (GraphPad, США). Нормальность распределения параметров в выборках оценивали с использованием теста Д'Агостино-Пирсона. Далее при нормально распределенных величинах применяли *t*-критерий Стьюдента, а при распределении, отличном от нормального – критерий Манна – Уитни. Двухфакторный дисперсионный анализ с последующим применением апостериорного критерия Бонферрони использовали для анализа амплитуд и квантового состава ПКП в залпе. Различия параметров выборок считали статистически значимыми при $p < 0.05$, n – количество исследованных синапсов в выборке. В тексте и на рисунках данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

Реактивы. Все реактивы для приготовления физиологического раствора Лайли были поставлены Хеликон, Россия. В экспериментах были использованы: продомен BDNF (Alomone, Израиль); антагонист сортилина AF38469 (GlpBio, США); антагонист TrkB-рецепторов циклотраксин В, блокатор потенциалзависимых Ca^{2+} каналов L-типа нитрендипин, конкурентный антагонист P2Y13-рецепторов MRS 2211 (все – Tocris, Великобритания); антагонист мускариновых M2-холинорецепторов метоктрамин, антагонист аденозиновых A_1 -рецепторов DPСРХ (Santa Cruz, США); блокатор паннексина 1 пробеницид (в виде водорастворимой натриевой соли) (AAT Bioquest, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ использовали деионизированную H_2O в качестве растворителя, кроме AF38469, нитрендипина и DPСРХ, для которых растворителем служил диметилсульфоксид – DMSO (Хеликон, Россия). Концентрация DMSO в рабочих растворах не превышала 0.02% (v/v), данный растворитель в такой концентрации не оказывал статистически значимого самостоятельного действия на исследуемые параметры спонтанной и вызванной секреции АХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первом блоке экспериментов мы решали вопрос о возможном участии функциональных комплексов рецепторов $p75$ с TrkB или сортилином в обеспечении GИRK-опосредованного негативного влияния продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в диафрагмальных синапсах мышцы. У нас было несколько предпосылок для исследования возможного участия TrkB в реализации эффекта продомена BDNF. Во-первых, имеются многочисленные данные об образовании гетеродимеров TrkB и $p75$ на мембране нейронов [19]. Во-вторых, нельзя было исключить возможного ингибирования TrkB в составе возможного функционального рецепторного комплекса с $p75$, что, в свою очередь, могло прекращать описанное тормозное влияние со стороны TrkB на GИRK [20].

Для проверки вовлеченности TrkB в реализацию действия продомена BDNF использовали циклотраксин В – циклический пептидный аллостерический модулятор TrkB, препятствующий его активации [21].

Сам по себе циклотраксин В (100 нМ) не вызвал никаких изменений параметров квантовой секреции АХ в коротких ритмических залпах. МП рассеченных мышечных волокон составил -38.9 ± 1.6 мВ в контроле ($n = 16$) и -39.7 ± 1.6 мВ в присутствии циклотраксина В ($n = 17$, $p = 0.78$). Амплитуда и квантовый состав ПКП, амплитуда МПКП в присутствии антагониста TrkB не имели статистически значимых различий по сравнению с таковыми в контроле (рис. 1а). Продомен BDNF (1 нМ) в присутствии циклотраксина В полностью сохранил свою способность угнетать квантовую секре-

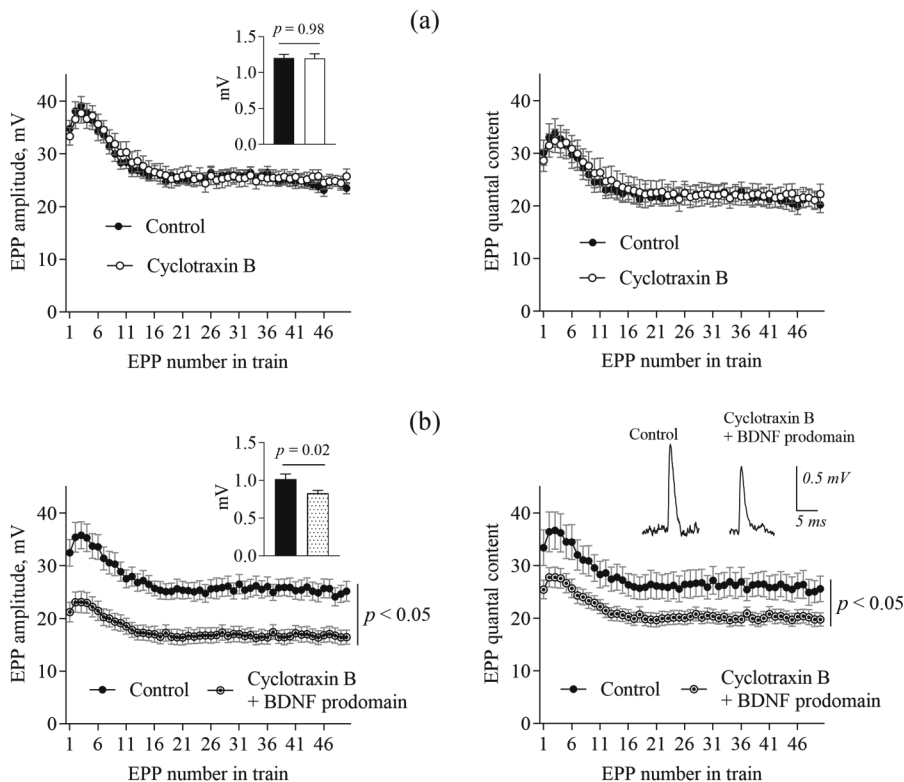


Рис. 1. Тормозное действие продомена BDNF (1 нМ) не зависит от активности TrkB-рецепторов в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 16$) и в присутствии антагониста TrkB-рецепторов циклотраксина В (100 нМ) ($n = 17$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии циклотраксина В ($n = 18$). На врезках – амплитуда МПКП и типичные примеры записей МПКП.

цию АХ. В таких экспериментальных условиях сочетанно и равномерно уменьшались на 25–30% по сравнению с контролем как амплитуды МПКП и ПКП, так и единообразно снижался квантовый состав всех ПКП в коротких ритмических залпах (рис. 1б).

Далее проверяли, участвует ли сортилин в индуцированном продомом BDNF торможении нервно-мышечной передачи. Для этого использовали селективный ингибитор сортилина AF38469 [22]. Сначала исследовали возможное самостоятельное действие этого ингибитора сортилина на синаптическую передачу в моторных синапсах, поскольку до настоящего момента синаптическое действие AF38469 не исследовалось. Оказалось, что, как и циклотраксин В, AF38469 (5 мкМ) не приводил к статистически значимым изменениям ни МП мышечных волокон: -41.8 ± 1.6 мВ в контроле ($n = 18$), -41.0 ± 1.3 мВ в присутствии AF38469 ($n = 21$, $p = 0.71$), ни параметров вызванной стимуляцией нерва секреции АХ. При ингибировании сортилина не наблюдали изменений как амплитуды МПКП и ПКП, так и квантового состава ПКП в залпах по сравнению с контролем (рис. 2а).

Однако в отличие от циклотраксина В, который оказался неспособен предотвратить тормозное влияние продомена BDNF на квантовую секрецию АХ, AF38469 полностью устранил негативное действие продомена BDNF на нервно-мышечную передачу (рис.

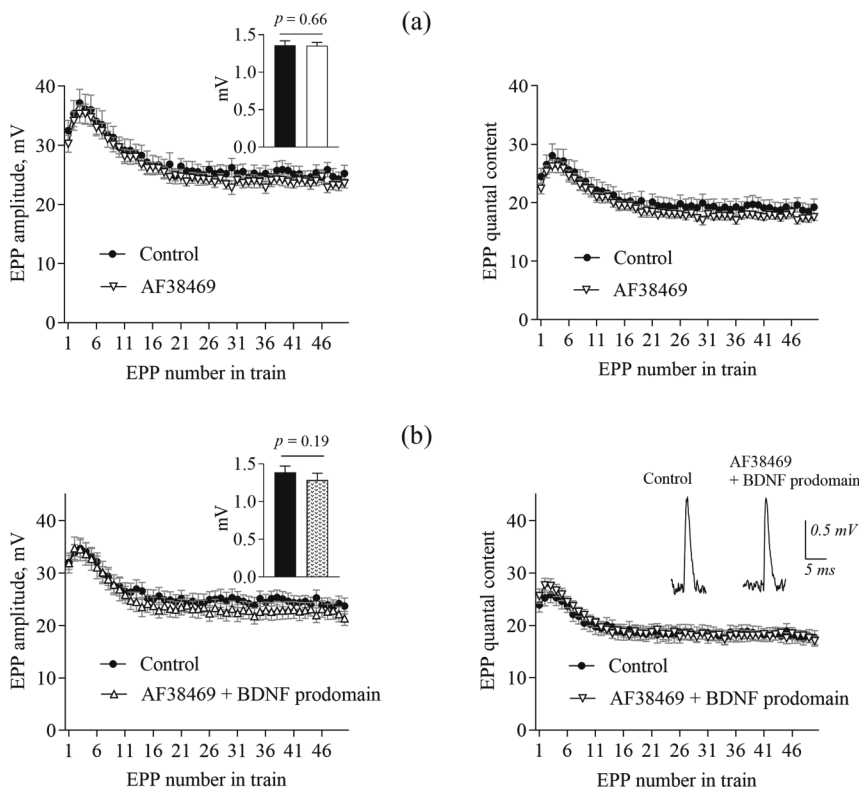


Рис. 2. Сортилин необходим для реализации тормозного влияния продомена BDNF (1 нМ) на синаптическую передачу в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 18$) и в присутствии антагониста сортилина AF38469 (5 мкМ) ($n = 21$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии AF38469 ($n = 18$). На врезках – амплитуда МПКП и типичные примеры записей МПКП.

2б). В присутствии ингибитора сортилина воздействие на моторные синапсы диафрагмы продомена BDNF не вызвало статистически значимых изменений амплитуд МПКП и ПКП, а также квантового состава ПКП в залпах ($n = 18$) по сравнению с таковыми в контроле ($n = 15$, $p > 0.05$).

Таким образом, мы установили, что двунаправленное тормозное действие продомена BDNF (1 нМ): сочетанное снижение амплитуд МПКП и ПКП и одновременное уменьшение квантового состава всех ПКП в коротком залпе (рис. 1б) – требует присутствия и активности не TrkB, а сортилина в моторных синапсах.

Во втором блоке экспериментов мы сосредоточились на поиске синаптических метаботропных рецепторов, сцепленных с G_i -белками, которые могли бы соучаствовать в активации GIRK при действии продомена BDNF.

Сначала проверяли возможную роль активности тормозных мускариновых M2-холинорецепторов в качестве коактиватора GIRK. Известно, что ингибирование этих метаботропных ауторецепторов увеличивает квантовый состав одиночных ПКП, и считается, что активация именно M2-холинорецепторов эндогенным АХ может соучаствовать в регуляторных контурах аутоингибирования вызванной квантовой секреции АХ в моторных синапсах [23–26].

В наших экспериментах исследовали действие блокатора M2-холинорецепторов метоктрамина (1 мкМ) на параметры квантовой секреции АХ в условиях не одиночной, а кратковременной высокочастотной ритмической стимуляции (50 Гц, 1 с) синапсов. Средняя амплитуда МПКП, регистрируемых перед стимуляцией нерва, под действием метоктрамина статистически не отличалась от контроля. Метоктрамин вызывал равномерное увеличение амплитуд ПКП за счет увеличения квантового состава каждого ПКП в залпе (рис. 3а).

Далее мы установили, что такое потенцирование вызванной квантовой секреции АХ в виде равномерного увеличения амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу залпа происходит за счет растормаживания Ca^{2+} -каналов L-типа при ингибировании M2-холинорецепторов. Считается, что этот тип Ca^{2+} -каналов, хотя и присутствует на пресинаптической мембране моторных нервных окончаний, в условиях, типичных для функционирования зрелых моторных синапсов (вызванная кратковременная ритмическая активность), не принимает участия в регуляции квантовой секреции АХ [27–29], хотя в последнее время начинает рассматриваться альтернативная точка зрения о слабом участии L-типа Ca^{2+} -каналов в работе моторных синапсов [30]. При этом, будучи «демаскированными», Ca^{2+} -каналы L-типа способны увеличивать квантовый состав ПКП в моторных синапсах. Вовлечь этот тип Ca^{2+} -каналов в потенцирование быстрого синхронного выброса квантов АХ в моторных синапсах можно разными способами – блокируя ВК-каналы [16, 31] или аденозиновые A_1 -рецепторы [16], ингибируя кальцинейрин [32], стимулируя P2X7-рецепторы [33] или действуя на эндоканнабиноидные CB1-рецепторы анандамидом [34].

Действительно, метоктрамин-индуцированное усиление вызванного выброса АХ полностью предотвращалось под действием блокатора L-типа Ca^{2+} -каналов нитрендипина (1 мкМ) (рис. 3б), который сам по себе не влияет на амплитуду и квантовый состав ПКП в коротких ритмических залпах [16, 32].

Учитывая, что метоктрамин-индуцированное и опосредованное активностью Ca^{2+} -каналов L-типа возрастание квантового состава ПКП в залпах могло замаскировать проявления негативного влияния на квантовую секрецию АХ продомена BDNF, в следующей серии экспериментов проводили одновременное двойное блокирование M2-холинорецепторов и Ca^{2+} -каналов L-типа. Оказалось, что в присутствии метоктрамина и нитрендипина продомен BDNF полностью сохранил способность угнетать квантовую секрецию АХ, снижая как амплитуду постсинаптических потенциалов, так и квантовый состав ПКП (рис. 3с).

Совокупность полученных данных свидетельствует, во-первых, о том, что мускариновые M2-холинорецепторы, наряду с участниками других регуляторных контуров, вовлечены в негативную регуляцию активности пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, обеспечивая их «молчащее» состояние в нормальных условиях работы моторных синапсов, а во-вторых, что эти ауторецепторы, несмотря на функционирование при кратковременной залповой активности синапсов, не участвуют в стимулировании GIRK под действием продомена BDNF.

Далее мы тестировали возможное соучастие в тормозных эффектах продомена BDNF G_i -белок-сцепленных P2Y13-пуринорецепторов, активируемых эндогенными АТФ и АДФ в моторных синапсах [12].

Ингибирование P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) оказывало на вызванную квантовую секрецию АХ в коротких ритмических залпах такой же эффект, как и ингибирование M2-холинорецепторов. Под действием MRS2211 происходило равномерное увеличение амплитуд ПКП по всему ходу коротких залпов за счет возрастания квантового состава ПКП (рис. 4а). Оказалось, что активность P2Y13-рецепторов, как и M2-холинорецепторов, направлена на предотвращение вовлечения в регуляцию квантовой секреции АХ Ca^{2+} -каналов L-типа – потенцирующее действие MRS2211 предотвращалось нитрендипином (рис. 4б). Однако, как и в случае с M2-холинорецепторами,

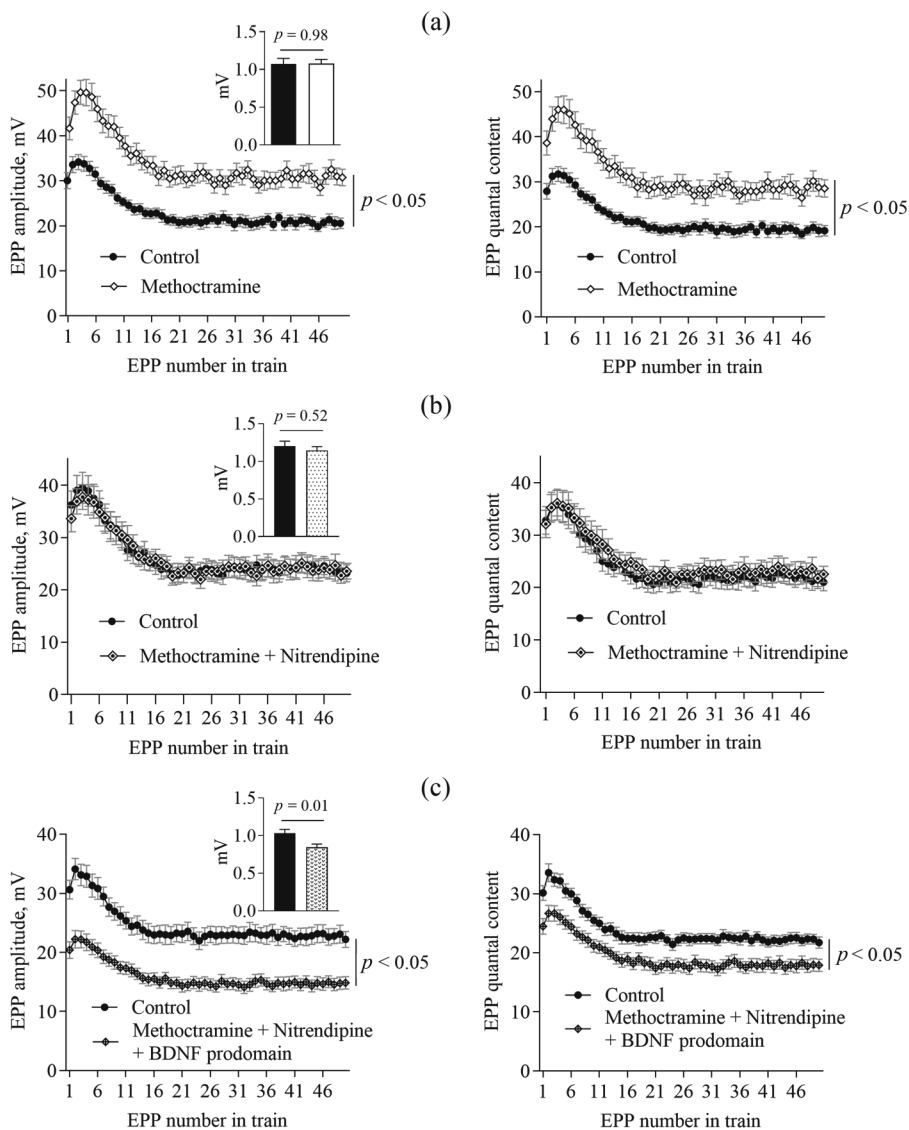


Рис. 3. Мускариновые M2-холинорецепторы тормозят вызванную квантовую секрецию АХ, препятствуя активации Ca^{2+} -каналов L-типа, но не вовлечены в механизм торможения продомом BDNF синаптической передачи в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и в присутствии блокатора M2-холинорецепторов метоктрамина (1 мкМ) ($n = 17$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 18$) и под действием метоктрамина в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 18$); (с) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 20$) и под действием продомы BDNF (1 нМ) в присутствии метоктрамина и нитрендипина ($n = 29$). На врезках – амплитуда МПКП.

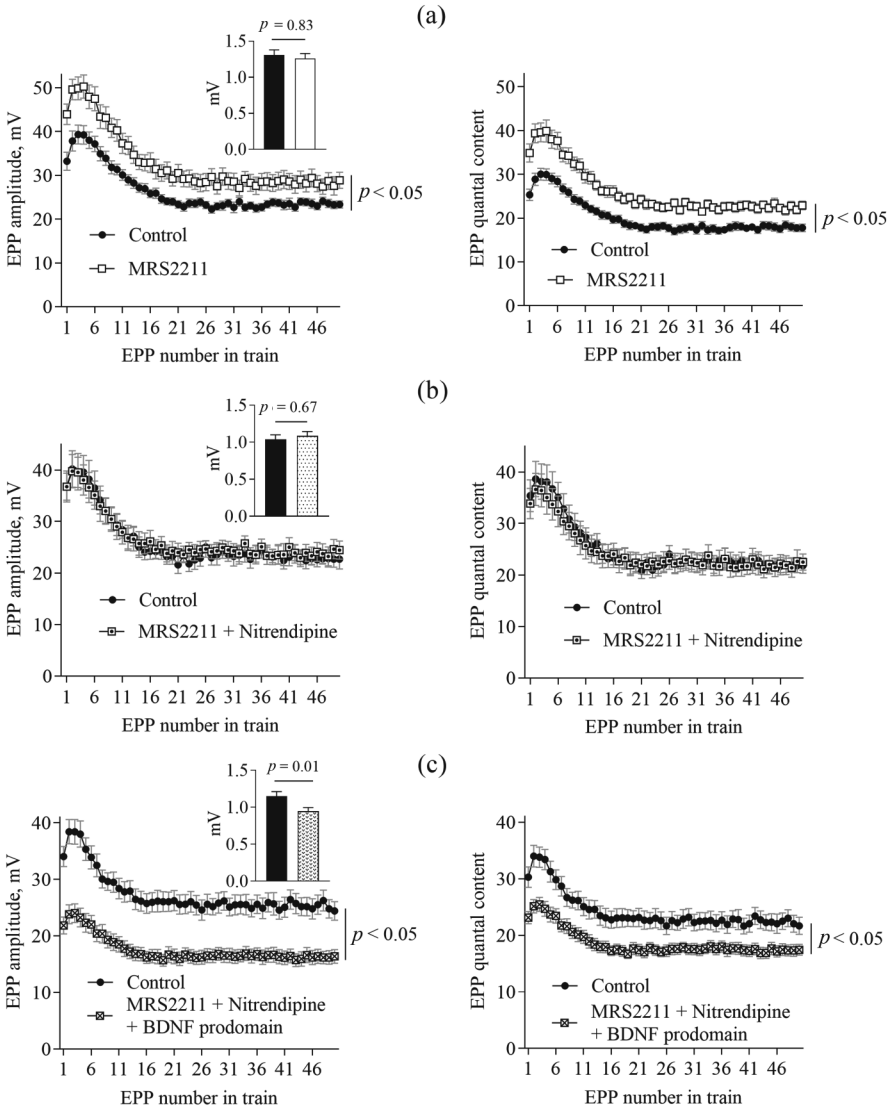


Рис. 4. P2Y13-пуринорецепторы тормозят активность Ca^{2+} -каналов L-типа и препятствуют потенцированию вызванной квантовой секреции АХ, но не участвуют в торможении продомоном BDNF синаптической передачи в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 22$) и в присутствии ингибитора P2Y13-рецепторов MRS2211 (10 мкМ) ($n = 22$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 15$) и под действием MRS2211 в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 15$); (с) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 17$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии метоктрамина и нитрендипина ($n = 19$). На врезках – амплитуда МПКП.

продомен BDNF при ингибировании P2Y₁₃-рецепторов MRS2211 и заблокированных нитрендипином Ca²⁺-каналах L-типа эффективно проявлял свое тормозное влияние на квантовую секрецию АХ. В этих условиях происходило снижение как амплитуд постсинаптических потенциалов, так и квантового состава ПКП в залпах (рис. 4с). Полученные данные являются сильным аргументом в пользу того, что, несмотря на присутствие и активность P2Y₁₃-рецепторов в моторных синапсах мыши [12, 35], доказанную физиологическую значимость этих рецепторов как негативных регуляторов выброса АХ [13, 36], их модулирующая активность не сопряжена со специфическим комплексным торможением секреции АХ под влиянием продомена BDNF.

Последним претендентом на возможное соучастие в тормозных эффектах продомена BDNF в моторных синапсах были пресинаптические аденозиновые A₁-рецепторы, давно известные в качестве негативных регуляторов квантовой секреции АХ [37–40]. Установлено, что ингибитор аденозиновых A₁-рецепторов DPCPX вызывает увеличение амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу залпа [13, 38], то есть оказывает эффект, аналогичный наблюдаемому при ингибировании M2-холинорецепторов или P2Y₁₃-пуринорецепторов. Такое DPCPX-индуцированное потенцирование квантовой секреции АХ эффективно предотвращается при блокировании нитрендипином Ca²⁺-каналов L-типа [16].

Однако, в отличие от предыдущих экспериментов, где тормозное действие продомена BDNF сохранялось при ингибировании M2- или P2Y₁₃-рецепторов при заблокированных нитрендипином Ca²⁺-каналах L-типа, при блокировании DPCPX (100 нМ) A₁-рецепторов в присутствии нитрендипина (1 мкМ) негативное влияние продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ полностью предотвращалось. В этих условиях значения амплитуд МПКП и ПКП и квантового состава ПКП в коротких залпах, несмотря на присутствие продомена BDNF, статистически значимо не отличались от таковых в контроле (рис. 5а). Это означает, что выключение механизма торможения квантовой секреции АХ, обеспечиваемого A₁-рецепторами, одновременно препятствует и негативному действию продомена BDNF на нервно-мышечную передачу.

Ранее мы показали, что проявление тормозного действия A₁-рецепторов в моторных синапсах требует функционирования полуканалов, образованных паннексином 1 (паннексон) [13]. Паннексон – источник синаптического АТФ (и образующегося в результате гидролиза АТФ аденозина), в дополнение к везикулярному АТФ. Оказалось, что достаточно устранения «паннексинового» источника АТФ за счет генетического нокаута у мышей паннексина 1 [13], чтобы ограничить активность A₁-рецепторов и реализацию их торможения квантовой секреции АХ. Кроме того, в моторных синапсах мышей, нокаутных по гену паннексина 1, имеющих нормальные характеристики квантовой секреции АХ [13, 33], оказывается элиминированной не только активация A₁-рецепторов и их тормозные влияния на выброс нейротрансмиттера, но и тормозное действие продомена BDNF на параметры квантовой секреции АХ [5].

В данной работе мы использовали фармакологическое блокирование паннексина 1 с помощью пробенецида, устраняющего выход внутриклеточного АТФ по этим каналам во внеклеточную среду [41–45], и тестировали действие продомена BDNF в этих условиях. Недавно мы установили, что пробеницид (1 мМ) сам по себе не влияет на параметры МПКП и ПКП [15]. Однако в его присутствии продомен BDNF перестал уменьшать амплитуду постсинаптических потенциалов и квантовый состав ПКП в залпах (рис. 5б).

Эти данные говорят о том, что эндогенная активация именно пресинаптических аденозиновых A₁-рецепторов, тормозящих секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих, одновременно необходима и для реализации комплексного механизма угнетающего влияния продомена BDNF на секрецию АХ с участием GIRK. Для такого A₁-зависимого тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах необходимо адекватное функционирование «паннексинового источника» синаптических пуринов.

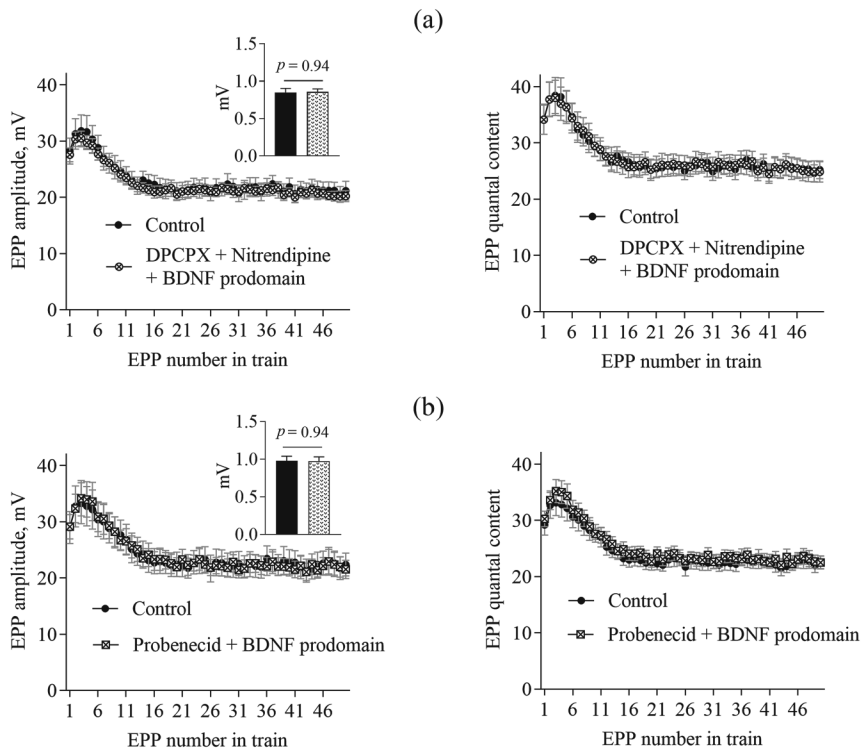


Рис. 5. Эндогенная активность A_1 -рецепторов аденозина, обусловленная функционированием полуканалов из паннексинов 1, необходима для развития торможения квантовой секреции АХ, индуцируемого продоменом BDNF в моторных синапсах диафрагмы мыши. (а) – Изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 16$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии ингибитора A_1 -рецепторов DPCPX (100 нМ) и блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ) ($n = 22$); (б) – изменения амплитуды ПКП (слева) и квантового состава ПКП (справа) по ходу ритмического залпа (50 Гц, 1 с) в контроле ($n = 19$) и под действием продомена BDNF (1 нМ) в присутствии блокатора паннексина 1 пробенецида (1 мМ) ($n = 24$). На врезках – амплитуда МПКП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы приводим новые данные, расширяющие представление о механизме тормозного действия продукта созревания нейротрофина мозга – продомена BDNF. Совсем недавно мы показали, что в зрелых моторных синапсах диафрагмы мыши продомен BDNF оказывает комплексное негативное влияние на параметры спонтанной и вызванной квантовой секреции АХ – снижает амплитуду и частоту МПКП, а также амплитуду и квантовый состав ПКП – равномерно по всему ходу короткого ритмического залпа. Это происходит за счет запуска под действием продомена BDNF р75-опосредованного сигнального пути, связанного с Rho-GDI, направленного на активацию калиевых каналов GIRK в моторных синапсах [5]. Уже выявленная нами роль р75 в качестве рецептора продомена BDNF в моторных синапсах созвучна данным, полученным на гиппокампальных нейронах, где продомен BDNF, действуя именно через р75 на постсинаптической мембране, усиливал долговременную депрессию [46]. Кроме того, в гиппокампе р75 необходим для осуществления структурных перестроек нейрональных отростков, индуцируемых продоменом BDNF [47]. В нашей работе мы сделали существенное дополнение полученным ранее данным о характере рецепции

продомена BDNF. Применяя ингибиторы TrkB и сортилина (циклотраксин В и AF38469 соответственно), мы установили, что вызываемый продоменом BDNF запуск каскада, активирующего в конечном итоге GIRK и вызывающего торможение квантовой секреции АХ в моторных синапсах, требует функционирования, помимо p75, и сортилина, но не TrkB. Если сведения о неучастии TrkB в реализации эффектов продомена BDNF в синапсах ЦНС можно встретить в литературе [45], то соучастие сортилина в регуляции синаптических эффектов продомена BDNF в моторных синапсах выявлено нами впервые и не описано в синапсах ЦНС. До сих пор роль сортилина в качестве рецептора рассматривалась для предшественника зрелого BDNF – проBDNF [7, 48–50]. Используемый нами ингибитор сортилина AF38469 конкурентно взаимодействует с сайтом связывания нейротенина [22]. Показано, что именно с этим сайтом связывается продоменная часть proBDNF [47], а то, что в присутствии AF38469 продомен утрачивал свою способность тормозить квантовую секрецию АХ, свидетельствует о специфичности использованного нами ингибитора, предотвращающего взаимодействие продомена с сортилином. Похожая ситуация наблюдается в гиппокампе, где рецепция продомена BDNF и проявление им физиологических функций требует участия не только p75, но и родственного сортилину рецептора SorCS2, который осуществляет связывание продомена BDNF с последующей активацией p75 по непонятному до сих пор механизму [47]. Вероятнее всего, в моторных синапсах мышцы рецепция продомена BDNF и запуск им сигнального пути, вовлекающего GIRK в негативную регуляцию квантовой секреции АХ, требует формирования сигнального комплекса сортилин/p75. Тонкий механизм такой рецепции с установлением четких ролей компонентов рецепторного комплекса требует дальнейших исследований.

Выявив ранее, что именно появляющаяся активность синаптических GIRK обеспечивает тормозное действие продомена BDNF на синаптическую передачу [5], во второй части работы мы сосредоточились на установлении конкретного метаболитного G_i-белок-сцепленного рецептора (или рецепторов), необходимого для активации GIRK [9].

В моторных синапсах млекопитающих такими возможными кандидатами являлись те метаболитные рецепторы, на которые способны воздействовать эндогенные лиганды в нормальных условиях работы моторных синапсов – АХ (мускариновые M2-рецепторы), АТФ, АДФ (P2Y₁₃) и аденозин (A₁). Для всех этих рецепторов при их активации уже показано выраженное тормозное действие на квантовую секрецию АХ [12, 13, 16, 26, 38, 39, 51].

Мы впервые показали, что M2- и P2Y₁₃-рецепторы при их эндогенной активации в условиях нормальной работы моторных синапсов мышцы обеспечивают торможение вызванной секреции АХ на пресинаптическом уровне за счет угнетения активности Ca²⁺-каналов L-типа. Таким образом, M2- и P2Y₁₃-рецепторы служат своеобразными «дублерами» аденозиновых A₁-рецепторов, для которых такой механизм тормозного влияния уже был ранее продемонстрирован [13, 16]. Мы предполагаем, что механизм угнетения активности Ca²⁺-каналов L-типа при эндогенной активации M2- и P2Y₁₃-рецепторов будет аналогичен показанному нами для A₁-рецепторов [16], хотя такое предположение, безусловно, требует экспериментальной проверки. Демаскирование L-типа Ca²⁺-каналов разными путями способно значительно увеличивать амплитуду многоквантовых ПКП за счет возрастания их квантового состава – как в ходе одиночной стимуляции [28, 52], так и в ходе коротких высокочастотных залпов. В случае ритмической стимуляции моторных синапсов растормаживание L-типа Ca²⁺-каналов оставляет неизменной выраженность и последовательность форм кратковременной синаптической пластичности (облегчение, депрессия, стабилизация выброса АХ), но значительно потенцирует секрецию АХ, равномерно увеличивая амплитуду и квантовый состав всех ПКП по всему ходу залпа [16, 31, 32]. Такое усиление секреции АХ мы продемонстрировали и в данной работе при действии селективных ингибиторов M2- и P2Y₁₃-рецепторов. Используя последовательную модель [53], мы уже проанализиро-

вали ранее, что равномерное усиление квантовой секреции АХ в залпах, обеспечиваемое за счет демаскирования L-типа Ca^{2+} -каналов, реализуется не за счет возрастания вероятности выброса, но благодаря увеличению размера пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу [33, 34]. Вероятнее всего, это происходит за счет вовлечения в секрецию АХ ранее «молчавших» активных зон.

Тот факт, что активность трех пресинаптических сопряженных с G_i -белками метаботропных ауторецепторов, стимулируемых каждый своим эндогенным лигандом (появляющихся в синаптической щели в разных концентрациях и функционирующих там различное время), в условиях вызванной активности моторных синапсов направлена на одну и ту же мишень (Ca^{2+} -каналы L-типа), говорит, на наш взгляд, о существовании в моторных терминалах регуляторных контуров отрицательной обратной связи. Эти контуры препятствуют вовлечению этого Ca^{2+} -входа в регуляцию квантовой секреции АХ в широком диапазоне режимов синаптической активности. При этом снижение функционирования любого из таких аутоингибиторных контуров, сопряженных с экзоцитозом синаптических везикул, обеспечивает растормаживание L-типа Ca^{2+} -каналов и характерное потенцирование секреции АХ [13]. Ослабление негативной регуляции L-типа Ca^{2+} -каналов со стороны метаботропных ауторецепторов может лежать в основе вовлечения этого Ca^{2+} -входа в поддержание быстрой синхронной многоквантовой секреции АХ в патологических условиях, когда она снижена. Такая ситуация, на наш взгляд, может возникать при развитии синдрома Ламберта-Итона в результате аутоиммунной атаки на триггерный Ca^{2+} -вход в активных зонах (Ca^{2+} -каналы P/Q-типа) [54]. Примеры подобной функциональной кооперации между синаптическими рецепторами в моторных синапсах уже показаны и обсуждаются [51].

Ключевым результатом наших исследований является то, что из трех пресинаптических метаботропных рецепторов (M_2 , P_2Y_{13} и A_1) исключительно A_1 -рецепторы оказались функционально сопряжены не только с торможением Ca^{2+} -каналов L-типа, но и с GIRK-опосредованным угнетением квантовой секреции АХ под действием продомена BDNF. Только при селективном ингибировании A_1 -рецепторов продомен BDNF полностью утрачивал свое негативное GIRK-опосредованное действие на квантовую секрецию АХ. Данная эксклюзивность оказалась несколько неожиданной, поскольку в синапсах в разных отделах ЦНС показано функциональное сопряжение между GIRK и мускариновыми M_2 -холинорецепторами [55, 56], P_2Y -рецепторами [57] и аденозиновыми A_1 -рецепторами [58–61]. Взаимодействие A_1 -рецепторов с GIRK в синапсах ЦНС преимущественно реализуется на постсинаптической мембране, где такая локализация обеспечивает контроль возбудимости постсинаптического нейрона в норме и в патологических условиях [60–63]. Вместе с тем имеются данные и о пресинаптическом расположении не только GIRK [64–66], но и об активации GIRK при стимуляции A_1 -рецепторов именно в нервных окончаниях [67].

Мы предполагаем, что в моторных синапсах функциональное сопряжение GIRK с A_1 -рецепторами и реализация тормозного влияния продомена BDNF на синаптическую передачу происходит именно на пресинаптическом уровне. У нас есть несколько аргументов в пользу такого умозаключения. Во-первых, GIRK-опосредованное торможение квантовой секреции АХ продоменом BDNF выражено в снижении квантового состава ПКП в залпе и частоты спонтанной секреции [5]. Изменения этих параметров происходят за счет исключительно пресинаптических процессов. Во-вторых, в нервно-мышечных синапсах мышцы A_1 -рецепторы локализованы на мембране моторной нервной терминали [51, 68, 69]. В-третьих, под действием продомена BDNF не было выявлено статистически значимых изменений МП (гиперполяризации) мышечных волокон в зрелых моторных синапсах диафрагмы [5], что можно было бы ожидать в случае активации постсинаптических GIRK в результате действия продомена BDNF. В недавней работе на нервно-мышечном синапсе лягушки была показана локализация GIRK именно на пресинаптической мембране, где они функционально сопряжены с M_2 -хо-

линорецепторами [70]. В совокупности все вышеперечисленные аргументы, результаты наших предыдущих исследований и данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о дуальной регуляторной роли пресинаптических аденозиновых A_1 -рецепторов в моторных синапсах. Эти метаботропные рецепторы выступают, с одной стороны, как мощный негативный регулятор активности L-типа Ca^{2+} -каналов, тормозя активность протеинкиназы A, вероятнее всего благодаря ингибирующему влиянию $G_i\alpha$ -субъединицы на функционирование аденилатциклазы [16], и одновременно могут, продуцируя образование $G_i\beta\gamma$ -субъединиц, играть роль коактиватора GIRK, обеспечивая взаимодействие этих каналов с $G_i\beta\gamma$ -субъединицами, необходимое для реализации тормозных эффектов продомена BDNF в случае активации им пресинаптического рецепторного комплекса $r75$ /сортилин. При этом, несмотря на устойчивую «тоническую» активацию A_1 -рецепторов в работающих моторных синапсах [13, 16, 38], маловероятно, что в одиночку эти рецепторы способны обеспечить активацию пресинаптических GIRK в типичных условиях функционирования моторных синапсов. Данное предположение базируется на том, что ингибирование GIRK тертиапином в отсутствие активации продоменом BDNF рецепторов $r75$ при сохраняющейся активации и функционировании A_1 -рецепторов в синапсах никак не влияет на параметры квантовой секреции АХ [5].

Остается загадочным обнаруженный нами факт снижения не только квантового состава ПКП, но и сочетанного уменьшения амплитуд МПКП и ПКП под действием продомена BDNF и непосредственное участие GIRK в этом компоненте торможения квантовой секреции АХ [5]. Если учитывать пресинаптическую локализацию GIRK в нервно-мышечных синапсах млекопитающих (что и обеспечивает возможность их функционального взаимодействия с A_1 -рецепторами) и их явное негативное влияние на триггерный вход ионов кальция в моторную терминаль по кальциевым каналам P/Q-типа, благодаря чему снижается квантовый состав ПКП [5], остается рассматривать пресинаптические механизмы снижения амплитуды постсинаптических потенциалов. Одним из таких вероятных механизмов может являться переключение режимов экзоцитоза синаптических везикул с *full-collapse* на *kiss-and-run* и выброс меньшего количества АХ в составе отдельных квантов АХ. Возможность такого переключения и его регуляции недавно была показана для синапсов диафрагмы [71, 72]. Однако возможное участие активируемых под действием продомена BDNF GIRK в такой регуляции, безусловно, требует дальнейших экспериментов.

Наконец, в нашей работе впервые было апробировано действие пробенецида, ингибитора высокопроводящих каналов белка паннексина 1, обеспечивающего поступление эндогенных пуринов из околосоинаптических (мышечных и других) источников в синаптическую щель моторных синапсов для активации A_1 - и других пуринорецепторов [15]. Мы убедились в том, что для A_1 -зависимого GIRK-опосредованного тормозного действия продомена BDNF на квантовую секрецию АХ в моторных синапсах необходимо обязательное адекватное функционирование именно «паннексинового источника» синаптических пуринов (АТФ/аденозина) в моторных синапсах. Используя пробенецид, мы подтвердили собственные недавно полученные данные, что генетическое элиминирование паннексина 1, устранявшее «паннексиновый путь» поступления пуринов в моторных синапсах, препятствует не только эффективной активации пуринорецепторов (включая A_1 -рецепторы), но и развитию тормозного действия продомена BDNF [5]. В совокупности наши настоящие и предыдущие исследования впервые показали, что от одних и тех же специфических путей поступления и рецепторного действия эндогенных пуринов (АТФ/аденозина) в моторных синапсах мышцы зависит как механизм A_1 -опосредованного торможения Ca^{2+} -каналов L-типа [13], так и A_1 -зависимая активация GIRK и торможение секреции АХ под действием продомена BDNF.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть оборудования, использованного в экспериментах, предоставлена МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках реализации федеральной Программы развития МГУ (договор 0504-44-2023).

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. Е. Г.), сбор данных (А. И. М., А. Е. Г.), обработка данных (А. И. М., А. Е. Г.), написание и редактирование манускрипта (А. И. М., О. П. Б., А. Е. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект 22-25-00111). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены биоэтической комиссией Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (протокол № 97-ж-3 от 11.11.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Castrén E, Antila H* (2017) Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Mol Psychiatry* 22(8): 1085–1095.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.61.Neuronal>
2. *Hurtado E, Cilleros V, Nadal L, Simó A, Obis T, Garcia N, Santafé MM, Tomàs M, Halievski K, Jordan CL, Lanuza MA, Tomàs J* (2017) Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKC α and cPKC β I. *Front Mol Neurosci* 10: 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00147>
3. *Gaydukov A, Bogacheva P, Tarasova E, Molchanova A, Miteva A, Pravdivceva E, Balezina O* (2019) Regulation of Acetylcholine Quantal Release by Coupled Thrombin/BDNF Signaling in Mouse Motor Synapses. *Cells* 8: 762.
<https://doi.org/10.3390/cells8070762>
4. *Garcia N, Tomàs M, Santafé MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomàs J* (2010) Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J Peripher Nerv Syst* 15: 40–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00250.x>
5. *Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE* (2022) ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front Cell Neurosci* 16: 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.866802>
6. *Kojima M, Matsui K, Mizui T* (2019) BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression. *Cell Tissue Res* 377: 73–79.
<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03034-6>
7. *Nykjaer A, Willnow TE* (2012) Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci* 35: 261–270.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>
8. *Kraemer BR, Yoon SO, Carter BD* (2014) The Biological Functions and Signaling Mechanisms of the p75 Neurotrophin Receptor. In: *Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics*. 121–164.

9. Luo H, Fernandez de Velasco EM, Wickman K (2022) Neuronal G protein-gated K₁ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 323: C439–C460.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2022>
10. Santafé MM, Salon I, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* 17: 119–127.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x>
11. Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs J (2006) Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* 23: 2048–2056.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x>
12. Guarracino JF, Cinalli AR, Fernández V, Roquel LI, Losavio AS (2016) P2Y₁₃ receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 326: 31–44.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.066>
13. Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP (2017) The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 11: 311–320.
<https://doi.org/10.1134/S1990747817040067>
14. Sousa-Soares C, Noronha-Matos JB, Correia-de-Sá P (2023) Purinergic Tuning of the Tripartite Neuromuscular Synapse. *Mol Neurobiol* 60: 4084–4104.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03317-8>
15. Miteva AS, Gaydukov AE, Balezina OP (2021) Acetylcholine Release in Mouse Motor Synapses. Changes of Purinergic Regulation under Conditions of Pharmacological Blockade of Pannexin 1 and Its Genetic Knockout. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 15: 378–386.
<https://doi.org/10.1134/S1990747821060088>
16. Tarasova EO, Miteva AS, Gaidukov AE, Balezina OP (2015) The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 9: 318–328.
<https://doi.org/10.1134/s1990747815050141>
17. Gaydukov AE, Bogacheva PO, Balezina OP (2019) The Participation of Presynaptic Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Inhibition of Acetylcholine Release during Long-Term Activity of Mouse Motor Synapses. *Neurochem J* 13: 20–27.
<https://doi.org/10.1134/S1819712419010082>
18. McLachlan EM, Martin AR (1981) Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J Physiol* 311: 307–324.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013586>
19. Eggert S, Kins S, Endres K, Brigadski T (2021) Brothers in arms: proBDNF/BDNF and sAPP α /A β -signaling and their common interplay with ADAM10, TrkB, p75NTR, sortilin, and sorLA in the progression of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 403: 43–71.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0330>
20. Rogalski SL, Appleyard SM, Pattillo A, Terman GW, Chavkin C (2000) TrkB Activation by Brain-derived Neurotrophic Factor Inhibits the G Protein-gated Inward Rectifier Kir3 by Tyrosine Phosphorylation of the Channel. *J Biol Chem* 275: 25082–25088.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M000183200>
21. Cazorla M, Jouvenceau A, Rose C, Guilloux JP, Pilon C, Dranovsky A, Prémont J (2010) Cyclothiazin-B, the first highly potent and selective TrkB inhibitor, has anxiolytic properties in mice. *PLoS One* 5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009777>
22. Schröder TJ, Christensen S, Lindberg S, Langgård M, David L, Maltas PJ, Eskildsen J, Jacobsen J, Tagmose L, Simonsen KB, Büllmann Rønn LC, De Jong IEM, Malik IJ, Karlsson JJ, Bundgaard C, Egebjerg J, Stavenhagen JB, Strandbygd D, Thirup S, Andersen JL, Uppalanchi S, Pervaram S, Kasturi SP, Eradi P, Sakumudi DR, Watson SP (2014) The identification of AF38469: An orally bioavailable inhibitor of the VPS10P family sorting receptor Sortilin. *Bioorg Med Chem Lett* 24: 177–180.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.046>
23. Minic J, Molgó J, Karlsson E, Krejci E (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci* 15: 439–448.
<https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01875.x>

24. *Santafé MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomàs M, Tomàs J* (2007) Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal. *Neuroscience* 148: 432–440.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.017>
25. *Garcia N, Tomàs M, Santafé MM, Besalduch N, Lanuza MA, Tomàs J* (2010) The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals. *J Neurosci* 30: 16514–16522.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2676-10.2010>
26. *Santafé MM, Priego M, Obis T, Garcia N, Tomàs M, Lanuza MA, Tomàs J* (2015) Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci* 42: 1775–1787.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12922>
27. *Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD* (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 441: 824–831.
<https://doi.org/10.1007/s004240000489>
28. *Flink MT, Atchison WD, Atchison B* (2003) Iberiotoxin-induced block of Ca²⁺-activated K⁺ channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Therap* 305: 646–652.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.046102>
29. *Pagani R, Song M, Mcenery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD* (2004) Differential expression of $\alpha 1$ and β subunits of voltage dependent Ca²⁺ channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca²⁺ channel knockout mouse. *Neuroscience* 123: 75–85.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.019>
30. *Zhilyakov N, Arkhipov A, Malomouzh A, Samigullin D* (2021) Activation of neuronal nicotinic receptors inhibits acetylcholine release in the neuromuscular junction by increasing Ca²⁺ flux through Cav1 channels. *Int J Mol Sci* 22.
<https://doi.org/10.3390/ijms22169031>
31. *Gaydukov AE, Melnikova SN, Balezina OP* (2009) Facilitation of acetylcholine secretion in mouse motor synapses caused by calcium release from depots upon activation of L-type calcium channels. *Bull Exp Biol Med* 148: 163–166.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0678-9>
32. *Gaydukov AE, Tarasova EO, Balezina OP* (2013) Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice. *Neurochem J* 7: 29–33.
<https://doi.org/10.1134/S1819712413010030>
33. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2018) Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signal* 14: 459–469.
<https://doi.org/10.1007/s11302-018-9630-7>
34. *Tarasova EO, Khotkina NA, Bogacheva PO, Chernyshev KA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Noncanonical Potentiation of Evoked Quantal Release of Acetylcholine by Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Mouse Motor Synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 15: 395–405.
<https://doi.org/10.1134/S199074782106012X>
35. *Guarracino JF, Cinalli AR, Veggetti MI, Losavio AS* (2018) Endogenous purines modulate K⁺-evoked ACh secretion at the mouse neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 96: 1066–1079.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24223>
36. *González Sanabria J, Hurtado Paso M, Frontera T, Losavio A* (2022) Effect of endogenous purines on electrically evoked ACh release at the mouse neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 100: 1933–1950.
<https://doi.org/10.1002/jnr.25107>
37. *Correia-de-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA* (1991) Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. *Br J Pharmacol* 103: 1614–1620.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb09836.x>
38. *Perissinotti PP, Uchitel OD* (2010) Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 32: 985–996.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07332.x>
39. *Searl TJ, Silinsky EM* (2012) Evidence for constitutively-active adenosine receptors at mammalian motor nerve endings. *Eur J Pharmacol* 685: 38–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.008>

40. *Nascimento F, Sebastião AM, Ribeiro JA* (2015) Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* 11: 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9465-4>
41. *Silverman W, Locovei S, Dahl G* (2008) Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: 761–767.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008>
42. *Xia J, Lim JC, Lu W, Beckel JM, Macarak EJ, Laties AM, Mitchell CH* (2012) Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X 7 receptors. *J Physiol* 590: 2285–2304.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.227983>
43. *Dahl G, Keane RW* (2012) Pannexin: From discovery to bedside in 11±4 years? *Brain Res* 1487: 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.058>
44. *Lopatář J, Dale N, Frenguelli BG* (2015) Pannexin-1-mediated ATP release from area CA3 drives mGlu5-dependent neuronal oscillations. *Neuropharmacology* 93: 219–228.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.014>
45. *Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, Wang Q* (2019) Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation* 42: 1082–1092.
<https://doi.org/10.1007/s10753-019-00969-4>
46. *Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Kojima M* (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling. *Pharmacol Res* 105: 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.019>
47. *Anastasia A, Deinhardt K, Chao MV, Will NE, Irmady K, Lee FS, Hempstead BL, Bracken C* (2013) Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat Commun* 4: 2490.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3490>
48. *Teng HK* (2005) ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *J Neurosci* 25: 5455–5463.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
49. *Meeker RB, Williams KS* (2015) The p75 neurotrophin receptor: At the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* 10: 721–725.
<https://doi.org/10.4103/1673-1673.156967>
50. *Taylor AR, Gifondorwa DJ, Robinson MB, Strupe JL, Prevetie D, Johnson JE, Hempstead B, Oppenheim RW, Milligan CE* (2012) Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF. *Dev Neurobiol* 72: 699–712.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20964>
51. *Tomàs J, García N, Lanuza MA, Santafé MM, Tomàs M, Nadal L, Hurtado E, Simó-Ollé A, Cilleros-Mañé V, Just-Borrás L* (2018) Adenosine receptors in developing and adult mouse neuromuscular junctions and functional links with other metabotropic receptor pathways. *Front Pharmacol* 9: 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00397>
52. *Atchison WD, O'Leary SM* (1987) Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction. *Brain Res* 419: 315–319.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90599-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90599-3)
53. *Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L* (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31: 2000–2008.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
54. *Giovannini F, Sher E, Webster R, Boot J, Lang B* (2002) Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 136: 1135–1145.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704818>
55. *Naser PV, Kuner R* (2018) Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience* 387: 135–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.049>
56. *Sugawara S, Nakaya Y, Matsumura S, Hirose K, Saito Y, Kaneko R, Kobayashi M* (2022) Neural Subtype-dependent Cholinergic Modulation of Neural Activities by Activation of Muscarinic 2 Receptors and G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel in Rat Periaqueductal Gray Neurons. *Neuroscience* 506: 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.10.012>

57. *Guzman SJ, Gerevich Z* (2016) P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/1207393>
58. *Wetherington JP, Lambert NA* (2002) Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors. *J Neurosci* 22: 1248–1255.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-04-01248.2002>
59. *Clark BD, Kurth-Nelson ZL, Newman EA* (2009) Adenosine-evoked hyperpolarization of retinal ganglion cells is mediated by G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ and small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *J Neurosci* 29: 11237–11245.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2836-09.2009>
60. *James SD, Hawkins VE, Falquetto B, Ruskin DN, Masino SA, Moreira TS, Olsen ML, Mulkey DK* (2018) Adenosine signaling through A1 receptors inhibits chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus. *eNeuro* 5: 1–11.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0404-18.2018>
61. *Hill E, Hickman C, Diez R, Wall M* (2020) Role of A1 receptor-activated GIRK channels in the suppression of hippocampal seizure activity. *Neuropharmacology* 164: 107904.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107904>
62. *Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA* (1997) G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels (GIRKs) Mediate Postsynaptic but Not Presynaptic Transmitter Actions in Hippocampal Neurons. *Neuron* 19: 687–695.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80381-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80381-5)
63. *Kim CS, Johnston D* (2015) A1 adenosine receptor-mediated GIRK channels contribute to the resting conductance of CA1 neurons in the dorsal hippocampus. *J Neurophysiol* 113: 2511–2523.
<https://doi.org/10.1152/jn.00951.2014>
64. *Ladera C, Del Carmen Godino M, Cabañero MJ, Torres M, Watanabe M, Luján R, Sánchez-Prieto J* (2008) Pre-synaptic GABAB receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 107: 1506–1517.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05712.x>
65. *Fernández-Alacid L, Watanabe M, Molnár E, Wickman K, Luján R* (2011) Developmental regulation of G protein-gated inwardly-rectifying K⁺ (GIRK/Kir3) channel subunits in the brain. *Eur J Neurosci* 34: 1724–1736.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07886.x>
66. *Luján R, Marron Fernandez de Velasco E, Aguado C, Wickman K* (2014) New insights into the therapeutic potential of Girk channels. *Trends Neurosci* 37: 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.006>
67. *Yum DS, Cho JH, Choi IS, Nakamura M, Lee JJ, Lee MG, Choi BJ, Choi JK, Jang IS* (2008) Adenosine A1 receptors inhibit GABAergic transmission in rat tuberomammillary nucleus neurons. *J Neurochem* 106: 361–371.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05400.x>
68. *Garcia N, Priego M, Obis T, Santafé MM, Tomàs M, Besalduch N, Lanuza Ma, Tomàs J* (2013) Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 38: 2229–2241.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12220>
69. *Tomàs J, Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Tomàs M, Besalduch N, Obis T, Priego M, Hurtado E* (2014) Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *J Neurosci Res* 92: 543–554.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23346>
70. *Tsentsevitsky AN, Khaziev EF, Kovyazina IV, Petrov AM* (2022) GIRK channel as a versatile regulator of neurotransmitter release via L-type Ca²⁺-channel-dependent mechanism in the neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 209: 109021.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109021>
71. *Petrov AM, Zakirjanova GF, Kovyazina IV, Tsentsevitsky AN, Bukharaeva EA* (2022) Adrenergic receptors control frequency-dependent switching of the exocytosis mode between “full-collapse” and “kiss-and-run” in murine motor nerve terminal. *Life Sci* 296: 120433.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120433>
72. *Tsentsevitsky AN, Gafurova CR, Mukhutdinova KA, Giniatullin AR, Fedorov NS, Malomouzh AI, Petrov AM* (2023) Sphingomyelinase modulates synaptic vesicle mobilization at the mice neuromuscular junctions. *Life Sci* 318.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121507>

Bdnf Prodomain Inhibits Neurotransmitter Quantal Release in Mouse Motor Synapses with the Necessary Participation of Sortilin and Adenosine A₁-receptors**A. I. Molchanova^a, O. P. Balezina^a, and A. E. Gaydukov^{a,*}***^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia***e-mail: gaydukov@gmail.com*

Brain neurotrophin (BDNF) is synthesized by proteolysis of proneurotrophin to form mature BDNF and the prodomain, whose regulatory activity on neuromuscular transmission is just beginning to be studied. At motor synapses, the BDNF prodomain has an inhibitory effect, stimulating GIRK potassium channels via activation of p75 receptors. The aim of this work was to study the initiation and implementation of the mechanism of inhibitory action of the BDNF prodomain in mature motor synapses of the mouse diaphragm. Microelectrodes were used to record spontaneous (miniature) and multiquantal endplate potentials evoked by stimulation of motor axons (MEPP and EPP, respectively). Using selective antagonists, it was revealed that the inhibitory effect of the prodomain on synaptic transmission requires the participation of sortilin, but not TrkB receptors. Stimulation of GIRK induced by the prodomain requires the participation of synaptic metabotropic receptors, which ensure the action of $\beta\gamma$ -subunits of Gi proteins on GIRK. Using selective inhibitors, it was found that M2 cholinergic receptors and P2Y₁₃ purinoceptors negatively regulate presynaptic L-type calcium channels, but these metabotropic receptors are not functionally related to the action of the BDNF prodomain. It turned out that the inhibition of quantal release of acetylcholine in motor synapses caused by BDNF prodomain requires the activity of the adenosine A₁-receptors only. In addition, when pannexin 1 was pharmacologically blocked by probenecid, the BDNF prodomain lost its inhibitory effect on neuromuscular transmission. Thus, BDNF prodomain-induced inhibition of quantal neurotransmitter release in mouse motor synapses requires the participation of sortilin and endogenous activation of adenosine A₁-receptors, which requires the functioning of pannexins 1, which most likely provide an additional source of synaptic ATP to the vesicular one.

Keywords: neuromuscular synapse, BDNF prodomain, sortilin, adenosine A₁-receptors, pannexin 1

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МИКРОИНЪЕКЦИИ РАСТВОРА ХЛОРИДА КОБАЛЬТА
В ИНФРАЛИМБИЧЕСКУЮ КОРУ ПОДАВЛЯЮТ РЕАКЦИИ СИСТЕМ
КРОВООБРАЩЕНИЯ И ДЫХАНИЯ АНЕСТЕЗИРОВАННОЙ КРЫСЫ
НА МИКРОЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЮ ЛАТЕРАЛЬНОЙ
ОРБИТАЛЬНОЙ КОРЫ**

© 2024 г. Е. А. Губаревич¹, Т. Н. Кокурина¹, Г. И. Рыбакова¹, Т. С. Туманова^{1,2},
В. Г. Александров^{1,*}

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

²*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия.*

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

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

В состав центральной автономной сети, осуществляющей контроль висцеральных систем, в том числе систем кровообращения и дыхания, входит висцеромоторная инфралимбическая кора (IL), которая является одной из областей префронтальной коры и расположена на медиальной поверхности больших полушарий. Вместе с тем имеются данные, которые указывают на то, что в контроле автономных функций могут принимать участие области префронтальной коры, расположенные на орбитофронтальной поверхности полушарий, в том числе латеральная орбитальная кора (LO). Цель настоящей работы состояла в том, чтобы экспериментально проверить гипотезу, согласно которой участие LO в контроле функций дыхания и кровообращения реализуется при посредстве IL. С этой целью в острых экспериментах на лабораторных крысах, анестезированных уретаном, было исследовано влияние микроинъекций раствора хлорида кобальта (CoCl₂) в IL на реакции систем кровообращения и дыхания, вызванные микроэлектростимуляцией LO. Известно, что ионы Co²⁺ являются неспецифическими блокаторами синаптической передачи, поэтому следовало ожидать, что микроинъекция раствора CoCl₂ в IL нарушит проведение в этой области коры. В первой контрольной серии экспериментов микроэлектростимуляция LO вызывала специфические ответы систем кровообращения и дыхания, которые стабильно воспроизводились в течение всего эксперимента. Во второй экспериментальной серии введение раствора CoCl₂ в IL подавляло ответы на микроэлектростимуляцию LO, причем этот эффект оказался обратимым. Полученные результаты подтвердили выдвинутую гипотезу о возможном участии IL в реализации автономных функций LO. Выяснение механизмов, обеспечивающих взаимодействие LO и IL в контексте автономного контроля, должно стать предметом дальнейшего экспериментального исследования.

Ключевые слова: префронтальная кора, автономный контроль, кровообращение, дыхание, микроэлектростимуляция, крыса

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, центральный контроль автономных функций осуществляет так называемая центральная автономная сеть (central autonomic network, CAN), в состав которой, наряду с подкорковыми структурами и автономными центрами ствола головного мозга, обычно включают области префронтальной коры, расположенные на медиальной и латеральной поверхностях больших полушарий [1–3]. В частности, инфраламбическая кора (infralimbic cortex, IL) образует проекции к стволовым автономным центрам вплоть до бульбарного уровня [4–6], а при ее микроэлектростимуляции наблюдаются изменения активности автономных систем, в том числе систем кровообращения и дыхания [7–10]. Эти и другие факты, а также некоторые клинические наблюдения и исследования дали основания для того, чтобы рассматривать IL в качестве висцеромоторной зоны [11–14].

С другой стороны, имеются экспериментальные данные, которые указывают на то, что в контроле автономных функций могут принимать участие поля префронтальной коры, расположенные на орбитофронтальной поверхности больших полушарий [15]. Установлено, в частности, что микроэлектростимуляция латеральной орбитальной коры (lateral orbital, LO) крысы вызывает специфические реакции систем кровообращения и дыхания, отличные от тех, которые наблюдаются в аналогичных условиях в ответ на стимуляцию IL [10], однако вопрос о механизмах, реализующих участие LO в контроле автономных функций, остается открытым. Установлено, что орбитофронтальная кора (orbitofrontal cortex, OFC), в состав которой входит LO, не образует прямых нисходящих проекций к структурам продолговатого мозга, осуществляющим регуляцию кровообращения и дыхания, но имеет связи с другими структурами, входящими в состав CAN, а именно: с миндалевидным комплексом [16–18], гипоталамусом и центральным серым веществом [19, 20]. Вместе с тем показано, что поля OFC образуют реципрокные связи с висцеромоторной IL [21–24]. Наличие подобных связей предполагает возможность взаимодействия LO и IL, в том числе и при реализации функции контроля кровообращения и дыхания. Такая возможность предусматривается, в частности, в рамках иерархической модели нейровисцеральной интеграции (neurovisceral integration, NVI). Авторы этой модели предполагают, что поля орбитофронтальной коры, входящие в состав так называемой орбитальной сети [25], тесно взаимодействуют с полями префронтальной коры, расположенными на медиальной и латеральной поверхностях больших полушарий, совместно контролируя выходы из CAN [26]. Однако следует признать, что конкретные нейрофизиологические механизмы этого взаимодействия изучены явно недостаточно.

Принимая во внимание несомненное наличие у IL висцеромоторной функции, а также существование связей между OFC и IL, можно было предположить, что участие LO в контроле функций дыхания и кровообращения реализуется, в том числе, путем взаимодействия с IL. Цель настоящей работы заключалась в экспериментальной проверке этого предположения. Основной задачей экспериментального исследования стало изучение влияния микроинъекций раствора хлорида кобальта (CoCl_2) в IL анестезированной крысы на специфические реакции систем кровообращения и дыхания, которые, как было показано нами ранее [10], можно вызвать, подвергая микроэлектростимуляции LO. Введение неселективного блокатора синаптической передачи CoCl_2 является методическим приемом, который применяют в нейрофизиологических исследованиях для блокирования проведения в структурах центральной нервной системы [27]. Поэтому возможное изменение реакций систем кровообращения и дыхания на микроэлектростимуляцию LO после введения CoCl_2 в IL предполагалось рассматривать как доказательство справедливости выдвинутой гипотезы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленной задачи были проведены острые эксперименты на самцах крыс Wistar массой 250–300 г, предоставленных Центром коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животные были случайным образом разделены на две группы: экспериментальную ($n = 6$) и контрольную ($n = 6$).

Оперативная подготовка животного

Перед проведением хирургических манипуляций животных анестезировали внутривенным введением раствора уретана в дозировке 1600 мг/кг. Глубину наркоза оценивали по степени выраженности болевого и роговичного рефлексов; температуру тела животного поддерживали на протяжении всего эксперимента на уровне 36.5–37.5°C. Проводили трахеостомию и катетеризацию правой бедренной артерии.

Регистрация и обработка пневмотахограммы и артериального давления

К трахеостомической трубке присоединяли пневмометрический датчик (MLT10L, ADInstruments, Австралия), подключенный ко входу пневмотахометра (FE141), который формировал сигнал пневмотахограммы (pneumotachogram, PTG). Артериальный катетер, заполненный гепаринизированным (50 МЕ/мл) физиологическим раствором, соединяли с камерой датчика артериального давления (MLT1199). Этот датчик подключали ко входу мостового усилителя (FE224), который формировал сигнал артериального давления (arterial pressure, AP). Сигналы PTG и AP поступали на вход устройства сбора данных (PowerLab 35/8), работавшего под управлением персонального компьютера с установленным на нем специализированным пакетом программ LabChart 7. Пакет программ обеспечивал обработку сигналов, их запись в файл, а также вывод на экран монитора сигналов и результатов их обработки. В режимах on- и off-line определяли и выводили на экран среднее AP (mean arterial pressure, MAP), частоту сердечных сокращений (HR), дыхательный объем (VT) и длительность дыхательного цикла (Ttot), а также максимальные величины потоков на вдохе (Vimax) и выдохе (Vemax).

Экспериментальные воздействия

Микроинъектор и микроэлектрод вводили соответственно в IL и LO левого полушария при помощи стереотаксического аппарата (SR-6R-HT, Narishige, Япония), снабженного микроманипулятором (SM-15L). Координаты IL и LO определяли, используя стереотаксический атлас мозга крысы [28]. Конец микроинъектора, который представлял собой стальную трубку с внешним диаметром 100 мкм, был локализован в точке с координатами: 4.1 мм от поверхности мозга, 2.5 мм роstralнее уровня bregma, 0.5–0.7 мм латеральнее сагиттальной плоскости. Металлический монополярный электрод сопротивлением 0.1 МОм вводили в точку с координатами: 4.2 мм от поверхности мозга, 3.2 мм роstralнее уровня bregma, 3.2 мм латеральнее сагиттальной плоскости; индифферентный электрод погружали в мышцы шеи. Микроинъектор при помощи гибкой полиэтиленовой трубки соединяли с микрошприцом (CR-700-20, Hamilton, США); микроинъектор и соединительная трубка были заполнены 2ММ раствором CoCl_2 или, в контрольных экспериментах, физиологическим раствором. В течение 3 мин в IL вводили 1 мкл раствора, затем, через 3–4 мин после окончания введения, микроинъектор извлекали. Для раздражения LO использовали электростимулятор (модель 4100, A-M Systems, США), который генерировал серии прямоугольных импульсов тока отрицательной полярности силой 150–200 мкА, длительностью 1 мс, частотой 50 имп./с; длительность серий составляла 10 с.

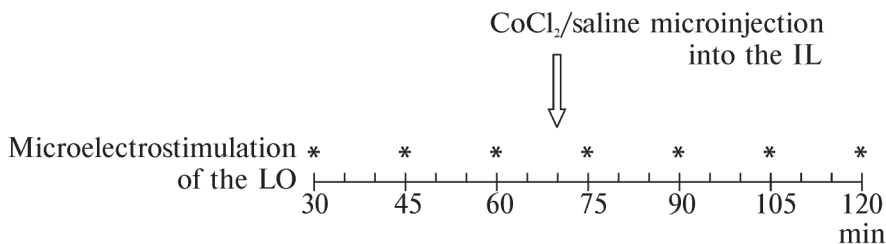


Рис. 1. Схема эксперимента. По оси – время от начала регистрации.

Экспериментальный протокол

К стимуляции ЛО приступали через 30 мин после завершения хирургической подготовки животного и начала регистрации. В дальнейшем, на фоне непрерывной регистрации АР и РТГ наносили стимулы каждые 15 мин так, что между первым и последним стимулами проходило 90 мин; всего в каждом эксперименте наносилось 7 стимулов (рис. 1). Микроинъекцию раствора CoCl_2 (или физиологического раствора) в ЛО выполняли однократно в каждом эксперименте через 10 мин после третьего предъявления электрического стимула, то есть на 70-й мин эксперимента.

Статистическая обработка экспериментальных данных

Для количественного описания эффектов микроэлектростимуляции средствами пакета программ LabChart 7.0 производили посекундное измерение регистрируемых и рассчитываемых параметров перед началом и на фоне раздражения. Полученные значения переносили в таблицы MS Excel, а затем определяли средние значения и стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$) всех учитываемых параметров. Величину параметров после начала микроэлектростимуляции коры выражали в процентах к их значениям непосредственно перед началом раздражения. Полученные величины также усредняли, определяли ошибку среднего и использовали при построении графиков, отражающих изменения учитываемых параметров под влиянием микроэлектростимуляции.

Для дальнейшей статистической обработки использовали пакет программ Statistica (версия 7.0, StatSoft, США). Сравнимые выборки проверяли на соответствие нормальному распределению при помощи теста Шапиро–Уилка. Достоверность различий между величинами определяли, используя метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Критический уровень значимости при проверке нулевой гипотезы принимался равным 0.05.

Гистологический контроль

После нанесения последнего, седьмого стимула животное усыпляли путем передозировки уретана, проводили краниотомию и извлекали мозг для последующего гистологического контроля. На замороженных срезах мозга по трекам, оставшимся после извлечения микроинъектора и электрода, идентифицировали места введения CoCl_2 и микроэлектростимуляции коры.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения фоновых величин МАР и HR, а также VT и Ttot перед нанесением первого стимула в контрольной и экспериментальной группах приведены в табл. 1.

Расчеты показали отсутствие достоверных различий между указанными параметрами в экспериментальной и контрольной группах. Кроме того, было установлено,

Таблица 1. Исходные величины параметров активности систем кровообращения и дыхания

параметр / группа	МАР, мм рт. ст.	HR, уд./мин	VT, мл	T _{тот} , с
контрольная	99 ± 7	405 ± 14	2.2 ± 0.2	0.38 ± 0.02
экспериментальная	107 ± 3	407 ± 20	2.4 ± 0.3	0.38 ± 0.03
<i>p</i>	0.281	0.960	0.609	0.921

p – вероятность случайности различия величин в контрольной и экспериментальной группах. В каждой группе *n* = 6.

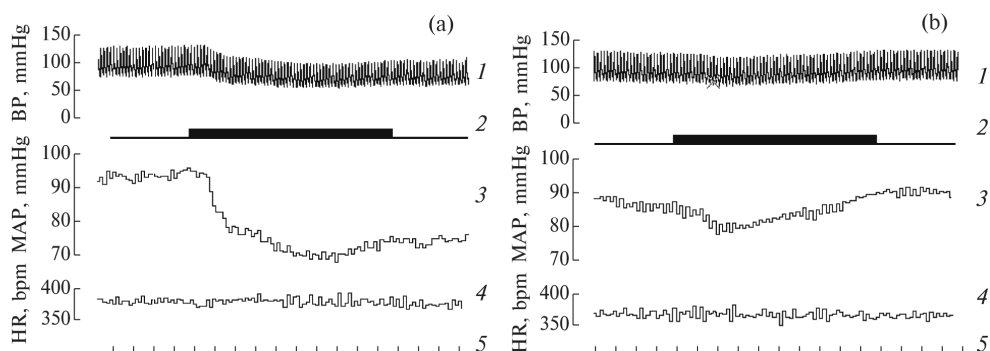


Рис. 2. Нативные записи и результаты обработки депрессорных ответов на микроэлектростимуляцию LO в эксперименте с микроинъекцией раствора CoCl_2 в IL. (а) – 60-я минута эксперимента (10 мин до микроинъекции), (б) – 75-я минута эксперимента (5 мин после микроинъекции). 1, 2, 3, 4, 5 – соответственно: нативная запись AP, отметка раздражения, МАР, HR, отметка времени (1 с).

что в обеих группах фоновые параметры кровообращения и дыхания не претерпевали достоверных изменений по ходу экспериментов. Эти результаты доказывают, что состояние систем кровообращения и дыхания животных контрольной и экспериментальных групп было стабильным и не менялось под влиянием микроинъекций растворов в IL.

Микроэлектростимуляция LO не вызывала изменения HR, но приводила к тому, что МАР в течение первых 3 секунд стимуляции снижалось, а затем стабилизировалось на фоне продолжающегося раздражения, причем такая реакция наблюдалась как в экспериментальной (рис. 2а), так и в контрольной группах.

Изменения амплитуды депрессорных ответов в ходе эксперимента характеризовали процентным соотношением величины МАР на 3-й секунде стимуляции LO к величине МАР непосредственно перед нанесением стимула. Очевидно, что возрастание этой величины указывало на ослабление реакции. Расчеты показали, что на 75-й минуте эксперимента, то есть уже через 5 мин после введения раствора CoCl_2 в IL, амплитуда депрессорных ответов достоверно уменьшалась по сравнению с их фоновыми значениями (рис. 3, 1).

Достоверное уменьшение реакции на микроэлектростимуляцию LO наблюдалось также на 90-й и 105-й минутах эксперимента, а на 120-й минуте, то есть в конце эксперимента, эффект Co^{2+} ослабевал, величина ответов возвращалась на исходный уровень. В контрольных экспериментах достоверных изменений амплитуды депрессорных ответов не наблюдалось (рис. 3, 2).

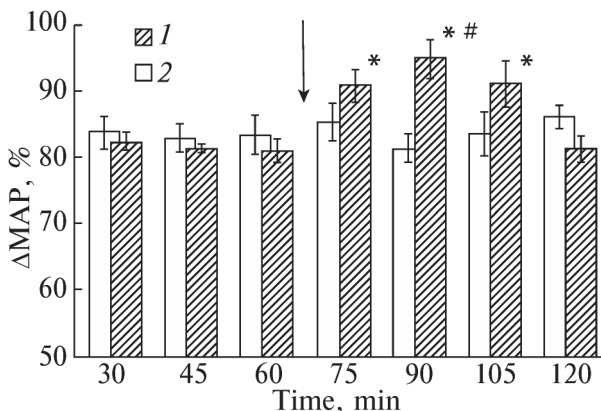


Рис. 3. Изменение амплитуды депрессорных ответов на микроэлектростимуляцию LO. По оси ординат – величина MAP на 3-й секунде стимуляции, выраженная в процентах к величине MAP на последней секунде перед началом стимуляции; по оси абсцисс – время от начала эксперимента. 1 – эксперименты с введением раствора CoCl_2 , 2 – контрольные эксперименты. * – достоверные отличия от значений, полученных до введения раствора CoCl_2 ; # – достоверные отличия от значений, полученных в контрольных экспериментах ($p < 0.05$, $n = 6$). Стрелкой обозначен момент введения растворов.

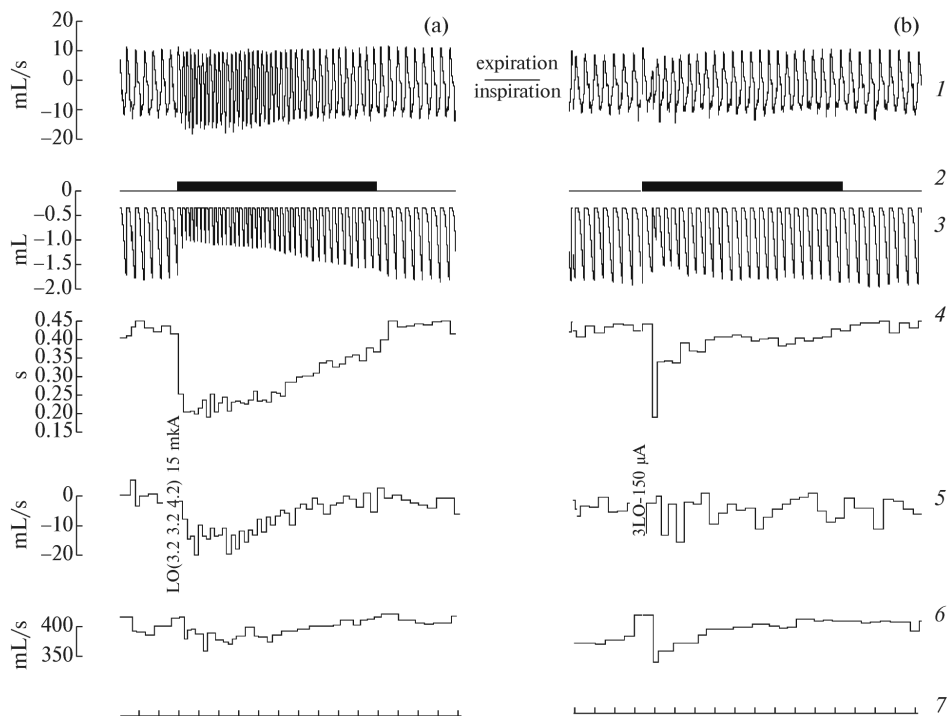


Рис. 4. Перестройки паттерна дыхания при микроэлектростимуляции LO в экспериментах с введением раствора CoCl_2 в IL. Нативная запись ПТГ и результаты ее обработки. (а) – Эффект микроstimуляции на 60-й минуте эксперимента (10 мин до введения раствора CoCl_2); (б) – эффект микроstimуляции на 75-й минуте того же эксперимента (5 мин после введения раствора CoCl_2). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – соответственно: ПТГ, отметка раздражения, VT, Ttot, Vimax, Vemax, отметка времени (1 с).

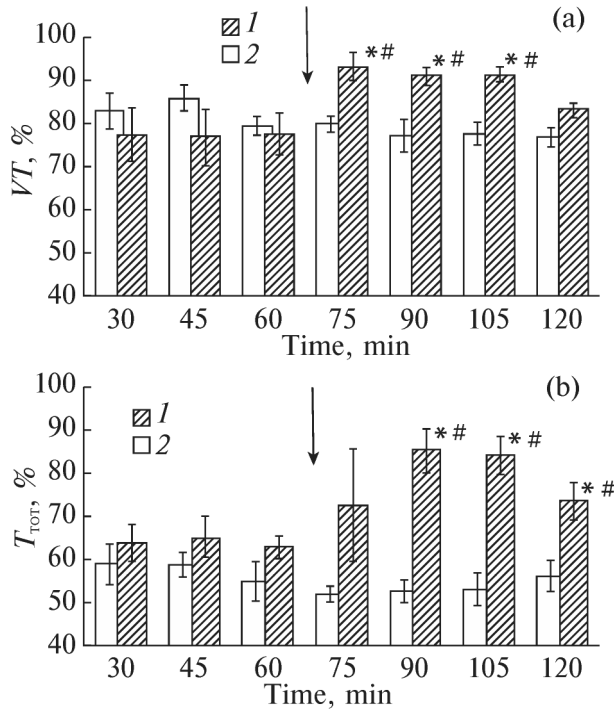


Рис. 5. Изменение объемно-временных параметров дыхания в ответ на микроэлектростимуляцию LO в экспериментах с микроинъекциями растворов в IL. (а) – изменение дыхательного объема (VT); (б) – изменение длительности дыхательного цикла (T_{tot}). По осям ординат – величина параметра на 3-й секунде стимуляции, выраженная в процентах к его величине на последней секунде перед стимуляцией; по осям абсцисс – время от начала регистрации. 1 – эксперименты с микроинъекциями раствора CoCl₂, 2 – контрольные эксперименты с микроинъекциями физраствора. Стрелками обозначен момент микроинъекций растворов в IL. * – достоверные отличия от значений, полученных до введения раствора CoCl₂; # – достоверные отличия от значений, полученных в контрольных экспериментах ($p < 0.05$, $n = 6$).

В обеих сериях экспериментов микроэлектростимуляция LO вызывала не только падение MAP, но и характерные перестройки паттерна дыхания (рис. 4а). Происходило резкое, в течение первой секунды стимуляции, снижение VT (рис. 4а, 3) и T_{tot} (рис. 4а, 4). Кроме того, наблюдалось увеличение V_{max} (рис. 4а, 5), при том что V_{max} не изменялась (рис. 4а, 6). Затем изменения объемно-временных параметров дыхания стабилизировались и постепенно слабели на фоне продолжающегося раздражения LO. Амплитуду колебаний VT и T_{tot} в ответ на микроэлектростимуляцию LO измеряли на 3-й секунде стимуляции. При первом предъявлении стимула VT уменьшалась в среднем на 0.54 ± 0.09 мл в экспериментах с микроинъекцией раствора CoCl₂ и на 0.38 ± 0.08 мл в контрольных экспериментах; T_{tot} уменьшалась соответственно на 0.14 ± 0.01 и 0.16 ± 0.01 секундах. Разницы между амплитудами колебаний VT и T_{tot}, полученными в разных сериях экспериментов, оказались статистически недостоверными. Было установлено, что уже через 5 мин после микроинъекции CoCl₂ респираторные эффекты стимуляции LO резко ослабевали (рис. 4б). В контрольных экспериментах микроинъекции физиологического раствора в IL не оказывали подобного действия на респираторные эффекты микроэлектростимуляции LO.

Изменения показателей респираторной реакции на микроэлектростимуляцию LO в ходе эксперимента, так же как и в случае депрессорных ответов, характеризовали

процентным соотношением величин VT и Ttot на 3-й секунде стимуляции LO к их величине непосредственно перед нанесением стимула (рис. 5). До микроинъекции растворов в IL реакции VT (рис. 5a) и Ttot (рис. 5b) на микроэлектростимуляцию LO характеризовались стабильностью и отсутствием достоверных различий между экспериментальными группами. Через 5 мин после введения раствора CoCl_2 реакция VT достоверно ослабевала, а через 50 мин амплитуда реакции возвращалась к исходному уровню. В контрольной группе эта величина не претерпевала достоверных изменений. Амплитуда реакции Ttot на стимуляцию также была величиной стабильной до микроинъекции CoCl_2 . Через 5 мин после микроинъекции эта реакция начинала слабеть, на 95-й и 105-й минутах это ослабление становилось достоверным, а на 120-й минуте реакция Ttot вновь усиливалась. В контрольной группе каких-либо достоверных изменений реакции Ttot не происходило.

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что в условиях уретановой анестезии, обеспечивающей стабильное функционирование систем кровообращения и дыхания экспериментального животного, микроэлектростимуляция LO вызывала реакции этих систем в виде падения артериального давления и перестройки паттерна дыхания, которая характеризовалась, в частности, временным снижением VT и Ttot. Микроинъекции раствора CoCl_2 в IL подавляли эти эффекты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предыдущим исследованием было установлено, что микроэлектростимуляция LO анестезированной крысы вызывает специфические реакции систем кровообращения и дыхания [10]. Эти реакции характеризовались быстрым падением MAP в среднем на 18 мм рт. ст. и его стабилизацией на достигнутом уровне, а также уменьшением VT и Ttot при одновременном увеличении V_{max} . Вопрос о механизмах, реализующих эти реакции, оставался открытым. В настоящем исследовании система кровообращения реагировала на микроэлектростимуляцию LO снижением MAP на 16–18 мм рт. ст. с последующей стабилизацией на этом уровне до окончания стимуляции. Как и в предыдущем исследовании, наблюдалось снижение VT и Ttot, а также увеличение V_{max} , при том что V_{max} не менялась. Таким образом, описанные ранее специфические реакции на микроэлектростимуляцию LO были успешно воспроизведены. Этот результат дал возможность выполнить основную задачу исследования, а именно, изучить влияние микроинъекций раствора CoCl_2 в IL анестезированной крысы на эффекты стимуляции LO.

Как известно, ионы Co^{2+} способны блокировать пресинаптические Ca^{2+} -каналы, нарушая выделение медиатора и подавляя синаптическую передачу [27, 29–31]. Синаптический эффект Co^{2+} зависит от концентрации вводимого раствора; он развивается достаточно быстро и может быть обратимым при концентрациях раствора, не превышающих 10 мМ; при более высоких концентрациях проявляется необратимый цитотоксический эффект Co^{2+} , который приводит к разрушению тел нейронов [27]. Вместе с тем было установлено, что при определенных условиях Co^{2+} даже в концентрации 4 мМ может вызывать гибель тел нейронов в области введения [32]. Микроинъекции растворов, содержащих CoCl_2 , являются эффективным методическим приемом, который позволяет блокировать проведение в структурах центральной нервной системы.

Применительно к висцеральным системам этот методический прием был использован главным образом для исследования механизмов центрального контроля кровообращения. Было установлено, в частности, что через 10 мин после билатеральной инъекции 100 нл 1 мМ раствора CoCl_2 в медиальные ядра миндалевидного комплекса (MeA) подвижной крысы происходит достоверное усиление барорефлекторной чувствительности, причем этот эффект исчезал через 60 мин после микроинъекций [33]. Сходные результаты были получены после инъекций кобальта в ядро ложа конечной

полоски [34]. Микроинъекции CoCl_2 (200 нл, 1мМ) в медиальную префронтальную кору подвижной крысы позволили установить, что блокирование прелимбической коры (PL) ослабляет рефлекторное повышение АР в ответ на гипоксический стимул, а введение раствора CoCl_2 в IL подобного эффекта не оказывает [35]. Было показано, что двусторонние микроинъекции кобальта в IL или PL по-разному изменяют реакцию системы кровообращения крысы на иммобилизацию [36], а двусторонняя блокада инсулярной коры (INS) ослабляла эту реакцию [37]. При исследовании нисходящих проекций, обеспечивающих участие IL в контроле кровообращения, было установлено, что микроинъекции CoCl_2 в переднюю часть латеральной гипоталамической области ослабляют прессорный ответ на электростимуляцию IL [38]. Микроинъекции кобальта были использованы и при исследовании механизмов взаимодействия структур, участвующих в контроле функции кровообращения. Так было установлено, что блокирование проведения через паравентрикулярное ядро гипоталамуса (PVN) подавляет прессорные и брадикардические ответы на введение норадреналина в MeA [31]. В свою очередь, блокада MeA путем введения в него (100 нл, 5 мМ) раствора CoCl_2 приводила к тому, что через 10 мин после введения ослабевали прессорные ответы на введение ангиотензина II в PVN анестезированной крысы; об обратимости этих эффектов не сообщается [39].

Резюмируя результаты предшествующих исследований, следует сделать вывод о том, что метод обратимой блокады различных, в том числе кортикальных, структур при помощи микроинъекций раствора CoCl_2 был с успехом использован для исследования роли этих структур в контроле функции кровообращения. При проведении исследований были использованы растворы CoCl_2 с концентрацией от 1 до 5 мМ, которые обратимо блокировали проведение в исследуемых структурах, ослабляя или усиливая реакции системы кровообращения на различные экспериментальные воздействия, в том числе на микроэлектростимуляцию IL. Было отмечено, что эти эффекты развивались быстро, обычно в течение 10–15 мин и сохранялись около часа, а затем ослабевали. Наши эксперименты, в которых был использован 2 мМ раствор CoCl_2 , показали сходную динамику эффекта блокады IL. Во всех предыдущих исследованиях имеются указания на то, что сами по себе микроинъекции растворов CoCl_2 в структуры, участвующие в контроле автономных функций, не вызывают изменения фоновых значений АР и HR, и эти данные также хорошо согласуются с результатами наших экспериментов. Вместе с тем в литературе отсутствуют сведения о возможном влиянии блокирования IL или других областей коры на циркуляторные или респираторные эффекты микростимуляции областей орбитофронтальной коры.

Решение основной задачи настоящего исследования позволило установить, что блокирование висцеромоторной IL обратимо подавляет депрессорные ответы и перестройки паттерна дыхания, вызванные микроэлектростимуляцией LO. По нашему мнению, этот результат прямо подтверждает гипотезу о том, что участие LO в контроле функций дыхания и кровообращения реализуется путем взаимодействия с IL. Очевидно, что при обсуждении возможных механизмов этого взаимодействия следует опираться прежде всего на результаты морфологических исследований (рис. 6).

Структура интракортикальных связей орбитофронтальной коры крысы к настоящему времени исследована достаточно подробно [15]. Установлено, в частности, что LO крысы может быть связана с IL как прямыми связями, так и через проекции к медиальной орбитальной и вентральной орбитальной областям, которые таким образом служат связующим звеном между LO и IL [21, 22, 40, 41]. Примечательно, что, по некоторым данным, существуют четкие структурно-функциональные отличия между роstralной и каудальной частями LO [22]. Прямые проекции к IL (а также к INS) образует по преимуществу задняя часть LO, и меченые терминалы аксонов идентифицировали в IL и INS после введения антероградного маркера в LO на уровне +3.2 мм относительно *bregma*, то есть на том же уровне, на котором в наших экспериментах располагался сти-

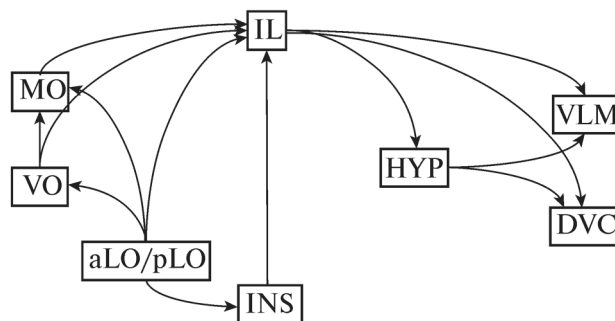


Рис. 6. Возможные пути реализации эффектов микроэлектростимуляции латеральной орбитальной коры. aLO – латеральная орбитальная кора, передняя; DVC – дорсальный комплекс ядер блуждающего нерва; IL – инфралимбическая кора; INS – инсулярная кора; HYP – гипоталамус; MO – медиальная орбитальная кора; pLO – латеральная орбитальная кора, задняя; VLM – венролатеральная область продолговатого мозга; VO – вентральная орбитальная кора.

мулирующий электрод. Вместе с тем следует иметь в виду, что INS, в которую проецируется каудальная часть LO, образует прямые проекции к IL [42, 43]. Поэтому вероятно, что INS также может участвовать в реализации эффектов стимуляции LO, которые наблюдались в наших экспериментах. Кроме того, принимая во внимание уникальные интракортикальные связи кластера, в том числе с полями префронтальной коры [44], можно предполагать участие этой структуры в реализации автономных функций OFC, в том числе взаимодействия LO и IL.

Эффекты этого взаимодействия могут проявляться в виде перестроек паттерна дыхания и изменений параметров системы кровообращения, которые происходят вследствие изменения активности бульбо-спинальных респираторных нейронов и преганглионарных нейронов ANS, образующих выходы из CAN. Установлено, что IL крыс образует прямые нисходящие проекции к дорсальному комплексу ядер блуждающего нерва (DVC), в пределах которого, как известно, расположена дорсальная группа респираторных нейронов, входящих в состав дыхательного центра и преганглионарные нейроны парасимпатического отдела ANS [4–7]. Кроме того, обнаружены проекции из IL к венролатеральной области продолговатого мозга (VLM), где находятся группы пресимпатических нейронов, модулирующих активность преганглионарных симпатических нейронов [4, 7]. Помимо этих прямых проекций IL может модулировать активность выходов из CAN по другим путям, например, через гипоталамус, нейроны которого, в свою очередь, образуют проекции к VLM и DVC [45, 46].

Таким образом, полученные результаты доказывают, что IL действительно принимает участие в реализации кардиореспираторных эффектов стимуляции LO и, следовательно, опосредует участие этой области OFC в контроле функций кровообращения и дыхания. Вместе с тем нейрофизиологические и нейрохимические механизмы взаимодействия LO и IL, а также роль других кортикальных и стволовых структур в реализации этого взаимодействия требуют дальнейшего экспериментального изучения.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Е. А. Г. – идея работы, проведение экспериментов, обработка данных и обсуждение результатов, подготовка рукописи. Т. Н. К. – планирование и проведение экспериментов, обработка данных и обсуждение результатов, подготовка рукописи. Т. С. Т.– проведение экспериментов, обработка результатов. Г. И. Р. проведение экспериментов, обработка данных и обсуждение результатов. В. Г. А. – идея работы, планирование экспериментов, обсуждение результатов, редактирование рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства”. Тема 64.1 (0134-2019-0001) “Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций внутренних органов”. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований и были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение Комиссии № 09/14 от 14 сентября 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Benarroch EE* (1993) The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* 68(10): 988–1001.
[https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)62272-1](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)62272-1)
2. *Lamotte G, Shouma K, Benarroch EE* (2021) Stress and central autonomic network. *Auton Neurosci* 235: 102870.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102870>
3. *Aleksandrov VG, Gubarevich EA, Kokurina TN, Rybakova GI, Tumanova TS* (2022a) Central autonomic network. *Human Physiol* 48(6): 715–721.
<https://doi.org/10.1134/S0362119722600412>
4. *Hurley KM, Herbert H, Moga M, Saper CB* (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Compar Neurol* 308(2): 249–276.
<https://doi.org/10.1002/cne.903080210>
5. *Fisk GD, Wyss JM* (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859(1): 83–95.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01935-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01935-1)
6. *Gasparini S, Howland JM, Thatcher AJ, Geerling JC* (2020) Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *J Compar Neurol* 528(16): 2708–2728.
<https://doi.org/10.1002/cne.24927>
7. *Terreberry RR, Neafsey EJ* (1987) The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. *Brain Res Bull* 19(6): 639–649.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90050-5)
8. *Owens NC, Verberne AJ* (2001) Regional hemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. *Brain Res* 919(2): 221–231.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03017-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03017-7)
9. *Alexandrov VG, Ivanova TG, Alexandrova NP* (2007) Prefrontal control of respiration. *J Physiol Pharmacol* an official J Polish Physiol Soc 58(Suppl 5 (Pt 1)): 17–23.
10. *Kokurina TN, Gubarevich EA, Rybakova GI, Tumanova TS, Aleksandrov VG* (2022) Microelectrostimulation of the rat lateral orbital cortex causes specific reactions of the circulation and respiration. *J Evol Biochem Physiol* 58(6): 2101–2108.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060369>
11. *Terreberry RR, Neafsey EJ* (1987) The rat medial frontal cortex projects directly to autonomic regions of the brainstem. *Brain Res Bull* 19(6): 639–649.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90050-5)
12. *Ruit KG, Neafsey EJ* (1990) Hippocampal input to a “visceral motor” corticobulbar pathway: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Exp Brain Res* 82(3): 606–616.
<https://doi.org/10.1007/BF00228802>
13. *Resstel LB, Corrêa FM* (2006) Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Auton Neurosci: Basic and Clin* 126-127: 130–138.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.022>
14. *Cechetto DF* (2014) Cortical control of the autonomic nervous system. *Exp Physiol* 99(2): 326–331.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075192>

15. Александров ВГ, Губаревич ЕА, Кокурина ТН, Рыбакова ГИ, Туманова ТС (2022) Орбитофронтальная кора в системе центрального управления автономными функциями. Успехи физиол наук 53(3): 45–53. [Aleksandrov VG, Gubarevich EA, Kokurina TN, Rybakova GI, Tumanova TS (2022) Orbitofrontal cortex in the system of the central autonomic control. Uspekhi fiziol nauk 53(3): 45–53. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179822030031>
16. Rempel-Clower NL (2007) Role of orbitofrontal cortex connections in emotion. *Ann NY Acad Sci* 1121: 72–86.
<https://doi.org/10.1196/annals.1401.026>
17. Chang CH (2017) Lateral orbitofrontal cortical modulation on the medial prefrontal cortex-amygdala pathway: differential regulation of intra-amygdala GABAA and GABAB receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 20(7): 602–610.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx027>
18. Chang CH, Ho TW (2017) Inhibitory modulation of medial prefrontal cortical activation on lateral orbitofrontal cortex-amygdala information flow. *J Physiol* 595(17): 6065–6076.
<https://doi.org/10.1113/JP274568>
19. Babalian A, Eichenberger S, Bilella A, Girard F, Szabolcsi V, Roccaro D, Alvarez-Bolado G, Xu C, Celio MR (2019) The orbitofrontal cortex projects to the parvafo nucleus of the ventrolateral hypothalamus and to its targets in the ventromedial periaqueductal grey matter. *Brain Struct Funct* 224(1): 293–314.
<https://doi.org/10.1007/s00429-018-1771-5>
20. Leemann S, Babalian A, Girard F, Davis F, Celio MR (2022) The PV2 cluster of parvalbumin neurons in the murine periaqueductal gray: connections and gene expression. *Brain Struct Funct* 227(6): 2049–2072.
<https://doi.org/10.1007/s00429-022-02491-0>
21. Illig KR (2005) Projections from orbitofrontal cortex to anterior piriform cortex in the rat suggest a role in olfactory information processing. *J Compar Neurol* 488(2): 224–231.
<https://doi.org/10.1002/cne.20595>
22. Barreiros IV, Ishii H, Walton ME, Panayi MC (2021) Defining an orbitofrontal compass: functional and anatomical heterogeneity across anterior-posterior and medial-lateral axes. *Behav Neurosci* 135(2): 165–173.
<https://doi.org/10.1037/bne0000442>
23. Mesa JR, Wesson DW, Schwendt M, Knackstedt LA (2022) The roles of rat medial prefrontal and orbitofrontal cortices in relapse to cocaine-seeking: A comparison across methods for identifying neurocircuits. *Addict Neurosci* 4: 100031.
<https://doi.org/10.1016/j.addicn.2022.100031>
24. Martínez-Rivera FJ, Pérez-Torres J, Velázquez-Díaz CD, Sánchez-Navarro MJ, Huertas-Pérez CI, Diehl MM, Phillips ML, Haber SN, Quirk GJ (2023) A novel insular/orbital-prelimbic circuit that prevents persistent avoidance in a rodent model of compulsive behavior. *Biol Psychiat* 93(11): 1000–1009.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.02.008>
25. Ongür D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10(3): 206–219.
<https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
26. Smith R, Thayer JF, Khalsa SS, Lane RD (2017) The hierarchical basis of neurovisceral integration. *Neurosci Biobehav Rev* 75: 274–296.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.003>
27. Kretz R (1984) Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci Methods* 11(2): 129–135.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90030-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90030-x)
28. Paxinos G, Watson C (eds) (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. Acad Press.
29. Nuseir K, Heidenreich BA, Proudfit HK (1999) The antinociception produced by microinjection of a cholinergic agonist in the ventromedial medulla is mediated by noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group. *Brain Res* 822(1-2): 1–7.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01195-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01195-0). PMID: 10082877
30. Crestani CC, Alves FH, Correa FM, Guimarães FS, Joca SR (2010) Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. *Behav Brain Funct* 6: 30.
<https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-30>
31. Fortaleza EA, Scopinho AA, Corrêa FM (2012) Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus mediate cardiovascular responses evoked by the microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of the rat brain. *Neuroscience* 219: 157–165.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.051>

32. *Malpeli JG, Burch BD* (1982) Cobalt destroys neurons without destroying fibers of passage in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Neurosci Lett* 32(1): 29–34.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90224-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90224-5)
33. *Fortaleza EA, Ferreira-Junior NC, Lagatta DC, Resstel LB, Corrêa FM* (2015) The medial amygdaloid nucleus modulates the baroreflex activity in conscious rats. *Autonom Neurosci* 193: 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.07.003>
34. *Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Corrêa FM, Guimarães FS* (2008) Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154(3): 869–876.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.007>
35. *Granjeiro EM, Scopinho AA, Corrêa FM, Resstel LB* (2011) Prelimbic but not infralimbic cortex is involved in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Exp Physiol* 96(5): 518–527.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057596>
36. *Tavares RF, Corrêa FM, Resstel LB* (2009) Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87(11): 2601–2607.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22070>
37. *Alves FH, Crestani CC, Corrêa FM* (2010) The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Brain Res* 1333: 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.077>
38. *Fisk GD, Wyss JM* (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859(1): 83–95.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01935-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01935-1)
39. *Rostami B, Hatam M* (2022) Cent nucleus of amygdala mediate pressor response elicited by microinjection of angiotensin II into the parvocellular paraventricular nucleus in rats. *Iran J Med Sci* 47(3): 272–279.
<https://doi.org/10.30476/ijms.2021.90015.2080>
40. *Hoover WB, Vertes RP* (2011) Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J Compar Neurol* 519(18): 3766–3801.
<https://doi.org/10.1002/cne.22733>
41. *Izquierdo A* (2017) Functional heterogeneity within rat orbitofrontal cortex in reward learning and decision making. *J Neurosci* 37(44): 10529–10540.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1678-17.2017>
42. *Mathiasen ML, Aggleton JP, Witter MP* (2023) Projections of the insular cortex to orbitofrontal and medial prefrontal cortex: a tracing study in the rat. *Front Neuroanat* 17: 1131167.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2023.1131167>
43. *Hoover WB, Vertes RP* (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212(2): 149–179.
<https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
44. *Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong HW* (2014) Neural networks of the mouse neocortex. *Cell* 156(5): 1096–1111.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.023>
45. *Chiba T, Kayahara T, Nakano K* (2001) Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res* 888(1): 83–101.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03013-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03013-4)
46. *Stornetta RL, Inglis MA, Viar KE, Guyenet PG* (2016) Afferent and efferent connections of C1 cells with spinal cord or hypothalamic projections in mice. *Brain Struct Funct* 221(8): 4027–4044.
<https://doi.org/10.1007/s00429-015-1143-3>

**Cobalt Microinjections into the Infralimbic Cortex of the Anesthetized Rat
Suppresses Circulatory and Respiratory Reactions to the Microelectrostimulation
of the Lateral Orbital Cortex**

**E. A. Gubarevich^a, T. H. Kokurina^a, G. I. Rybakova^a, T. S. Tumanova^{a,b},
and V. G. Aleksandrov^{a,*}**

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

^b*Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia*

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

The central autonomous network that controls visceral systems, including circulatory and respiratory systems, includes the visceromotor infralimbic cortex (IL), which is one of the areas of the prefrontal cortex and is located on the medial surface of the large hemispheres. At the same time, there is evidence that areas of the prefrontal cortex located on the orbitofrontal surface, including the lateral orbital cortex (LO), can participate in the control of autonomous functions. The purpose of this work was to experimentally test the hypothesis according to which the participation of LO in the control of respiratory and circulatory functions is realized through IL. To this end, in acute experiments on laboratory rats anesthetized with urethane, the effect of microinjections of cobalt chloride solution (CoCl_2) in IL on the reactions of circulatory and respiratory systems caused by microelectrostimulation of LO was investigated. It is known that Co^{2+} ions are non-specific blockers of synaptic transmission, therefore microinjections of CoCl_2 solutions lead to disruption of conduction in the structures of the central nervous system. In the first, control series of experiments, micro-electrical stimulation of LO caused specific responses of the circulatory and respiratory systems, which were consistently reproduced throughout the experiment. In the second, experimental series, the introduction of CoCl_2 solution into IL suppressed responses to micro-electrical stimulation of LO, and this effect turned out to be reversible. The obtained results confirmed the hypothesis put forward about the possible participation of IL in the implementation of autonomous LO functions. The elucidation of the mechanisms that ensure the interaction of LO and IL in the context of autonomous control should be the subject of further experimental research.

Keywords: prefrontal cortex, autonomic control, blood circulation, respiration, electrical microstimulation, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ДИАСТОЛИЧЕСКОЙ УПРУГОСТИ
ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

© 2024 г. В. И. Капелько¹, В. Л. Лакомкин^{1,*}, А. А. Абрамов¹, А. В. Просвирнин¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: v.lakomkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.09.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

Важнейшим свойством миокарда, определяющим наполнение левого желудочка (ЛЖ) сердца, является его растяжимость. Наиболее простым методом ее оценки является соотношение давления и объема ЛЖ в конце диастолы, однако оно может варьировать в широком диапазоне и сильно зависит от условий притока и сопротивления, что затрудняет оценку растяжимости. В работе сопоставлены шесть расчетных индексов диастолической упругости ЛЖ сердца, большинство которых основано на законе Гука, сравнивается их устойчивость, разбросы и коэффициенты корреляции с различными параметрами гемодинамики. Оказалось, что только индекс диастолической упругости № 4, учитывающий прирост упругости ЛЖ в течение диастолы, показал слабую зависимость от фракции выброса, частоты сокращений и других параметров гемодинамики ЛЖ сердца, что обосновывает его применимость при оценке растяжимости при патологии сердца, сопровождающейся различными изменениями гемодинамики.

Ключевые слова: растяжимость миокарда, расчетные индексы упругости левого желудочка сердца, коннектин (титин)

DOI: 10.31857/S0869813924020069, **EDN:** DJLYNL

ВВЕДЕНИЕ

Растяжимость миокарда является важнейшим свойством сердца, она определяет степень наполнения желудочков и, следовательно, величину ударного объема. При оценке сократительной функции левого желудочка (ЛЖ) в различных гемодинамических ситуациях, а также для понимания патогенеза различных заболеваний сердца оценка растяжимости миокарда является одним из необходимых компонентов. Способы оценки растяжимости ЛЖ служили предметом исследования в ограниченном числе работ, в основном выполненных в клинике. «Золотым стандартом» измерения упругости сердца является соотношение давления и объема ЛЖ в конце диастолы в большом диапазоне притока к ЛЖ [1], однако этот подход является сложным и трудоемким процессом [2]. Более простым способом оценки диастолической упругости является определение соотношения между давлением в ЛЖ и его объемом в конце диастолы [3], однако он сильно зависит от притока и сопротивления.

Термином, наиболее часто используемым для описания пассивного механического поведения биологических материалов, является жесткость или упругость. Она

количественно определяет степень сопротивления объекта в ответ на приложенную силу. Податливость является обратной величиной упругости и количественно определяет деформируемость материала [2]. Упругий материал можно рассматривать как пружину, а его механическую реакцию можно описать законом Гука – «механическое напряжение в упруго деформированном теле прямо пропорционально относительной деформации этого тела». Закон выражается формулой $F_{упр} = k \cdot \Delta l$, где k – упругость тела. Соответственно $k = F_{упр} / \Delta l$. Применительно к ЛЖ эти величины пропорциональны величине конечного диастолического давления ($F_{упр}$) и приросту объема ЛЖ за диастолу, т. е. разности конечного и начального диастолического объема. Вместе с тем, поскольку эти величины не вполне идентичны применяемым в законе Гука, в данной работе, выполненной на крысах *in vivo*, были рассчитаны и другие возможные индексы на основе сведений о давлении и объеме ЛЖ. Лучшим индексом диастолической упругости может быть тот, который не должен зависеть от условий гемодинамики и колебаться в ограниченных пределах в однородной группе животных. Такой индекс в дальнейшем можно использовать для оценки растяжимости миокарда при различной патологии сердца. Цель работы состояла в сопоставлении различных индексов диастолической упругости ЛЖ и оценке степени их зависимости от условий гемодинамики.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы 12 крыс-самцов стока Wistar массой 350–400 г, возраст 5–6 месяцев. Животных содержали в биоклинике кардиоцентра в клетках по 5 голов со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировался (12 ч освещения, 12 ч затемнения) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C.

Крысам внутрибрюшинно вводили наркоз Золетил-100 в дозе 5 мг/кг. Этого хватало для вставления всех катетеров. Если животное просыпалось, ему добавляли Золетил, разбавленный в 4 раза по 1–1.5 мг/кг. Выполняли катетеризацию ЛЖ при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018, вводимого через правую сонную артерию, и усилителя ADV500 (Transonic, Канада). Это позволяло получать одновременную информацию о давлении и объеме ЛЖ [4]. Во время P-V измерений для лучшего контроля за глубиной наркоза животных переводили на ингаляционный наркоз Изофлураном (1–2%-ный) с помощью наркозного аппарата Somno Suit фирмы Kent (США). Использовали программное обеспечение LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия), позволявшее рассчитывать более 20 параметров сократительной функции в ходе сердечного цикла, в том числе максимальную скорость наполнения ЛЖ (dV/dt) и константу времени расслабления в изоволюмическом периоде – τ [5]. Для статистической обработки результатов измерений использовали алгоритмы, предоставляемые программой Microsoft Excel (2013). При расчете корреляций выполняли проверку данных на нормальность распределения. Во всех группах было обнаружено нормальное распределение. Вычисляли коэффициент корреляции Пирсона. Результаты представлены в виде $M \pm SD$.

Расчет индексов упругости ЛЖ

Индекс № 1. Наиболее употребительным способом оценки, особенно часто используемым клиницистами, является соотношение конечного диастолического давления (КДД) в ЛЖ и конечного диастолического объема (КДО), он определяется простым делением этих величин.

Индекс № 2. Второй индекс следует закону Гука, он вычисляется по формуле КДД/(КДО – НДО), т.е. разности между конечным и начальным диастолическим давлением (НДО).

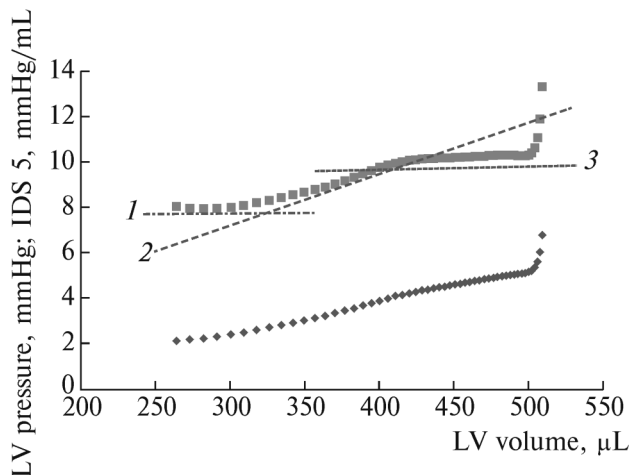


Рис. 1. Соотношение объема ЛЖ и давления в нем (нижняя кривая) во время диастолы, а также соотношение объема ЛЖ и расчетного индекса диастолической упругости № 5 (ИДУ, верхняя кривая) в течение диастолы. В начальном (1) и конечном (3) сегментах кривой ИДУ постоянен, а в средней части (2) индекс возрастает.

Индекс № 3. Третий индекс фактически является модификацией второго, только за силу растяжения применяется не КДД, а разность конечного и начального диастолического давления (НДД). Он имеет вид: $(\text{КДД} - \text{НДД}) / (\text{КДО} - \text{НДО})$, и учитывает разность прироста давления и объема за диастолу [1].

Индекс № 4. Данный индекс также можно рассматривать как один из вариантов закона Гука. Он также учитывает разность, как и индекс № 3, но в отличие от последнего, имеет вид $(\text{КДД} / \text{КДО} - \text{НДД} / \text{НДО})$, т. е. разность упругости ЛЖ в конце и начале диастолы.

Индекс № 5. Этот индекс учитывает соотношение давления и объема ЛЖ на всем протяжении диастолы. Он вычисляется программой автоматически посредством деления давления на объем в любой точке диастолы и позволяет вычлнить отдельные фрагменты, отличающиеся по степени наклона (рис. 1). Как правило, наибольший наклон, т. е. прирост упругости, наблюдается в средней части диастолы. Крутизна наклона может быть оценена расчетом прироста индекса на нормированную величину прироста объема, например, 0.1 мл.

Индекс № 6. Этот индекс также учитывает соотношение давления и объема ЛЖ, но определяется в середине диастолы в точке стабильного подъема индекса № 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Степень размаха индексов в разных опытах и средние величины показаны в табл. 2. Все индексы имеют размерность мм рт. ст./мл.

Как видно из данных табл. 2, наибольшие коэффициенты вариации присущи индексам №№ 5 и 6, к тому же вычисление этих индексов трудоемко и в известной мере зависит от оператора. Так что можно считать эти индексы малопригодными для последующего сравнения функционирования сердец в норме и патологии. Индексы №№ 1–4 характеризуются меньшим размахом, но важно определить, какие параметры гемодинамики влияют на эти индексы. Для каждого индекса были определены его корреляции с наиболее важными параметрами гемодинамики и вычислена статистическая достоверность (табл. 3).

Таблица 1. Исходные показатели гемодинамики

Показатели	$M \pm SD$
Число опытов	11
Частота сокращений/мин	369 ± 44
Фракция выброса (%)	71 ± 8
Конечный диастолический объем (мл)	0.46 ± 0.12
Начальный диастолический объем (мл)	0.12 ± 0.05
Минимальное диастолическое давление (мм рт. ст.)	0.3 ± 1.2
Конечное диастолическое давление (мм рт. ст.)	4.0 ± 1.5
Индекс артериальной упругости (мм рт. ст./мл)	0.42 ± 0.16
Максимальная скорость наполнения ЛЖ (мл/с)	$9,8 \pm 3.0$
Константа времени расслабления tau (мс)	7.2 ± 1.1

Таблица 2. Сравнение устойчивости индексов упругости левого желудочка сердец крыс

Индекс №	Формула	Размах	$M \pm SD$	SD/M (%)
1	КДД/КДО	3.5–19.8	9.8 ± 3.6	37
2	КДД/(КДО–НДО)	2.7–28.9	13.5 ± 7.3	54
3	(КДД–НДД)/(КДО–НДО)	6.4–16.5	11.6 ± 4.5	39
4	(КДД/КДО) – (НДД/НДО)	2.3–9.0	5.3 ± 2.3	43
5	Наклон ДД/ДО	12–90	46 ± 32	70
6	ДД/ДО в середине диастолы	2.3–15	6.5 ± 4.3	66

Обозначения: КДД – конечное диастолическое давление; КДО – конечный диастолический объем; НДО – начальный диастолический объем; НДД – начальное диастолическое давление; ДД – диастолическое давление; ДО – диастолический объем.

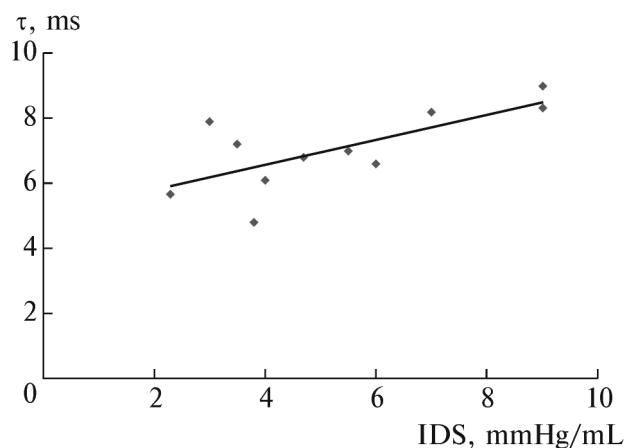
Практически для каждого индекса выявлена значительная зависимость от 2–4 параметров гемодинамики. Величина индексов оказалась прямо пропорциональна замедлению расслабления и величине артериальной упругости и обратно пропорциональна максимальной скорости наполнения ЛЖ. Частота сокращений сердца слабо влияла на величину индексов. Индекс артериальной упругости прямо коррелировал с константой времени расслабления ($r = 0.75$) и обратно – со скоростью быстрого наполнения ЛЖ ($r = -0.75$). Это свидетельствует о наличии тесной связи расслабления, наполнения ЛЖ и артериальной упругости.

Единственным исключением является индекс № 4, он практически не зависел от гемодинамических условий опыта и показал умеренную незначимую зависимость только от константы времени расслабления (рис. 2). Его преимущество также состоит в относительной простоте измерения, требуется вычислить всего два показателя в конце и начале диастолы. Поэтому есть основания полагать, что он лучшим образом из представленных индексов способен характеризовать диастолическую упругость ЛЖ.

Таблица 3. Корреляции индексов упругости с некоторыми параметрами гемодинамики

Индексы диастолической упругости	КДО (мкл)	НДД (мм рт. ст.)	КДД (мм рт. ст.)	ЧСС/мин	ФВ (%)	Еа (мм рт. ст./мл)	dV/dt max (мл/мин)	Тау (мс)
№ 1	-0.55	0.63	0.83 **	-0.69	0.13	0.76 **	-0.82 **	0.69 *
№ 2	-0.54	0.08	0.27	-0.38	-0.06	0.74 *	-0.90 **	0.65
№ 3	-0.35	0.87 **	0.91 **	-0.35	-0.03	0.67	-0.71	0.61
№ 4	-0.40	-0.28	-0.22	-0.40	-0.08	0.21	-0.42	0.70
№ 5	-0.82 *	0.38	0.22	0.39	-0.56	0.91 **	-0.85 *	0.92**
№ 6	-0.59	0.90 **	0.82 **	0.35	-0.07	0.60	-0.46	0.32

Обозначения: КДО – конечный диастолический объем, НДД и КДД – начальное и конечное диастолическое давление в ЛЖ, ЧСС – частота сокращений сердца, ФВ – фракция выброса, Еа – индекс артериальной упругости, dV/dt max – максимальная скорость быстрого наполнения ЛЖ, Тау – константа времени расслабления. Статистическая значимость корреляций * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

**Рис. 2.** Корреляция индекса диастолической упругости (IDS) № 4 с константой времени расслабления tau (ms).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данная работа является первой, в которой была поставлена задача сравнения различных способов оценки диастолической упругости ЛЖ. Ее определение в основном интересовало клиницистов, поскольку она определяет переносимость физических нагрузок [1]. Золотым стандартом оценки считают отношение прироста давления к приросту объема на всем протяжении диастолы [1, 2], но сами авторы отмечают трудоемкость метода и необходимость варьирования притока в ЛЖ. В обстоятельном обзоре [2] представлены различные биофизические модели миокарда, но основное внимание авторы уделили неинвазивным способам определения диастолической упругости ЛЖ. Зависимость предлагаемых способов от условий гемодинамики не служила предметом изучения.

Наши результаты показали, что все индексы тесно связаны с показателем расслабления (τ). Прямая связь между ними означает, что замедление расслабления сопровождается повышением диастолической упругости ЛЖ. Связь между расслаблением и диастолической упругостью была отмечена ранее [2, 6, 7]. При замедленном расслаблении митральный клапан открывается при относительно более высоком давлении в ЛЖ, и наполнение ЛЖ прежним объемом требует применения большей силы, что выражается в повышении диастолического давления и, следовательно, упругости ЛЖ. Также легко объяснима обратная связь индексов упругости со скоростью наполнения ЛЖ. Последняя тем выше, чем ниже минимальное давление в ЛЖ, зависящее от скорости падения в ЛЖ в конечной стадии расслабления.

Растяжимость ЛЖ зависит от многих компонентов – величины наполнения, формы ЛЖ, состава миокардиальной ткани, но главным образом она определяется свойствами саркомерного белка коннектина (титина) [8], являющегося связующим звеном между концами миозиновых нитей и границей саркомера – линией Z. Его пружиноподобная структура сжимается при сокращении саркомеров, а после их расслабления распрямляется. Чем быстрее и полнее будут извлечены ионы Ca^{++} из миофибрилл, тем быстрее будет распрямляться пружина коннектина и тем ниже упадет давление в конце расслабления. Это облегчит наполнение ЛЖ в начальной фазе и замедлит подъем давления в конце диастолы, в основном определяющий упругость. Представления о функции коннектина в миокарде изложены в ряде обзоров последних лет [1, 9–13].

Связь диастолической упругости ЛЖ с величиной артериальной упругости также имеет под собой солидную основу. Насосная функция сердца тесно связана с состоянием артериального русла. Соотношение между ними служило предметом исследования как в эксперименте, так и в клинике. Артериальная упругость является просто функцией системного сосудистого сопротивления [14]. При изгнании крови в аорте и крупных артериях, обладающих эластичными стенками, возникает волна, которая имеет как продольное, так и возвратное направление [15]. Скорость пульсовой волны напрямую связана с величиной артериальной упругости [16]. В опытах на собаках влияние этой волны на гемодинамику изучали как посредством кратковременного пережатия нисходящей аорты [7], так и при раздувании помещенного в аорту баллона в разные сроки после начала систолы [6].

В норме возвратная волна приходит к ЛЖ в начале диастолы и никак не влияет на контур давления в ЛЖ. Но при пережатии грудной аорты или раздувании баллона во время изгнания возвратная волна приходит к ЛЖ еще во второй половине систолы, возникает дополнительное сопротивление, систола удлиняется, а в ЛЖ возникает небольшой вторичный подъем давления на 2–20 мм рт. ст. [6], при этом задерживается и наступление расслабления. Известно, что расслабление миокарда начинается гораздо раньше завершения систолы – в опытах с пережатием восходящей аорты в разные сроки после начала систолы было выяснено, что контур давления в ЛЖ изменяется, и начало расслабления возникает уже после завершения первой трети систолы [17]. Таким образом, расслабление зависит от условий нагрузки во время выброса, поэтому удлинение систолы и дополнительный прирост давления в ЛЖ замедляют расслабление. При этом митральный клапан открывается при более высоком давлении в ЛЖ, и скорость быстрого наполнения ЛЖ оказывается сниженной. Тесная связь между расслаблением и диастолической упругостью была недавно отмечена при оценке состояния ЛЖ у людей с хронической сердечной недостаточностью и сохраненной фракцией выброса [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленных индексов только № 4 (прирост упругости за диастолу), представляющий один из вариантов закона Гука и принципиально близкий к «золотому стандарту», показал слабую зависимость от фракции выброса, частоты сокращений

и гемодинамических параметров ЛЖ. Он был связан только с константой времени расслабления, и эта связь вполне объяснима, потому что оба процесса – и расслабление, и растяжение ЛЖ осуществляются главным образом одной механической структурой – коннектином. Относительная независимость этого индекса диастолической упругости от условий гемодинамики позволяет рекомендовать его для оценки растяжимости ЛЖ при различной патологии сердца.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

В. И. К. и В. Л. Л. – идея работы и дизайн экспериментов; А. А. А., А. В. П. и В. Л. Л. – получение данных; А. А. А., А. В. П., В. Л. Л. и В. И. К. – обработка и представление данных; В. Л. Л., В. И. К. и А. А. А. – написание и редактирование рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта РФФИ № 23-15-00275. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, (протокол заседания № ЛЭПС/18.07.2023 от 18 июля 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lalande S, Mueller PJ, Chung CS* (2017) The link between exercise and titin passive stiffness. *Exp Physiol* 102 (9): 1055–1066. <https://doi.org/10.1113/EP086275>
2. *Emig R, Zgierski-Johnston CM, Timmermann V, Taberner A, Nash MP, Kohl P, Peyronnet R* (2021) Passive myocardial mechanical properties: meaning, measurement, models. *Biophys Rev* 13(5): 587–610. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00838-1>
3. *Liu W, Wang Z* (2019) Current Understanding of the Biomechanics of Ventricular Tissues in Heart Failure. *Bioengineering (Basel)* 7(1): 2. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7010002>
4. *Lakomkin VL, Abramov AA, Lukoshkova EV, Prosvirnin AV, Kapelko VI* (2022) Hemodynamics and cardiac contractile function in type 1 diabetes. *Kardiologija* 62(8): 33–37. <https://doi.org/10.18087/cardio.2022.8.n1967>. PMID: 36066985
5. *Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML* (1976) Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 58: 751–760. <https://doi.org/10.1172/JCI108522>
6. *Gillebert TC, Lew WY* (1991) Influence of systolic pressure profile on rate of left ventricular pressure fall. *Am J Physiol* 261(3 Pt 2): H805–H813. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.3.H805>
7. *Yano M, Kohno M, Kobayashi S, Obayashi M, Seki K, Ohkusa T, Miura T, Fujii T, Matsuzaki M* (2001) Influence of timing and magnitude of arterial wave reflection on left ventricular relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(4): H1846–H1852. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1846>

8. *Granzier H, Labeit S* (2002) Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol* 541 (Pt 2): 335–342.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014381>
9. *Li N, Hang W, Shu H, Zhou N* (2022) RBM20, Therapeutic Target to Alleviate Myocardial Stiffness via Titin Isoforms Switching in HFpEF. *Front Cardiovasc Med* 9: 928244.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.928244>
10. *Loescher CM, Hobbach AJ, Linke WA* (2022) Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics, and medical significance. *Cardiovasc Res* 118(14): 2903–2918.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab328>
11. *Tharp C, Mestroni L, Taylor M* (2020) Modifications of Titin Contribute to the Progression of Cardiomyopathy and Represent a Therapeutic Target for Treatment of Heart Failure. *J Clin Med* 9(9): 2770.
<https://doi.org/10.3390/jcm9092770>
12. *Franssen C, González MA* (2016) The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24(4): 259–267.
<https://doi.org/10.1007/s12471-016-0812-z>
13. *Капелько ВИ* (2022) Роль титина в сократительной функции сердца. *Успехи физиол наук* 53(2): 1–15. [*Капелько ВИ* (2022) The role of sarcomeric protein titin in the pump function of the heart. *Uspehi fiziol nauk* 53(2): 1–15. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179822020059>
14. *Chirinos JA, Rietzschel ER, Shiva-Kumar P, De Buyzere ML, Zamani P, Claessens T, Geraci S, Konda P, De Bacquer D, Akers SR, Gillebert TC, Segers P* (2014) Effective arterial elastance is insensitive to pulsatile arterial load. *Hypertension* 64(5): 1022–1031.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03696>
15. *Weber T* (2020) The Role of Arterial Stiffness and Central Hemodynamics in Heart Failure. *Int J Heart Fail* 2(4): 209–230.
<https://doi.org/10.36628/ijhf.2020.0029>
16. *Avolio AP, Chen SG, Wang RP, Zhang CL, Li MF, O'Rourke MF* (1983) Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community. *Circulation* 68(1): 50–58.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.68.1.50>
17. *Solomon SB, Nikolic SD, Frater RW, Yellin EL* (1999) Contraction-relaxation coupling: determination of the onset of diastole. *Am J Physiol* 277(1): H23–H27.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.1.H23>
18. *Sathyanarayanan SP, Oberoi M, Shaikat MHS, Stys T, Stys A* (2022) Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Concise Review. *SD Med* 75(11): 513–517.

Methods for Assessing the Diastolic Distensibility of the Left Ventricle

V. I. Kapelko^a, V. L. Lakomkin^{a,*}, A. A. Abramov^a, and A. V. Prosvirnin^a

^aChazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Healthcare, Moscow, Russia
*e-mail: v.lakomkin@yandex.ru

The most important property of the myocardium that determines the filling of the left ventricle (LV) of the heart is its distensibility. The simplest method of its assessment is the ratio of pressure and LV volume at the end of the diastole. Active relaxation of the myocardium is determined by the work of calcium pumps, and passive relaxation is determined by sarcomere proteins and, first of all, by connectin – titin. The paper compares 6 calculated indices of LV diastolic stiffness of the heart, compares their stability, variations and correlation coefficients from various parameters of hemodynamics. It is shown that only the diastolic stiffness index No. 4, which takes into account LV stiffness at the beginning and end of diastole, showed a weak dependence on LV, heart rate and other parameters of LV hemodynamics of the heart. Therefore, this index can be used in the future to assess the distensibility of the heart in various pathologies.

Keywords: myocardial extensibility, calculated indices of LV elasticity of the heart, titin

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ И ДОФАМИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У МЫШЕЙ

© 2024 г. Д. В. Базовкина^{1,*}, У. С. Устинова², С. Н. Адонина¹, П. Д. Комлева¹,

А. Б. Арефьева¹, Е. А. Куликова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

*E-mail: daryabazovkina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.10.2023 г.

После доработки 30.11.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

Дофаминовая система мозга участвует в регуляции различных физиологических процессов и поведенческих реакций, включая социальное поведение. На грызунах было показано, что длительное одиночное содержание может приводить к изменениям параметров поведения и нейрохимических показателей, однако не всегда эти данные можно однозначно интерпретировать. В настоящей работе исследовали эффекты продолжительной социальной изоляции на поведение и состояние дофаминовой системы мозга у самцов мышей линии C57Bl/6. Животных опытной группы с 40–42-дневного возраста содержали индивидуально в отдельных клетках в течение шести недель, в то время как мышей контрольной группы – в групповых условиях. Изоляция не повлияла на двигательную и исследовательскую активность в тесте «открытое поле» по сравнению с групповым содержанием. В то же время животные, подвергавшиеся продолжительной изоляции, демонстрировали большую длительность социальных контактов в модели «резидент – интродер» и ослабление стереотипного поведения в тесте «закапывание шариков» по сравнению с контрольной группой. Эти изменения в поведении сопровождалось повышением уровней мРНК генов, кодирующих дофаминовые рецепторы D1 и D2, в стриатуме мышей. Кроме этого, уровень метаболита дофамина DOPAC снижался в гипоталамусе и повышался во фронтальной коре мышей вследствие действия социальной изоляции по сравнению с контрольной группой. Результаты вносят вклад в понимание эффектов длительной социальной изоляции на поведение и дофаминовую систему мозга у мышей.

Ключевые слова: социальная изоляция, поведение, дофамин, дофаминовый рецептор, экспрессия генов, мозг, мыши

DOI: 10.31857/S0869813924020071, **EDN:** DJINUE

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная пандемия 2020 г. вызвала всплеск в исследовании последствий длительной социальной изоляции, поскольку главной рекомендацией ВОЗ для предотвращения распространения инфекции была минимизация социальных связей вплоть до полного карантина. Однако социальная изоляция, определяемая как лишение со-

циальных контактов и взаимодействия, является сильным стрессорирующим фактором как для людей, так и для животных [1, 2]. Особенно стоит отметить, что хронический стресс в раннем возрасте может быть причиной развития тяжелых психических расстройств, включая шизофрению, агрессию, тревожность во взрослом возрасте [2, 3]. Поэтому в последние несколько лет приобретают актуальность модели социальной изоляции, разрабатываемые на животных, в частности, на грызунах [4–6]. По литературным данным, длительное одиночное содержание мышей или крыс может приводить к снижению нейрогенеза и синаптической пластичности [6], а также к негативным последствиям, таким как повышенное тревожное и депрессивноподобное поведение [7, 8]. Продолжительная социальная изоляция может усиливать проявления агрессии и менять структуру социальных взаимодействий [4, 9, 10], при этом данные по влиянию длительной изоляции на стереотипное поведение остаются малочисленными и неоднозначными [11–13].

Дофаминовая система мозга участвует в регуляции различных физиологических процессов, включая двигательную активность, нейроэндокринные функции и многие виды поведения, в том числе тревожное, социальное и стереотипное [14–15]. Дофамин играет важную роль в патофизиологии таких нейродегенеративных и психических расстройств, как паркинсонизм [16], шизофрения, депрессия [17] и тревожность [18]. Дофаминовые рецепторы (D1 – D5) являются трансмембранными G-белок-связанными клеточными рецепторами. Наиболее изученными являются рецепторы D1 и D2, которые вовлечены в регуляцию широкого спектра поведенческих реакций [15].

Данные по влиянию социальной изоляции на дофаминовую систему мозга довольно противоречивы. Некоторые авторы обнаруживают, что длительное одиночное содержание увеличивает внеклеточный уровень дофамина [19–20], но другие исследователи этого не подтверждают [21]. Данные по влиянию длительной изоляции на рецепторы дофамина также неоднозначны: по одним сведениям, происходит снижение плотности рецепторов D1 и D2 в структурах мозга [22–24], но другие результаты указывают на повышение активности рецепторов D2 в мозге в ответ на изоляцию [25].

Целью данной работы было исследование влияния длительной социальной изоляции на двигательную активность и тревожное, стереотипное и социальное поведение и функциональную активность дофаминовой системы мозга. Для этого у самцов мышей линии C57Bl/6 было изучено влияние одиночного содержания на: 1) поведение в тестах «открытое поле», «закапывание шариков» и «социальное взаимодействие»; 2) содержание дофамина и его метаболитов DOPAC (ДОФУК, 3,4-диоксифенилуксусная кислота) и HVA (ГВК, гомованилиновая кислота) в структурах мозга; 3) уровни мРНК генов, кодирующих рецепторы D1 и D2, в структурах мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Эксперименты проводились на самцах линии C57Bl/6 ($n = 20$). Данная линия имеет SPF-статус и поддерживается в Центре коллективного пользования SPF-виварий Института цитологии и генетики СО РАН. Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023). Были сделаны все усилия для снижения числа экспериментальных животных и уменьшения их страдания.

После отсадки от матерей в возрасте 4 недель самцы содержались по 5 особей в индивидуально вентилируемых клетках Optimice (Techniplast, Италия) в стандартных условиях вивария (температура 20–22°C, влажность 50–60%, световой цикл 14 : 10, стандартный корм и вода без ограничений). В начале эксперимента по изоляции возраст мышей составлял 40–42 дня.

Дизайн исследования: социальная изоляция

Самцов мышей разделили на две группы: контрольную (контроль, $n = 10$) и экспериментальную (изоляция, $n = 10$). Контрольных животных продолжали содержать в клетках по 5 особей, тогда как животные из опытной группы были рассажены в индивидуальные клетки сроком на 6 недель, поскольку, по литературным данным, необходимо не менее трех недель одиночного содержания для обнаружения изменений в поведении грызунов [26].

За день до тестирования животных контрольных групп рассаживали в отдельные клетки для снятия группового эффекта, поскольку содержание грызунов в группах в одной клетке сопровождается установлением иерархических отношений, которые влияют на поведение, метаболизм биогенных аминов в мозге и уровень кортикостерона. Поэтому перед тестированием рекомендуется рассадить животных в индивидуальные клетки. Было показано, что у грызунов через сутки после рассаживания влияние группового эффекта нивелируется [27].

Последовательно, по одному в день, были проведены тесты «открытое поле» (для оценки уровня двигательной активности и тревожного поведения), «закапывание шариков» (для оценки уровня стереотипного поведения) и «социальное взаимодействие». Выбор тестов был обусловлен тем, что дофаминовая система мозга участвует в регуляции данных видов поведения [14–15]. Социальная изоляция продолжалась до декаптации животного с последующим выделением на льду структур мозга: гипоталамуса, фронтальной коры и стриатума. Выбор структур был обусловлен тем, что вышеназванные отделы мозга получают дофаминергические проекции [14]. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до дальнейших процедур.

Тесты поведения

Тест «открытое поле» (Open field test) проводили в аппарате, состоящем из круглой арены (40 см в диаметре), окруженной пластиковым бортиком 25 см, с инвертированным освещением (двумя галогенными лампами по 12 Вт, расположенными на 40 см ниже арены) и системой компьютерной регистрации “EthoStudio” (Россия). Мышь помещали около бортика и в течение 5 мин автоматически регистрировали пройденный путь (м) и время (%) пребывания в центре арены (20 см в диаметре) и исследованную площадь арены (%) [28].

В *тесте «закапывание шариков» (Marble burying)* мышей помещали в стандартные клетки OptiMice, в которые предварительно насыпали (и слегка утрамбовывали) чистые опилки подстила глубиной 5 см. Поверх опилок равномерно раскладывали 20 стеклянных шариков (диаметром 1 см). Тест длился 30 мин, во время теста экспериментаторы выходили из комнаты. После тестирования животных возвращали в домашние клетки, затем вручную подсчитывали число закопанных и незакопанных шариков. Шарик считался закопанным, когда более 2/3 его объема было покрыто опилками [29].

Социальное взаимодействие (Social interaction) тестировали в модели «резидент – интродер»: в домашнюю клетку экспериментального самца подсаживали ювенильного (4-недельного) самца линии Balb/c. В течение 10 мин с помощью программы EthoStudio фиксировали продолжительность социальных контактов (обнюхивание головы, тела, груминг) и длительность агрессивных атак по отношению к интродеру [30].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Для выделения общей РНК и ВЭЖХ использовали метод множественного выделения. Для этого структуры гомогенизировали в объеме (гипоталамус, фронтальная кора в 150 мкл, стриатум в 250 мкл) холодного 50 мМ Tris HCl буфера (pH 7.6) на льду, затем аликвоты гомогената использовали для выделения общей РНК (по 100 мкл для гипоталамуса и фронтальной коры и по 200 мкл для стриатума) и ВЭЖХ (50 мкл). Али-

квоту для ВЭЖХ (50 мкл) быстро переносили в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты (HClO_4). В оставшуюся аликвоту (100 мкл или 200 мкл) быстро добавляли TRIzolReagent (“Lifetechnologies”, США), вся процедура занимала меньше минуты.

Методом ВЭЖХ определяли содержание дофамина, DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, 3,4-диоксифенилукусная кислота) и HVA (Homovanillic acid, гомованилиновая кислота) в гипоталамусе, фронтальной коре и стриатуме по протоколу, описанному ранее [31]. После добавления аликвоты гомогената ткани мозга (50 мкл) в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты (HClO_4) пипетировали и центрифугировали 15 мин при 4°C и 14000 об/мин для осаждения белка. Отбирали супернатант и разбавляли водой *miliQ* в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при –20°C для последующего определения белка методом Бредфорда. Для этого осадок растворяли в 1 мл 0.1 М NaOH, концентрацию белка в полученном растворе определяли с помощью реактива Бредфорда в двух повторах для каждого образца. Измерение концентрации белка проводили с помощью спектрофотометра MultiScan GO и программного обеспечения Thermo Scientific SkanIt (Thermo Fisher Inc. США). 20 мкл супернатанта вводили в петлю системы ВЭЖХ, которая состояла из следующих компонентов: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE ИТМ; Antec, Нидерланды), проточный элемент из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), системный контроллер CBM-20A, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.6 мл/мин на колонке C18 (размер частиц 5 мкм, L × ID 75 × 4.6 мм, Luna, Phenomenex, США), защищенной предколонкой C8 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из 87% буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия (Sigma Aldrich, США), 1.4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты (Chimmed, Россия) и 0.05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma Aldrich, США) pH 3.9, и 13% метанола (Chimmed, Россия). Для построения калибровочной кривой внешних стандартов использовали серию растворов, содержащих по 0.5, или 1, или 2 нг дофамина, DOPAC и HVA (Sigma Aldrich, США). Площадь пиков была оценена при помощи программы LabSolution LG/GC (Shimadzu, США) и калибрована на соответствующий внешний стандарт. Концентрации биогенных аминов выражали в нг/мг белка, как было описано ранее [31].

Выделение общей РНК

Общая РНК была выделена с помощью TRIzolReagent (“Lifetechnologies”, США), затем обработана ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о.е./мл) в соответствии с инструкциями производителей. Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре (Nanodrop, США). РНК была разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при –70°C. Отсутствие примесей геномной ДНК в образцах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [32, 33], с использованием праймеров к гену *Tph1*, который не экспрессируется в ЦНС (кроме эпифиза), а также с использованием отрицательного контроля (без обратной транскриптазы). Качество выделенной РНК также определяли по наличию в агарозном геле четких двух полос рибосомальной РНК без «шлейфа».

Реакция обратной транскрипции

Реакцию проводили по протоколу, описанному ранее [31–32]. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана с 8 мкл смеси, содержащей 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ), 5.65 мкл воды, обработанной диэтиллирокарбонатом и 2.25 мкл стерильного 1М KCl, денатурирована при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), затем до-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж.}, ^\circ\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaacctgtcgaatgctctc-3' R 5'-ccagccaaccsacacaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccacttcttgacatacattg-3' R 5'-cccattccacagcctctctaag-3'	65	203
<i>Polr2a</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaattgcgtact-3'	60	194

бавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Биосан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М MnCl₂ (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпиноксикарбонатом. Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41°C в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20°C.

ОТ-ПЦР в реальном времени

Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [32, 33]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании “Биосан” (Новосибирск, Россия) (в Базе данных RefSeq: NM_001291068.1 для *Polr2a*, NM_010076.3 для *Drd1*, NM_010077.3 для *Drd2*). Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (R-402, Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche Applied Science, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95°C, 1 цикл; 10 с при 95°C, 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°C, 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали в отдельных пробирках (одновременно с образцами кДНК) и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – IgP (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480. Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров.

Экспрессия каждого исследуемого гена была представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [32, 33].

Статистический анализ

Результаты представляли как $M \pm SEM$ и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро – Уилка. Достоверными считались различия с $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние длительной социальной изоляции на поведение мышей линий C57Bl/6 в тестах «открытое поле», «закапывание шариков» и социальное поведение в модели «резидент – интродер»

	Контроль	Изоляция	F, p
Открытое поле			
Пройденный путь, м	10.9 ± 0.5	11.7 ± 0.7	$F_{1,18} < 1$
Исследованная площадь арены, %	96.2 ± 1.3	95.6 ± 1.4	$F_{1,18} < 1$
Время в центре, %	13.4 ± 2.5	10.8 ± 1.1	$F_{1,18} = 1.1, p > 0.05$
Социальное поведение			
Длительность социальных контактов, с	49.1 ± 15.9	119.4 ± 29.1	$F_{1,18} = 4.8, p < 0.05$
Длительность агрессивных атак, с	16.1 ± 4.7	18.8 ± 5.6	$F_{1,18} < 1$
Закапывание шариков			
Число закопанных шариков	11.0 ± 0.7	7.7 ± 0.8	$F_{1,18} = 9.4, p < 0.01$

n = 10 в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведенческие результаты

В табл. 2 представлены результаты исследований поведения в тестах «открытое поле», «социальное взаимодействие», «закапывание шариков». В тесте «открытое поле» не было выявлено различий ни по длине пройденного пути, ни по исследованной площади арены, ни по времени, проведенному в центре, между исследуемыми группами мышей ($p > 0.05$). В тесте «социальное взаимодействие» самцы, подвергавшиеся изоляции, демонстрировали большую длительность социальных контактов ($p < 0.05$), но не отличались по продолжительности агрессивных атак ($p > 0.05$) по отношению к интродеру по сравнению с контрольными животными. В тесте «закапывание шариков» уровень стереотипного поведения (определяемого по числу закопанных шариков) снижался у мышей, подвергавшихся изоляции, по сравнению с контролем ($p < 0.01$) (табл. 2).

Метаболизм дофамина в мозге

Длительная социальная изоляция не оказала достоверного влияния на содержание дофамина в гипоталамусе самцов ($F_{1,18} = 1.2, p > 0.05$). При этом была обнаружена тенденция к увеличению уровня нейромедиатора во фронтальной коре ($F_{1,18} = 3.7, p = 0.07$) и стриатуме ($F_{1,17} = 3.8, p = 0.07$) у мышей вследствие действия изоляции (рис. 1а). Одинокое содержание мышей привело к падению уровня ДОРАС в гипоталамусе ($F_{1,18} = 4.4, p < 0.05$), а также к повышению уровней этого метаболита в стриатуме на уровне тенденции ($F_{1,17} = 3.5, p = 0.08$) и фронтальной коре ($F_{1,18} = 5.8, p < 0.05$) по сравнению с контролем (рис. 1б). Не было найдено влияния изоляции на содержание НВА в гипоталамусе ($F_{1,18} = 1.8, p > 0.05$) и фронтальной коре ($F_{1,18} < 1$), однако была обнаружена тенденция к повышению содержания этого метаболита в стриатуме ($F_{1,17} = 3.5, p = 0.08$) мышей, подвергавшихся изоляции, по сравнению с контролем (рис. 1с).

Индекс метаболизма дофамина, определяемый как ДОРАС/дофамин, не отличался у обеих групп для гипоталамуса ($F_{1,18} < 1$), фронтальной коры ($F_{1,18} < 1$) и стри-

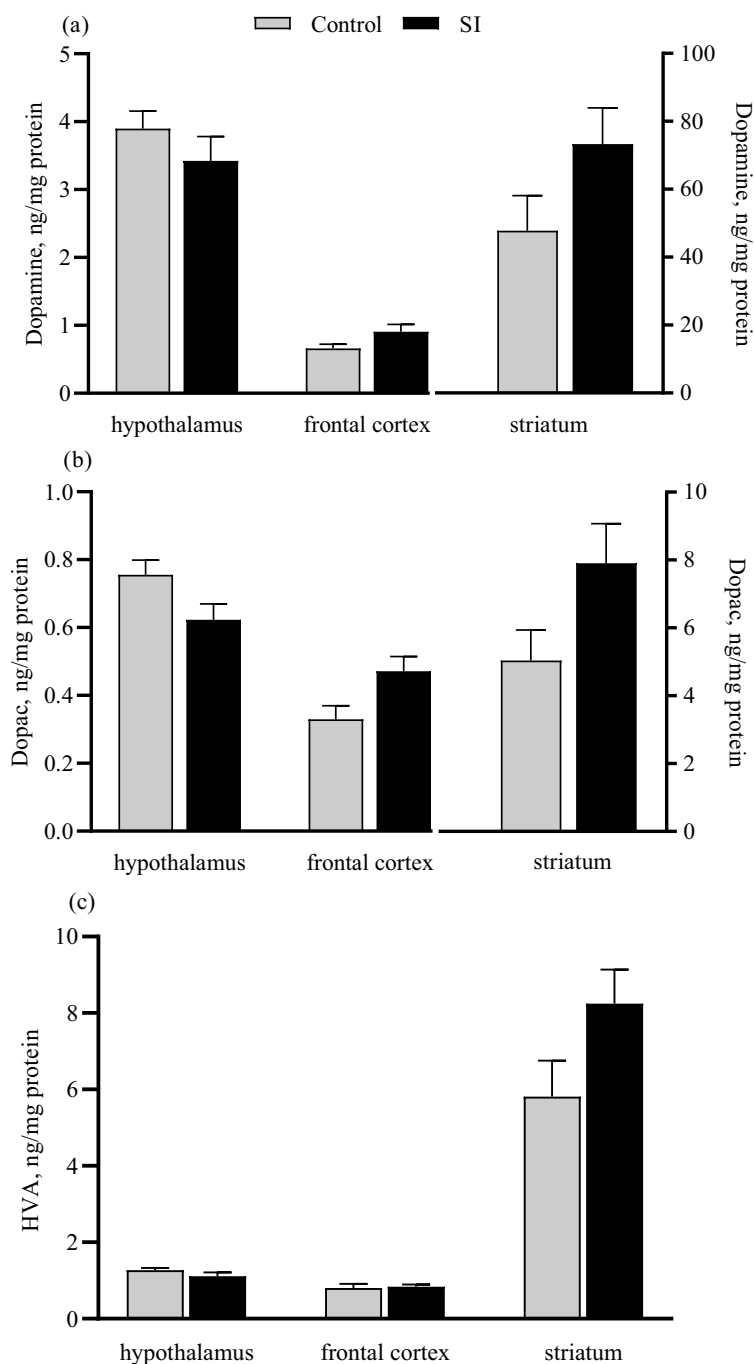


Рис. 1. Влияние длительной социальной изоляции на уровни дофамина (а), его метаболитов DOPAC (б) и HVA (в) в структурах мозга самцов мышей линии C57Bl/6. * $p < 0.05$, число животных в группе составляет 10 мышей.

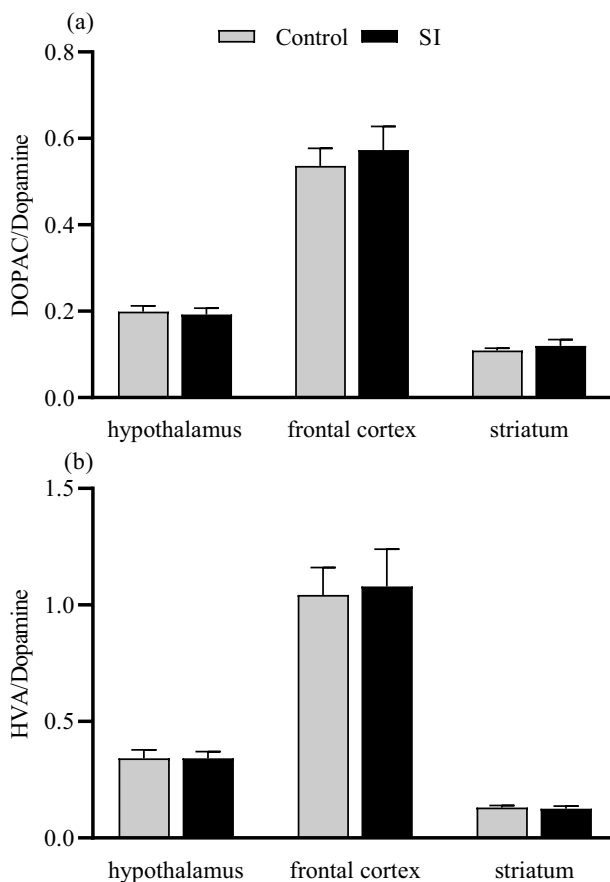


Рис. 2. Влияние длительной социальной изоляции на индексы метаболизма дофамина DOPAC/дофамин (а) и HVA/дофамин (б) для структур мозга у самцов мышей линии C57Bl/6. Число животных в группе составляет 10 мышей.

тума ($F_{1,17} < 1$) (рис. 2а). Также не отличался между группами индекс метаболизма нейромедиатора, определяемый как HVA/дофамин ($F_{1,18} < 1$), для всех изученных структур (рис. 2б).

Экспрессия генов

Исследуемые группы не отличались по уровню мРНК гена *Drd1*, кодирующего рецептор D1, ни в гипоталамусе ($F_{1,18} < 1$), ни во фронтальной коре ($F_{1,18} < 1$) (рис. 3а). Также не было найдено различий по экспрессии гена *Drd2*, кодирующего рецептор D2, в этих отделах мозга ($F_{1,18} < 1$ для обеих структур) (рис. 3б). Однако социальная изоляция привела к росту уровней мРНК генов *Drd1* ($F_{1,18} = 10.9, p < 0.01$) и *Drd2* ($F_{1,18} = 6.6, p < 0.05$) в стриатуме мышей по сравнению с контролем (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью настоящей работы было изучение влияния длительной социальной изоляции на поведение и дофаминовую систему мозга у мышей, причем впервые эффекты

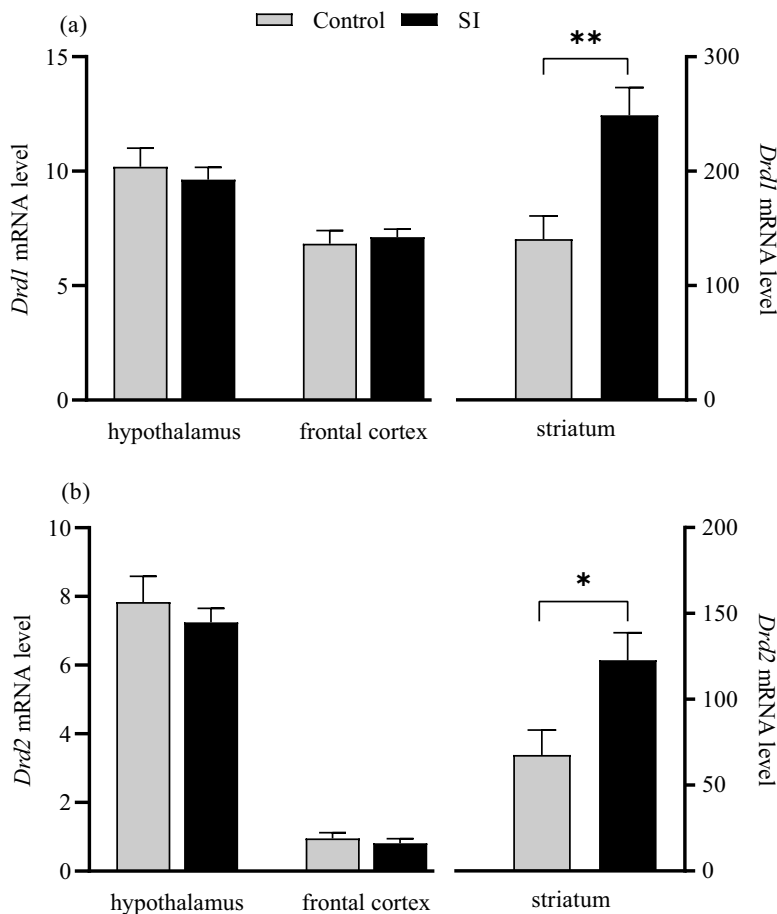


Рис. 3. Влияние длительной социальной изоляции на уровни мРНК генов *Drd1* (a) и *Drd2* (b), кодирующих дофаминовые D1- и D2-рецепторы, в структурах мозга у самцов мышей линии C57Bl/6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, число животных в группе составляет 10 мышей.

изоляция были комплексно оценены и на уровне метаболизма нейромедиатора, и на уровне экспрессии генов ключевых дофаминергических рецепторов.

Большая часть авторов сообщает об анксиогенном действии длительной социальной изоляции у грызунов [9, 34]. Однако результаты зависят и от продолжительности одиночного содержания, и от возраста, в котором животное было подвергнуто изоляции [35, 36]. Кроме этого, такие факторы, как генотип и пол животного, тоже могут иметь важное значение [37–38]. Так, самцы мышей линии Swiss и крысы линии Sprague–Dawley (изоляция которых началась в 21-дневном возрасте) демонстрировали повышенное тревожное поведение, определяемое по снижению времени в центре «открытого поля», по сравнению с животными, содержащимися группой [7, 39]. При этом уровень двигательной активности у Sprague–Dawley крыс снижался [7], а у Swiss мышей, наоборот, увеличивался [39]. Однако в другой работе одиночное содержание с 28-го дня жизни самцов мышей линий C57Bl/6 и DBA/2 в течение семи недель приводило к снижению времени нахождения в центре новой арены только у мышей линии DBA/2. Примечательно, что при этом изоляция оказала анксиолитический эффект в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у животных обеих линий [40].

В нашей работе самцы линии C57Bl/6, подвергавшиеся изоляции в течение шести недель, не отличались от контрольной группы по времени в центре исследованной площади арены в тесте «открытое поле», который является наиболее широко используемым методом исследования параметров двигательной активности и тревожности [41]. Таким образом, в нашем эксперименте одиночное содержание не повлияло на тревожное поведение и исследовательскую активность мышей в этом тесте. Также нужно отметить, что животные обеих групп не различались по длине пройденного пути, поэтому можно заключить, что различия в других показателях поведения не связаны с какими-либо изменениями базовой двигательной активности.

Тест «закапывание шариков» используется у грызунов для оценки уровня тревожности и/или стереотипного поведения [42, 43]. Данные по влиянию длительного одиночного содержания на поведение в этом тесте крайне малочисленны. Было показано, что социальная изоляция, длящаяся несколько недель, приводит к увеличению числа закопанных шариков у крыс линии Wistar, что интерпретируется как повышение тревожности [13, 44], однако другие авторы не подтверждают такого эффекта у мышей линии C57Bl/6 и крыс [11, 12]. Принято считать, что в норме закапывание предметов, не представляющих угрозу, может отражать у грызунов реакцию на новизну [45]. Снижение числа закопанных шариков у мышей, подвергавшихся изоляции в нашем эксперименте, можно было бы объяснить нарушением у них этой реакции. Это предположение согласуется с гипотезой других авторов о том, что социальные стимулы необходимы для модулирования адаптивных реакций на новые ситуации [44].

Хроническая социальная изоляция может влиять у грызунов на поведение в модели «резидент – интродер»: изоляция в раннем постнатальном периоде (post-weaning social isolation) уже давно используется на крысах для моделирования аномального агрессивного поведения [36, 46, 47]. Однако некоторые авторы сообщают, что длительное одиночное содержание (с 21-дневного возраста) самцов крыс Sprague–Dawley [7] и Wistar [4] приводило к снижению социального интереса в модели «резидент – интродер», но не влияло на показатели агрессии. У мышей длительная изоляция может вызывать в парадигме «резидент – интродер» усиление социального интереса [9, 10, 35] и/или агрессивности [5, 9, 34]. Примечательно, что если самцы мышей содержались в индивидуальных клетках начиная с половозрелого возраста, то изоляция не влияла на поведение в этом тесте [35, 48]. В нашем эксперименте мыши линии C57Bl/6, содержащиеся в одиночных клетках, демонстрировали большую длительность социальных контактов, но не отличались по продолжительности агрессивных атак от животных контрольной группы. Таким образом, наши результаты по поведению частично совпадают с работами других авторов.

Нейромедиатор дофамин участвует в регуляции многих видов поведения, в том числе тревожного, социального и стереотипного [14, 15]. Однако данные литературы по влиянию социальной изоляции на эту систему мозга неоднозначны, и стоит отметить, что они практически все получены на крысах разных линий, что затрудняет их интерпретацию.

В нашей работе изоляция мышей привела к повышению содержания дофамина (на уровне тенденции) и его метаболита DOPAC во фронтальной коре, структуре, входящей в мезокортикальный дофаминовый путь, который задействован в регуляции эмоционального поведения, когнитивных функций и реакции на новизну [14, 49]. Этот результат согласуется с другими исследованиями, демонстрирующими увеличение уровня этого нейромедиатора в префронтальной коре крыс вследствие изоляции [19, 20, 50]. Хотя другие авторы не обнаруживают влияния длительного одиночного содержания на метаболизм дофамина во фронтальной коре крыс Wistar [4] или даже сообщают о снижении уровня нейромедиатора в этой структуре крыс линий Sprague–Dawley [51] и FSL [52]. Наши результаты частично подтверждают гипотезу Shirenova и соавт. об усилении по мере пролонгирования социальной изоляции функциональной

активности дофаминовой системы в префронтальной коре [50]. Вероятно, такой эффект может быть обусловлен снижением плотности рецепторов D2 в этой структуре, что было показано на крысах линии Sprague-Dawley [24] и мышах линии C57Bl/6 [5], подвергавшихся длительному одиночному содержанию. Это предположение требует дальнейших исследований в этом направлении.

Что касается содержания дофамина в гипоталамусе, который является частью дофаминового тубероинфундибулярного пути, отвечающего за регуляцию гормональной секреции [14], то данные литературы неоднозначны. С одной стороны, уровень нейромедиатора не изменялся под действием 4-недельной изоляции у крыс линии Wistar [4] и 6-недельной – у мышей линии ddY [54]. Но, с другой стороны, содержание гипоталамического дофамина повышалось у крыс Wistar, подвергавшихся 9-месячному одиночному содержанию [50]. В нашей работе изоляция не изменила содержание дофамина, но привела к падению уровня его метаболита DOPAC в гипоталамусе. Этот результат частично можно объяснить, если рассматривать длительную изоляцию как модель хронического эмоционального стресса, характеризующуюся нарушением эндокринного статуса [6, 53].

Самым ярким эффектом изоляции на дофаминовую систему мозга в нашей работе было повышение уровня мРНК генов рецепторов D1 и D2 в стриатуме, которое сопровождалось тенденцией к увеличению уровней дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA в этой структуре. Полученный результат коррелирует с данными, демонстрирующими повышенную активность рецепторов D2 в стриатуме самцов капюшонных крыс, подвергавшихся 4-недельной изоляции с 20–24-го дня жизни [25]. Авторы этой работы считают, что длительную социальную изоляцию можно рассматривать как модель психоза на животных, поскольку большая часть типичных антипсихотиков нацелена на блокаду рецепторов D2 [25]. В то же время недавние исследования говорят о том, что эффективность антипсихотических препаратов связана также с ингибированием рецепторов D1 в стриатуме [55], что также не противоречит нашим результатам. Примечательно, что внутрибрюшинное введение неселективных агонистов D2-рецепторов приводит (не влияя на двигательную активность) к снижению числа закопанных шариков в одноменном тесте у самцов мышей линии NMRI [56] и линии ICR [57], что согласуется с результатами нашей работы.

В то же время некоторые авторы сообщают о том, что у самцов крыс линии Sprague-Dawley 8-недельное одиночное содержание, начатое на 21-м дне жизни, не влияло на плотность и функциональную эффективность D2-рецепторов в полосатом теле [58], а по некоторым данным, 6-недельная изоляция крыс привела даже к снижению плотности рецепторов D2 в этой структуре [23].

Что касается влияния социальной изоляции на метаболизм дофамина в полосатом теле, то по одним данным, 9-недельная изоляция не оказала эффекта на содержание дофамина и его метаболитов в вентральном стриатуме крыс линии Sprague-Dawley [21], а 4-недельное одиночное содержание не изменило уровень дофамина в дорзальном стриатуме у крыс линии Wistar [4]. Однако, по другим сведениям, 6-недельное одиночное содержание увеличивало высвобождение и захват нейромедиатора в дорзомедиальном стриатуме у крыс линии Long-Evans, что сопровождалось повышением концентрации белка транспортера дофамина в этом отделе мозга [59]. Также на самцах и самках крысах линии Sprague-Dawley было показано повышение концентрации дофамина в стриатуме после 9-недельной изоляции [51], что согласуется с нашими результатами. Эти данные имеют особое значение, поскольку они предполагают возможный механизм повышенной восприимчивости к аддиктивным свойствам психостимуляторов у людей, испытавших тяжелый стресс в раннем возрасте [59].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии хронической изоляции на стереотипное и социальное поведение, что сопровождалось изменениями в дофаминовой системе мозга, наиболее значительным из которых было повышение уровня экспрессии генов рецепторов D1 и D2 в стриатуме.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Д. В. Б., Е. А. К. – концепция и руководство работой; Д. В. Б., С. Н. А., У. С. У., П. Д. К., А.Б.А. – проведение экспериментов; Д. В. Б., С. Н. А., У. С. У. – обработка данных; Д. В. Б., Е. А. К. – написание и редактирование манускрипта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского Научного Фонда (грант № 21-15-00051). Содержание линий мышей осуществлялось за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996 г.) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. №119н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016 г. № 43232). Дизайн эксперимента был одобрен Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 101 от 10.11.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Arakawa H* (2018) Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res* 341: 98–108.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.022>
2. *Brandt L, Liu S, Heim C, Heinz A* (2022) The effects of social isolation stress and discrimination on mental health. *Translational Psychiatry* 12: 398.
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-02178-4>
3. *Nakama N, Usui N, Doi M, Shimada S* (2023) Early life stress impairs brain and mental development during childhood increasing the risk of developing psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 126: 110783.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110783>
4. *Kaneda Y, Kawata A, Suzuki K, Matsunaga D, Yasumatsu M, Ishiwata T* (2021) Comparison of neurotransmitter levels, physiological conditions, and emotional behavior between isolation-housed rats with group-housed rats. *Dev Psychobiol* 63: 452–460.
<https://doi.org/10.1002/dev.22036>
5. *Zhang X, Xun Y, Wang L, Zhang J, Hou W, Ma H, Cai W, Li L, Guo Q, Li Y, Lv Z, Jia R, Tai F, He Z* (2021) Involvement of the dopamine system in the effect of chronic social isolation during adolescence on social behaviors in male C57 mice. *Brain Res* 1765: 147497.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147497>
6. *Grigoryan GA, Pavlova IV, Zaichenko MI* (2022) Effects of Social Isolation on the Development of Anxiety and Depression-Like Behavior in Model Experiments in Animals. *Neurosci Behav Physiol* 52: 722–738.
<https://doi.org/10.1007/s11055-022-01297-1>
7. *Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL* (2009) Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav* 55: 248–256.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.10.014>
8. *Wang HT, Huang FL, Hu ZL, Zhang WJ, Qiao XQ, Huang YQ, Dai RP, Li F, Li CQ* (2017) Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Mincycline. *Neurotox Res* 31: 505–520.
<https://doi.org/10.1007/s12640-016-9696-3>

9. *Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K* (2009) Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res* 202: 114–121.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.028>
10. *Kercmar J, Büdefeld T, Grgurevic N, Tobet SA, Majdic G* (2011) Adolescent social isolation changes social recognition in adult mice. *Behav Brain Res* 216: 647–651.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.007>
11. *Dankoski EC, Agster KL, Fox ME, Moy SS, Wightman RM* (2014) Facilitation of serotonin signaling by SSRIs is attenuated by social isolation. *Neuropsychopharmacology* 39: 2928–2937.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.162>
12. *Kinley BL, Kyne RF, Lawton-Stone TS, Walker DM, Paul MJ* (2021) Long-term consequences of peri-adolescent social isolation on social preference, anxiety-like behaviour, and vasopressin neural circuitry of male and female rats. *Eur J Neurosci* 54: 7790–7804.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15520>
13. *Perić I, Stanislavljević A, Gass P, Filipović D* (2021) Fluoxetine exerts subregion/layer specific effects on parvalbumin/GAD67 protein expression in the dorsal hippocampus of male rats showing social isolation-induced depressive-like behaviour. *Brain Res Bull* 173: 174–183.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021>
14. *Baskerville TA, Douglas AJ* (2010) Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther* 16: e92–e123.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00154.x>
15. *Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR* (2015) Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* 172: 1–23.
<https://doi.org/10.1111/bph.12906>
16. *Villalba RM, Smith Y* (2013) Differential striatal spine pathology in Parkinson's disease and cocaine addiction: a key role of dopamine? *Neuroscience* 251: 2–20.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.011>
17. *Grace AA* (2016) Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci* 17: 524–532.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.57>
18. *Correia R, Coimbra B, Domingues AV, Wezik M, Vieitas-Gaspar N, Gaspar R, Sousa N, Pinto L, Rodrigues AJ, Soares-Cunha C* (2023) Involvement of nucleus accumbens D2-medium spiny neurons projecting to the ventral pallidum in anxiety-like behaviour. *J Psychiatry Neurosci* 48: E267–E284.
<https://doi.org/10.1503/jpn.220111>
19. *Han X, Wang W, Shao F, Li N* (2011) Isolation rearing alters social behaviors and monoamine neurotransmission in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. *Brain Res* 1385: 175–181.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.035>
20. *Trabace L, Zotti M, Colaianna M, Morgese MG, Schiavone S, Tucci P, Harvey BH, Wegener G, Cuomo V* (2012) Neurochemical differences in two rat strains exposed to social isolation rearing. *Acta Neuropsychiatr* 24: 286–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2011.00627.x>
21. *Brenes JC, Fornaguera J* (2009) The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res* 198: 199–205.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.036>
22. *Hall FS* (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12: 129–162.
<https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v12.i1-2.50>
23. *Bean G, Lee T* (1991) Social isolation and cohabitation with haloperidol-treated partners: effect on density of striatal dopamine D2 receptors in the developing rat brain. *Psychiatry Res* 36: 307–317.
[https://doi.org/10.1016/0165-1781\(91\)90029-o](https://doi.org/10.1016/0165-1781(91)90029-o)
24. *Fitzgerald ML, Mackie K, Pickel VM* (2013) The impact of adolescent social isolation on dopamine D2 and cannabinoid CB1 receptors in the adult rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 235: 40–50.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.021>
25. *King MV, Seeman P, Marsden CA, Fone KCF* (2009). Increased dopamine D2 receptors in rats reared in social isolation. *Synapse* 63: 476–483.
<https://doi.org/10.1002/syn.20624>
26. *Archer J* (1969) Contrasting effects of group housing and isolation on subsequent open field exploration in laboratory rats. *Psychon Sci* 14: 234–235.
<https://doi.org/10.3758/BF03332812>

27. *Науменко ЕВ, Попова НК, Старыгин АГ* (1971) Гипофизарно-надпочечниковая система животных в группах и изоляции. Журн общей биол 32: 731–736. [*Naumenko EV, Popova NK, Starygin AG* (1971) Pituitary-adrenal system of animals in groups and isolation. J General Biol 32: 731–736. (In Russ)].
28. *Kulikov AV, Tikhonova MA, Kulikov VA* (2008). Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. J Neurosci Methods 170: 345–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.024>
29. *Deacon RM* (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. Nature Protocols 1: 122–124.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>
30. *Kulikova EA, Bazovkina DV, Antonov YV, Akulov AE, Kulikov AV, Kondaurova EM* (2017) Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy. Neurosci Res 117: 14–21.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.11.009>
31. *Bazovkina D, Naumenko V, Bazhenova E, Kondaurova E* (2021) Effect of Central Administration of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) on Behavior and Brain Monoamine Metabolism in New Recombinant Mouse Lines Differing by 5-HT1A Receptor Functionality. Int J Mol Sci 22: 11987.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111987>
32. *Naumenko VS, Kulikov AV* (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain. Mol Biol (Mosk) 40: 37–44.
<https://doi.org/10.1134/s0026893306010079>
33. *Naumenko VS, Osipova DV, Kostina EV, Kulikov AV* (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. J Neurosci Methods 170: 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>
34. *Du Preez A, Law T, Onorato D, Lim YM, Eiben P, Musaelyan K, Egeland M, Hye A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM, Fernandes C* (2020) The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviours, and associated biological alterations. Transl Psychiatry 10: 325.
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-01000-3>
35. *Lander SS, Linder-Shacham D, Gaisler-Salomon I* (2017) Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. Behav Brain Res 316: 245–254.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.005>
36. *Locci A, Geoffroy P, Miesch M, Mensah-Nyagan AG, Pinna G* (2017) Social Isolation in Early versus Late Adolescent Mice Is Associated with Persistent Behavioral Deficits That Can Be Improved by Neurosteroid-Based Treatment. Front Cell Neurosci 11: 208.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00208>
37. *Liu N, Wang Y, An AY, Banker C, Qian YH, O'Donnell JM* (2020) Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. Eur J Neurosci 52: 2694–2704.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14565>
38. *Oliver DK, Intson K, Sargin D, Power SK, McNabb J, Ramsey AJ, Lambe EK* (2020) Chronic social isolation exerts opposing sex-specific consequences on serotonin neuronal excitability and behaviour. Neuropharmacology 168: 108015.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108015>
39. *Amiri S, Haj-Mirzaian A, Rahimi-Balaei M, Razmi A, Kordjazy N, Shirzadian A, Ejtemaei Mehr S, Sianati H, Dehpour AR* (2015) Co-occurrence of anxiety and depressive-like behaviors following adolescent social isolation in male mice; possible role of nitrenergic system. Physiol Behav 145: 38–44.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.032>
40. *Vöikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H* (2005) Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. Genes Brain Behav 4: 240–252.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00106.x>
41. *Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z* (2019) The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods Mol Biol 1916: 99–103.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
42. *Dixit PV, Sahu R, Mishra DK* (2020) Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. J Pharmacol Toxicol Methods 102: 106676.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106676>
43. *Himanshu, Dharmila, Sarkar D, Nutan* (2020) A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. Clin Psychopharmacol Neurosci 18: 341–351.
<https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.3.341>

44. Zlatković J, Todorović N, Bošković M, Pajović SB, Demajo M, Filipović D (2014) Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol Cell Biochem* 393: 43–57.
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2045-z>
45. Thomas A, Burant A, Bui N, Graham D, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2009) Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 204: 361–373.
<https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>
46. Tulogdi A, Tóth M, Barsvári B, Biró L, Mikics E, Haller J (2014) Effects of resocialization on post-weaning social isolation-induced abnormal aggression and social deficits in rats. *Dev Psychobiol* 56: 49–57.
<https://doi.org/10.1002/dev.21090>
47. Biro L, Toth M, Sipos E, Bruzsik B, Tulogdi A, Bendahan S, Sandi C, Haller J (2017) Structural and functional alterations in the prefrontal cortex after post-weaning social isolation: relationship with species-typical and deviant aggression. *Brain Struct Funct* 222: 1861–1875.
<https://doi.org/10.1007/s00429-016-1312-z>
48. Ma YK, Zeng PY, Chu YH, Lee CL, Cheng CC, Chen CH, Su YS, Lin KT, Kuo TH (2022) Lack of social touch alters anxiety-like and social behaviors in male mice. *Stress* 25: 134–144.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2022.2047174>
49. Weele CMV, Siciliano CA, Tye KM (2019) Dopamine tunes prefrontal outputs to orchestrate aversive processing. *Brain Res* 1713: 16–31.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.044>
50. Shirenova SD, Khlebnikova NN, Narkevich VB, Kudrin VS, Krupina NA (2023) Nine-month-long Social Isolation Changes the Levels of Monoamines in the Brain Structures of Rats: A Comparative Study of Neurochemistry and Behavior. *Neurochem Res* 48: 1755–1774.
<https://doi.org/10.1007/s11064-023-03858-3>
51. Ko C-Y, Liu Y-P (2016) Disruptions of sensorimotor gating, cytokines, glycemia, monoamines, and genes in both sexes of rats reared in social isolation can be ameliorated by oral chronic quetiapine administration. *Brain Behav Immun* 51: 119–130.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.003>
52. Mncube K, Möller M, Harvey BH (2021) Post-weaning social isolated flinders sensitive line rats display bio-behavioural manifestations resistant to fluoxetine: a model of treatment-resistant depression. *Front Psychiatry* 12: 688150.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.688150>
53. Algamal M, Pearson AJ, Hahn-Townsend C, Burca I, Mullan M, Crawford F, Ojo JO (2021) Repeated unpredictable stress and social isolation induce chronic HPA axis dysfunction and persistent abnormal fear memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 104: 110035.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110035>
54. Watanabe T, Iba H, Moriyama H, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K (2021) Sansoninto attenuates aggressive behavior and increases levels of homovanillic acid, a dopamine metabolite, in social isolation-reared mice. *J Tradit Complement Med* 12: 243–249.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2021.08.006>
55. Yun S, Yang B, Anair JD, Martin MM, Fleps SW, Pamukcu A, Yeh NH, Contractor A, Kennedy A, Parker JG (2023) Antipsychotic drug efficacy correlates with the modulation of D1 rather than D2 receptor-expressing striatal projection neurons. *Nat Neurosci* 26: 1417–1428.
<https://doi.org/10.1038/s41593-023-01390-9>
56. Bruins Slot LA, Bardin L, Auclair AL, Depoortere R, Newman-Tancredi A (2008) Effects of antipsychotics and reference monoaminergic ligands on marble burying behavior in mice. *Behav Pharmacol* 19: 145–152.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282f62cb2>
57. Egashira N, Kubota N, Goto Y, Watanabe T, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K (2018) The antipsychotic trifluoperazine reduces marble-burying behavior in mice via D2 and 5-HT2A receptors: Implications for obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 165: 9–13.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.006>
58. Del Arco A, Zhu S, Terasmaa A, Mohammed AH, Fuxe K (2004) Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 171: 148–155.
<https://doi.org/10.1007/s00213-003-1578-8>
59. Yorgason JT, Calipari ES, Ferris MJ, Karkhanis AN, Fordahl SC, Weiner JL, Jones SR (2016) Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology* 101: 471–479.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.025>

Influence of Long-Term Social Isolation on the Behavior and Dopamine System of the Brain in Mice

**D. V. Bazovkina^{a,*}, U. S. Ustinova^b, S. N. Adonina^a, P. D. Komleva^a, A. B. Arefieva^a,
and E. A. Kulikova^a**

^aInstitute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

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

The dopamine brain system is involved in the regulation of various physiological processes and behavioral responses, including social behavior. It was shown in rodents that prolonged social isolation can lead to changes in behavioral parameters and neurochemical parameters, but these data remain unclear. In this work, we studied the effects of prolonged social isolation on the behavior and state of the brain dopamine system in male C57Bl/6 mice. Animals of the experimental group from the age of 40 - 42 days were kept individually in separate cages for six weeks, while the mice of the control group were kept in-group conditions. Isolation did not affect locomotor and exploratory activity in the "open field" test compared to the content in the group. At the same time, animals subjected to prolonged isolation demonstrated a longer duration of social contacts in the "resident-intruder" model and a weakening of stereotypical behavior in the "marbles burying" test compared to the control group. These behavioral changes were accompanied by an increase in mRNA levels of the genes encoding dopamine D1 and D2 receptors in the striatum of mice. In addition, the level of the dopamine metabolite DOPAC decreased in the hypothalamus and increased in the frontal cortex of mice due to the effect of social isolation compared with the control group. The results contribute to the understanding of the effects of prolonged social isolation on the behavior and dopamine brain system in mice.

Keywords: social isolation, behavior, dopamine, dopamine receptor, gene expression, brain, mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА ФОСФОЛИПИДОВ
НА ФОРМИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ C57BL/6J**

© 2024 г. Л. В. Болдырева¹, М. В. Морозова¹, К. С. Павлов¹, Е. Н. Кожевникова^{1,*}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины,
Новосибирск, Россия

*E-mail: kozhevnikovaen@neuronm.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Препараты на основе фосфолипидов широко используются в качестве гепатопротекторных, нейропротекторных и антистрессовых лекарств, а также в составе биологически активных добавок. Кроме этого, лецитин, содержащий в своем составе до 70% смеси фосфолипидов – фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и фосфатидной кислоты, повсеместно применяется в пищевом производстве в качестве эмульгатора. Дозы этих биологически активных веществ в диете современного человека могут быть очень высоки. Ранее мы показали, что хроническое воспаление кишки у мышей с мутацией в гене *Muc2* приводит к нарушению поведения одновременно с существенным повышением содержания ряда форм фосфолипидов в клетках эпителия кишечника: фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты. В данной работе мы исследовали эффекты длительного приема смеси этих фосфолипидов, а также эффекты длительного приема соевого лецитина на формирование поведенческих паттернов у мышей. Животные, длительно принимавшие смесь фосфолипидов, не демонстрировали естественного предпочтения по отношению к самке в тесте с двумя интродерами (самкой и самцом). В тесте на социальные запахи они также не различали запахи самки и самца, в то время как дискриминация несоциальных запахов сохранилась. Кроме того, мы выявили снижение признаков компульсивности и тревожности при этом и отдельные черты шизофреноподобного поведения у таких животных. Прием соевого лецитина оказал схожее влияние на социальное поведение и компульсивные черты и вызвал повышение агрессии у самцов. Таким образом, долговременный перинатальный прием как смеси фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты), так и соевого лецитина способен оказывать влияние на различные аспекты поведения у мышей.

Ключевые слова: поведение; фосфатидилхолин; фосфатидилсерин; фосфатидная кислота; соевый лецитин; лабораторная мышь C57BL/6J

DOI: 10.31857/S0869813924020082, **EDN:** DJAGXG

ВВЕДЕНИЕ

Основной функцией желудочно-кишечного тракта является пищеварение и метаболизм питательных веществ. При этом ряд пищевых компонентов действует как регуляторы клеточной сигнализации и метаболизма и может оказывать существенное

влияние на физиологию организма [1, 2]. Один из важнейших для всего организма процессов – поглощение из пищи и оборот липидов – основного строительного материала клеточных мембран и источника энергии, регуляторов передачи гормонов и сигналов [3–5]. Некоторые липиды метаболизируются непосредственно в кишечнике, а другие упаковываются в хиломикроны и транспортируются лимфой и кровью в органы и периферические ткани [4]. Центральная нервная система (ЦНС) богата липидами, на долю которых приходится примерно 50% сухой массы мозга. Различные классы фосфолипидов (ФЛ) выполняют множественные биологические функции в ЦНС [6, 7]. Хорошо известно значение мембранных ФЛ для нейродегенеративных и ишемических заболеваний мозга. Сфинголипиды, глицерофосфолипиды и холестерин участвуют в передаче клеточных сигналов, формировании миелина и липидных «плотов», энергетическом балансе, формировании гематоэнцефалического барьера и воспалительных реакциях [8–10]. Нарушение метаболизма липидов в ЦНС выявлено ассоциировано с широким спектром нейродегенеративных заболеваний [11]. Растущее число выявленных генов, участвующих в липидном обмене, указывает на роль липидов в развитии болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний [6, 12]. Например, аллель гена аполипопротеина эpsilon-4 является наиболее распространенным генетическим фактором риска развития болезни Альцгеймера и важен для транспортировки холестерина в мозг [13]. Липидомный анализ клеток спинного мозга у крыс, мутантных по гену SOD1-G93A (модели бокового амиотрофического склероза), выявил снижение содержания кардиолипина, что может отражать потерю митохондриальной функциональности [14]. Лимфоидные клетки пациентов с болезнью Хантингтона демонстрируют большие митохондриальные агрегаты, гиперполяризацию митохондриальной мембраны и изменения в механизме деления/слияния, связанные с изменением уровня церамидов в митохондриях [15]. Безусловна важность ФЛ не только в качестве главного компонента клеточных мембран и транспортных молекул, но и, кроме этого, – в качестве предшественников и субстрата для широкого ряда биологически активных молекул. ФЛ выполняют целый спектр молекулярных и клеточных функций, и изменение их метаболизма коррелирует с заболеваниями и течением хронических воспалительных процессов [16, 17].

Ранее мы получили данные, которые показывают, что хроническое воспаление кишечника у мышей с мутацией в гене *Muc2*, с одной стороны, приводит к существенному изменению поведенческих характеристик животных и, с другой стороны, к изменению метаболомного профиля крови и мозга [18, 19]. В частности, мы выявили, что у таких животных нарушения социального поведения сопровождаются значительным повышением уровня ряда форм ФЛ в клетках эпителия кишечника, в наибольшей степени – фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты. Животные с нокаутом гена *Muc2* показали существенное увеличение общей активности, снижение тревожности и ряд других поведенческих изменений [19, 20]. Поскольку метаболизм липидов критически важен для функционирования мозга, а сами липидные молекулы способны преодолевать кишечный и гематоэнцефалический барьер [16, 21, 22], мы проверили вклад повышения ФЛ в кишечнике на упомянутые выше поведенческие реакции мышей. Таким образом, данная работа посвящена исследованию влияния приема ФЛ – фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты и фосфатидилхолина и ФЛ растительного происхождения – соевого лецитина на социальное поведение у мышей дикого типа. Кроме того, мы исследовали влияние ФЛ на ряд других поведенческих характеристик, для которых ранее были выявлены достоверные изменения у животных с нокаутом гена *Muc2* [19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В исследовании использовали линии мышей C57BL/6JNskrc (локальная субколлония C57BL/6J) и BALB/cNskrc (локальная субко-

лония BALB/c). Животных содержали в однополых группах по 3–5 особей в клетках размером 37 x 21 x 15 см (длина × ширина × высота) с подстилом из древесной стружки в конвенциональном виварии НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск. Световой режим 12 ч день : 12 ч ночь при 20–22°C, при свободном доступе к стандартному полнорационному сухому гранулированному корму для лабораторных грызунов и очищенной воде. Критерии исключения животных из эксперимента: потеря массы тела более 20% от нормы; органические нарушения функции ЦНС, алопеции, бесплодие, абсцессы, травмы у животных.

Диета. Перинатальное кормление мышей линии C57BL/6J: беременные самки со второй недели беременности в равномерной смеси со стандартным кормом получали смесь ФЛ (80% фосфатидилхолина (Solgar, США), 10% фосфатидилсерина (4+NUTRITION, Италия), 10% фосфатидной кислоты (4+NUTRITION, Италия)) либо соевый лецитин (Solgar, США), из расчета 35 г на 1 кг корма. Потомство продолжало получать корм с теми же дозами веществ вплоть до поведенческого тестирования. Кратковременное кормление ФЛ мышей линии C57BL/6J: самцы получали смесь ФЛ либо соевый лецитин с кормом в течение двух недель до тестирования.

Тестирование поведения. Было сформировано по две экспериментальные группы животных: половозрелые самцы линии C57Bl/6 (группа «контроль», $n = 10$), половозрелые самцы линии C57Bl/6, длительно перинатально получавшие смесь ФЛ либо соевый лецитин с кормом (группа «фосфолипиды перинатально», $n = 10$ и «лецитин перинатально», $n = 10$ соответственно), промежуток между различными поведенческими тестами составлял три дня. Между тестированиями каждой мыши арену установок очищали 70%-ным раствором этанола для удаления запахов.

Тест открытое поле. Тест используют для комплексной оценки двигательной, исследовательской активности и тревожности животных. Для теста использовали квадратную пластиковую установку 40 x 40 см с прозрачными стенками и непрозрачным дном. За центр поля был принят квадрат 20 x 20 см. Тестирование проводили в темное (для животных) время суток при красном освещении на протяжении 6 мин. Мышь помещали в центр поля, затем измеряли пройденный путь, количество стоек, время, проведенное в центре поля. Все параметры фиксировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения Ethovision XT10 (Noldus International Technology). Число дефекаций и время груминга учитывали визуально.

Тест «темно-светлая камера». Тест используют для оценки исследовательской активности и тревожности животных. Прямоугольная установка (42 x 21 x 25 см) состоит из двух отсеков, разделенных перегородкой с отверстием 3 x 4 см. Темный отсек составлял 1/3 часть установки, мышь сажали в темный отсек мордой в противоположную сторону от отверстия, соединяющего отсеки, затем на протяжении 5 мин фиксировали видеокамерой, расположенной сверху, время первого выхода из темного отсека, продолжительность нахождения в светлом отсеке, пройденный в светлом отсеке путь. Все параметры фиксировались и обрабатывались с помощью программного обеспечения Ethovision XT10 (Noldus Information).

Тест закапывания шариков. Тест используют для оценки обсессивно-компульсивного поведения животных. Данный тест проводили в чистых пластиковых клетках для животных (37 × 21 × 15 см) при красном освещении. На дно клеток насыпали опилки (4 см), на которые равномерно раскладывали 20 стеклянных шариков ($d = 1.0$ см). Каждую мышь помещали в клетку на 30 мин. Затем мышью убирали из клеток и считали число шариков, закрытых опилками более чем на 70%. Увеличение числа закопанных шариков свидетельствует о признаках обсессивно-компульсивного поведения.

Тест акустической стартл-реакции (acoustic startle reflex), престаимпульного торможения (PPI) и привыкания (габитуация). Тест используют для оценки престаимпульного торможения (PPI) у животных и степени привыкания (габитуации) к акустическим стимулам [23]. Снижение престаимпульного торможения (PPI) свидетельствует о ши-

зофреноподобных чертах поведения [24, 25]. Нарушение привыкания (габитуации) к акустическим стимулам также является отклонением от нормы и может отражать шизофреноподобное поведение [24, 26]. Тестирование проводили в аппарате SR-Pilot (San Diego Instruments), регистрация и обработка велась автоматически прилагаемой к прибору компьютерной программой. Тест состоял из 5 блоков, всего 64 испытания согласно методике, использованной нами ранее [19]:

Блок 1. Адаптация: 5 мин при уровне фонового шума (65 дБ).

Блок 2. Испытания 1–6: шесть звуковых сигналов (120 дБ, 40 мс каждый).

Блок 3. Испытания 7–32: из них 26 испытаний с одним стимулом (120 дБ), остальные – сочетание престимул (69, 73 или 81 дБ, 20 мс) + через 100 мс стимул (120 дБ, 40 мс) и испытания NOSTIM (фиксация базового движения животного без стимула в псевдослучайном порядке).

Блок 4. Испытания 33–58: из них 26 испытаний с одним стимулом (120 дБ), остальные – сочетание престимул (PP69, PP73 или PP81 дБ, 20мс) + через 100 мс стимул (120 дБ, 40 мс) и испытания NOSTIM в псевдослучайном порядке.

Блок 5. Испытания 58–64: шесть одиночных стимулов (120 дБ, 40 мс).

Интервалы между испытаниями длились 15 с. PP69 представлял собой престимул 69 дБ + стимул 120 дБ, PP73 – престимул 73 дБ + стимул 120 дБ, PP81 – престимул 81 дБ + стимул 120 дБ.

Среднее значение вздрагивания на одиночный звуковой сигнал в блоках 3 и 4 использовали для расчета рефлекса вздрагивания, разница между средними значениями вздрагивания на одиночный звуковой сигнал в блоках 2 и 5 использовалась для расчета привыкания, а разница между средними значениями вздрагивания на одиночный звуковой сигнал и вздрагивания на сочетание престимул + стимул в блоках 3 и 4 использовались для расчета PPI для каждого значения престимула. Привыкание (габитуацию) рассчитывали как разницу среднего значения вздрагивания на одиночный стимул (блок № 2) и среднего значения вздрагивания на одиночный стимул (блок № 5) в процентах от среднего значения вздрагивания на одиночный стимул (блок № 2).

Рефлекс вздрагивания (P) рассчитывают как средний (только одиночный стимул в блоках №№ 3 и 4), выраженный в условных единицах.

Престимульное торможение (PPI) рассчитывают как [среднее значение вздрагивания на одиночный стимул (P) – среднее значение вздрагивания на престимул + стимул]/среднее значение вздрагивания на одиночный стимул (P), в %.

Привыкание (габитуацию) рассчитывают, как [среднее значение вздрагивания на одиночный стимул (блок № 2) – среднее значение вздрагивания на одиночный стимул (блок № 5)]/среднее значение вздрагивания на одиночный стимул (блок № 2), в %.

Тест на социальное предпочтение (тест с двумя интродерами: самцом и самкой). Тест используют для оценки социального интереса и времени взаимодействия с самцом и самкой (обнюхивание), полового предпочтения (садки) и агрессии (атаки). За 4 дня до теста самцов, получивших половой опыт, рассаживали в индивидуальные клетки. В качестве интродеров использовали самок и самцов линии BALB/c [27–29]. За день до теста половозрелых самок-интродеров линии BALB/c помечали безопасным красителем в районе холки либо хвоста. Для выполнения тестирования в домашнюю клетку к тестируемому самцу помещали одновременно самку и самца интродеров, затем предоставляли животным свободно взаимодействовать в течение 15 мин. В течение этого времени вели видеозапись и подсчитывали длительность преследования и обнюхивания (социальный контакт), садки (половое предпочтение) и атаки (агрессия) тестируемого самца в отношении самки и самца интродеров.

Тест с социальными запахами. Тест используют для оценки способности животных различать социальные запахи (самца и самки) и полового предпочтения без контакта. Для оценки обонятельного предпочтения тестируемому самцу, предварительно получившему половой опыт, так как известно, что наличие полового опыта способствует

проявлению половой мотивации у самцов [30, 31], в домашней клетке предъявляли образцы грязного подстила от самок и самцов линии BALB/c, помещенные в два сетчатых металлических контейнера (сита для чая Ikea, арт. № 469.568.00). Самец исследовал образцы в течение 5 мин, за это время подсчитывали время обнюхивания образцов грязного подстила от самок и самцов. Результат выражен как (время обнюхивания подстила от самки или самца)/(общее время обнюхивания) в процентах.

Тест на предпочтение запаха. Тест используют для оценки способности животных различать запахи. За 10–12 ч до тестирования животных помещали в индивидуальные чистые клетки без корма, с питьевой водой. Перед тестированием животных взвешивали, чтобы удостовериться в отсутствии потери массы тела более 20%. Затем животным предъявляли помещенные в два сетчатых металлических контейнера корм и чистые бусины без запаха, размером и текстурой имитирующие корм. Мыши исследовали контейнеры в течение 5 мин, за это время подсчитывали время обнюхивания корма и бусин. Результат выражался как (время обнюхивания корма или бусин)/(общее время обнюхивания) в процентах.

Статистический анализ. Данные представлены графически как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистический анализ данных проводили в программе STATISTICA 12.0 (StatSoft TIBCO Software). Характер распределения выборки определяли с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Для проверки равенства дисперсий выборок использовали критерий Фишера. Для сравнения нормально распределенных выборок использовали критерий Стьюдента либо применяли двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим тестом Тьюки HSD. Для сравнения выборок с распределением, отличным от нормального, использовали тест Краскела – Уоллиса с последующим сравнением с помощью U-теста Манна – Уитни – Уилкоксона либо теста Уилкоксона с поправкой на множественность Бонферрони. Уровень значимости был принят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние длительного приема ФЛ на поведенческие характеристики мышей

Для того чтобы оценить двигательную и исследовательскую активность и признаки тревожности животных, длительно получавших смесь ФЛ по сравнению с контрольной группой, выполнили тесты Открытое поле и Темно-светлая камера. Животные, получавшие смесь ФЛ, прошли достоверно большее расстояние в светлом отсеке темно-светлой камеры ($t = 8.7, p = 0.007$) (рис. 1a), чем контрольные животные, что говорит о более низком уровне тревожности. При этом опытные животные проявляли в целом достоверно более высокую двигательную активность в тесте Открытое поле ($t = 2.9, p = 0.031$) (рис. 1b). В количестве стоек и времени, проведенном в центре открытого поля, различий между животными, длительно принимавшими ФЛ, и контрольными мы не обнаружили. Эти наблюдения позволяют сделать вывод о снижении тревожности при повышении двигательной и исследовательской активности животных, длительно принимавших ФЛ.

Мы использовали тест на закапывание шариков для оценки склонности животных к повторяющимся действиям, что считается отражением степени компульсивности [32]. Группа животных, длительно принимавших ФЛ, закопала достоверно меньше шариков по сравнению с контрольной группой ($U = 17.1, p = 0.03$) (рис. 1c).

В тесте акустической стартл-реакции и привыкания (габитуации) мыши, длительно принимавшие ФЛ, продемонстрировали значительно сниженную габитуацию ($U = 13.2, p = 0.006$) (рис. 1d) при сохранении нормальной реакции вздрагивания и престаимпульного ингибирования. Такое отклонение может свидетельствовать о наличии отдельных шизофреноподобных черт либо признаках аутично-подобного поведения [24, 26, 33].

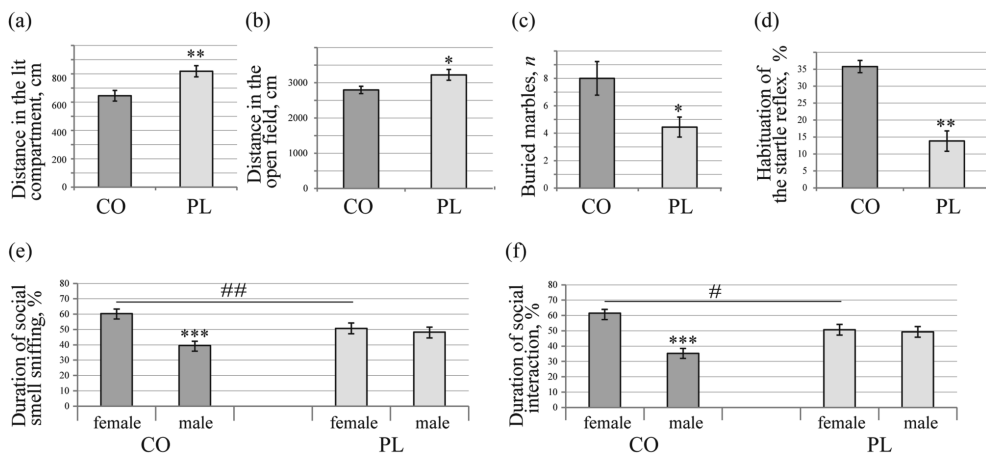


Рис. 1. Поведенческие характеристики животных, длительно принимавших смесь ФЛ (фосфатидилсерина, фосфатидноуксусной кислоты и фосфатидилхолина). (а) – Увеличение пути в светлом отсеке в тесте Темно-светлая камера; (б) – увеличение общего пройденного пути в открытом поле в тесте Открытое поле; (с) – снижение числа закопанных шариков в тесте закапывания шариков; (д) – снижение габитуации в тесте акустической стартл-реакции; (е) – нарушение предпочтения в тесте на предпочтение социальных запахов; (ф) – нарушения социального и полового предпочтения в тесте с двумя интродуцерами. СО – контрольные животные C57BL/6J, PL – животные, длительно принимавшие смесь ФЛ. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n = 10$ для каждой группы, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Чтобы исследовать социальное поведение животных, мы провели тест на предпочтение социальных запахов и тест с двумя интродуцерами (самкой и самцом), характеризующие половое и социальное предпочтение в поведении животных. В обоих тестах животные, длительно принимавшие ФЛ, проявили существенные отклонения в социальном и половом предпочтении. В тесте на предпочтение социальных запахов двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверный эффект взаимодействия факторов «пол» и «фосфолипиды» ($F_{(1,36)} = 24.9, p < 0.001$, ANOVA) и достоверный эффект фактора «пол» ($F_{(1,36)} = 47.4, p < 0.001$, ANOVA) (рис. 1е). Самцы контрольной группы достоверно предпочитали запах самки ($p < 0.001$, Тьюки HSD). И в то же время самцы, длительно принимавшие ФЛ, достоверно меньше предпочитали запах самки, чем самцы контрольной группы ($p = 0.006$, Тьюки HSD). Самцы, длительно принимавшие ФЛ, не проявили достоверных различий в предпочтении запахов самки либо самца (рис. 1е).

В тесте с двумя интродуцерами (самкой и самцом) двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверный эффект взаимодействия факторов «пол интродуцера» и «фосфолипиды» ($F_{(1,36)} = 18.4, p < 0.001$, ANOVA) и достоверный эффект фактора «пол интродуцера» ($F_{(1,36)} = 24.3, p < 0.001$, ANOVA) (рис. 1ф). Самцы контрольной группы достоверно предпочитали взаимодействовать с самкой ($p < 0.001$, Тьюки HSD). В то же время самцы, длительно принимавшие ФЛ, достоверно меньше предпочитали самку, чем самцы контрольной группы ($p = 0.03$, Тьюки HSD). Самцы, длительно принимавшие ФЛ, не проявили достоверных различий в предпочтении самки и самца (рис. 1ф).

Влияние длительного приема соевого лецитина на поведенческие характеристики мышей

В тесте Открытое поле животные, длительно получавшие соевый лецитин, не обнаружили существенных отличий от контрольной группы животных ни по площади

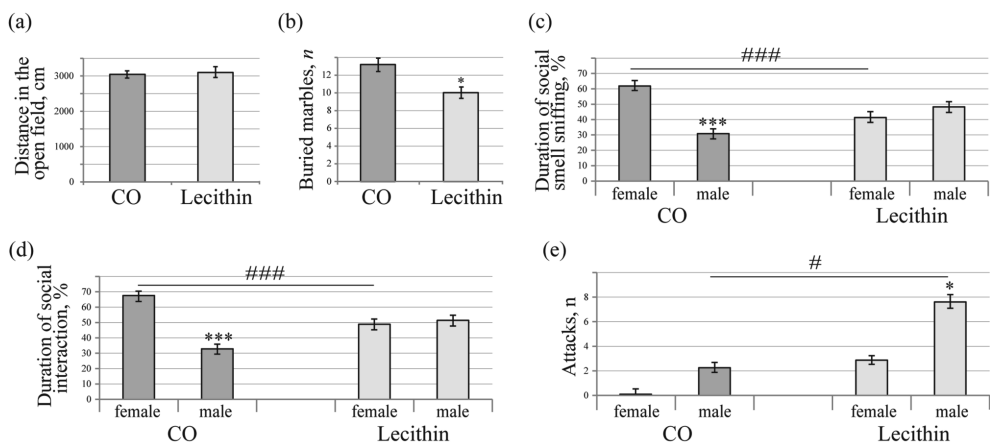


Рис. 2. Поведенческие характеристики мышей после длительного приема лецитина. (а) – общий пройденный путь в открытом поле в тесте Открытое поле; (б) – снижение числа закопанных шариков в тесте закапывания шариков; (с) – нарушение предпочтения в тесте на предпочтение социальных запахов; (д) – нарушения социального и полового предпочтения в тесте с двумя интродуерами; (е) – повышение агрессии по отношению к самцам-интродуерам. CO – контрольные животные C57BL/6J, Lecithin – животные, длительно принимавшие соевый лецитин. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n = 10$ для каждой группы, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

исследованной арены и количеству стоек, которые отражают исследовательскую активность, ни в продолжительности нахождения в центре поля либо на периферии, что говорит об отсутствии изменения тревожности (данные не представлены). Пройденный путь также не различался между группами ($t = 0.2$, $p = 0.66$) (рис. 2а). Таким образом, длительный перинатальный прием соевого лецитина не сказался на стереотипном поведении и тревожности мышей.

В тесте на закапывание шариков животные, длительно принимавших соевый лецитин, закопала достоверно меньше шариков по сравнению с контрольной группой ($U = 17.5$, $p = 0.03$) (рис. 2б).

В тестах на социальное и половое предпочтение животные, длительно принимавшие соевый лецитин, продемонстрировали существенные отклонения в социальном и половом предпочтении. Дисперсионный анализ показал достоверный эффект взаимодействия факторов «пол» и «лецитин» ($F_{(1,36)} = 89.5$, $p < 0.001$, ANOVA) и достоверный эффект фактора «пол» ($F_{(1,36)} = 46.7$, $p < 0.001$, ANOVA) в тесте на распознавание социально значимых запахов. Тестируемые самцы, принимавшие лецитин, не проявляли естественного социального и полового предпочтения в пользу самки, в отличие от контрольной группы (рис. 2с, д). Самцы контрольной группы достоверно предпочитали запах самки по сравнению с запахом самца ($p < 0.001$, Тьюки HSD). В то же время самцы, длительно принимавшие соевый лецитин, достоверно меньше предпочитали запах самки, чем самцы контрольной группы ($p < 0.001$, Тьюки HSD). Самцы, длительно принимавшие соевый лецитин, не проявили достоверных различий в предпочтении запахов самки и самца (рис. 2с). При этом самцы, длительно принимавшие лецитин, сохраняли нормальную дискриминацию несоциальных запахов. Дисперсионный анализ показал достоверный эффект взаимодействия фактора «корм» ($F_{(1,36)} = 1790.7$, $p < 0.001$, ANOVA) в тесте на предпочтение запаха корма. В тесте на предпочтение запаха такие животные достоверно предпочитали обнюхивать корм ($p < 0.001$, Тьюки HSD), так же как и животные контрольной группы ($p < 0.001$, Тьюки HSD).

В тесте с двумя интродуерами (самкой и самцом) двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверный эффект взаимодействия факторов «пол интродуера» и «ле-

цитин» ($F_{(1,36)} = 60.5, p < 0.001, ANOVA$), достоверный эффект фактора «пол интродера» ($F_{(1,36)} = 51.3, p < 0.001, ANOVA$) (рис. 2d). Самцы контрольной группы достоверно предпочитали взаимодействовать с самкой ($p < 0.001$, Тьюки HSD). В то же время самцы, длительно принимавшие соевый лецитин, достоверно меньше предпочитали самку, чем самцы контрольной группы ($p < 0.001$, Тьюки HSD). Самцы, длительно принимавшие соевый лецитин, не проявили достоверных различий в предпочтении самки и самца (рис. 2с, d). Кроме этого, тестируемые самцы, принимавшие лецитин, совершили достоверно большее число актов агрессии в отношении самцов-интродеров в сравнении с самками-интродерами ($U = 2.5, p = 0.04$, критерий Уилкоксона для зависимых выборок с поправкой Бонферрони) и достоверно большее число актов агрессии в отношении самцов-интродеров, чем самцы контрольной группы ($U = 16.5, p = 0.04$, критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони) (рис. 2е).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что долговременный перинатальный прием как смеси фосфолипидов, так и соевого лецитина приводит к формированию ряда поведенческих отклонений у лабораторных мышей C57BL/6J. Так, у животных, длительно получавших смесь фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и фосфатидной кислоты), наблюдалось достоверное снижение естественного предпочтения по отношению к самке в тесте с двумя интродерами (самкой и самцом) и в тесте на социальные запахи при сохранении способности различать запахи в тесте на несоциальные запахи. Кроме того, мы наблюдали снижение тревожности, признаков компульсивности и привыкания к акустическому стимулу у этих животных. Прием соевого лецитина оказал схожее влияние на социальное поведение и компульсивные черты, и, кроме того, вызвал повышение агрессии у самцов по отношению к самцам-интродерам в социальном тесте.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на большой интерес к теме оси «кишечник – мозг» (gut-brain axis) и широкий фронт исследовательских работ, активно продвигающихся в этом направлении, эта сложная взаимосвязь еще во многом остается непонятой. Влияние питательных веществ, присутствующих в диете, на психоэмоциональное состояние стало остроактуальной тематикой в последнее десятилетие. Целый ряд работ на пациентах и животных моделях указывает на гораздо больший спектр и значимость такого влияния, чем полагали ранее [34, 35].

В данном исследовании мы показали, что длительный прием здоровыми мышами смеси ФЛ либо соевого лецитина в тех дозах, которые могут быть достигнуты в диете современного человека (с учетом БАД и профилактических лекарственных препаратов), способен оказывать существенное влияние на поведенческие черты – тревожность, обсессивно-компульсивные и шизофреноподобные черты, исследовательскую и двигательную активность, а также социальное взаимодействие. Полученные данные полностью согласуются с результатами, опубликованными нами ранее на мышах с мутацией гена *Muc2* [19]. Добавление ФЛ в корм мышей воспроизвело значительную долю поведенческих особенностей мышей с генетически детерминированным хроническим воспалением кишечника. Таким образом, повышение уровня ФЛ может опосредовать поведенческие изменения, характерные для мутантных животных, и позволяет предположить возможные механизмы взаимодействий в оси «кишечник – мозг» [19, 36].

Мы предполагаем, что возможный путь влияния ФЛ на поведение – метаболический. После предоставления ФЛ в диету происходит поступление избытка полученных с питанием ФЛ в мозг через кровь, поскольку ФЛ способны проникать через клеточные мембраны и, как следствие, гематоэнцефалический барьер [21, 37]. ФЛ являются важнейшими компонентами клеточных мембран и, в частности, синаптических кон-

тактов, что может также быть причиной модуляции поведения через избыток либо нарушение относительного содержания ФЛ [38]. Кроме того, показано, что липидный состав мембраны сам по себе может влиять на восприятие запаховых сигналов, это может объяснять значительное снижение дискриминации интродеров по полу у животных после приема ФЛ [39]. Таким образом, изменение нейрональных процессов может происходить в результате нарушения уровня и соотношений ФЛ либо же в результате расщепления ФЛ до биологически активных метаболитов, затем оказывающих влияние на ЦНС. Так, фосфатидилхолин (ФХ) является основным компонентом клеточных мембран, составляющим 40–50% всех клеточных ФЛ, он присутствует преимущественно во внешнем слое плазматической мембраны [40]. ФХ представляет собой источник большого ряда биологически активных молекул, он метаболизируется липолитическими ферментами, в частности, фосфолипазами [41, 42]. Фосфолипаза С продуцирует диацилглицерины, которые важны в метаболизме большинства ФЛ [43]. Фосфолипаза D производит фосфатидную кислоту и холин [44]. Холин задействован в биосинтезе липопротеинов, в регуляции активности генов и является предшественником нейромедиатора ацетилхолина [45]. ФХ также является предшественником фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидной кислоты (ФК). ФС составляет от 5% до 10% клеточных ФЛ, являясь компонентом внутреннего слоя плазматической мембраны и также самостоятельно выступает в роли сигнальной молекулы [46]. Так, при апоптозе ФС перемещается с внутренней на внешнюю сторону клеточной мембраны, являясь сигналом «съешь меня» для рецепторов распознавания ФС [47, 48]. ФС является важным элементом гомеостаза холестерина, он необходим для трансмембранного перемещения избыточного холестерина, образующегося в результате лизосомальной деградации липопротеинов, от плазматической мембраны к эндоплазматическому ретикулуму, тем самым поддерживая целостность мембран и обеспечивая выживание клеток [48, 49]. Достаточно высокие концентрации ФС наравне с докозагексаеновой кислотой в тканях ЦНС необходимы для их развития и функционирования [50]. Прием ФС снижает риск деменции и когнитивной дисфункции у пожилых людей [51]. ФК служит субстратом в биосинтезе многих других ФЛ и жиров, а в самостоятельном виде выполняет важные клеточные, транспортные и сигнальные функции [52, 53]. В аппарате Гольджи ФК участвует в мембранном переносе [53]. ФК является предшественником лизо-ФК, а последняя действует как многофункциональный липидный мессенджер в физиологических и патофизиологических процессах [54, 55]. Избыток лизо-ФК влияет на кальциевый транспорт, а также цитоскелет [56], которые играют ключевую роль в функционировании нейронов [57, 58].

Кроме этого, действие ФЛ на мозг может происходить путем влияния на митохондриальные функции, так как ФЛ являются важными составляющими мембран всех клеточных структур, в том числе и органелл [59, 60]. Исследования последних лет убедительно демонстрируют, что важнейшими факторами возникновения и развития патологических процессов в тканях мозга нередко являются состояние и функционирование митохондрий [59, 60]. В настоящее время митохондрии рассматриваются как потенциальная терапевтическая мишень для нейродегенеративных заболеваний [61, 62]. Эта гипотеза подтверждается также и нашими предыдущими результатами [20, 63]. Поскольку ФХ является также биосинтетическим предшественником сфингомиелина, следовательно, он может оказывать опосредованное влияние на многие метаболические пути, составляющие сфинголипидный цикл. Сфинголипиды и церамиды присутствуют в составе митохондрий, и известно об их роли в митофагии и формировании проницаемых для белков каналов, которые способствуют высвобождению цитохрома С из митохондрий [15, 64]. Высокий уровень церамидов С16 снижает выработку АТФ в митохондриях и увеличивает количество активных форм кислорода [65]. Если уровни церамидов возрастают еще сильнее, они оказывают значительное воздействие на митохондриальное дыхание, что приводит к гибели клеток [65]. Мутации

в гене профермента фосфатидилсериндекарбоксилазы (PISD) приводят к тяжелой митохондриальной дисфункции и связаны с врожденными катарактами, низкорослостью, атаксией и умственной отсталостью [65, 66].

Полученные нами в данном исследовании результаты свидетельствуют о существенном влиянии приема ФЛ на функции ЦНС на примере лабораторных мышей. Дальнейшие исследования эффектов ФЛ кишечного или диетического происхождения, а также продуктов их метаболизма в регуляции функции ЦНС может стать новым витком в понимании роли метаболических соединений в механизмах кишечного-нервных взаимодействий.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Н. К., Л. В. Б., М. В. М.), сбор данных (М. В. М., Л. В. Б., К. С. П., Е. Н. К.), обработка данных (М. В. М., К. С. П., Е. Н. К.), написание и редактирование манускрипта (Л. В. Б., Е. Н. К.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств РФФ № 23-25-00417 (<https://rscf.ru/project/23-25-00417/>). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований и были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ нейронаук и медицины (протокол № 5 от 16.02.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maggini S, Pierre A, Calder PC* (2018) Immune Function and Micronutrient Requirements Change over the Life Course. *Nutrients* 10(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101531>
2. *Zhao M, Tuo H, Wang S, Zhao L* (2020) The Effects of Dietary Nutrition on Sleep and Sleep Disorders. *Mediat Inflamm* 2020: 3142874. <https://doi.org/10.1155/2020/3142874>
3. *Adamovich Y, Aviram R, Asher G* (2015) The emerging roles of lipids in circadian control. *Biochim Biophys Acta* 1851(8): 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.11.013>
4. *Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P* (2020) Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17(3): 169–183. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0250-7>
5. *Shi J, Fan J, Su Q, Yang Z* (2019) Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 703. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00703>
6. *Hachem M, Ahmed MK, Nacir-Delord H* (2023) Phospholipidomics in Clinical Trials for Brain Disorders: Advancing our Understanding and Therapeutic Potentials. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03793-y>
7. *Ma X, Li X, Wang W, Zhang M, Yang B, Miao Z* (2022) Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases. *Front Aging Neurosci* 14: 975176. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.975176>
8. *Simons K, Toomre D* (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>

9. *Chakraborty M, Jiang XC* (2013) Sphingomyelin and its role in cellular signaling. *Adv Exp Med Biol* 991: 1–14.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_1
10. *Ruysschaert JM, Loney C* (2015) Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. *Biochim Biophys Acta* 1848(9): 1860–1867.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.014>
11. *Estes RE, Lin B, Kherra A, Davis MY* (2021) Lipid Metabolism Influence on Neurodegenerative Disease Progression: Is the Vehicle as Important as the Cargo? *Front Mol Neurosci* 14: 788695.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.788695>
12. *Hamilton LK, Fernandes KJL* (2018) Neural stem cells and adult brain fatty acid metabolism: Lessons from the 3xTg model of Alzheimer’s disease. *Biol Cell* 110(1): 6–25.
<https://doi.org/10.1111/boc.201700037>
13. *Tamura Y, Yamato M, Kataoka Y* (2022) Animal Models for Neuroinflammation and Potential Treatment Methods. *Front Neurol* 13: 890217.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.890217>
14. *Falabella M, Vernon HJ, Hanna MG, Claypool SM, Pitceathly RDS* (2021) Cardiolipin, Mitochondria, and Neurological Disease. *Trends Endocrinol Metab* 32(4): 224–237.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.01.006>
15. *Aufschnaiter A, Kohler V, Diessl J, Peselj C, Carmona-Gutierrez D, Keller W, Buttner S* (2017) Mitochondrial lipids in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 367(1): 125–140.
<https://doi.org/10.1007/s00441-016-2463-1>
16. *Boldyreva LV, Morozova MV, Saydakova SS, Kozhevnikova EN* (2021) Fat of the Gut: Epithelial Phospholipids in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci* 22(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms222111682>
17. *Petan T, Mancek-Keber M* (2022) Half is enough: Oxidized lysophospholipids as novel bioactive molecules. *Free Radic Biol Med* 188: 351–362.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.228>
18. *Borisova MA, Snytnikova OA, Litvinova EA, Achasova KM, Babochkina TI, Pindyurin AV, Tsentalovich YP, Kozhevnikova EN* (2020) Fucose Ameliorates Tryptophan Metabolism and Behavioral Abnormalities in a Mouse Model of Chronic Colitis. *Nutrients* 12(2).
<https://doi.org/10.3390/nu12020445>
19. *Morozova MV, Borisova MA, Snytnikova OA, Achasova KM, Litvinova EA, Tsentalovich YP, Kozhevnikova EN* (2022) Colitis-associated intestinal microbiota regulates brain glycine and host behavior in mice. *Sci Rep* 12(1): 16345.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-19219-z>
20. *Borisova MA, Achasova KM, Morozova KN, Andreyeva EN, Litvinova EA, Ogienko AA, Morozova MV, Berkavaeva MB, Kiseleva E, Kozhevnikova EN* (2020) Mucin-2 knockout is a model of intercellular junction defects, mitochondrial damage and ATP depletion in the intestinal epithelium. *Sci Rep* 10(1): 21135.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78141-4>
21. *Roy R, Paul R, Bhattacharya P, Borah A* (2023) Combating Dopaminergic Neurodegeneration in Parkinson’s Disease through Nanovesicle Technology. *ACS Chem Neurosci* 14(16): 2830–2848.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00070>
22. *Graham DB, Xavier RJ* (2020) Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* 578(7796): 527–539.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2025-2>
23. *Geyer MA, Dulawa SC* (2003) Assessment of murine startle reactivity, prepulse inhibition, and habituation. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8 17.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0817s24>
24. *Cadenhead KS, Geyer MA, Braff DL* (1993) Impaired startle prepulse inhibition and habituation in patients with schizotypal personality disorder. *Am J Psychiatry* 150(12): 1862–1867.
<https://doi.org/10.1176/ajp.150.12.1862>
25. *Wolff AR, Bilkey DK* (2010) The maternal immune activation (MIA) model of schizophrenia produces pre-pulse inhibition (PPI) deficits in both juvenile and adult rats but these effects are not associated with maternal weight loss. *Behav Brain Res* 213(2): 323–327.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.008>
26. *Braff DL, Geyer MA* (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 47(2): 181–188.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1990.01810140081011>
27. *Белюсова ИИ, Гладких ДВ, Железова АИ, Стефанова НА, Колосова НГ, Амстиславская ТГ* (2009) Возрастные аспекты репродуктивной функции самцов крыс с обычным и ускоренным темпом старения. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 95(11): 1258–1267. [*Belousova II, Gladkikh DV, Ghelezova AI, Stephanova NA, Kolosova NG, Amstislavskaya TG* (2009) Age

- Aspects of Neurohormonal and Neurochemical Regulation of Sexual Behavior in Male Rats. *Russ J Physiol* 95(11): 1258–1267. (In Russ)].
28. *Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL, Ennaceur A* (2010) Anxiety responses in Balb/c, c57 and CD-1 mice exposed to a novel open space test. *Behav Brain Res* 207(2): 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.028>
 29. *Новиков СН* (1988) Феромоны и размножение млекопитающих: физиол. аспекты. Наука. Ленингр отд-ние. [*Novikov SN* (1988) Pheromones and reproduction in mammals. Nauka. (LO). 1988. (In Russ)].
 30. *Amstislavskaya TG, Bulygina VV, Tikhonova MA, Maslova LN* (2013) Social isolation during peri-adolescence or adulthood: effects on sexual motivation, testosterone and corticosterone response under conditions of sexual arousal in male rats. *Chin J Physiol* 56(1): 36–43. <https://doi.org/10.4077/CJP.2013.BAA074>
 31. *Zolotykh MA, Kozhevnikova EN* (2017) The effect of social experience on olfactory preference in male mice. *Appl Animal Behav Sci* 189: 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.013>
 32. *Joel D* (2006) Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(3): 374–388. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.11.006>
 33. *Takahashi H, Komatsu S, Nakahachi T, Ogino K, Kamio Y* (2016) Relationship of the Acoustic Startle Response and Its Modulation to Emotional and Behavioral Problems in Typical Development Children and Those with Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord* 46(2): 534–543. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2593-4>
 34. *Berding K, Vlckova K, Marx W, Schellekens H, Stanton C, Clarke G, Jacka F, Dinan TG, Cryan JF* (2021) Diet and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Adv Nutr* 12(4): 1239–1285. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa181>
 35. *Hamamah S, Amin A, Al-Kassir AL, Chuang J, Covasa M* (2023) Dietary Fat Modulation of Gut Microbiota and Impact on Regulatory Pathways Controlling Food Intake. *Nutrients* 15(15). <https://doi.org/10.3390/nu15153365>
 36. *Agagunduz D, Icer MA, Yesildemir O, Kocak T, Kocyigit E, Capasso R* (2023) The roles of dietary lipids and lipidomics in gut-brain axis in type 2 diabetes mellitus. *J Transl Med* 21(1): 240. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04088-5>
 37. *Pifferi F, Laurent B, Plourde M* (2021) Lipid Transport and Metabolism at the Blood-Brain Interface: Implications in Health and Disease. *Front Physiol* 12: 645646. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.645646>
 38. *Santos AL, Preta G* (2018) Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cell Mol Life Sci* 75(11): 1909–1927. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2765-4>
 39. *Lowry TW, Kusi-Appiah AE, Fadool DA, Lenhart S* (2023) Odor Discrimination by Lipid Membranes. *Membranes (Basel)* 13(2). <https://doi.org/10.3390/membranes13020151>
 40. *Van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL* (2017) The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859(9 Pt B): 1558–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>
 41. *Dennis EA* (2015) Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. *J Lipid Res* 56(7): 1245–1247. <https://doi.org/10.1194/jlr.E061101>
 42. *Johnson AA, Stolzing A* (2019) The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. *Aging Cell* 18(6): e13048. <https://doi.org/10.1111/acer.13048>
 43. *Farooqui AA, Horrocks LA* (2005) Signaling and interplay mediated by phospholipases A2, C, and D in LA-N-1 cell nuclei. *Reprod Nutr Dev* 45(5): 613–631. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005049>
 44. *Nelson RK, Frohman MA* (2015) Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. *J Lipid Res* 56(12): 2229–2237. <https://doi.org/10.1194/jlr.R059220>
 45. *Salvi F, Gadda G* (2013) Human choline dehydrogenase: medical promises and biochemical challenges. *Arch Biochem Biophys* 537(2): 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.07.018>
 46. *Leventis PA, Grinstein S* (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39: 407–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>

47. *Das P, Estephan R, Banerjee P* (2003) Apoptosis is associated with an inhibition of aminophospholipid translocase (APTL) in CNS-derived HN2-5 and HOG cells and phosphatidylserine is a recognition molecule in microglial uptake of the apoptotic HN2-5 cells. *Life Sci* 72(23): 2617–2627.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00163-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00163-2)
48. *Kay JG, Fairn GD* (2019) Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Commun Signal* 17(1): 126.
<https://doi.org/10.1186/s12964-019-0438-z>
49. *Lenoir G, D'Ambrosio JM, Dieudonne T, Copic A* (2021) Transport Pathways That Contribute to the Cellular Distribution of Phosphatidylserine. *Front Cell Dev Biol* 9: 737907.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.737907>
50. *Kim HY, Akbar M, Kim YS* (2010) Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6): 165–172.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.025>
51. *More MI, Freitas U, Rutenberg D* (2014) Positive effects of soy lecithin-derived phosphatidylserine plus phosphatidic acid on memory, cognition, daily functioning, and mood in elderly patients with Alzheimer's disease and dementia. *Adv Ther* 31(12): 1247–1262.
<https://doi.org/10.1007/s12325-014-0165-1>
52. *Bond P* (2017) Phosphatidic acid: biosynthesis, pharmacokinetics, mechanisms of action and effect on strength and body composition in resistance-trained individuals. *Nutr Metab (Lond)* 14: 12.
<https://doi.org/10.1186/s12986-017-0166-6>
53. *Zegarlinska J, Piascik M, Sikorski AF, Czogalla A* (2018) Phosphatidic acid - a simple phospholipid with multiple faces. *Acta Biochim Pol* 65(2): 163–171.
https://doi.org/10.18388/abp.2018_2592
54. *Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS* (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandin Other Lipid Mediat* 64(1-4): 1–10.
[https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(01\)00110-1](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(01)00110-1)
55. *Moolenaar WH* (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270(22): 12949–12952.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.12949>
56. *Hines OJ, Ryder N, Chu J, McFadden D* (2000) Lysophosphatidic acid stimulates intestinal restitution via cytoskeletal activation and remodeling. *J Surg Res* 92(1): 23–28.
<https://doi.org/10.1006/jsre.2000.5941>
57. *Jedrzejewska-Szmek J, Dorman DB, Blackwell KT* (2023) Making time and space for calcium control of neuron activity. *Curr Opin Neurobiol* 83: 102804.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102804>
58. *Parato J, Bartolini F* (2021) The microtubule cytoskeleton at the synapse. *Neurosci Lett* 753: 135850.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>
59. *Rojas-Charry L, Nardi L, Methner A, Schmeisser MJ* (2021) Abnormalities of synaptic mitochondria in autism spectrum disorder and related neurodevelopmental disorders. *J Mol Med (Berl)* 99(2): 161–178.
<https://doi.org/10.1007/s00109-020-02018-2>
60. *Pozo Devoto VM, Onyango IG, Stokin GB* (2022) Mitochondrial behavior when things go wrong in the axon. *Front Cell Neurosci* 16: 959598.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.959598>
61. *Licht-Mayer S, Campbell GR, Canizares M, Mehta AR, Gane AB, McGill K, Ghosh A, Fullerton A, Menezes N, Dean J, Dunham J, Al-Azki S, Pryce G, Zandee S, Zhao C, Kipp M, Smith KJ, Baker D, Altmann D, Anderton SM, Kap YS, Laman JD, Hart BA, Rodriguez M, Watzlawick R, Schwab JM, Carter R, Morton N, Zagnoni M, Franklin RJM, Mitchell R, Fleetwood-Walker S, Lyons DA, Chandran S, Lassmann H, Trapp BD, Mahad DJ* (2020) Enhanced axonal response of mitochondria to demyelination offers neuroprotection: implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 140(2): 143–167.
<https://doi.org/10.1007/s00401-020-02179-x>
62. *Khan MM, Paez HG, Pitzer CR, Alway SE* (2023) The Therapeutic Potential of Mitochondria Transplantation Therapy in Neurodegenerative and Neurovascular Disorders. *Curr Neuropharmacol* 21(5): 1100–1116.
<https://doi.org/10.2174/1570159X05666220908100545>
63. *Saydakova S, Morozova K, Smytnikova O, Morozova M, Boldyreva L, Kiseleva E, Tsentalovich Y, Kozhevnikova E* (2023) The Effect of Dietary Phospholipids on the Ultrastructure and Function of Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 24(2).
<https://doi.org/10.3390/ijms24021788>

64. *Mayr JA* (2015) Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *J Inherit Metab Dis* 38(1): 137–144.
<https://doi.org/10.1007/s10545-014-9748-x>
65. *Funai K, Summers SA, Rutter J* (2020) Reign in the membrane: How common lipids govern mitochondrial function. *Curr Opin Cell Biol* 63: 162–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.006>
66. *Bathina S, Das UN* (2023) Role of Mitochondrial Dysfunction in Cellular Lipid Homeostasis and Disease. *Discov Med* 35(178): 653–663.
<https://doi.org/10.24976/Discov.Med.202335178.64>

Effect of Dietary Phospholipid on the Behavior in C57BL/6J Mice

L. V. Boldyreva^a, M. V. Morozova^a, K. S. Pavlov^a, and E. N. Kozhevnikova^{a,*}

^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

**e-mail: kozhevnikovaen@neuronm.ru*

Nowadays phospholipids are widely used as hepatoprotective, neuroprotective and anti-stress drugs, as well as the dietary supplements. Besides, lecithin consisting up to 70% of the phospholipids mixture: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and phosphatidic acid, is the often component of food production as an emulsifier. Dose of these biologically active substances in the modern human diet could be quite high. Previously we have shown that chronic intestinal inflammation in *Muc2*-knockout mice induces behavioral changes along with the significant increase in the content of phospholipids in intestinal epithelial cells, particularly, phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidic acid. Here we investigate the effects of long-term administration of a mixture of these phospholipids, as well as the effects of long-term administration of soy lecithin on the behavioral patterns in laboratory mice. Animals long-term taken a phospholipid mixture shows no normally observed preference towards females in the two intruders test (with female and male). In the social odor preference test, they also did not distinguish female and male odors, while non-social odors discrimination preserved. In addition, we identified a decrease in anxiety, obsessive traits, and schizophrenia-like behavior traits in these animals. Soy lecithin supplementation had similar effects on social behavior and compulsive traits, and increased aggression in males. Thus, long-term perinatal administration of either mixture of phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidic acid) or soy lecithin can influence various aspects of behavior in mice.

Keywords: behavior; phosphatidylcholine; phosphatidylserine; phosphatidic acid; soy lecithin; C57BL/6J laboratory mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ НА СТРЕСС У КРЫС
С ПАССИВНО-ОБОРОНИТЕЛЬНЫМ ТИПОМ ПОВЕДЕНИЯ ПОСЛЕ
СВЕТОВОГО ДЕСИНХРОНОЗА И ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

© 2024 г. Т. А. Томова^{2,4,5}, А. А. Гостюхина^{1,2,*}, Т. А. Замощина^{2,3}, М. В. Светлик^{2,3},
Н. Д. Блажко², Е. В. Медведева², С. А. Огородников², В. В. Ярцев^{2,3}, К. В. Зайцев¹

¹Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии,
Голубое, Московская обл., Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

³Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Томск, Россия

⁴Томский государственный педагогический университет, Томск, Россия

⁵Филиал Московского педагогического государственного университета, Черняховск, Россия

*E-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.08.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Проведена оценка гематологических показателей периферической крови и структурно-функциональных изменений надпочечников у стресс-неустойчивых крыс (пассивно-оборонительного типа поведения в тесте «открытое поле») после воздействия световой депривации и физической нагрузки в период весеннего равноденствия. Эксперимент показал, что световая депривация в течение 10 суток снижает общее количество лейкоцитов, абсолютное содержание моноцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и уровень кортикостерона в периферической крови по сравнению с интактной группой, находившейся на естественном режиме освещения. Гистологический анализ надпочечников данной группы показал, что в пучковой зоне в таких условиях происходила гипертрофия ядер, увеличение ядерно-цитоплазматического отношения адренкортикоцитов и уменьшение размеров клубочковой зоны коры надпочечников крыс по отношению к интактной группе. Физическая нагрузка в виде принудительного плавания до полного утомления в течение 5 дней подряд при естественном освещении у стресс-неустойчивых крыс не изменяла показатели периферической крови животных, однако приводила к увеличению площади цитоплазмы, ядерно-цитоплазматического отношения, а также к формированию гипертрофии ядер адренкортикоцитов пучковой зоны надпочечников, что указывало на подготовку клеток к повышению синтетической активности. Нахождение крыс в течение 10 суток в условиях полной темноты перед ежедневным в течение 5 дней принудительным плаванием, с одной стороны, формировало гипоксическое состояние и истощение надпочечников, с другой стороны, стабилизировало лейкоцитарный пул периферической крови по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс.

Ключевые слова: показатели гемограммы, кортикостерон, надпочечники крысы, стресс, световая депривация, принудительное плавание

ВВЕДЕНИЕ

Современную жизнь неотъемлемо сопровождают нарушения циркадных ритмов, физические и психоэмоциональные нагрузки, вирусные атаки (постковидный синдром) [1, 2] и т. п., формируя напряжение физиологических систем организма. Стресс является одной из самых значимых и распространенных медико-социальных проблем в мире, это один из факторов, способствующих развитию заболеваний. Стресс-факторы могут приводить к таким поведенческим состояниям, как агрессивность, тревожность, нарушение реактивности, исследовательского поведения и обучения, что, в свою очередь, является почвой психогенной соматической патологии [1]. Данные стратегии поведения, формирующиеся под влиянием стрессорных факторов, дают возможность организму перераспределять физиологические ресурсы и адаптироваться [3]. Стратегии имеют свои фундаментальные гормональные, биохимические и психофизиологические основы [4–6]. Решающее значение в понимании, углублении и расширении этих фундаментальных основ имеют эксперименты с участием лабораторных животных.

Самым распространенным и доступным методом оценки выраженности и динамики элементарных поведенческих актов является тест «открытое поле». Поведенческие показатели, исследуемые в этом тесте, широко используются в качестве прогностических критериев индивидуальной стресс-устойчивости организма экспериментальных животных [1]. Высокая активно-поисковая компонента в открытом поле позволяет рассматривать таких особей как стресс-устойчивых, тогда как крысы с низкой исследовательской и двигательной активностью (пассивно-оборонительный тип) расцениваются как стресс-неустойчивые. Сочетание низкого уровня перемещений в открытом поле с обильными дефекациями характеризует животное как нестабильного интроверта с низким болевым порогом [7], являющегося, вероятно, в популяции наиболее чувствительным к действию различных факторов, с высокой предрасположенностью к нарушению адаптации и формированию патологий. Вместе с тем есть и амбивалентные экземпляры, имеющие средний уровень перемещений и исследовательской активности в открытом поле.

В формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма при экстремальных воздействиях кровь является ключевой гомеостатической системой [8]. Широко распространенными индикаторами реакции на стресс являются изменения клеточного состава и концентрации кортикостероидов в периферической крови, а также состояние надпочечников [9–11]. В свою очередь, особенности данных проявлений стресс-реакции у стресс-неустойчивых крыс в условиях десинхроноза и физической нагрузки представляет большой интерес для прогноза ответа организма и использования прогностических данных в различных областях деятельности человека (спорт, смена часовых поясов, профориентация и т.п.). Изучение характера ответа организма при сочетании факторов друг с другом (десинхроноза и физической нагрузки) поможет понять потенциальную значимость синергетического или антагонистического их взаимодействия в отношении функциональных резервов организма, что может внести вклад в разработку гигиенических мероприятий.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы явилось выявление изменений показателей гемограммы периферической крови, уровня кортикостерона в сыворотке крови и морфометрических, цитометрических показателей надпочечников у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения после воздействия на них световой депривации, физической нагрузки и их сочетания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен в весенний период года (конец марта – апрель) на 39 крысах-самцах линии Вистар массой 220 ± 30 г, полученных из сертифицированного питом-

Таблица 1. Типы поведения и их характеристики у лабораторных крыс в тесте «открытое поле»

Типы поведения животных	Горизонтальная активность (усл. ед.)	Вертикальная активность (усл. ед.)	Груминг (усл. ед.)
активно-поисковый тип поведения	48 (44; 50)	20 (20; 26)	0 (0; 0)
пассивно-оборонительный тип поведения	15 (13; 17) $p < 0.05$ $p_1 < 0.05$	2 (1; 4) $p < 0.05$ $p_1 < 0.05$	0 (0; 0)
Промежуточный (или смешанный) тип поведения	32 (28; 38) $p < 0.05$	13 (9; 16) $p < 0.05$	0 (0; 1)

Результаты представлены в виде $Me (Q_1; Q_3)$, p – уровень статистической значимости в сравнении с показателями животных с активно-поисковым типом поведения; p_1 – уровень статистической значимости в сравнении с показателями животных с промежуточным типом поведения.

ника. Животные после периода карантина (14 суток) содержались в контролируемых условиях вивария в клетках при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Для оценки реактивности нервной системы использовали общеповеденческий тест – методику «открытое поле». При тестировании животных с 8 до 10 ч фиксировали поведенческие реакции с последующим кластерным анализом данных и вовлечением в дальнейшем в эксперимент только животных с пассивно-оборонительным типом поведения.

Методика «открытое поле» заключалась в количественном измерении компонентов поведения животного, помещенного в новое открытое пространство, выбраться из которого ему мешает огораживающая арену стенка. Не менее чем за 1 час до тестирования исключали кормление, взятие в руки и другие активные манипуляции. Эксперимент проходил в полной тишине без посторонних звуков. «Открытое поле» представляло собой хорошо освещенную круглую арену диаметром 1.2 м и высотой 45 см, пол которой размечен радиальными и круговыми линиями. Крысу выпускали в центральный сектор поля и в течение 3 мин регистрировали количество пересечений горизонтальных и вертикальных линий, комплекс уходовых движений (груминг), количество заглядываний в отверстия и совершенных дефекаций [12–14].

Кластерный анализ показателей поведенческой активности (вертикальная, горизонтальная активность и груминг) 113 крыс-самцов, проведенный методом к-средних, позволил выделить три группы животных (рис. 1). Первую группу составили 37 крыс, у которых показатели поведенческой активности (вертикальная, горизонтальная активность и груминг) имели наиболее высокие уровни, что соответствует активно-поисковому типу поведения (табл. 1). Во вторую группу вошли 39 животных, у которых показатели поведенческой активности (вертикальная, горизонтальная активность и груминг) имели наименьшие значения, что соответствует пассивно-оборонительной поведенческой стратегии (табл. 1). У остальных 37 крыс проявлялся так называемый промежуточный (или смешанный) тип ориентировочно-исследовательского поведения (табл. 1).

Крыс с пассивно-оборонительной поведенческой стратегией рандомизировали на 4 группы: группа № 1 ($n = 9$) – интактные крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям; группа № 2 ($n = 10$) – крысы, круглосуточно находившиеся в темноте в течение 10 суток (ТТ-режим, световая депривация); группа № 3 ($n = 10$) – крысы, под-

вергавшиеся физической нагрузке (ФН) в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения (ЕО) (ЕО+ФН-режим); группа № 4 ($n = 10$) – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения после круглосуточного нахождения в темноте в течение 10 суток (ТТ+ФН-режим).

Для экспериментального светового десинхроноза животных помещали в условия круглосуточного полного затемнения 2–3 LX на 10 суток [15]. Кормление и уход за животными проводили исключительно при красном свете в разное время суток в течение всего эксперимента.

В качестве физической нагрузки использовали методику «принудительного плавания» крыс до полного утомления в собственной модификации [16]. Плавательный тест проводили в аквариуме прямоугольной формы с утяжеляющим грузом, равным по массе 10% от массы тела конкретной особи, при температуре воды 26–28°C ежедневно, в течение 5 дней подряд, в одно и то же время суток (с 10:00 до 11:00) в группе № 3 и параллельно в группе № 4 сразу после отмены световой депривации. Критерием полного утомления служили три безуспешные попытки крысы всплыть на поверхность либо отказ от таких попыток и опускание на дно бассейна.

Через 24 ч после завершения экспериментальных воздействий у всех животных под CO_2 -наркозом надрезали десну и проводили забор крови, которую помещали в пробирку с калийными солями этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) для дальнейшего исследования. В периферической крови по стандартной методике с использованием ветеринарного гематологического анализатора PCE-90 Vet («High Technology», США) определяли общее количество эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, а также объем эритроцитов и тромбоцитов, содержание гемоглобина, гематокрит и тромбокрит. В основе работы гематологического анализатора лежит принцип кондуктометрии (принцип Культера), и разделение клеток по категориям (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, осадок) осуществляется прибором на основании анализа амплитуды полученных лазером импульсов. Полученный сигнал обрабатывается аналогово-цифровым преобразователем. Результаты автоматического гематологического анализа представляются в виде абсолютных и относительных цифровых значений, а также в виде распределения клеток по объему.

После забора крови из десны крыс декапитировали под CO_2 -наркозом, истекающую кровь у декапитированных животных собирали в чистую сухую пробирку для получения сыворотки с целью определения уровня кортикостерона. Забор биологического материала выполняли строго в утренние часы: с 10:00 до 11:00. Определение концентрации исследуемого гормона выполняли с помощью иммуноферментного анализа. Измерения проводили на программируемом фотометре для микрострипов STAR FAX 303 PLUS (США). Иммуноферментный анализ проводили с использованием поликлональных антител кортикостерона согласно рекомендациям производителя тест-систем «IBL», Германия. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм.

После декапитации проводили вскрытие крыс, извлекали левый надпочечник и фиксировали его в 10%-ном забуференном формалине, обезживали в растворах этанола возрастающей крепости (70-, 95- и 98%), просветляли в бутаноле и заключали в парафин (LabPoint, Россия). Срезы толщиной 5–7 мкм изготавливали на ротационном микротоме RMD-3000 (MTPoint, Россия) с последующей окраской гематоксилином Карazzi и эозином. Все процедуры проводили по стандартным методикам [17, 18]. Микроскопию препаратов, изготовление снимков и измерения осуществляли с использованием системы из микроскопа Axio Lab A1, камеры AxioCam ERc 5s и программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy, Германия). По ми-

Таблица 2. Морфометрические и цитометрические показатели надпочечников

Первичные (измеренные) показатели	
Площадь надпочечника, мкм ²	$S_{\text{НП}}$
Площадь мозгового вещества, мкм ²	$S_{\text{МВ}}$
Общая площадь пучковой и сетчатой зон и мозгового вещества, мкм ²	$S_{(\text{МВ}+\text{ПЗ}+\text{СЗ})}$
Общая площадь сетчатой зоны и мозгового вещества, мкм ²	$S_{(\text{МВ}+\text{СЗ})}$
Площадь адренокортикоцитов, мкм ²	$S_{\text{АДР}}$
Площадь ядер адренокортикоцитов, мкм ²	$S_{\text{Я АДР}}$
Вторичные (рассчитанные) показатели	
Площадь клубочковой зоны, мкм ²	$S_{\text{КЗ}} = S_{\text{НП}} - S_{(\text{МВ}+\text{ПЗ}+\text{СЗ})}$
Площадь пучковой зоны, мкм ²	$S_{\text{ПЗ}} = S_{(\text{МВ}+\text{ПЗ}+\text{СЗ})} - S_{(\text{МВ}+\text{СЗ})}$
Площадь сетчатой зоны, мкм ²	$S_{\text{СЗ}} = S_{(\text{МВ}+\text{СЗ})} - S_{\text{МВ}}$
Площадь коркового вещества, мкм ²	$S_{\text{КВ}} = S_{\text{НП}} - S_{\text{МВ}}$
Относительная площадь мозгового вещества, %	$S_{(\text{отн}) \text{МВ}} = (S_{\text{МВ}}/S_{\text{НП}}) \times 100$
Относительная площадь коркового вещества, %	$S_{(\text{отн}) \text{КВ}} = (S_{\text{КВ}}/S_{\text{НП}}) \times 100$
Относительная площадь клубочковой зоны, %	$S_{(\text{отн}) \text{КЗ}} = (S_{\text{КЗ}}/S_{\text{КВ}}) \times 100$
Относительная площадь пучковой зоны, %	$S_{(\text{отн}) \text{ПЗ}} = (S_{\text{ПЗ}}/S_{\text{КВ}}) \times 100$
Относительная площадь сетчатой зоны, %	$S_{(\text{отн}) \text{СЗ}} = (S_{\text{СЗ}}/S_{\text{КВ}}) \times 100$
Площадь цитоплазмы адренокортикоцитов, мкм ²	$S_{\text{ЦИТ АДР}} = S_{\text{АДР}} - S_{\text{Я АДР}}$
Ядерно-цитоплазматическое отношение	$\text{ЯЦО}_{\text{АДР}} = S_{\text{Я АДР}} / S_{\text{ЦИТ АДР}}$

крофотоснимкам центральных трех срезов надпочечника измеряли первичные параметры, на основе которых рассчитывали ряд вторичных показателей, приведенных в табл. 2.

Статистический анализ выполнен с помощью пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Ряды данных проверяли на характер распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Рассчитывали следующие описательные статистики: среднее (\bar{x}), минимум (min) и максимум (max), стандартное отклонение (σ), стандартная ошибка среднего ($m\bar{x}$), медианы (Me), 1-го и 3-го квартилей (Q1; Q3), коэффициент вариации (Cv), уровень значимости (p). Ввиду отклонения от нормального распределения одного или нескольких сравниваемых рядов данных оценка различий между двумя независимыми выборками проводилась с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни, а между зависимыми выборками – критерия Уилкоксона [19]. При проверке статистических гипотез достоверным считали уровень значимости менее или равный 5% ($p \leq 0.05$). Корреляционный анализ проводился по Спирмену, на его основе составлялись корреляционные матрицы, при этом учитывались коэффициенты корреляции не меньше |0.7|.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под перекрестной адаптацией в физиологии понимают изменение устойчивости организма к одному стрессору при развитии адаптации к другому [20]. В основе «перекрестных» эффектов адаптации к стресс-факторам лежит структурный след предшествующих адаптационных процессов [21, 22] не только на стрессорные нагрузки, но и обстановочные средовые факторы. Согласно общебиологическим законам любые приспособительные эффекты организма всегда обладают свойством целесообразности. При этом необходимо учитывать тот факт, что перекрестная адаптация при всей своей целесообразности может обуславливать как положительный, так и отрицательный характер конечного результата по отношению к какой-либо конкретной функции или деятельности организма [23].

Ранее в экспериментах в период весеннего равноденствия [24–26] продемонстрированы взаимные влияния десинхронизации и физической нагрузки на адаптивные реакции лабораторных животных, не подвергавшихся делению на группы по типу поведения в «открытом поле». Показано, что физическая нагрузка в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день, повторяясь в течение 5 суток в одно и то же время, выступала в качестве внешнего цикла, захватывающего ритмы организма и оптимизирующего их. При этом расширение световой фазы до максимума (что соответствовало генетической программе в период весеннего равноденствия) адаптировало крыс к последующей физической нагрузке и способствовало экономизации физических и метаболических ресурсов, а также ограничивало пагубные эффекты стресс-реакции и предупреждало истощение. В то же время у таких животных при суживании световой фазы до минимума (что противоречило генетической программе в период весеннего равноденствия) и последующей физической нагрузке стресс-реакции сохранялись, но они утрачивали признаки истощения, которые отмечены у крыс, подвергавшихся только принудительному плаванию [27]. Таким образом, особенности адаптивных реакций животных при сочетании вышеуказанных воздействий определялись характером депривации и направлением фазового сдвига. Вместе с тем следует подчеркнуть, что у группы крыс, не дифференцированных по типу поведения, расширение световой фазы до максимума и сужение ее до минимума способствовало таким структурно-функциональным изменениям в организме животного, которые обуславливали более благоприятный ответ на физическую нагрузку в отличие от крыс, которые подвергались только принудительному плаванию.

В дальнейших работах установлено, что тип поведенческой активности в тесте «открытое поле» определяет как исходную работоспособность в тесте «принудительное плавание» (первое предъявление теста) и динамику работоспособности в течение пяти дней ежедневного предъявления теста после десинхронизации, так и уровень кортикостерона в сыворотке крови [13]. Так, в период весеннего равноденствия для крыс пассивно-оборонительного типа поведения характерен более низкий уровень кортикостерона в сыворотке крови и наименьший исходный уровень работоспособности по сравнению с крысами активно-поискового и промежуточного типов поведения в тесте «открытое поле» [28].

В нашем эксперименте сочетание световой депривации у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения и последующей физической нагрузки способствовало понижению уровня кортикостерона по отношению к уровню у интактных животных, что, по-видимому, указывало на истощение ресурсов. Глюкокортикоиды являются важными составляющими устойчивости организма и активного развития адаптации, продукция которых опосредована гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой, реагирующей на стресс [29]. Таким образом, очевидно, что программа адаптации у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения в ответ на сочетанную стрессорную нагрузку не позволяла этим животным совладать со стрессорами и компенсировать их последствия, так как ресурсное обеспечение организма не соответствовало его запросам в настоящий момент.

Кроме кортикостероидов, состояние гомеостатической системы отражают показатели гемограммы. Полагают, что они играют решающую роль в специфических и неспецифических адаптационных реакциях при любых воздействиях, определяя резистентность и реактивность организма [30]. Рядом исследователей показано, что при действии стрессоров основные гормоны и медиаторы стресса (норадреналин, адреналин и кортикостерон) изменяют качественные и количественные характеристики клеток крови в организме [31, 32], которые участвуют в перестройке активности физиологических систем [33].

В этом аспекте становится актуальным выявление особенностей структурно-функциональных изменений у стресс-неустойчивых особей как в транспортной системе (периферическая кровь) организма, так и в состоянии надпочечников при сочетании десинхроноза и физического переутомления в процессе реализации программы адаптации в период весеннего равноденствия.

Эксперимент показал, что после воздействия световой депривации у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения происходит снижение общего количества лейкоцитов, абсолютного содержания моноцитов, гранулоцитов, лимфоцитов и уровня кортикостерона в периферической крови по сравнению с интактной группой, находившейся на естественном режиме освещения (табл. 3). При этом гистологический анализ надпочечников данной группы выявил, что в пучковой зоне в этих условиях имела место гипертрофия ядер, увеличивалась ядерно-цитоплазматическое отношение адренокортикоцитов и уменьшались размеры клубочковой зоны коры надпочечников

Таблица 3. Показатели периферической крови лабораторных крыс с пассивно-оборонительным типом поведения в условиях светового десинхроноза и физической нагрузки в период весеннего равноденствия

Показатели	Группы животных			
	Группа № 1 Интактные	Группа № 2 ТТ-режим	Группа № 3 ЕО+ФН-режим	Группа № 4 ТТ+ФН-режим
Кортикостерон, нг/мл	177.7 (156.5; 187.5)	131.4 (107.7; 160.1) $p < 0.05$	178.5 (161.6; 209.7)	60.6 (51.5; 146.2) $p < 0.05$ $p' < 0.001$ $p^2 < 0.001$
Общее количество лейкоцитов, $10^9/л$	17.3 (16.1; 18.5)	8.8 (7.05; 9.70) $p < 0.01$	9.9 (9.20; 10.60)	13.1 (10.80; 15.60) $p' < 0.05$
Лимфоциты, $10^9/л$	10.3 (9.6; 11.4)	5.1 (4.45; 5.80) $p < 0.05$	5.5 (5.20; 7.10)	6.8 (6.00; 10.90)
Моноциты, $10^9/л$	0.7 (0.6; 0.8)	0.3 (0.25; 0.30) $p < 0.01$	0.4 (0.30; 0.50)	0.7 (0.60; 0.90) $p' < 0.01$
Гранулоциты, $10^9/л$	6.4 (4.9; 6.6)	3.1 (2.65; 3.90) $p < 0.05$	4.0 (3.40; 4.30)	5.3 (4.00; 6.50) $p' < 0.05$

Окончание табл. 3

Показатели	Группы животных			
	Группа № 1 Интактные	Группа № 2 ТТ-режим	Группа № 3 ЕО+ФН-режим	Группа № 4 ТТ+ФН-режим
Лимфоциты, %	62.6 (57.2; 64.8)	60.9 (58.80; 63.70)	58.3 (49.40; 61.00)	59.0 (51.60; 62.10)
Моноциты, %	3.9 (3.7; 4.2)	3.3 (3.10; 3.45)	4.4 (3.00; 4.70)	4.9 (4.60; 6.30) $p^1 < 0.01$
Гранулоциты, %	33.5 (30.3; 39.7)	36.1 (32.95; 37.80)	37.4 (36.00; 45.90)	36.0 (33.30; 42.90)
Общее количество эритроцитов, $10^{12}/л$	9.4 (8.8; 10.0)	9.3 (8.98; 9.48)	8.1 (8.00; 8.46)	8.1 (7.79; 8.43) $p < 0.05$ $p^1 < 0.01$
Гемоглобин, г/л	143.0 (140.0; 155.0)	149.0 (145.00; 152.00)	132.5 (130.00; 136.00)	113.0 (104.0; 118.0) $p < 0.001$ $p^1 < 0.01$
Гематокрит, %	54.5 (53.7; 56.0)	54.3 (52.80; 55.55)	49.1 (47.90; 49.50)	46.2 (44.50; 48.30) $p < 0.01$ $p^1 < 0.01$
Средний объем эритроцитов, фл	57.1 (55.8; 60.0)	58.9 (58.00; 59.95)	60.3 (58.00; 61.60)	57.1 (56.10; 58.80)
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг	15.5 (14.7; 15.8)	15.9 (15.60; 16.55)	16.1 (15.70; 16.50)	13.9 (13.60; 14.10) $p^1 < 0.001$ $p^2 < 0.001$
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	269.0 (260.0; 275.0)	275.5 (268.50; 278.50)	272.5 (253.00; 280.00)	242. (240.0; 243.0) $p < 0.01$ $p^1 < 0.001$ $p^2 < 0.01$
Степень разброса эритроцитов по объему, %	13.0 (12.7; 13.3)	12.7 (12.55; 12.95)	12.4 (12.00; 12.60)	13.0 (12.20; 14.30)

Примечание: Результаты представлены в виде $Me (Q_1; Q_3)$, p – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем интактных крыс, p^1 – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем в группе № 2, p^2 – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем в группе № 3, группа № 1 – интактные крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям; группа № 2 – крысы, находившиеся круглосуточно в темноте в течение 10 суток (световая депривация); группа № 3 – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения; группа № 4 – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения после круглосуточного нахождения в темноте в течение 10 суток, ЕО – естественное освещение, ФН – физическая нагрузка, ТТ – режим световой депривации.

крыс по отношению к интактной группе (табл. 4). Уменьшение размеров клубочковой зоны, наблюдаемое нами в случае ТТ-режима, согласуется с результатами, полученными на других моделях стресса (например, при иммобилизации) [34]. Показано, что у крыс при гипотермии происходит активация секреторной активности кортикоцитов клубочковой зоны коры надпочечников на начальных этапах развития стресс-реакции [35]. По-видимому, во всех случаях, включая наши экспериментальные данные, это может быть связано с усилением реакции альдостерона на стресс, как это показано при реакциях крыс линии НИСАГ на эмоциональный стресс [36].

Воздействие же только физической нагрузки в виде принудительного плавания до полного утомления в течение пяти дней подряд при естественном освещении у крыс с пассивно-оборонительным типом поведения не вызывало значимых изменений показателей периферической крови животных, в том числе и содержания кортикостерона по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс (табл. 3). Однако в надпочечниках животных зарегистрированы увеличение площади цитоплазмы, ядерно-цитоплазматического отношения, а также гипертрофия ядер адренкортикоцитов пучковой зоны (табл. 4), что указывает на подготовку клеток к повышению синтетической активности.

Сочетание круглосуточного затемнения в течение десяти суток и следующего за ним принудительного плавания ежедневно в течение пяти дней привело к значимым изменениям показателей периферической крови у стресс-неустойчивых крыс. Так, физическое напряжение после световой депривации повышало общее количество лейкоцитов, абсолютное содержание моноцитов и гранулоцитов и формировало значения этих показателей, как у интактных. В этих же условиях у данной группы животных уменьшалось общее количество эритроцитов, содержание гемоглобина в эритроцитах и гематокрит по сравнению с аналогичными показателями крыс, находившихся только в условиях круглосуточного затемнения в течение десяти суток, тем самым, обусловив значимо низкий уровень этих показателей по сравнению с показателями интактных животных (табл. 3). Развитие такого гипоксического состояния, по-видимому, обусловлено повышением в первые 2 дня и последующей стабилизацией работоспособности, что показано ранее [14], но при этом в кровеносном русле увеличилось количество лейкоцитов до уровня значений интактных крыс – как мобилизационного элемента еще имеющегося ресурсного обеспечения, необходимого для регуляции иммунного ответа в тканях. Уровень кортикостерона у крыс данной группы снижался практически в 3 раза как по сравнению с интактной, так и с группами животных, которые подвергались либо только световой депривации, либо только физической нагрузке (табл. 3).

При гистологической оценке состояния надпочечников крыс с пассивно-оборонительным типом поведения после сочетанного стресс-воздействия выявлено уменьшение клубочковой зоны коры надпочечников по сравнению с таковой у интактных животных. Аналогичное уменьшение было показано и в группе животных, подвергшихся только ТТ-режиму, что согласуется с результатами других исследований на различных моделях стресса (например, при иммобилизации) [34–36]. В пучковой зоне надпочечников возрастало ядерно-цитоплазматическое отношение адренкортикоцитов в сравнении со значением этого параметра у интактной группы. При этом происходило уменьшение значений относительной площади цитоплазмы и увеличение относительной площади самих клеток по отношению к группе с физической нагрузкой. Гипертрофия ядер адренкортикоцитов наблюдалась и в данной группе. Животные из этой группы имели самую большую площадь ядер адренкортикоцитов пучковой зоны надпочечников (табл. 4). Все в совокупности свидетельствует о завершении высокой синтетической активности клеток пучковой зоны коры надпочечников у животных данной группы. Гипертрофия ядер адренкортикоцитов в сочетании с пониженным уровнем кортикостерона указывает на исчерпание синтетических резервов данных клеток после активной секреции.

Таблица 4. Морфометрические и цитометрические показатели надпочечников лабораторных крыс с пассивно-оборонительным типом поведения в условиях светового десинхроноза и физической нагрузки в период весеннего равноденствия

Показатели	Группы животных			
	Группа № 1 Интактные	Группа № 2 ТТ-режим	Группа № 3 ЕО+ФН-режим	Группа № 4 ТТ+ФН-режим
Относительная площадь коркового вещества, %	80.0 ± 3.8	82.9 ± 4.9	80.23 ± 2.19	78.47 ± 0.9
Относительная площадь мозгового вещества, %	19.9 ± 3.8	17.1 ± 4.9	19.95 ± 2.02	21.52 ± 0.9
Относительная площадь клубочковой зоны, %	16.9 ± 2.6	11.9 ± 1.8 <i>p</i> < 0.05	13.17 ± 0.96	12.50 ± 1.3 <i>p</i> < 0.05
Относительная площадь пучковой зоны, %	54.0 ± 4.2	50.2 ± 8.7	55.5 ± 2.34	55.06 ± 2
Относительная площадь сетчатой зоны, %	28.9 ± 4.2	37.9 ± 9.6	31.33 ± 2.45	32.42 ± 2.8
Площадь клеток, мкм ²	208.9 ± 16.4	200.9 ± 27.0	242.67 ± 3.91 <i>p</i> < 0.05	216.57 ± 3.9 <i>p</i> ² < 0.05
Площадь цитоплазмы, мкм ²	180.6 ± 16.1	166.6 ± 23.9	207.06 ± 3.87 <i>p</i> < 0.05	143.16 ± 2.8 <i>p</i> ² < 0.05
Площадь ядер, мкм ²	28.2 ± 2.2	34.3 ± 5.1 <i>p</i> < 0.05	35.62 ± 0.37 <i>p</i> < 0.05	36.82 ± 0.35 <i>p</i> < 0.05 <i>p</i> ¹ < 0.05 <i>p</i> ² < 0.05
Ядерно-цитоплазматическое отношение адренокортицитов	0.170 ± 0.019	0.207 ± 0.028 <i>p</i> < 0.05	0.19 ± 0.004 <i>p</i> < 0.05	0.19 ± 0.006 <i>p</i> < 0.05

Примечание: Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm m\bar{x}$, *p* – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем интактных крыс, *p*¹ – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем в группе № 2, *p*² – уровень статистической значимости по сравнению с соответствующим показателем в группе № 3, группа № 1 – интактные крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям; группа № 2 – крысы, находившиеся круглосуточно в темноте в течение 10 суток (световая депривация); группа № 3 – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения; группа № 4 – крысы, подвергавшиеся физической нагрузке в виде принудительного плавания до полного утомления каждый день в течение 5 дней в условиях естественного освещения после круглосуточного нахождения в темноте в течение 10 суток, ЕО – естественное освещение, ФН – физическая нагрузка, ТТ – режим световой депривации.

Корреляционный анализ по Спирмену показал, что в группе интактных животных обнаружено 20 корреляционных связей ($r = |0.7| - |0.9|$, $p < 0.05$) между показателями периферической крови, морфологическими характеристиками надпочечников и уровнем кортикостерона в сыворотке. В группе, подвергшейся только световой депривации, количество корреляций увеличивалось до 22, а в группе с физической нагрузкой – до 28. При сочетанном стрессе количество корреляций, наоборот, уменьшалось до 18. Следовательно, изолированная стрессовая нагрузка увеличивала взаимодействие между изучаемыми физиологическими системами, а сочетанная, наоборот, ослабляла. Следовательно, однофакторная стрессовая нагрузка увеличивает взаимодействие между изучаемыми физиологическими системами, а многофакторная, наоборот, ослабляет.

Подводя итог, можно полагать, что полученные результаты реагирования показателей крови и состояния надпочечников на сочетание стресс-факторов являются следствием того, что процессы адаптации в тканях и органах протекают не одновременно, а с разной скоростью и, по-видимому, с разной степенью развития стадий общего адаптационного синдрома – от тревоги при воздействии изолированных факторов, до истощения – при их сочетании.

Таким образом, у стресс-неустойчивых крыс в программе реализации перекрестной адаптации целесообразны как положительно направленная реакция, так и отрицательно направленная реакция по отношению к какому-либо показателю резистентности и реактивности организма. Нахождение этих животных в течение 10 суток в условиях полной темноты перед ежедневным в течение 5 дней принудительным плаванием, с одной стороны, вызывало истощение надпочечников и гипоксическое состояние, с другой стороны, повышение работоспособности в первые 2 дня плавания с последующей стабилизацией работоспособности и лейкоцитарного пула периферической крови по сравнению с интактными крысами. В совокупности это может указывать на то, что повышение адаптивных возможностей опорно-двигательного аппарата и иммунной системы обеспечивается за счет истощения симпатoadренальной системы и эритроцитарного звена периферической крови организма стресс-неустойчивых животных, что подтвердила и корреляционная матрица. Очевидно, что при сочетанном воздействии стресс-факторов перераспределение нагрузки между физиологическими системами будет определяться целесообразностью ответа согласно заданным условиям.

Надо полагать, что при длительном действии сочетанных стрессоров, где для выживания была нужна актуализация двигательной активности, несоответствие ресурсного обеспечения выбранной стратегии ответа обусловит высокую вероятность срыва адаптации и формирования патологий у крыс пассивно-оборонительного типа поведения.

Следует подчеркнуть, что результаты настоящего исследования имеют теоретическое и практическое значение. Во-первых, они направлены на выяснение механизмов, лежащих в основе индивидуальной чувствительности и устойчивости организма к действию различных стресс-факторов. Во-вторых, они расширяют представления об особенностях адаптивных реакций организма на различные сочетания или комбинации стресс-факторов в зависимости от типа нервной деятельности. В-третьих, являются основой для разработки новых фармакологических, физиотерапевтических методов повышения адаптивных возможностей организма человека в сложных условиях труда и экологической ситуации, а также усовершенствования методов реабилитации больных, перенесших инфекционные заболевания (постковидный синдром) или нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы (инсульты, инфаркты и др.).

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Т. А. Т. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. А. А. Г. – проведение экспериментальной и аналитической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Т. А. З. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи.

М. А. С. – статистическая обработка результатов. К. В. З. – разработка концепции и дизайна. В. В. Я. – анализ и интерпретация данных по гистологическому анализу. Н. Д. Б. – проведение экспериментальной части исследования, оформление статьи по правилам журнала. Е. В. М. – проведение гистологического анализа, статистическая обработка полученных результатов по морфометрии и цитометрии надпочечников. С. А. О. – проведение гистологического анализа, статистическая обработка полученных результатов по морфометрии и цитометрии надпочечников.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Государственного задания Федерального медико-биологического агентства. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Локальным этическим комитетом Томского Научно-исследовательского института курортологии и физиотерапии филиала Федерального государственного бюджетного учреждения Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства России (протокол № 3 от 22.03.2012 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Умрюхин АЕ, Судаков КВ* (2013) Поведение в открытом поле и состояние надпочечников и тимуса у крыс после стрессорных нагрузок при возрастании в крови уровня аутоантител к дофамину и глутамату. Бюл экспер биол мед 155: 532–535. [*Umryukhin AE., Sudakov KV* (2013) Behavior in the open field and the state of the adrenal glands and thymus in rats after stress loads with increasing levels of autoantibodies to dopamine and glutamate in the blood. Bull Exp Biol Med 155: 532–535. (In Russ)].
2. *Котельникова СВ, Котельников АВ, Теплый ДЛ* (2014) Влияние режима освещенности на интенсивность перекисного окисления липидов в норме и при кадмиевой интоксикации. Естеств науки 3: 55–62. [*Kotelnikova SV, Kotelnikov AV, Temply DL* (2014) Influence of the illumination mode on the intensity of lipid peroxidation in normal and cadmium intoxication. Natl Sci 3: 55–62. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro2018111811182>
3. *Мамылина НВ, Павлова ВИ* (2014) Физиологические аспекты поведенческой активности животных в условиях эмоционального стресса. Челябинск. Цицеро. [*Mamylina NV, Pavlova VI* (2014) Physiological aspects of behavioral activity of animals under emotional stress. Chelyabinsk. Pica. (In Russ)].
4. *Исмайлова ХЮ, Агаев ТМ, Семенова ТП* (2007) Индивидуальные особенности поведения. Баку. Нурлан. [*Ismailova HY, Agaev TM, Semenova TP* (2007) Individual features of behavior. Baku. Nurlan. (In Russ)].
5. *Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA* (1991) Behavioural differences between artificially selected aggressive and nonaggressive mice: response to apomorphine. Behav Brain Res 43: 203–208.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80072-5](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80072-5)
6. *Driscoll P, Demek M, Angio D, Claustre Y, Scatton B* (Eds) (1990) Genetically-based model for divergent stress responses: behavioral, neurochemical and hormonal aspects. Hamburg. Verlag Paul Parey 97–107.
<https://doi.org/10.1080/1025389031000111320>
7. *Симонов ПВ* (1987) Мотивированный мозг. М. Наука. [*Simonov PV* (1987) Motivated brain. M. Science. (In Russ)].

8. Селье Г (1960) Очерки об адаптационном синдроме. М. Медгиз. [*Sel' e G (1960) Essays on the Adaptation Syndrome. M. Medgiz. (In Russ)*].
9. Колесникова ЛА, Оскина ИН (2003) Концентрация кортикостерона в крови и лейкоцитарная формула при изучении стресса у серых крыс с различными типами поведения. Известия АН Сер Биол 1: 88–92. [*Kolesnikova LA, Os'kina IN (2003) Blood corticosterone concentration and differential leukocyte count in stressed Norway rats with different modes of behavior Izv Akad Nauk Ser Biol 1: 88–92. (In Russ)*].
10. Томова ТА, Замощина ТА, Светлик МВ, Седокова МЛ, Гостюхина АА, Фатюшина АМ (2020) Gly-Pro и адаптивные реакции при многокомпонентном стрессе. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 106: 231–242. [*Tomova TA, Zamoschina TA, Svetlik MV, Sedokova ML, Gostyukhina AA, Fatyushina AM (2020) Gly-Pro and adaptive reactions under multicomponent stress. Russ J Physiol 106: 231–242. (In Russ)*].
<https://doi.org/10.31857/S0869813920020107>
11. Кириллов ОИ, Хасина ЭИ, Дуркина ВВ (2003) Влияние стресса на постнатальный рост массы тела и надпочечников крыс. Онтогенез 34(5): 371–376. [*Kirillov OI, Khasina EI, Durkin VB (2003) Effect of stress on postnatal growth of body weight and adrenal glands of rats. Ontogenesis 34(5): 371–376. (In Russ)*].
12. Буреш Я (1991) Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. Высшая школа. [*Buresh Y (1991) Methods and basic experiments on the study of the brain and behavior. M. Higher School. (In Russ)*].
13. Гостюхина АА, Замощина ТА, Светлик МВ, Жукова ОБ, Зайцев КВ, Абдулкина НГ (2013) Поведенческая активность крыс в «открытом поле» после световой или темновой деприваций и физического переутомления. Бюл сибирск мед 15(3): 16–23. [*Gostyukhina AA, Zamoshchina TA, Svetlik MV, Zhukova OB, Zaitsev KV, Abdulkina NG (2016) Behavioral activity of rats in the “open field” after light or dark deprivation and physical fatigue. Bull Siber Med 15(3): 16–23. (In Russ)*].
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2016-3-16-23>
14. Гостюхина АА, Замощина ТА, Прокопова АВ, Зайцев КВ (2022) Индивидуально-типологические особенности реагирования лабораторных крыс на многокомпонентный стресс. Совр вопр биомед 6: 47–55. [*Gostyukhina AA, Zamoshchina TA, Prokopova AV, Zaitsev KV (2022) Individual typological features of laboratory rats' response to multicomponent stress Modern Issues Biomed 6: 47–55. (In Russ)*].
https://doi.org/10.51871/2588-0500_2022_06_02_5
15. Замощина ТА (2000) Лития оксибутират и ритмическая структура активно-поискового поведения и температуры тела крыс в условиях постоянного освещения. Экспер клин фармакол 63(2): 12–15. [*Zamoshchina T (2000) Lithium oxybutyrate and the rhythmic structure of active search behavior and body temperature of rats under constant lighting conditions. Exp Clin Pharmacol 63(2): 12–15. (In Russ)*].
16. Патент на изобретение № 2617206/ 21.04.2017. Бюл № 12. Гостюхина АА, Зайцев КВ, Замощина ТА, Светлик МВ, Жукова ОБ, Абдулкина НГ, Зайцев АА, Воробьев ВА Способ моделирования физического переутомления у крыс в условиях десинхронозов. [Patent for invention No. 2617206/ 21.04.2017. Byul No 12. Gostyukhina AA, Zaitsev KV, Zamoshchina TA, Svetlik MV, Zhukova OB, Abdulkina NG, Zaitsev AA, Vorobyev VA A method for modeling physical fatigue in rats under conditions of desynchronization. (In Russ)].
17. Exbrayat JM (2013) Classical methods of visualization. Histochemical and cytochemical methods of visualization. Boca Raton. London, New York. CRC Press Taylor and Francis Group. 3–58.
<https://doi.org/10.1201/B14967>
18. ГОСТ Р-53434-2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. М. Стандартиформ. 2010. [RF GOST R-53434-2009 Principles of good laboratory practice. M. Standartinform. 2010. (In Russ)].
19. Медик ВА, Симонов СА (2000) Статистика в медицине и биологии. М. Медицина. [*Medic VA, Simonov SA (2000) Statistics in medicine and biology. M. Medicine. (In Russ)*].
20. Глазачев ОС, Крыжановская СЮ (2021) В поисках структурно-функционального следа эффектов перекрестной адаптации: проблемы трансляционной физиологии. Физиол человека 47(6): 125–133. [*Glazachev OS, Kryzhanovskaya SYu (2021) In search of a structural and functional trace of the effects of cross-adaptation: problems of translational physiology. Human Physiol 47(6): 125–133. (In Russ)*].
<https://doi.org/10.31857/s0131164621050040>
21. Меерсон ФЗ, Пишеникова МГ (1988) Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам. М. Медицина. [*Meerson FZ, Pshennikova MG (1998) Adaptation to stressful situations and physical activity. M. Medicine. (In Russ)*].
22. Румянцева ЭР, Горюлев ПС (2005) Спортивная подготовка тяжелоатлетов. Механизмы адаптации. М. Теория и практика физической культуры. [*Rumyantseva ER, Gorulev PS (2005)*

- Sports training of weightlifters. Mechanisms of adaptation. M. Theory and Practice of Physical Culture. (In Russ)].
23. *Меерсон ФЗ* (1993) Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации. М. Дело. [*Meerson FZ* (1993) Adaptive medicine: the concept of long-term adaptation. M. Delo. (In Russ)].
 24. *Гостюхина АА, Замощина ТА, Зайцев КВ, Гутор СС, Жукова ОБ, Светлик МВ, Абдулкина НГ, Зайцев АА* (2018) Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления. Бюл сибирск мед 17 (3): 22–34. [*Gostyukhina AA, Zamoshchina TA, Zaitsev KV, Gutor SS, Zhukova OB, Svetlik MV, Abdulkina NG, Zaitsev AA* (2018) Adaptive reactions of rats after light desynchronization and physical. Bull Siber Med 17 (3): 22–34. (In Russ)]. https://doi.org/10.51871/2588-0500_2022_06_02_5
 25. *Томова ТА, Замощина ТА, Федоруцева ЕЮ, Светлик МВ* (2017) Сезонные влияния пептида gly-pro на секреторную функцию желудка у крыс с разной реактивностью центральной нервной системы. Экспер клин гастроэнтерол 6(142): 66–71. [*Tomova TA, Zamoshchina TA, Fedorutseva EYu, Svetlik MV* (2017) Seasonal effects of gly-pro peptide on the secretory function of the stomach in rats with different reactivity of the central nervous system. Exp Clin Gastroenterol 6(142): 66–71. (In Russ)]. https://doi.org/10.51871/2588-0500_2022_06_02_5
 26. *Volharelli FF, Gobatto CA, R de Mello MA* (2002) Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. Braz J Boil Res 35(11): 1389–1394. <https://doi.org/10.1016/j.yinstr.2014.10.001>
 27. *Гостюхина АА, Зайцев КВ, Замощина ТА, Жукова ОБ, Гутор СС, Светлик МВ, Абдулкина НГ* (2016) Сезонные особенности содержания кортикостерона в сыворотке крови крыс после физического переутомления в условиях десинхроноза. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 102(1): 50–55. [*Gostyukhina AA, Zaitsev KV, Zamoshchina TA, Zhukova OB, Gutor SS, Svetlik MV, Abdulkina NG* (2016) Seasonal features of corticosterone content in blood serum of rats after physical overwork in conditions of desynchronization. Russ J Physiol 102(1): 50–55. (In Russ)].
 28. *Гостюхина АА, Замощина ТА, Прокопова АВ, Зайцев КВ* (2022) Индивидуально-типологические особенности реагирования лабораторных крыс на многокомпонентный стресс. Совр вопр биомед 6(2): 47–55. [*Gostyukhina AA, Zamoshchina TA, Prokopova AV, Zaitsev KV* (2022) Individual and typological features of the response of laboratory rats to multi-component stress. Modern Issues Biomed 6(2): 47–55. (In Russ)]. https://doi.org/10.51871/2588-0500_2022_06_02_5
 29. *Кондашевская МВ* (2019) Сравнительный анализ гормональных и поведенческих изменений в моделях посттравматического стрессового расстройства и остром стрессе. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 105(7): 879–887. [*Kondashevskaya MV* (2019) Comparative analysis of hormonal and behavioral changes in models of post-traumatic stress disorders and acute stress. Russ J Physiol. 105(7): 879–887. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0869813919070045>
 30. *Yeltokova M, Ulyanova O, Askarov M, Chernyshova A, Kozina L* (2019) Integral hematologic indices in the evaluation of the immunologic reactivity of the organism in a patient with complication of type 1 diabetes mellitus: a case of diabetic retinopathy after autologous mesenchymal stem cell transplant. Exp Clin Transplant 17(1): 234–235. <https://doi.org/10.6002/ect.MESOT2018.P9>
 31. *Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS* (2012) Stress-induced redistribution of immune cells—from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones—curt richter award winner. Psychoneuroendocrinology 37(9): 1345–1368. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.05.008>
 32. *Томова ТА, Замощина ТА, Просекина ЕЮ, Светлик МВ* (2015) Влияние карбахолина и глицилпролина (GLY-PRO) на секреторную функцию желудка в зависимости от реактивности ЦНС у крыс. Экспер клин фармакол 78(3): 13–16. [*Tomova TA, Zamoshchina TA, Proseki-na EYu, Svetlik MV* (2015) The effect of carbacholine and glycyproline (GLY-PRO) on the secretory function of the stomach depending on the reactivity of the central nervous system in rats. Exp Clin Pharmacol 78(3): 13–16. (In Russ)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-3-13-16>
 33. *Reul JMH., Collins A, Saliba RS, Mifsud KR, Carter SD, Gutierrez-Mecinas M, Qian X, Linthorst ACE* (2015) Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. Neurobiol Stress 1: 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2014.06.003>
 34. *Полина ЮВ, Наумова ЛИ, Шишкина ТА, Родзаевская ЕБ* (2020) Морфофункциональные изменения в надпочечниках крыс в условиях экспериментальной модели иммобилизационного стресса. Форсире 3(S2): 32–35. [*Polina YUV, Naumova LI, SHishkina TA, Rodzaevskaya EB*

- (2020) Morpho-functional changes the adrenal glands of rats under the conditions of an experimental model of immobilization stress. *Forcipe* 3(S2): 32–35. (In Russ)].
35. Алябьев ФВ, Парфирьева АМ, Логвинов СВ (2007) Морфометрические показатели надпочечников крыс в динамике общей гипотермии. *Морфология* 132(6): 52–56. [Alyabyev FV, Parfiryeva AM, Logvinov SV (2007) Morphometric parameters of rat adrenals in the dynamics of general hypothermia. *Morphology* 162(6): 52–56. (In Russ)].
36. Антонов ЕВ, Маркель АЛ, Якобсон ГС (2011) Альдостерон и стрессзависимая артериальная гипертензия. *Бюл экспер биол мед* 152(8): 148–151. [Antonov EV, Markel' AL, Yakobson GS (2011) Aldosterone and stress-dependent arterial hypertension. *Bull Exp Biol Med* 152(8): 148–151. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1484-8>

Features of Reactions to Stress in Rats with Passive-Defense Behavior after Light Desynchronization and Physical Activity

T. A. Tomova^{b, d, e}, A. A. Gostyukhina^{a, b, *}, T. A. Zamoshchina^{b, c}, M. V. Svetlik^{b, c},
 N. D. Blazhko^b, E. V. Medvedeva^b, S. A. Ogorodnikov^b, V. V. Yartsev^{b, c}, and K. V. Zaitsev^a

^a*Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow oblast, Solnechnogorsk district, Goluboe village, Russia*

^b*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

^c*Siberian State Medical University SSMU, Tomsk, Russia*

^d*Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia*

^e*Moscow Pedagogical State University, Chernyakhovsk, Russia*

*e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

An assessment was made of hematological parameters of peripheral blood and structural and functional changes in the adrenal glands in stress-unresistant rats (passive-defensive type of behavior in the open field test) after exposure to light deprivation and physical activity during the spring equinox. The experiment showed that light deprivation for 10 days reduces the total number of leukocytes, the absolute content of monocytes, granulocytes, lymphocytes and the level of corticosterone in the peripheral blood compared to the intact group, that was on a natural lighting regime. Histological analysis of the adrenal glands of this group showed, that in the zona fasciculata under such conditions there was nuclear hypertrophy, an increase in the nuclear-cytoplasmic ratio of adrenocorticocytes and a decrease in the size of the zona glomerulosa of the adrenal cortex of rats in relation to the intact group. Physical activity in the form of forced swimming until complete fatigue for 5 days in a row in natural light in stress-unresistant rats did not change the parameters of the peripheral blood of animals, however it led to an increase in the area of the cytoplasm, the nuclear-cytoplasmic ratio, as well as the formation of hypertrophy of the nuclei of adrenocorticocytes in the fascicle adrenal zones, which indicated the preparation of cells for increased synthetic activity. Keeping rats for 10 days in complete darkness before forced swimming every day for 5 days, on the one hand, formed a hypoxic state and exhaustion of the adrenal glands, on the other hand, stabilized the leukocyte pool of peripheral blood compared to similar indicators in intact rats.

Keywords: hemogram parameters, corticosterone, rat adrenal glands, stress, light deprivation, forced swimming

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ
ХРОНИЧЕСКОГО НАРУШЕНИЯ СОЗНАНИЯ**

© 2024 г. К. А. Зарипова¹, С. А. Тыганов¹*, О. В. Туртикова¹,
Е. Н. Скитева^{1,2}, Ю. М. Забродская^{2,3,4}, С. А. Кондратьев⁵,
Е. А. Кондратьева^{2,4}, А. Н. Кондратьев², Б. С. Шенкман¹

¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

²*Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт
им. профессора А.Л. Поленова – филиал Национального медицинского
исследовательского центра им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия*

³*Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

⁴*Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны РФ,
Санкт-Петербург, Россия*

⁵*AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol Cyprus*

*E-mail: s.a.tyganov@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

Миопатия критических состояний (critical illness myopathy, CIM) — это первичная миопатия, которая развивается у пациентов в критическом состоянии. Гистологические признаки CIM включают общее уменьшение площади поперечного сечения мышечных волокон и преимущественную потерю моторного белка миозина при отсутствии воспалительных инфильтратов, но с обнаруживаемой активацией цитокинов. Целью данного исследования было изучение состояния внеклеточного матрикса камбаловидной мышцы человека в условиях CIM, вызванного хроническим нарушением сознания. Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов, находившихся в хроническом критическом состоянии и проходивших лечение в отделении анестезиологии и реанимации Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. профессора А.Л. Поленова – филиала Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова. В исследование включались пациенты с хроническим нарушением сознания продолжительностью не менее 2 месяцев. В качестве контроля использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии под местной анестезией. С помощью окрашивания гистологических срезов у пациентов с CIM было определено повышение площади коллагена, которое превышало контрольное значение на 82%. Также было определено повышенное содержание мРНК коллагенов I, III и VIa, наряду с повышением белкового содержания коллагена I и III. При этом мы не нашли изменений в содержании мРНК фибронектина и фактора роста внеклеточной ткани, но наблюдали повышение мРНК субъединицы интегри-

на А7. Полученные результаты свидетельствуют о значительном фиброзе скелетных мышц в условиях СИМ. Необходимы дальнейшие исследования сигнальных путей, регулирующих этот процесс.

Ключевые слова: хроническое нарушение сознания, скелетная мышца, миопатия критических состояний, внеклеточный матрикс, коллаген

DOI: 10.31857/S0869813924020102, **EDN:** DIXRQB

ВВЕДЕНИЕ

Хронические нарушения сознания (ХНС) – это состояния, развивающиеся после комы в сроки, как правило, более 28 дней после повреждения головного мозга, сопровождающиеся восстановлением бодрствования без проявлений осознанной деятельности. Выделяют основные формы ХНС – вегетативное состояние/синдром ареактивного бодрствования (ВС/САБ) и состояние минимального сознания (СМС) [1]. Миопатия критических состояний (critical illness myopathy, СИМ) возникает у части пациентов, длительно находящихся в критическом состоянии [2], проявляется выраженной слабостью скелетных мышц [3], потерей миофибриллярных волокон [4, 5], разрушением цитоскелета мышечных клеток [6], присутствием некроза [7, 8], пониженной возбудимостью мышечной мембраны [9, 10], нарушением мышечного метаболизма [9, 11], повышенным распадом белка и снижением синтеза белка [12, 13], дисфункцией митохондрий [14, 15]. Стоит отметить, что атрофия, вызванная критическим заболеванием, значительно отличается от атрофии, вызванной иммобилизацией и механической разгрузкой [16]. Основная особенность потери мышечной массы при СИМ заключается в преимущественной потере миофибриллярных и белков, связанных с актином [17–19]. Причины этой особенности остаются неясными, и многие стандартные модели мышечной атрофии, такие как иммерсия или иммобилизация, не могут воспроизвести этот результат. Однако существует модель, в которой используется искусственная вентиляция легких грызунов в сочетании с глубокой анестезией, с использованием которой можно воспроизводить эффекты СИМ [20]. Соответственно, разработка стратегий предотвращения или ограничения потери мышечных белков во время (или после) СИМ является фундаментальной целью будущих методов лечения [19].

В данной работе проведено исследование изменений внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ЕСМ) камбаловидной мышцы у пациентов с ХНС с проявлениями миопатии критических состояний. Внеклеточный матрикс (ЕСМ) скелетных мышц играет решающую роль в физиологической активности мышц. Он состоит из трех основных типов белков: коллагенов, протеогликанов и фибронектина, а также рецепторов и регуляторов, таких как интегрины и матриксные металлопротеиназы [21]. Коллагены образуют сеть ЕСМ, т.е. центральные волокнистые компоненты внеклеточного матрикса [22]. ЕСМ организован в три слоя: эндомизий, представляющий самый внутренний слой, который окружает отдельные мышечные волокна; перимизий, окружающий отдельные пучки мышечных волокон; эпимизий, охватывающий всю мышцу. Все три слоя при этом соединены между собой. Внутримышечная соединительная ткань содержит различные формы коллагенов, а наиболее распространены типы I и III [23, 24]. Эндомизий соединяется с сарколеммой миофибрилл через специализированную базальную мембрану, которая состоит в основном из коллагена IV типа и ламинина [25, 26]. Обнаружено, что концентрация этих двух компонентов различается в зависимости от типа мышечных волокон: медленно сокращающиеся волокна характеризуются значительно более высокими концентрациями коллагена IV, но более низкими концентрациями ламинина [22, 27]. Остальные типы коллагена (II, V, VI, VII, XV, XVIII) в скелетной мышце представлены значительно меньше [27, 28].

Механическая разгрузка приводит к потере мышечных сократительных белков и силы мышечных волокон. Ослабление мышцы сопровождается потерей мышечной массы и уменьшением размеров мышечных клеток. Снижение синтеза белка и усиление его деградации проявляются как в сократительном аппарате, так и во внеклеточном матриксе [22]. Все совокупные данные указывают на то, что изменение внеклеточного матрикса приводит к увеличению жесткости мышц, уменьшению их силы и повышению их восприимчивости к травмам. Таким образом, критически важно создать стратегии вмешательства, направленные на уменьшение этих изменений. Мы предположили, что в условиях хронического нарушения сознания будут наблюдаться значительные изменения структуры и состава ЕСМ. Для проверки этой гипотезы были взяты биопсии камбаловидных мышц у пациентов, пребывающих в палате интенсивной терапии не менее 2 месяцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие мышечных биопсий у пациентов

Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов в хроническом критическом состоянии (на рисунках и в результатах обозначены С1), проходивших лечение в отделении анестезиологии и реанимации Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. профессора А.Л. Поленова – филиала Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова. В исследование были включены пациенты с продолжительностью ХНС не менее 2 месяцев. Критерии исключения: инфекция в области забора биопсийного материала, непереносимость местных анестетиков, индекс массы тела (ИМТ) ниже 15, наличие выраженного системного воспалительного ответа и сепсиса, а также нестабильности витальных функций.

В условиях «малой хирургической операции» осуществлялся забор исследуемой ткани под местной анестезией 1%-ным раствором ропивакаина. Забор биоптатов скелетных мышц проводили в диагностических целях с согласия законных представителей пациентов.

В качестве контроля (на рисунках и в результатах обозначены Con) использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии под местной анестезией. В горизонтальном положении в помещении, предназначенном для хирургических манипуляций, проводили местную анестезию путем внутрикожной инъекции 2%-ного раствора лидокаина над поверхностью задней группы мышц голени. Затем выполняли кожный разрез с помощью однократного хирургического лезвия и производили стерильный забор ткани с помощью биопсийной аспирационной иглы Бергстрема. После извлечения иглы рану обрабатывали гемостатической губкой и закрывали бактерицидным лейкопластырем. После взятия биопсии у пациентов с хроническим критическим состоянием и у здоровых добровольцев мышечная ткань в течение одной минуты замораживалась в жидком азоте для последующих анализов.

Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit («Qiagen», США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы «Синтол» (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17.4 мкМ олиго-d(T)15, 1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 5x-буфер для M-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, «Bio-Rad Laboratories», США). Для проведе-

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Последовательность праймеров (5' – 3')
<i>ColIa</i>	F GATTCCTGGACCTAAAGGTGC R AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA
<i>ColIIIa</i>	F TGGTCTGCAAGGAATGCCTGGA R TCTTTCCTGGGACACCATCAG
<i>ColIV</i>	F TTCCTGTA CTGCAACCCTGGTGAT R ATATCCGATCCACAAACTCCGCCA
<i>ColVIa</i>	F AGCCTACGGAGAGTGCTACA R GTCCTGGGAATCCAATGGGG
<i>CTGF</i>	F CTCCTGCAGGCTAGAGAAGC R GATGCACTTTTTGCCCTTCTT
<i>INTGa7</i>	F CCTGTCCAATGAGAATGCCTCC R TCTACCTCCAGTTCCTGGTCT
<i>INTGβ1</i>	F GGATTCTCCAGAAGGTGGTTTCG R TGCCACCAAGTTTCCCATCTCC
<i>Fibronectin</i>	F ACAACACCGAGGTGACTGAGAC R GGACACAACGATGCTTCCTGAG
<i>GAPDH</i>	F CCAGTATGATTCTACCCACGGC R CGGAGATGATGACCCTTTGGC
<i>Rpl13a</i>	F AGCTCATGAGGCTACGGAAA R CTTGCTCCCAGCTTCCTATG

ния ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (pH 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, «Синтол»). Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию housekeeping генов RPL13a и GAPDH. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы

Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System («Santa Cruz», США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail («Santa Cruz», США), 10 мкг/мл апротинина («SIGMA», США), 10 мкг/мл лейпептина («SIGMA», США), 10 мкг/мл пепстатина («SIGMA», США), «complete Mini Protease Inhibitor Cocktail» (Roche, Швейцария) 20 мкл, фосфоингибиторный коктейль («Santa Cruz», США) 40 мкл.

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы группы С1 загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе

тока 17 мА на гель в мини-системе («Bio-Rad Laboratories») при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot («Bio-Rad Laboratories»). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока («Bio-Rad Laboratories») в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела. В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена («Santa Cruz», США) в разведении 1:50000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner («LI-COR Biotechnology», США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Медиану оптического поглощения (ОП) полос вывешенной группы делили на медиану ОП полос соответствующей контрольной группы, отличия выражали в процентах. Медиану ОП полос контрольной группы принимали за 100%. Статистическая обработка данных вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

Определение коллагена

Гистохимический анализ коллагена проводили в соответствии с Segnani и соавт. [29]. Поперечные замороженные срезы (толщиной 10 мкм) образцов камбаловидной мышцы готовили с помощью криостата Leica CM 1900 (Leica, Брауншвейг, Германия) при -20°C. После этого срезы фиксировали в 4%-ном PFA в течение 20 мин и промывали дистиллированной водой. Затем срезы инкубировали в 0.04%-ном растворе светло-зеленого (Light green SF yellowish (CI 42095), SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH & Co. KG, Гейдельберг, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой в течение 10 мин и инкубировали в 0.1%-ном растворе светло-зеленого с 0.04% Sirius Red (Direct Red 80, «Sigma Aldrich», США) в насыщенной пикриновой кислоте в течение 30 мин. После этого срезы промывали 0.5%-ной соляной кислотой и фотографировали. Срезы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica Q500MC со встроенной цифровой камерой (TCM 300F, Leica, Германия) и объективным увеличением 400x. Компьютерный анализ изображений проводился с использованием специального плагина для ImageJ 1.52a. Общую площадь, занимаемую коллагеном на срезах, рассчитывали и выражали в относительных единицах.

Статистическая обработка данных

Данные представлены как средние \pm SEM. Средние значения всех групп показаны в % от Контроля. Чтобы проверить, были ли различия между группами статистически значимы, учитывая небольшую размер выборки и сравнения между двумя группами, был использован непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Значение p менее 0.05 расценивали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Коллаген является наиболее распространенным белком внеклеточного матрикса (ЕСМ) и выполняет несколько важных функций в скелетных мышцах, включая: обеспечение прочности на растяжение и эластичности; передачу мышечных усилий костям; регуляцию прикрепления и дифференцировки клеток [30, 31]. Эффекты мобилизации на ЕСМ скелетных мышц не совсем однозначны. В ранних исследованиях было показано, что у крыс снижается как активность гидроксилазы, так и содер-

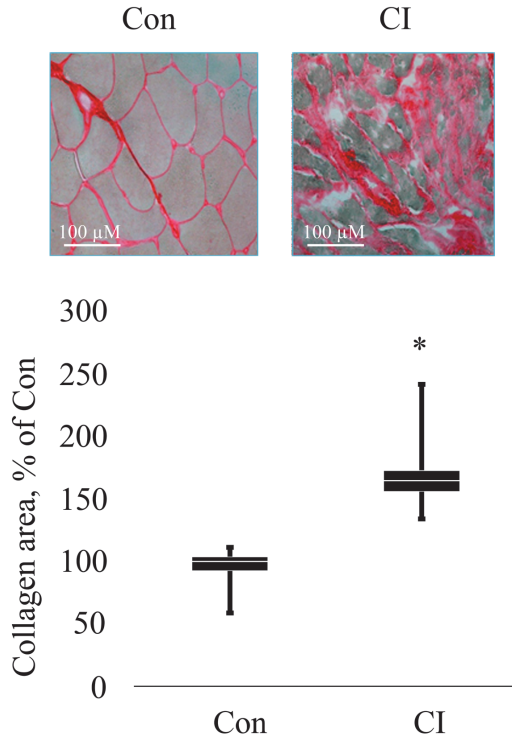


Рис. 1. Окрашивание волокон *m. soleus* на collagen. Con – здоровые люди, CI – критические состояния. * – достоверное отличие от Con ($p < 0.05$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала ($0.25-0.75$) ± минимальное и максимальное значения.

жание гидроксипролина (аминокислота, составляющая collagen) [22, 32, 33]. Позже было обнаружено, что изменения содержания collagenа в ответ на кратковременную иммобилизацию или разгрузку довольно небольшие [34, 35]. Недавние исследования показали, что содержание collagenа I и биомеханические свойства (модуль упругости, максимальное напряжение) фасции голени, окружающей трехглавую мышцу голени крысы, значительно увеличиваются уже после 21-го дня разгрузки задних конечностей [36]. В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории, было показано, что collagen снижает свою экспрессию после 7 и 21 суток ограничения подвижности [37], а также после 14-суточного антиортостатического вывешивания грызунов [38]. У людей иммуногистохимическое окрашивание не выявило изменений в плотности сети collagenа I после 60 дней постельного режима [39], также не было выявлено изменений в содержании тотального collagenа [40]. В данной работе содержание collagenа, измеренное на срезах камбаловидной мышцы, у пациентов с СИМ на 82% превышало значения контроля (рис. 1). Помимо изменения, потери или нарушения некоторых специфических компонентов ESM в физиологических и патологических состояниях, жесткость ESM сама по себе, по-видимому, является важным фактором, регулирующим рост и функцию мышечных клеток [41]. Покоящиеся скелетные мышцы и мышечные трубки в культуре демонстрируют одинаковую упругую жесткость, тогда как старые и дистрофические мышцы в несколько раз жестче [42]. Причиной таких изменений является повышенное накопление внеклеточного матрикса, особенно отложение collagenа фибробластами в результате повторяющихся событий мышечной дегенерации-регенерации [41].

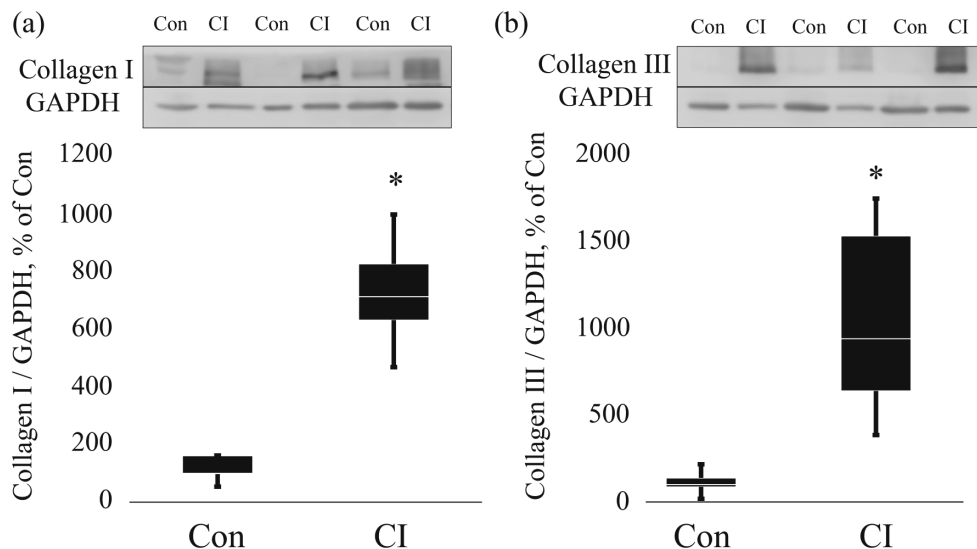


Рис. 2. Содержание коллагена I (a) и коллагена III (b). Con – здоровые люди, CI – критические состояния. * – достоверное отличие от Con ($p < 0.05$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (0.25–0.75) ± минимальное и максимальное значения.

Ранее было изучено содержание мРНК коллагена I в камбаловидной мышце в экспериментах по вывешиванию задних конечностей и обнаружено выраженное снижение экспрессии на третий день, которое сменилось восстановлением до контрольного уровня к седьмым суткам вывешивания [43]. В свою очередь, экспрессия мРНК коллагена III в камбаловидной мышце снизилась после семи дней вывешивания [38]. Экспрессия мРНК коллагенов различного типа также снижалась в скелетной мышце после 5 суток сухой иммерсии [44]. В этой работе мы наблюдали достоверное увеличение содержания коллагенов I и III в камбаловидной мышце пациентов с СИМ на 534% и 832% соответственно (рис. 2a, b).

Также нами было проведено изучение экспрессии мРНК коллагенов разного типа. Мы наблюдали достоверное увеличение содержания мРНК коллагена I, III и VIa (рис. 3a, b, e). При этом экспрессия коллагена II и IV не изменялась (рис. 3b, d).

Фактор роста соединительной ткани (CTGF) представляет собой белок, участвующий в различных критических биологических процессах, особенно во время эмбрионального развития, где он экспрессируется в высокой степени. Во взрослом возрасте экспрессия CTGF минимальна в большинстве тканей, однако его уровни повышаются при повреждении тканей и различных патологических состояниях [45–47]. Мы предположили, что фиброз скелетных мышц в условиях СИМ связан именно с этим фактором роста. Однако мы не обнаружили увеличения экспрессии CTGF (рис. 4a). Кроме того, не было обнаружено изменения экспрессии мРНК другого важного белка ЕСМ – фибронектина (рис. 5b).

Внеклеточные домены интегринов встроены во внеклеточный матрикс, тогда как внутриклеточный домен связывает талин и винкулин, косвенно соединяя интегрины с α -актинином в саркомере [48]. В скелетных мышцах изоформы интегрин различаются в зависимости от развития, при этом изоформа $\alpha 7\beta 1D$ является первичной изоформой у взрослых костягеров; уровни и изоформы изменяются при физических нагрузках и при миопатиях [48–50]. Исследования также показали, что интегрины могут напрямую регулировать пролиферацию и дифференцировку сателлитных клеток,

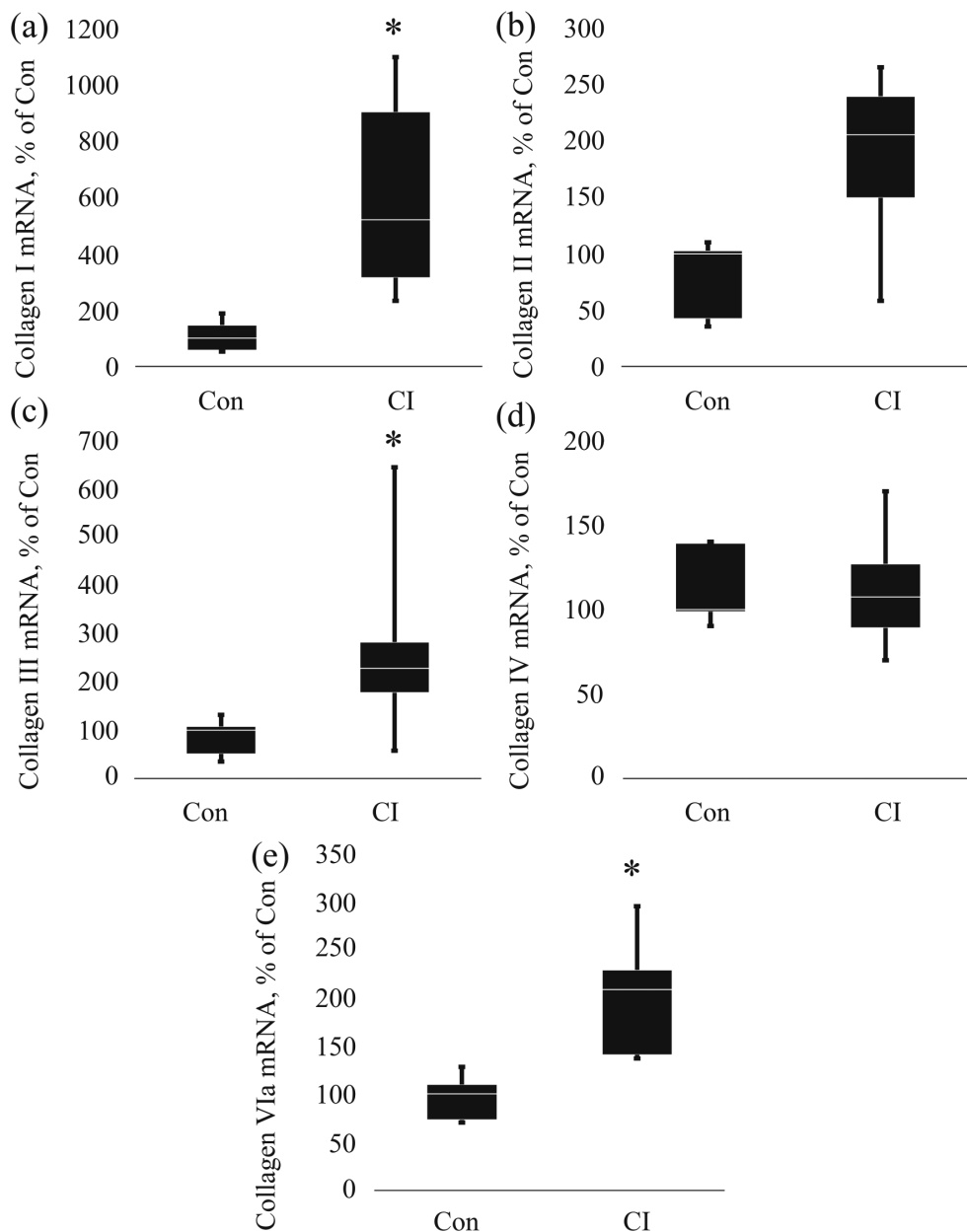


Рис. 3. Содержание мРНК коллагена I (а), коллагена II (б), коллагена III (с), коллагена IV (д), коллагена VIa (е). Con – здоровые люди, CI – критические состояния. * – достоверное отличие от Con ($p < 0.05$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (0.25–0.75) ± минимальное и максимальное значения.

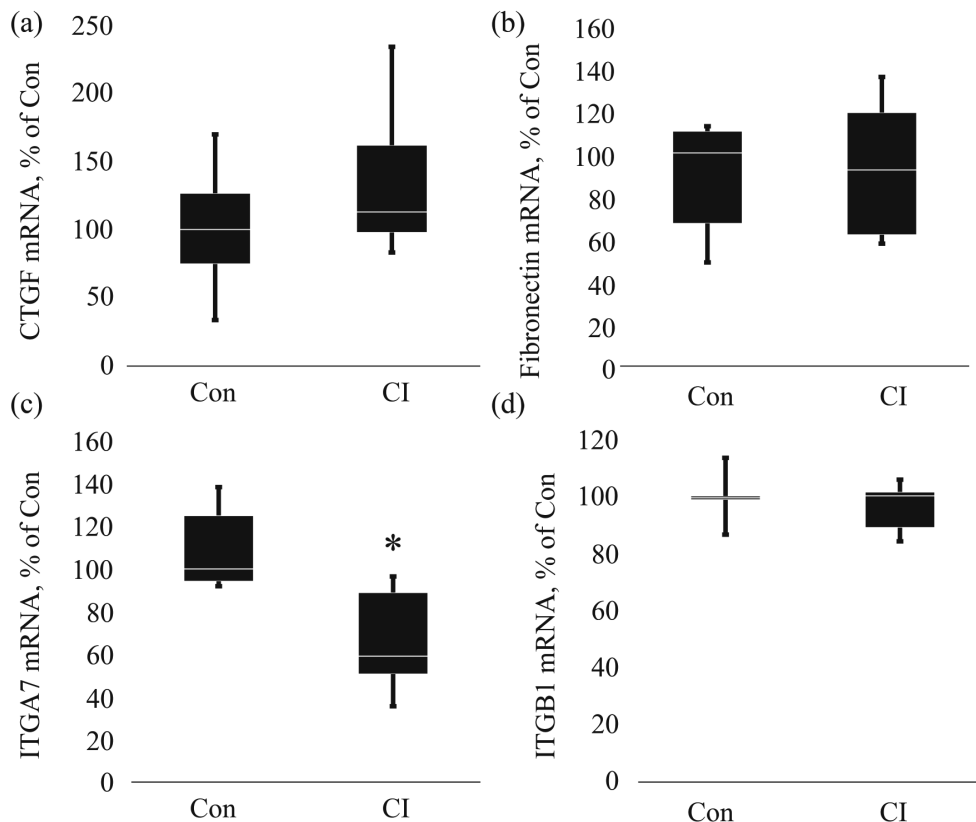


Рис. 4. Содержание мРНК фактора роста соединительной ткани – CTGF (а), фибронектина (б), субъединицы интегрина А7 (с), субъединицы интегрина В1 (д). Con – здоровые люди, CI – критические состояния. * – достоверное отличие от Con ($p < 0.05$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (0.25–0.75) ± минимальное и максимальное значения.

перестройку ЕСМ, а также поддержание физиологической активности и гомеостаза сателлитных клеток [51–53]. Изучение содержания мРНК субъединиц интегринов показало достоверное снижение экспрессии на 40% только для субъединицы А7 (рис. 4с, д).

Иммобилизация обычно приводит к снижению активности ферментов биосинтеза коллагена в скелетных мышцах [34, 54], это позволяет предположить, что биосинтез коллагеновой сети снижается в результате снижения мышечной активности [55, 56]. Скорость общего синтеза коллагена зависит главным образом от общего белкового баланса ткани, но, по-видимому, на нее положительно влияет растяжение мышц [34, 54–56]. В случае же длительного хронического нарушения сознания мы наблюдали значительное увеличение содержания компонентов ЕСМ при существенном уменьшении размера мышечных волокон [57]. Это сопровождается значительным увеличением синтеза мРНК коллагенов I, III и VIa. Также можно предположить, что эффект фиброза связан со снижением оборота коллагенов вместе со снижением активности убиквитинлигаз [57], что приводит к чрезмерному накоплению соединительной ткани и сопутствующему увеличению неферментативного сшивания коллагеновых волокон [58–61]. Исследования на животных показывают, что возникающий фиброзный фенотип сопровождается значительным увеличением мышечной жесткости [42, 62], что связано с изменением механотрансдукции, а также хемотаксическими и воспалительными реакциями [61, 63].

Таким образом, исследование внеклеточного матрикса у пациентов с ХНС выявило значительное увеличение экспрессии коллагенов I, III и VIa, наряду с пониженной экспрессией одной из субъединиц интегринов, что может быть связано со снижением распада коллагена в условиях хронического нарушения сознания и, как следствие, приводящее к развитию фиброза мышечной ткани.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают глубокую благодарность Е. М. Ледневу и Т. Ф. Вепхвадзе за проведение игольчатой биопсии, Куканову К. К., Войнову Н. Е. за выполнение забора биопсионного материала у исследуемой группы больных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента Б. С. Ш., А. Н. К., Ю. М. З., С. А. К. Сбор материала биопсии С. А. К., Е. Н. С. Сбор данных С. А. Т., Е. Н. С., К. А. З., О. Н. Т. Обработка данных С. А. Т., К. А. З., О. Н. Т. Написание и редактирование манускрипта С. А. Т., Б. С. Ш., Е. А. К., С. А. К., Ю. М. З.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект 22-25-00615). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены локальным Этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, протокол № 1411-20 от 16 ноября 2020 г. Забор биоптатов скелетных мышц проводили в диагностических целях с согласия законных представителей пациентов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирадов МА, Супонева НА, Вознюк ИА, Кондратьев АН, Щеголев АВ, Белкин АА, Зайцев ОС, Пряников ИВ, Петрова МВ, Иванова НЕ, Гнедовская ЕВ, Рябинкина ЮВ, Сергеев ДВ, Язева ЕГ, Легостаева ЛА, Фуфаева ЕВ, Петриков СС (2020) Хронические нарушения сознания: терминология и диагностические критерии. Результаты первого заседания Российской рабочей группы по проблемам хронических нарушений сознания. *Анналы неврол* 14(1): 5–16. [Piradov MA, Suponeva NA, Voznyuk IA, Kondratyev AN, Shchegolev AV, Belkin AA, Zaitsev OS, Pryanikov IV, Petrova MV, Ivanova NE, Gnedovskaya EV, Ryabinkina YuV, Sergeev DV, Iazeva EG, Legostaeva LA, Fufaeva EV, Petrikov SS (2020) Chronic disorders of consciousness: terminology and diagnostic criteria. The results of the first meeting of the Russian Working Group for Chronic Disorders of Consciousness. *Annu Clin Exp Neurol* 14(1): 5–16. (In Russ)].
<https://doi.org/10.25692/ACEN.2020.1.1>
2. Larsson L, Friedrich O (2016) Critical Illness Myopathy (CIM) and Ventilator-Induced Diaphragm Muscle Dysfunction (VIDD): Acquired Myopathies Affecting Contractile Proteins. *Compr Physiol* 7(1): 105–112.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150054>
3. Friedrich O, Diermeier S, Larsson L (2018) Weak by the machines: muscle motor protein dysfunction – a side effect of intensive care unit treatment. *Acta Physiol (Oxf)* 222(1).
<https://doi.org/10.1111/apha.12885>

4. Larsson L, Li X, Edstrom L, Eriksson LI, Zackrisson H, Argentini C, Schiaffino S (2000) Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels. *Crit Care Med* 28(1): 34–45.
<https://doi.org/10.1097/00003246-200001000-00006>
5. Derde S, Hermans G, Derese I, Guiza F, Hedstrom Y, Wouters PJ, Bruyninckx F, D'Hoore A, Larsson L, Van den Berghe G, Vanhorebeek I (2012) Muscle atrophy and preferential loss of myosin in prolonged critically ill patients. *Crit Care Med* 40(1): 79–89.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31822d7c18>
6. Shepherd S, Batra A, Lerner DP (2017) Review of Critical Illness Myopathy and Neuropathy. *Neurohospitalist* 7(1): 41–48.
<https://doi.org/10.1177/1941874416663279>
7. Kress JP, Hall JB (2014) ICU-acquired weakness and recovery from critical illness. *N Engl J Med* 370(17): 1626–1635.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1209390>
8. Ramsay DA, Zochodne DW, Robertson DM, Nag S, Ludwin SK (1993) A syndrome of acute severe muscle necrosis in intensive care unit patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 52(4): 387–398.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199307000-00006>
9. Kalamgi RC, Larsson L (2016) Mechanical Signaling in the Pathophysiology of Critical Illness Myopathy. *Front Physiol* 7(23).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00023>
10. Rich MM, Pinter MJ, Kraner SD, Barchi RL (1998) Loss of electrical excitability in an animal model of acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol* 43(2): 171–179.
<https://doi.org/10.1002/ana.410430207>
11. Lyu Q, Wen Y, Zhang X, Addinsall AB, Cacciani N, Larsson L (2021) Multi-omics reveals age-related differences in the diaphragm response to mechanical ventilation: a pilot study. *Skelet Muscle* 11(1): 11.
<https://doi.org/10.1186/s13395-021-00267-4>
12. Hermans G, De Jonghe B, Bruyninckx F, Van den Berghe G (2008) Clinical review: Critical illness polyneuropathy and myopathy. *Crit Care* 12(6): 238.
<https://doi.org/10.1186/cc7100>
13. Kanova M, Kohout P (2022) Molecular Mechanisms Underlying Intensive Care Unit-Acquired Weakness and Sarcopenia. *Int J Mol Sci* 23(15): 8396.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158396>
14. Jiroutkova K, Krajcova A, Ziak J, Fric M, Waldauf P, Dzupa V, Gojda J, Nemcova-Furstova V, Kovar J, Elkalaf M, Trnka J, Duska F (2015) Mitochondrial function in skeletal muscle of patients with protracted critical illness and ICU-acquired weakness. *Crit Care* 19: 448.
<https://doi.org/10.1186/s13054-015-1160-x>
15. McClave SA, Wischmeyer PE, Miller KR, van Zanten ARH (2019) Mitochondrial Dysfunction in Critical Illness: Implications for Nutritional Therapy. *Curr Nutr Rep* 8(4): 363–373.
<https://doi.org/10.1007/s13668-019-00296-y>
16. Zink W, Kollmar R, Schwab S (2009) Critical illness polyneuropathy and myopathy in the intensive care unit. *Nat Rev Neurol* 5(7): 372–379.
<https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.75>
17. Friedrich O, Reid MB, Van den Berghe G, Vanhorebeek I, Hermans G, Rich MM, Larsson L (2015) The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol Rev* 95(3): 1025–1109.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2014>
18. Puthuchery ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, Hopkinson NS, Phadke R, Dew T, Sidhu PS, Velloso C, Seymour J, Agley CC, Selby A, Limb M, Edwards LM, Smith K, Rowlerson A, Rennie MJ, Moxham J, Harridge SD, Hart N, Montgomery HE (2013) Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA* 310(15): 1591–1600.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.278481>
19. Batt J, Herridge MS, Dos Santos CC (2019) From skeletal muscle weakness to functional outcomes following critical illness: a translational biology perspective. *Thorax* 74(11): 1091–1098.
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208312>
20. Ochala J, Gustafson AM, Diez ML, Renaud G, Li M, Aare S, Qaisar R, Banduseela VC, Hedstrom Y, Tang X, Dworkin B, Ford GC, Nair KS, Perera S, Gautel M, Larsson L (2011) Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *J Physiol* 589(Pt 8): 2007–2026.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202044>
21. Zhang W, Liu Y, Zhang H (2021) Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. *Cell and Biosci* 11(1): 65.
<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00579-4>

22. *Csapo R, Gumpenberger M, Wessner B* (2020) Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front Physiol* 11: (253).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00253>
23. *Gillies AR, Lieber RL* (2011) Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 44(3): 318–331.
<https://doi.org/10.1002/mus.22094>
24. *Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne FJ, Bailey AJ* (1977) The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 79(2): 248–252.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80797-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80797-7)
25. *Martin GR, Timpl R* (1987) Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol* 3: 57–85.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.000421>
26. *Sanes JR* (1982) Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol* 93(2): 442–451.
<https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.442>
27. *Kovanen V* (2002) Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev* 30(1): 20–25.
<https://doi.org/10.1097/00003677-200201000-00005>
28. *Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Lehto M, Vuorio E* (1991) Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. *Lab Invest* 64(1): 76–84.
29. *Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Pellegrini C, Blandizzi C, Dolfi A, Bernardini N* (2015) Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS One* 10(12): e0144630.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144630>
30. *Laurent GJ* (1987) Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 252(1 Pt 1): C1–C9.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.252.1.C1>
31. *Minor RR* (1980) Collagen metabolism: a comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am J Pathol* 98(1): 225–280.
32. *Karpakka J, Vaananen K, Orava S, Takala TE* (1990) The effects of preimmobilization training and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *Int J Sports Med* 11(6): 484–488.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-1024842>
33. *Karpakka J, Virtanen P, Vaananen K, Orava S, Takala TE* (1991) Collagen synthesis in rat skeletal muscle during immobilization and remobilization. *J Appl Physiol* (1985) 70(4): 1775–1780.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1991.70.4.1775>
34. *Savolainen J, Vaananen K, Puranen J, Takala TE, Komulainen J, Vihko V* (1988) Collagen synthesis and proteolytic activities in rat skeletal muscles: effect of cast-immobilization in the lengthened and shortened positions. *Arch Phys Med Rehabil* 69(11): 964–969.
35. *Haus JM, Carrithers JA, Carroll CC, Tesch PA, Trappe TA* (2007) Contractile and connective tissue protein content of human skeletal muscle: effects of 35 and 90 days of simulated microgravity and exercise countermeasures. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(4): R1722–R1727.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00292.2007>
36. *Huang Y, Fan Y, Salanova M, Yang X, Sun L, Blottner D* (2018) Effects of Plantar Vibration on Bone and Deep Fascia in a Rat Hindlimb Unloading Model of Disuse. *Front Physiol* 9: 616.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00616>
37. *Tyganov SA, Belova SP, Turtikova OV, Vikhlyantsev IM, Nemirovskaya TL, Shenkman BS* (2023) Changes in the Mechanical Properties of Fast and Slow Skeletal Muscle after 7 and 21 Days of Restricted Activity in Rats. *Int J Mol Sci* 24(4): 4141.
<https://doi.org/10.3390/ijms24044141>
38. *Tyganov SA, Mochalova EP, Melnikov IY, Vikhlyantsev IM, Ulanova AD, Sharlo KA, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2021) NOS-dependent effects of plantar mechanical stimulation on mechanical characteristics and cytoskeletal proteins in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *FASEB J* 35(10): e21905.
<https://doi.org/10.1096/fj.202100783R>
39. *Schoenrock B, Zander V, Dern S, Limper U, Mulder E, Veraksits A, Viir R, Kramer A, Stokes MJ, Salanova M, Pejpsi A, Blottner D* (2018) Bed Rest, Exercise Countermeasure and Reconditioning Effects on the Human Resting Muscle Tone System. *Front Physiol* 9: 810.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00810>
40. *Lemoine JK, Haus JM, Trappe SW, Trappe TA* (2009) Muscle proteins during 60-day bedrest in women: impact of exercise or nutrition. *Muscle Nerve* 39(4): 463–471.
<https://doi.org/10.1002/mus.21189>

41. *Grzelkowska-Kowalczyk K* (2016) The Importance of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development and Function; Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/62230>
42. *Yin H, Price F, Rudnicki MA* (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93(1): 23–67.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
43. *Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N* (2008) TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *J Appl Physiol* (1985) 104(1): 170–177.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00463.2006>
44. *Guilhot C, Fovet T, Delobel P, Dargegen M, Jasmin BJ, Brioche T, Chopard A, Py G* (2022) Severe Muscle Deconditioning Triggers Early Extracellular Matrix Remodeling and Resident Stem Cell Differentiation into Adipocytes in Healthy Men. *Int J Mol Sci* 23(10): 5489.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105489>
45. *Ramazani Y, Knops N, Elmonem MA, Nguyen TQ, Arcolino FO, van den Heuvel L, Levtschenko E, Kuypers D, Goldschmeding R* (2018) Connective tissue growth factor (CTGF) from basics to clinics. *Matrix Biol* 68-69: 44–66.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.007>
46. *Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ* (2009) Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal* 3(2): 89–94.
<https://doi.org/10.1007/s12079-009-0037-7>
47. *Rebolledo DL, Lipson KE, Brandan E* (2021) Driving fibrosis in neuromuscular diseases: Role and regulation of Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF). *Matrix Biol Plus* 6: 11: 100059.
<https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100059>
48. *Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC* (2017) Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* 7(3): 891–944.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>
49. *Sun M, Opavsky MA, Stewart DJ, Rabinovitch M, Dawood F, Wen WH, Liu PP* (2003) Temporal response and localization of integrins beta1 and beta3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines. *Circulation* 107(7): 1046–1052.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000051363.86009.3c>
50. *Docheva D, Popov C, Alberton P, Aszodi A* (2014) Integrin signaling in skeletal development and function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102(1): 13–36.
<https://doi.org/10.1002/bdrc.21059>
51. *Zhang H, Liu Y, Li C, Zhang W* (2022) ITGbeta6 Facilitates Skeletal Muscle Development by Maintaining the Properties and Cytoskeleton Stability of Satellite Cells. *Life (Basel)* 12(7): 926.
<https://doi.org/10.3390/life12070926>
52. *McClure MJ, Ramey AN, Rashid M, Boyan BD, Schwartz Z* (2019) Integrin-alpha7 signaling regulates connexin 43, M-cadherin, and myoblast fusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 316(6): C876–C887.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2018>
53. *Bayer ML, Svensson RB, Schjerling P, Williams AS, Wasserman DH, Kjaer M* (2020) Influence of the integrin alpha-1 subunit and its relationship with high-fat diet upon extracellular matrix synthesis in skeletal muscle and tendon. *Cell and Tissue Res* 381(1): 177–187.
<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03184-y>
54. *Savolainen J, Myllyla V, Myllyla R, Vihko V, Vaananen K, Takala TE* (1988) Effects of denervation and immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscle and tendon. *Am J Physiol* 254(6 Pt 2): R897–R902.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.254.6.R897>
55. *Edom-Vovard F, Schuler B, Bonnin MA, Teillet MA, Duprez D* (2002) Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol* 247(2): 351–366.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0707>
56. *Kjaer M* (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84(2): 649–698.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2003>
57. *Tyganov SA, Zaripova KA, Turtikova OV, Skiteva EN, Belova SP, Zabrodskaya YM, Kondratiev SA, Kondratieva EA, Kondratiev AN, Shenkman BS* (2023) Desmin degradation in the skeletal muscle of patients with chronic critical illness. *J Evol Biochem Physiol*.
58. *Kragstrup TW, Kjaer M, Mackey AL* (2011) Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci in Sports* 21(6): 749–757.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2011.01377.x>

59. *Csapo R, Malis V, Sinha U, Du J, Sinha S* (2014) Age-associated differences in triceps surae muscle composition and strength – an MRI-based cross-sectional comparison of contractile, adipose and connective tissue. *BMC Musculoskelet Disord* 15: 209.
<https://doi.org/10.1186/1471-2474-15-209>
60. *Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA* (2007) Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 103(6): 2068–2076.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00670.2007>
61. *Gumpenberger M, Wessner B, Graf A, Narici MV, Fink C, Braun S, Hoser C, Blazevich AJ, Csapo R* (2020) Remodeling the Skeletal Muscle Extracellular Matrix in Older Age-Effects of Acute Exercise Stimuli on Gene Expression. *Int J Mol Sci* 21(19): 7089.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197089>
62. *Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Claflin DR, Brooks SV* (2014) Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol* (1985) 117(4): 363–369.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00256.2014>
63. *Silver FH, DeVore D, Siperko LM* (2003) Invited Review: Role of mechanophysiology in aging of ECM: effects of changes in mechanochemical transduction. *J Appl Physiol* (1985) 95(5): 2134–2141.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00429.2003>

Desmin Degradation in the Skeletal Muscle of Patients with Chronic Critical Illness

**K. A. Zaripova^a, S. A. Tyganov^{a,*}, O. V. Turtikova^a, E. N. Skiteva^{a,b},
Y. M. Zabrodska^{a,b,c,d}, S. A. Kondratiev^e, E. A. Kondratieva^{b,d}, A. N. Kondratiev^b,
and B. S. Shenkman^a**

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

^b*Department of Anesthesiology and Intensive Care of the Russian National Institute of Chemistry, Saint Petersburg, Russia*

^c*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia*

^d*S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia*

^e*AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol Cyprus*

**e-mail: s.a.tyganov@gmail.com*

Critical illness myopathy (CIM) is a primary myopathy that develops in critically ill patients. Histologic features of CIM include a general decrease in muscle fiber cross-sectional area and a predominant loss of the motor protein myosin. These features are observed in the absence of inflammatory infiltrates but with detectable cytokine activation. The purpose of this study was to examine the state of the extracellular matrix of the human soleus muscle under conditions of CIM caused by chronic impairment of consciousness. Incisional muscle biopsies were taken from the soleus muscle of 6 patients who were in a chronic critical condition and were treated in the Department of Anesthesiology and Reanimation at the A.L. Polenov Russian Research Institute - branch of the Almazov National Medical Research Center. The study included patients with a chronic impairment of consciousness lasting at least 2 months. Muscle biopsies taken from healthy men were used as controls. The biopsies were obtained using needle biopsy under local anesthesia. Using histological staining of tissue sections, it was determined that patients with CIM exhibited a significant increase in collagen area, surpassing the control value by 82%. An increased mRNA content of collagens I, III, and VIa was also observed, along with an increase in the protein content of collagen I and III. At the same time, we did not observe any changes in the content of fibronectin and extracellular tissue growth factor mRNA. However, we did observe an increase in the mRNA of the integrin A7 subunit. The results obtained indicate significant skeletal muscle fibrosis under CIM conditions. Further studies on the signaling pathways that regulate this process are needed.

Keywords: chronic critical illness, skeletal muscle, critical illness myopathy, extracellular matrix, collagen