

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 6

июнь

2023



СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Механизмы физиологического ангиогенеза

А. Н. Иванов, Ю. Р. Чаббаров

703

Экспериментальные статьи

Влияние метаболита микробиоты – масляной кислоты на двигательную координацию, силу мышц и уровень окислительного стресса в скелетных мышцах при дисбиозе у мышей

*О. В. Яковлева, А. И. Муллакаева, А. Ф. Салихзянова,
Д. М. Сорокина, Г. Ф. Ситдикова*

723

Сравнительный анализ экспрессии факторов фиброза в сердечной ткани крыс Sprague-Dawley и Wistar при развитии хронической почечной недостаточности

*Н. И. Агалакова, Е. В. Михайлова, А. А. Пьянков, О. В. Надей,
И. А. Ершов, М. М. Галагудза, А. Я. Багров, И. В. Романова*

737

Вазоактивное и нейропротекторное действие ингибитора с-Jun-N-терминальных киназ у крыс с хронической гипоперфузией головного мозга

*С. Ю. Жилев, Т. Ф. Платонова, А. И. Хлебников,
И. А. Щепёткин, И. Т. Демченко, Д. Н. Аточин*

749

Влияние озона на кислородсвязывающие свойства крови и ее прооксидантно-антиоксидантный баланс в условиях воздействия на H₂S-генерирующую систему

В. В. Зинчук, Е. С. Билецкая

760

Кардиопротективное действие соевого белка при высокосолевого диете у яванских макак

*А. Н. Куликов, О. Н. Береснева, Г. Т. Иванова, М. М. Парастаева,
Е. О. Богданова, И. Г. Каюков, А. Г. Кучер, С. В. Орлов*

771

Влияние гибернации на электрическую активность и калиевые токи в миокарде длиннохвостого суслика

Т. С. Филатова, Д. В. Абрамочкин

788

Электрическая эпидуральная стимуляция спинного мозга децеребрированной крысы

*П. Ю. Шкорбатова, В. А. Ляховецкий, О. В. Горский, Н. В. Павлова,
Е. Ю. Баженова, Д. С. Калинина, П. Е. Мусиенко, Н. С. Меркульева*

798

CONTENTS

Reviews

- Mechanisms of Physiological Angiogenesis
A. N. Ivanov and Yu. R. Chabbarov 703
-

Experimental Articles

- The Effect of the Microbiota Metabolite – Butyric Acid on Motor Coordination, Muscle Strength and the Level of Oxidative Stress in Skeletal Muscles in Mice with Dysbiosis
O. V. Yakovleva, A. I. Mullakaeva, A. F. Salikhzyanova, D. M. Sorokina, and G. F. Sitdikova 723
- Comparative Analysis of the Fibrosis Factors Expression in the Heart Tissue of Sprague–Dawley and Wistar Rats during Development of Chronic Renal Failure
N. I. Agalakova, E. V. Mikhailova, A. A. Piankov, O. V. Nadei, I. A. Ershov, M. V. Galagudza, A. Y. Bagrov, and I. V. Romanova 737
- Vasoactive and Neuroprotective Action of c-Jun-N-Terminal Kinases Inhibitor in Rats with Chronic Brain Hypoperfusion
S. Yu. Zhilyaev, T. F. Platonova, A. I. Khlebnikov, I. A. Schepetkin, I. T. Demchenko, and D. N. Atochin 749
- Impact of Ozone on the Oxygen Affinity Blood Properties and Prooxidant–Antioxidant Balance under Effect of H₂S-Generating System
V. V. Zinchuk and E. S. Biletskaya 760
- Cardioprotective Effect of Soy Protein on a High-Salt Diet in Cynomolgus Monkeys
A. N. Kulikov, O. N. Beresneva, G. T. Ivanova, M. M. Parastaeva, E. O. Bogdanova, I. G. Kayukov, A. G. Kucher, and S. V. Orlov 771
- The Influence of Hibernation on Electrical Activity and Potassium Currents in Myocardium of Long-Tailed Ground Squirrel
T. S. Filatova and D. V. Abramochkin 788
- Electric Epidural Stimulation of the Spinal Cord of the Decerebrated Rat
P. Yu. Shkorbatova, V. A. Lyakhovetskii, O. V. Gorsky, N. V. Pavlova, E. Yu. Bazhenova, D. S. Kalinina, P. E. Musienko, and N. S. Merkul'yeva 798
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МЕХАНИЗМЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНГИОГЕНЕЗА

© 2023 г. А. Н. Иванов¹, Ю. Р. Чаббаров¹, *

¹*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
Саратов, Россия*

**E-mail: chabbarov@bk.ru*

Поступила в редакцию 12.03.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 07.05.2023 г.

Ангиогенез представляет собой образование новых кровеносных сосудов из уже существующих для удовлетворения потребности ткани в перфузии. Во взрослом организме это часто реализуется в процессе роста и регенерации организма. Ангиогенез привлекает внимание исследователей с позиции его терапевтической регуляции: усиление может способствовать существенному прогрессу в терапии ишемических заболеваний, а ингибирование активно изучается для лечения опухолевых заболеваний. Регуляция ангиогенеза невозможна без точных знаний его механизмов. Ангиогенез осуществляется либо путем миграции эндотелиальных клеток существующего сосуда во внеклеточный матрикс для формирования сосуда по направлению ангиогенных стимулов, либо путем разделения сформированного сосуда на два новых в результате образования перегородки, отграничивающей два самостоятельных просвета. В данном обзоре рассматриваются основные этапы каждого из видов физиологического ангиогенеза, их механизмы и регуляция.

Ключевые слова: ангиогенез, эндотелиальные клетки, факторы роста, микроциркуляция, кровеносный сосуд, регуляция ангиогенеза, механизмы ангиогенеза

DOI: 10.31857/S0869813923060043, **EDN:** WHBLCG

ВВЕДЕНИЕ

Ангиогенез — это формирование новых кровеносных сосудов из уже существующих, что отличает его от васкулогенеза, характеризующегося образованием сосудов *de novo* с участием ангиобластов во время эмбрионального развития или эндотелиальных клеток-предшественниц постнатально [1]. За последние два десятилетия существенно возрос и продолжает расти интерес к разработке методов лечения, нацеленных на ангиогенез. Выделяют два основных направления такого подхода: стимуляция ангиогенеза и антиангиогенная терапия. Стимуляция ангиогенеза, направленная на восстановление сниженной перфузии ткани, рассматривается как потенциальный способ лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и хронических ишемических процессов [2]. Главной точкой приложения антиангиогенной терапии являются злокачественные новообразования, рост которых невозможен без формирования новых сосудов [3]. Разработка направленных на ангиогенез методов лечения особенно актуальна с учетом того, что ишемические и онкологические заболевания являются причиной большинства смертей и случаев инвалидности в Российской Федерации [4]. Все методы терапевтического воздействия на ангиогенез фокусируются на определенных звеньях его регуляции, имен-

но поэтому понимание механизмов ангиогенеза является ключом к успеху. Цель данного обзора – систематизация современной информации об этапах физиологического ангиогенеза, их механизмах и регуляции.

ИНДУКЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА

Физиологический ангиогенез является важнейшим условием роста и развития органов и тканей, а также осуществления компенсаторно-приспособительных процессов, в особенности регенерации [1]. Основными участниками ангиогенеза являются регулирующие его молекулы и эффекторные клетки. Паттерны экспрессии и секреции ангиогенных молекул зависят от множества факторов, включая индивидуальные генетические особенности организма, эпигенетические регуляторы (особое внимание исследователи уделяют микроРНК), особенности экспрессии и строения клеточных рецепторов и функционирование сигнальных путей. Основными эффекторными клетками ангиогенеза являются эндотелиальные клетки (ЭК); также участвуют перициты, гладкомышечные клетки, фибробласты, макрофаги. Фенотип клеток может меняться под воздействием множества модифицируемых и немодифицируемых факторов внутренней и внешней среды. В зависимости от этого динамически меняется способность клеток отвечать на определенные стимулы, что также влияет на процесс ангиогенеза. Таким образом, регуляция ангиогенеза является многоуровневым процессом. Подход к изучению механизмов регуляции ангиогенеза должен включать методы геномики, эпигеномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики (мультиомный подход). Подходы, направленные на терапевтическую модуляцию ангиогенеза, могут быть нацелены на каждый из уровней регуляции [5, 6].

Пусковым механизмом физиологического ангиогенеза является снижение тканевой концентрации кислорода, при котором усиливается синтез индуцируемых гипоксией факторов. Ключевым регулятором клеточного ответа на гипоксию является семейство транскрипционных факторов HIF, причем особенно важен HIF-1 α , активирующий сигнальные пути адаптации, которые переключают метаболизм клеток для повышения их жизнеспособности в условиях гипоперфузии [7]. HIF-1 α взаимодействует с энхансерами, активируя таким образом транскрипцию более 100 нижестоящих генов, которые регулируют синтез ферментов гликолиза, эритропоэтина и множества факторов роста [8]. Быстрый и эффективный переход на гликолиз является важнейшим условием адаптации ЭК к ишемии и участия в ангиогенезе. Активация гликолиза в ЭК осуществляется путем повышения экспрессии 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3 (PFKFB3) и активатора фосфофруктокиназы-1 [9]. Факторы роста представляют собой белковые сигнальные молекулы, стимулирующие рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. Некоторые из них являются важнейшими регуляторами ангиогенеза и называются ангиогенные факторы роста (АФР). АФР и связанные с ними сигнальные пути играют ключевую роль в активации, регуляции и затухании ангиогенных процессов [10].

Важнейшим АФР, участвующим в регуляции почти всех этапов физиологического ангиогенеза, является семейство сосудистого эндотелиального фактора роста, состоящее из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F и PlGF и рецепторов VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 [8]. VEGF секретируется ЭК, перицитами, гладкомышечными клетками, лейкоцитами, клетками стромы и паренхимы органов и влияет почти на все процессы ангиогенеза [10]. VEGF-A является ключевым звеном сигнального пути VEGF/VEGFR и играет основную роль в начальных процессах ангиогенеза: повышает проницаемость сосудов, стимулирует дифференцировку, пролиферацию и миграцию ЭК [11]. Данные функции реализуются при вза-

имедействии VEGF с VEGFR-1 и дальнейшей активации различных сигнальных путей, включая PI3K/Akt (фосфоинозитид-3-киназа/ протеинкиназа В) и MAPK/ERK (митоген-активируемая протеинкиназа/киназа, регулируемая внеклеточным сигналом), которые запускают миграцию клеток, высвобождение протеолитических ферментов во внеклеточный матрикс (ВКМ) и высвобождение воспалительных цитокинов, многие из которых обладают проангиогенным эффектом. В результате связывания VEGF с внеклеточным доменом VEGFR-2 активируются пути PLC γ /PKC (фосфолипазы-С γ /протеинкиназы С) и MAPK/ERK, что приводит к активации пролиферации ЭК [11]. Другим важным для ангиогенеза рецептором VEGF является VEGFR-2, запускающий высвобождение NO путем активации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) с участием пути PI3K/AKT [12]. Существует несколько изоформ VEGF-A, образующихся в результате альтернативного сплайсинга, который определяет количество аминокислот в составе белка, что отражается в названии изоформы [13]. В контексте ангиогенеза наибольший интерес представляет VEGF121, VEGF165 и VEGF189, хотя существуют и другие изоформы. Основное их отличие заключается в количестве гепарин-связывающих доменов, с помощью которых факторы роста закрепляются во внеклеточном матриксе посредством связывания с протеогликанами гепарансульфата внеклеточного матрикса [14]. VEGF189 имеет в своем составе два таких домена, VEGF165 – один, а изоформа VEGF-121 – ни одного, поэтому неспособна к прочному и длительному закреплению во внеклеточном матриксе [8]. Связывание VEGF и других АФР с внеклеточным матриксом необходимо, поскольку их эффект не строго специфичен к ЭК, а плюрипотентен, поэтому при системном действии митогенный эффект может проявиться и на других типах клеток [15]. Повышение концентрации АФР в нецеленой ткани может способствовать развитию патологического процесса (особенно часто это проявляется при неопластических заболеваниях). Несмотря на то что VEGF участвует во всех процессах ангиогенеза, для физиологического ангиогенеза необходимы и другие АФР [10].

Большой вклад в регуляцию ангиогенеза вносит сигнальный путь фактора роста фибробластов (FGF), основные представители которого – FGF-1, FGF-2 и рецепторы FGFR-1–FRFR-4. FGF-1 (aFGF или кислый фактор роста фибробластов) способствует миграции ЭК, морфогенезу сосудов и участвует в активации сигнальных путей других факторов роста. FGF-2 (bFGF или основной фактор роста фибробластов) стимулирует миграцию, пролиферацию и дифференцировку ЭК; активирует ремоделирование внеклеточного матрикса в процессе ангиогенеза [10, 16, 17]. Среди сигнальных путей, участвующих в реализации эффектов FGF, есть совпадения с путями VEGF: MAPK/ERK, PI3K/AKT и PLC γ /PKC. Сигнальные пути, задействованные в ангиогенезе, имеют множество точек взаимодействия, в которых реализуются механизмы обратной связи, конкуренции, избыточности, синергизма и антагонизма. Именно поэтому в контексте регуляции ангиогенеза недостаточно рассмотреть изолированные эффекты отдельных молекул, а нужно оценить их взаимодействие в динамике [18].

Фактор роста гепатоцитов (HGF), также известный как фактор рассеивания (SF), участвует в эмбриогенезе, регенерации и ангиогенезе и реализует эффекты путем связывания с рецептором c-Met и расположенным на ЭК [19]. HGF продуцируется мезенхимальными клетками (фибробластами, гладкомышечными клетками сосудов). Проангиогенное действие HGF проявляется в стимулировании миграции, пролиферации и инвазии ЭК, активации тубулярного морфогенеза (выстраивание ЭК в вытянутые тяжи, которые предшествуют формированию сосуда) и увеличению экспрессии VEGF и MMP-1 [19, 20].

Для образования зрелых функциональных сосудов важно не только наличие всех необходимых медиаторов ангиогенеза, но и соответствие их концентраций и

продолжительности действия довольно узкому физиологическому диапазону. Этот аспект хорошо изучен применительно к VEGF: терапевтический диапазон довольно узок, а выход за его пределы приводит к формированию патологических сосудов. При сверхэкспрессии VEGF образуются гемангиомы, негерметичные сосуды с аномальной морфологией и неравномерно расширенным просветом, а слишком низкая концентрация VEGF приводит к формированию недостаточного для восстановления перфузии количества сосудов, причем эти сосуды имеют уменьшенный просвет, не успевают созреть и быстро регрессируют [21].

Важно отметить, что существует некоторый базальный уровень секреции АФР, который существенно ниже, чем при ишемии. В условиях нормоксии не происходит ангиогенеза, поскольку эффект проангиогенных молекул уравновешен антиангиогенными. Вкратце рассмотрим важнейшие из них, начиная с вазогибина-1 (VASH-1), который продуцируется ЭК в ответ на повышение концентрации VEGF, FGF-2, HIF-1 α . Экспрессия VASH-1 увеличивается в терминальной зоне ангиогенеза для ограничения дальнейшего прорастания сосудов [22]. Пигментный фактор эпителиального происхождения (PEDF) является ингибитором индуцированного ишемией ангиогенеза и вызывает апоптоз в активированных ЭК; он также играет важную роль в регуляции формирования сосудов глаза [23]. Хондромодулин-1 (ChM-1) – специфичный для хряща фактор, который проявляет антиангиогенную активность в различных тканях [24]. Ангиостатин оказывает антиангиогенный эффект посредством нескольких механизмов: ингибирует интегрин $\alpha v \beta 3$, способствуя уменьшению адгезии клеток; блокирует АТФ-синтазу ЭК, лишая их необходимой для участия в ангиогенезе энергии; ингибирует ангиотензин, который является вырабатываемым тромбоцитами стимулятором миграции ЭК [25–27]. Тромбоспондины (TSP-1 и TSP-2), вырабатываемые тромбоцитами и мегакариоцитами, уменьшают интенсивность миграции и пролиферации ЭК, а также могут запускать апоптоз ЭК и модулировать активность некоторых регуляторов ангиогенеза [25–27]. Снижают интенсивность образования сосудов ингибиторы многочисленных ферментов, участвующих в ангиогенезе (TIMP, ингибитор эластазы и др.) [25].

Переход сосудистой сети от состояния покоя к ангиогенезу называется ангиогенным переключением. Оно происходит, когда равновесие между ангиогенными и антиангиогенными факторами смещается в пользу первых за счет их высвобождения из депо, повышения биодоступности и усиленной продукции в результате приобретения клетками проангиогенного фенотипа. Ангиогенному переключению также способствует снижение продукции и биодоступности антиангиогенных молекул, однако их концентрация более стабильна [12]. Важнейшими молекулами, участвующими в ангиогенном переключении, являются VEGF-A, FGF-2, Ang-2, TGF- β , PDGF, NO и IL-8 [12, 28]. Чаще всего ангиогенное переключение рассматривается в контексте онкогенеза, поскольку оно является обязательным условием роста опухоли, перфузионные потребности которой очень высоки и не могут быть удовлетворены без формирования дополнительных сосудов. Поскольку опухоль может расти только в том случае, если формируется достаточная для ее кровоснабжения сосудистая сеть, в данном контексте ангиогенное переключение рассматривается как одно из ключевых звеньев патогенеза опухолей. Помимо этого, формируемая в результате опухолевого ангиогенеза сосудистая сеть является важным механизмом распространения метастазов, а в дальнейшем – их активации и роста. На этом основано перспективное направление лечения в онкологии – антиангиогенная терапия [29]. Опухолевый ангиогенез является патологическим, поскольку приводит к формированию сосудов с нарушенной морфологией и функциями, что во многом связано с отклонением соотношения между регуляторами ангиогенеза от физиологического. Во многом этому способствует сверхэкспрессия VEGF-A, которая приводит к чрезмерной пролиферации ЭК, формирования множества со-

судов, которые не успевают созреть и имеют повышенную проницаемость [29, 30]. Патологический ангиогенез при каждом отдельном заболевании имеет свои особенности, которые связаны с паттернами высвобождения проангиогенных и антиангиогенных факторов и их соотношением.

Таким образом, процесс ангиогенеза запускается сложным каскадом реакций, который включает в себя изменение транскрипции генов, индуцируемых локальными метаболическими изменениями тканей, приводящими к выделению комплекса АФР, среди которых наибольшее значение имеют факторы семейства VEGF. АФР обеспечивают комплекс межклеточных взаимодействий между ЭК, перicyтами, гладкомышечными клетками, лейкоцитами, клетками стромы и паренхимы органов. Межклеточные регуляторные реакции, сопряженные с изменением продукции АФР, вызывают активацию многочисленных внутриклеточных сигнальных механизмов ЭК, что приводит к формированию их ангиогенного фенотипа. Важно отметить, что в указанном регуляторном каскаде большое значение имеют множественные отрицательные обратные связи. В условиях нормоксии тканевой продукция АФР физиологически уравнивается выделением антиангиогенных факторов (VASH-1, ангиостатин и др.). При индукции ангиогенеза происходит изменение баланса продукции АФР и антиангиогенных факторов, что определяется как ангиогенное переключение – сигнальный механизм, адекватное функционирование которого определяет сано- или патогенетический характер ремоделирования сосудистого русла.

ПРОРАСТАНИЕ СОСУДОВ КАК МЕХАНИЗМ АНГИОГЕНЕЗА

Механизм процесса ангиогенеза может быть реализован двумя способами: проращением – SA (от англ. – Sprouting angiogenesis) и расщеплением – IA (от англ. – Intussusceptive angiogenesis) [31]. Суть механизма SA заключается в миграции ЭК сформированного сосуда во внеклеточный матрикс и росте сосуда в направлении ангиогенных стимулов [31]. Инициация SA происходит за счет увеличения под действием VEGF проницаемости стенки сосуда и опосредованного VEGF, NO и другими вазодилататорами локального снижения тонуса гладкомышечных клеток стенки сосуда, что в итоге способствует проникновению белков плазмы (фибриноген, витронектин и фибронектин) во внеклеточный матрикс [1, 10]. VEGF взаимодействует с расположенными на ЭК рецепторами VEGFR-2, что приводит к формированию верхушечного (или концевое) фенотипа ЭК. Верхушечные ЭК секретируют Delta-like ligand 4 (Dll4), который взаимодействует с интегральными белками-рецепторами Notch соседних ЭК, что способствует снижению экспрессии VEGFR-2 и увеличению экспрессии VEGFR-1. Активация VEGFR-1 приводит к образованию ЭК стеблевого фенотипа [32]. VEGF стимулирует секрецию Dll4 всеми ЭК, однако верхушечный фенотип приобретают те из них, которые начинают ее раньше и осуществляют активнее под действием более высокой концентрации VEGF [17]. Передача сигналов по пути Dll4/Notch также способствует усилению ангиогенеза за счет повышения интенсивности секреции FGF-2, VEGF-A и HGF [33]. Помимо Dll4, у рецепторов Notch есть и другой лиганд: белок Jagged1 (Jag1), вырабатываемый стеблевыми ЭК и подавляющий передачу сигнала Dll4–Notch, что обеспечивает возможность взаимодействия VEGF с VEGFR-2 ЭК для образования новых верхушечных ЭК [32, 34]. В поддержании оптимального соотношения концентраций Dll4 и Jag1, регулирующих переход ЭК из одного фенотипа в другой, также участвуют: сигнальный путь Wnt/ β -катенин, ответственный за активацию секреции Dll4 [35], цитокин TNF- α , усиливающий эффект Jag1 и снижающий активность Dll4 [34]. Поскольку отличительной чертой SA является инвазия ЭК во

внеклеточный матрикс, сигнальный путь Notch является одним из ключевых для данного способа ангиогенеза.

Функция верхушечных ЭК заключается в определении направления роста сосуда за счет миграции по градиенту проангиогенных стимулов. Верхушечные ЭК секретируют плазмин, матриксные металлопротеиназы и другие протеолитические ферменты для разрушения базальной мембраны сосуда, в результате чего становится возможной инвазия ЭК во внеклеточный матрикс [1, 36]. Плазмин запускает лизис белков внеклеточного матрикса и активирует MMP-1, MMP-2, MMP-3 MMP-7 и MMP-9 [37]. Базальные мембраны играют регуляторную роль в ангиогенезе, поскольку их компоненты, такие как коллаген и ламинин, могут оказывать стимулирующее действие, а такие как эндостатин, тумостатин и другие – ингибирующее [38, 39]. Важная функция коллагена I типа заключается в запуске упорядочивания ЭК в тяжи, приобретения ими веретенообразной формы и морфогенеза сосуда [38, 39]. Для миграции ЭК в направлении ангиогенного стимула необходима деградация и ремоделирование внеклеточного матрикса, что также осуществляется с помощью секретируемых верхушечными ЭК протеолитических ферментов [37, 40]. Внеклеточный матрикс служит резервуаром АФР, которые, как было сказано выше, связываются с белками посредством гепарин-связывающих доменов. В состоянии покоя данные АФР имеют очень низкую биодоступность, но при высвобождении в результате протеолиза внеклеточного матрикса способны к мощному стимулированию и поддержанию ангиогенеза [38]. В процессе ангиогенеза повышается концентрация не только стимуляторов ангиогенеза, но и его ингибиторов. Эндостатин образуется в результате протеолиза коллагена XVIII типа, тумстатин-коллагена IV типа, тетрастатин, пентастатин и гексастатин-коллагена IV типа. Данные молекулы ингибируют пролиферацию и миграцию ЭК и запускают их апоптоз. Таким образом постоянно происходит коррекция соотношения между про- и антиангиогенными молекулами для предотвращения гиперактивации ангиогенеза [37].

Движение ЭК в направлении проангиогенных стимулов реализуется в основном за счет хемотаксиса по градиенту VEGF. На филоподиях верхушечных ЭК активно экспрессируется VEGFR-2, который регистрирует градиент концентраций VEGF, от которого зависит запуск перестройки актиновых волокон цитоскелета для формирования филоподий и ламеллоподий, которые удлиняются в направлении максимального сосредоточения VEGF [1, 36]. На поверхности активированных VEGF ЭК экспрессируются интегрины, посредством которых осуществляется адгезия ЭК к коллагену и фибрину внеклеточного матрикса. Это способствует активации сигнального пути MAPK, результатом чего является повышение жизнеспособности ЭК. Внеклеточный матрикс служит каркасом, к которому с помощью интегринов адгезируются ЭК, что необходимо для нормального протекания ангиогенеза, поскольку при низкой адгезии запускается апоптоз ЭК, при средней – становится возможной их дифференцировка, а при высокой – пролиферация и правильная пространственная ориентация. После того как филоподии верхушечных ЭК зафиксированы на субстрате, происходит сокращение актиновых филаментов для перемещения всей массы клетки по градиенту VEGF [10, 17]. Отличительной чертой верхушечных ЭК является сверхэкспрессия гликолитического регулятора PFKFB3, которая необходима для интенсивного гликолиза, обеспечивающего высокие энергетические потребности клеток в условиях гипоксии [9]. Гликолитические ферменты связываются с F-актином и компартиментализируются в ламеллоподии и филоподии, где быстрое и локализованное производство АТФ посредством гликолиза делает возможным ремоделирование цитоскелета во время миграции клеток [9].

Ключевая особенность стеблевых ЭК сводится к высокой пролиферативной активности, благодаря которой они, следуя за верхушечными клетками, формируют ствол будущего сосуда. Стеблевые ЭК также являются основными участниками

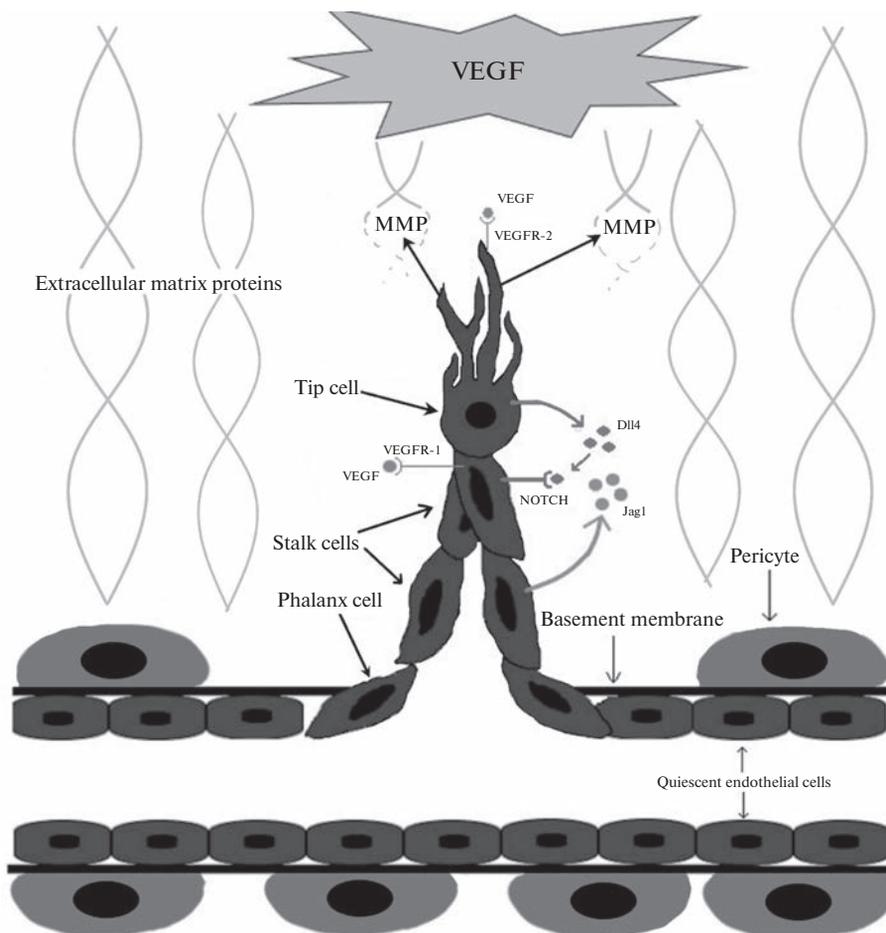


Рис. 1. Начальные процессы SA. MMP – матриксные металлопротеиназы, Extracellular matrix proteins – белки внеклеточного матрикса, Tip cell – верхушечная ЭК, Stalk cells – стеблевые ЭК, Phalanx cell – фаланговая ЭК, Basement membrane – базальная мембрана, Pericyte – перицит, Quiescent endothelial cells – покоящиеся ЭК, которые не участвуют в ангиогенезе.

процесса формирования просвета сосуда и синтеза компонентов базальной мембраны [36]. Есть и третий фенотип ЭК – фаланговый – представленный покоящимися ЭК. Они обладают меньшей пролиферативной активностью, чем стеблевые клетки и движутся в направлении проангиогенного стимула с минимальной скоростью. Фаланговые ЭК образуют гладкий монослой из плотно прилегающих друг к другу клеток и участвуют в созревании и стабилизации сосуда за счет укрепления межклеточных контактов, построения базальной мембраны, обеспечения взаимодействия ЭК с перицитами. Рис. 1 иллюстрирует описанные выше процессы, происходящие в начале SA.

Для ангиогенеза недостаточно приобретших ангиогенный фенотип ЭК, входящих в состав расположенных в области гипоперфузии сосудов, поэтому необходимо привлечение дополнительных ЭК и эндотелиальных клеток-предшественниц в зону ангиогенеза. Термин “эндотелиальные клетки-предшественницы” имеет множество

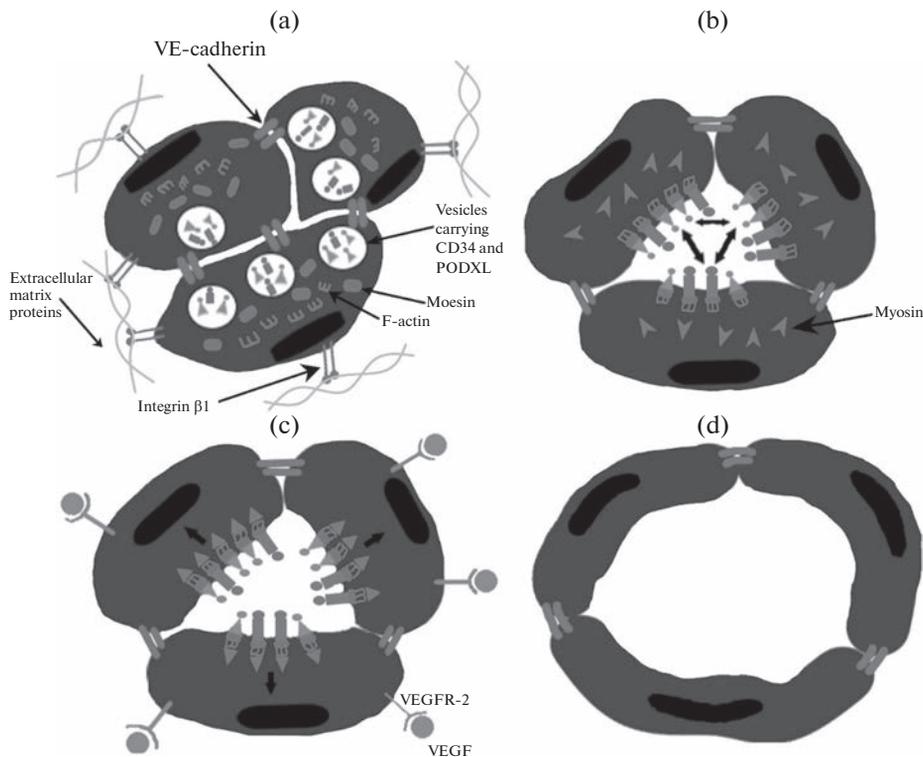


Рис. 2. Люменогенез путем межклеточного отталкивания. (а) – Интегрин-опосредованное взаимодействие ЭК и внеклеточного матрикса для оформления люминальной и базальной поверхностей ЭК. (б) – Смещение VE-кадгерина на периферию; экзоцитоз люминальных гликопротеинов и взаимное отталкивание ЭК; связывание люминальных гликопротеинов с F-актином. (с) – Формирование актино-миозинового комплекса и расширение просвета сосуда в результате его сократительной активности. (d) – Просвет сформирован. VE-cadherin – VE-кадгерин, Vesicles carrying CD34 and PODXL – везикулы, несущие люминальные гликопротеины CD34 и PODXL (подокалексин), Moesin – моезин, F-actin – F-актин, Integrin $\beta 1$ – интегрин $\beta 1$, Extracellular matrix proteins – белки внеклеточного матрикса, Myosin – миозин.

определений, но ключевой смысл заключается в том, что это клетки, способные дифференцироваться в зрелые ЭК [18]. Эндотелиальные клетки-предшественницы формируются в красном костном мозге, откуда при появлении таких стимулов, как гипоксия, АФР (особенно VEGF) и цитокины (особенно ГМ-КСФ), рекрутируются в ишемизированную ткань; также эндотелиальные клетки-предшественницы формируются локально в стенке сосудов [41].

Следующим этапом ангиогенеза является образование в туже ЭК просвета (люменогенез). Данный процесс может осуществляться по внеклеточному и внутриклеточному механизму, и в реализации их обоим важную роль играет состав внеклеточного матрикса и взаимодействие с ним ЭК [42]. Внеклеточный люменогенез начинается с поляризации ЭК, которая запускается интегрин-опосредованным взаимодействием ЭК и внеклеточного матрикса и поддерживается VE-кадгерин (рис. 2а). Оформление люминальной поверхности, выстилающей просвет сосуда, и базальной, которая обращена к внеклеточному матриксу, начинается со смещения

межклеточных контактов в направлении от центра тяжа к периферии с соответствующей реорганизацией цитоскелета [43]. Параллельно происходит опосредованный VE-кадгерином и белком-регулятором клеточного цикла Cdc42 экзоцитоз расположенных в везикулах ЭК гликопротеинов CD34 и PODXL (подокаликсин) на люминальную поверхность (рис. 2b). Люминальные гликопротеины имеют отрицательный заряд, что способствует взаимному отталкиванию ЭК с постепенным формированием просвета (рис. 2b). Люминальные гликопротеины соединяются с F-актином цитоскелета (рис. 2b) при участии белков ERM (эзрин, радиксин и моэзин), из которых моэзин играет основную роль. Далее VEGF связывается с VEGFR-2, что приводит к активации протеинкиназы ROCK, отвечающей за образование актино-миозинового комплекса, который за счет сократительной активности расширяет просвет сосуда (рис. 2c) до необходимого диаметра (рис. 2d) [43].

Процесс нормального люменогенеза невозможен без еще одного – внутриклеточного механизма, суть которого заключается в образовании посредством пиноцитоза крупных вакуолей и мелких пузырьков, которые в дальнейшем сливаются для формирования центрального просвета, который соединяется с аналогичными просветами соседних клеток (рис. 3a, b) [44]. Для инициации данного процесса необходимо интегрин-опосредованное взаимодействие ЭК с внеклеточным матриксом, причем состав внеклеточного матрикса определяет активность внутриклеточного люменогенеза. Активирующим действием обладают коллаген I типа и фибрин [42]. Важную роль в стимулировании такого способа образования просвета играет MT1-MMP [44]. В большинстве сосудов для формирования стабильного просвета необходимо сочетание обоих способов люменогенеза. Паттерн формирования просвета зависит от измеряемой в количестве клеток толщины сосуда. Клеточное отталкивание реализуется в сосудах с большим диаметром и начинается на периферии сосуда, в то время как в ЭК в центре клеточного тяжа преобладает внутриклеточный механизм [45].

Следующим этапом SA является формирование одного непрерывного сосуда путем слияния в области максимальной концентрации VEGF двух предшественников, проросших с разных сторон (рис. 4) [46]. Между верхушечными ЭК устанавливается контакт, который далее стабилизируется макрофагами и VE-кадгерином [10, 17]. VE-кадгерин модулирует экспрессию VEGFR-2, что способствует снижению миграционной активности ЭК для предотвращения формирования избыточных контактов [47]. Макрофаги участвуют в образовании анастомоза между предшественниками сосудов за счет продукции VEGF-C, который активирует VEGFR-3 верхушечных ЭК, что способствует активации NOTCH для перехода верхушечных ЭК в стеблевые для прекращения миграции и стабилизации контакта между ЭК [48]. Для полноценного функционирования сосуда он должен быть стабилизирован путем рекрутирования перицитов и формирования прочных межклеточных контактов между ЭК. Наличие полноценного этапа созревания является важнейшей отличительной чертой физиологического ангиогенеза по сравнению с патологическим. В этом процессе ключевая роль принадлежит сигнальным путям PDGF и Ang/Tie (ангиопоэтин/рецепторная тирозинкиназа) [49, 50]. Хотя сигнальный путь PDGF участвует в регуляции начальных стадий ангиогенеза, его наиболее важная и специфическая функция реализуется именно на данном этапе. PDGF экспрессируется ЭК и запускают миграцию, пролиферацию и встраивание в состав сосуда клеток, экспрессирующих PDGFR- β , в число которых входят перициты и гладкомышечные клетки [50]. Рекрутирование перицитов необходимо для формирования непрерывного матрикса базальной мембраны капилляра путем отложения ламинина, фибронектина и коллагена IV типа [50]. Перициты способствуют стабилизации сосуда путем реорганизации внеклеточного матрикса, упорядочивания ЭК, снижения пролиферативной активности ЭК и экспрессии TGF- β_1 – стимулятора

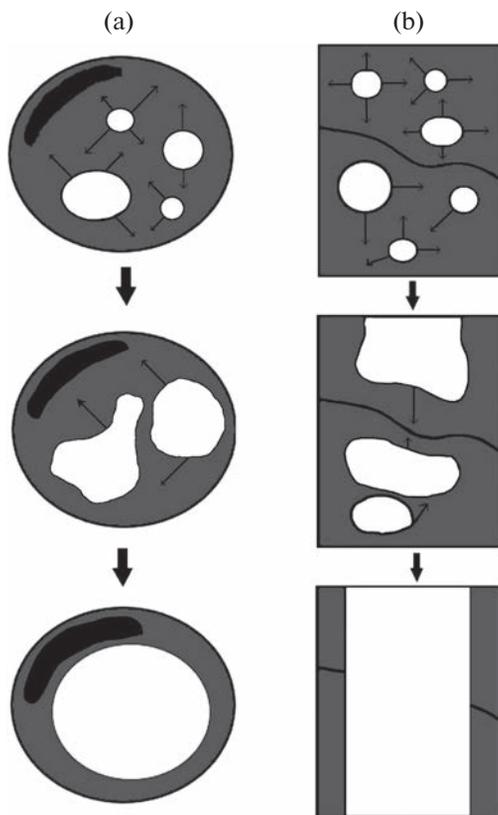


Рис. 3. Внутриклеточный люменогенез. (а) – Поперечный срез. (б) – Вид сверху.

дифференцировки клеток мезенхимального происхождения в перициты [49]. Из секретируемых перицитами проангиогенных молекул особо важна роль ангиопоэтина-1 (Ang-1), который является агонистом локализованных на ЭК рецепторов Tie2. Передача сигналов Ang-1/Tie2 за счет активации путей eNOS и PI3K/АКТ оказывает антиапоптотическое действие; способствует стабилизации и повышению жизнеспособности ЭК; усиливает взаимодействие между ЭК и перицитами; индуцирует сужение межклеточных щелей и увеличение прочности соединений между ЭК; стабилизирует VE-кадгерин; запускает перестройку цитоскелета ЭК и способствует уменьшению проницаемости сосуда. Ang-1 также снижает чувствительность ЭК к проангиогенным стимулам, что ведет к затуханию процессов ангиогенеза и переходу сосудистой сети к состоянию покоя, которое окончательно произойдет после восстановления перфузии ткани [51, 52].

Ангиогенез завершается реорганизацией вновь сформированных сосудов из гомогенной паутины в дифференцированную иерархичную сосудистую сеть, которая способна обеспечить необходимую перфузию ткани с максимальной эффективностью (рис. 5а, б). В процессе реорганизации происходит элиминирование избыточных, незрелых и неправильно сформированных сосудов, отростков и анастомозов путем апоптоза ЭК или их миграции и встраивания в состав соседних сосудов (механизмы варьируются в зависимости от ткани). Функциональные сосуды претерпевают изменения толщины стенки, диаметра просвета и формы для оптимизации

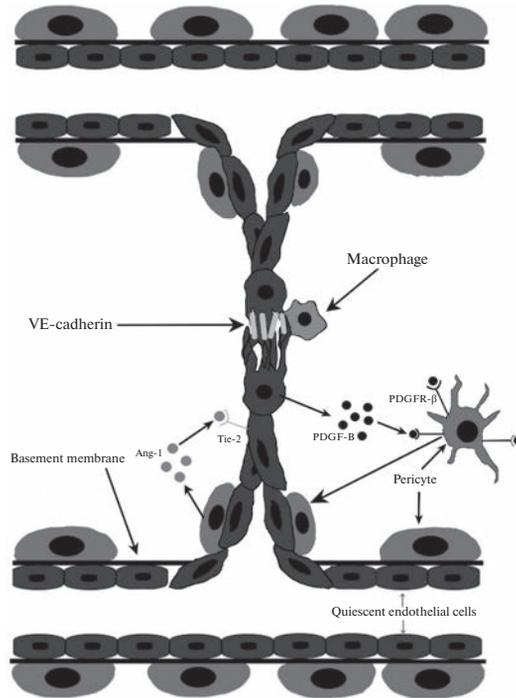


Рис. 4. Образование непрерывного сосуда из двух предшественников. Macrophage – макрофаг, Pericyte – перидцит, Quiescent endothelial cells – покоящиеся ЭК, Basement membrane – базальная мембрана.

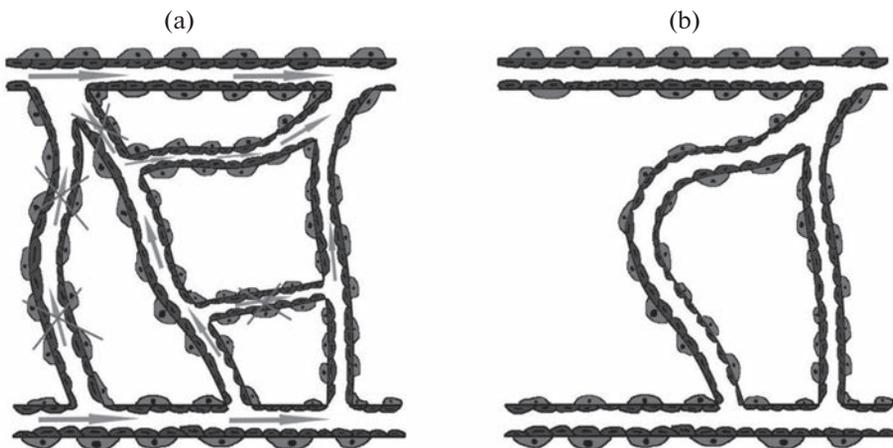


Рис. 5. Ремоделирование сосудистой сети. (a) – Сосудистая сеть до ремоделирования. Стрелками отмечены области с активным кровотоком, а перечеркнутыми стрелками – области с минимальным кровотоком. (b) – Сосудистая сеть после ремоделирования.

их гемодинамической функции [46]. Основным регулятором этого процесса является напряжение сдвига, которое тем больше, чем активнее кровотоков в сосуде. В сосудах с интенсивным кровотоком высокое напряжение сдвига способствует активации Akt, которая посредством Kruppel-подобного фактора 2 (KLF2) повышает экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и супероксиддисмутазы (SOD), что приводит к повышению жизнеспособности ЭК и расширению просвета сосудов [53]. В клетках сосудов с минимальной активностью кровотока аналогичной активации сигнальных путей повышения жизнеспособности не происходит, поэтому эти сосуды подвергаются разрушению [54]. Проангиогенные факторы повышают жизнеспособность ЭК, поэтому снижение их концентрации при достижении достаточного уровня перфузии ткани приводит к гибели сосудов, не успевших созреть и стабилизироваться [55]. Уменьшение уровня проангиогенных молекул способствует смещению равновесия в сторону антиангиогенных, играющих важную роль в запуске апоптоза. В инициации регрессии сосудов важная функция отведена Ang-2, который в условиях сниженной концентрации VEGF, характерной для завершающей стадии ангиогенеза, нарушает передачу сигналов PI3K/AKT, запускает инволюцию нефункционирующих и незрелых сосудов за счет апоптоза ЭК и дальнейшей регрессии капилляров. Это не единственная функция Ang-2: в условиях высокой концентрации VEGF он выступает в роли синергиста Ang-1/Tie2, способствуя тем самым созреванию сосудов в условиях гипоперфузии. Такая зависимость при физиологическом ангиогенезе обуславливает своевременный переход от фазы образования предшественника сосуда к его созреванию и является звеном динамической регуляции активности ангиогенеза с учетом потребности ткани [54].

После того как по образованным сосудам устанавливается кровоток и возникает состояние нормоксии, кислород связывается с HIF-1 α , в результате чего снижается его экспрессия и начинается деградация. Уменьшение концентрации HIF-1 α приводит к снижению продукции проангиогенных факторов, и процессы ангиогенеза стихают [16].

Таким образом, SA протекает в несколько этапов:

1. Появление стимула к активации ангиогенеза (медиаторы-индукторы ангиогенеза);
2. Миграция ЭК, имеющих вершущечный фенотип;
3. Образование тяжа за счет пролиферации стеблевых ЭК;
4. Формирование просвета;
5. Слияние двух предшественников сосуда в месте повышенной концентрации VEGF с образованием единого непрерывного сосуда;
6. Созревание сосуда за счет рекрутирования перицитов, укрепления межклеточных контактов и формирования базальной мембраны;
7. Образование зрелой сосудистой сети благодаря удалению избыточных и патологических сосудов и функциональной дифференцировки перфузируемых;
8. Восстановление кровотока, снижение концентрации проангиогенных факторов, стихание ангиогенеза.

РАСЩЕПЛЕНИЕ СОСУДОВ КАК МЕХАНИЗМ АНГИОГЕНЕЗА

IA – это процесс образования новых сосудов за счет разделения имеющегося на две части путем формирования внутри него перегородки, отграничивающей два самостоятельных просвета. Данный механизм ангиогенеза реализуется в капиллярах, мелких артериях и венах [56]. IA существенно быстрее и энергетически выгоднее SA, потому что не требует разрушения базальной мембраны и внеклеточного матрикса, миграции ЭК в направлении локализованного во внеклеточном матрик-

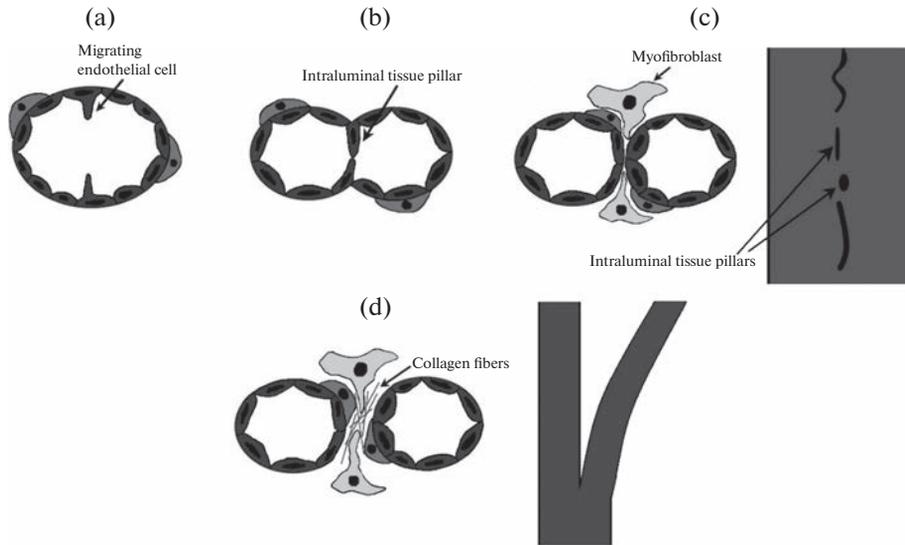


Рис. 6. Этапы IA. (a) – Выпячивание ЭК. (b) – Образование внутрипросветного тканевого столба. (c) – Перфорация тканевого столба в центре и инвазия отростками миофибробластов; рекрутирование перицитов. Слева изображен поперечный срез сосуда, справа – вид сверху. (d) – Синтез коллагена перицитами и миофибробластами; разрастание тканевых столбов и окончательное разделение на два самостоятельных сосуда. Слева изображен поперечный срез сосуда, справа – вид сверху. Migrating endothelial cell – мигрирующая (выпячивающаяся) в просвет ЭК, Intraluminal tissue pillar – внутрипросветный тканевый столб, Myofibroblast – миофибробласт, Collagen fibrils – волокна коллагена.

се проангиогенного стимула и активной клеточной пролиферации [31]. Формирование тканевого столба в процессе IA осуществляется в несколько этапов. Вначале под действием Ang-1 и Ang-2 происходит выпячивание ЭК в просвет в двух противоположных друг другу точках окружности сосуда (рис. 6a) с формированием из них листков эндотелия, которые впоследствии сливаются с образованием внутрипросветного тканевого столба (рис. 6b) [31, 56, 57]. Далее тканевый столб стабилизируется за счет упрочнения межклеточных контактов, после чего в его центре формируется канал, который инвазируется цитоплазматическими отростками миофибробластов (рис. 6c). Затем под действием PDGF происходит рекрутирование перицитов (рис. 6c) в латеральную часть тканевого столба для стабилизации межклеточных взаимодействий между ЭК. Формирование столба завершается синтезом перицитами и миофибробластами коллагена (рис. 6d) и увеличением толщины столба (рис. 6d) [1, 31]. Несколько столбов увеличиваются в размерах и сливаются друг с другом, в результате чего сосуд окончательно разделяется на два (рис. 6d).

Существует три вида IA: рост микрососудов (рис. 7a), их разветвление (рис. 7b) и ремоделирование ветвления (рис. 7c). Рост микрососудов осуществляется за счет развития тканевых столбов в центре сосуда на протяженном участке, что, в свою очередь, приводит к формированию многочисленных капилляров одинакового размера. Разветвление микрососудов осуществляется путем формирования тканевых столбов на протяжении всего существующего сосуда. Данный вид IA способствует переходу от гомогенной капиллярной сети к иерархичному сосудистому руслу с дифференцировкой на артериолы, капилляры и вены. При ремоделировании ветвления тканевые столбы образуются вблизи бифуркации, и их дальней-

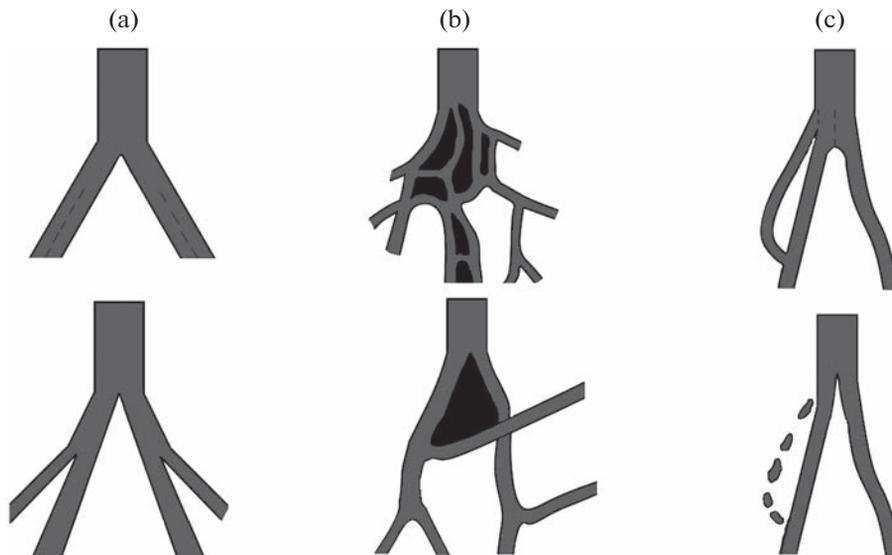


Рис. 7. Виды IA. (a) – Рост микрососудов. (b) – Разветвление микрососудов. (c) – Ремоделирование ветвления.

ший рост приводит либо ее к сужению и смещению в проксимальном направлении, либо к перекрытию просвета гемодинамически невыгодной ветви сосуда. То есть ремоделирование ветвления представляет собой процесс обрезки лишних сосудов или изменение угла отхождения ветви сосуда для оптимизации кровоснабжения ткани [57].

Главным пусковым фактором IA, как и при SA, является гипоксия. Отличие в регуляции данных механизмов ангиогенеза заключается в том, что при IA бóльшее значение имеют механические факторы. Паттерн формирования столбов зависит от локальных особенностей гемодинамики, обуславливающих разные потребности в кровоснабжении ткани. Пространственное распределение градиентов силы сдвига определяет направление развития столбов: они развиваются в областях с низким напряжением сдвига и растут вдоль них [31, 57]. Возникновение градиента силы сдвига может быть обусловлено либо постоянным усилением кровотока, либо чередованием воздействия кровотока высокой и низкой интенсивности (в мышцах при чередовании физической работы и покоя). Рост столбов вдоль оси сосуда приводит к удвоению сосуда, а развитие столбов в направлении, не совпадающем с осью, отвечает за ремоделирование угла ветвления и обрезку неэффективных сосудов. Насчет биохимической регуляции IA мнения исследователей менее согласованы, чем при SA, хотя спектры молекул, участвующих в регуляции IA и SA схожи (VEGF, FGF-1, FGF-2, HGF и другие) [56, 57]. Для IA характерна иницирующая роль Ang-1, более равномерное и непрерывное распределение VEGF, чем при SA [31].

Совсем недавно была выдвинута гипотеза о существовании еще одного вида ангиогенеза – коалесцентного (Coalescent angiogenesis). Сутью данного механизма является слияние многочисленных микрососудов в один крупный, который обладает более высокой гемодинамической эффективностью. Коалесцентный ангиогенез запускается в гомогенной сосудистой сети, которая не способна обеспечить достаточную перфузию. Инициация коалесцентного ангиогенеза, предположительно,

обусловлена локальными особенностями силы сдвига. Формирование крупного сосуда способствует элиминации неэффективных микрососудов с перенаправлением тока крови по “предпочтительному пути”, то есть гемодинамически наиболее выгодному направлению [58].

В процессе коалесцентного ангиогенеза происходит элиминация тканевых островков, которые разделяют микрососуды изначальной капиллярной сети, поэтому при одномоментной визуализации сосудистого русла коалесцентный ангиогенез практически неотличим от IA. Для выявления различий и установления механизма ангиогенеза необходима длительная видеозапись, которая позволит определить, сливаются сосуды или расщепляются [58, 59].

Данный механизм формирования сосудов был обнаружен только при эмбриональном развитии [58, 59], поэтому необходимы дальнейшие исследования для определения правильности его отнесения к ангиогенезу, а не васкулогенезу. Осуществимость коалесцентного ангиогенеза во взрослом организме, а также особенности его регуляции еще только предстоит выяснить. Необходимо определить, является ли данный механизм самостоятельным видом ангиогенеза или должен рассматриваться как один из этапов созревания сосудистой сети.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность представленных данных свидетельствует, что процесс ангиогенеза, запускаемый сложным регуляторным каскадом, включающим комплекс реакций метаболома, транскриптома, протеома, может реализовываться двумя механизмами: SA и IA. Основная функция IA заключается в формировании органоспецифической ангиоархитектоники и ремоделировании сосудов для удовлетворения местной потребности ткани в кислороде в ходе адаптации или при развитии организма. Функция SA заключается в первичном увеличении количества сосудов. Эти два механизма ангиогенеза с рядом общих регуляторных путей дополняют друг друга и совместно участвуют в повышении плотности сосудистой сети. Каждый из механизмов представляет собой сложный многостадийный процесс, регулируемый динамически изменяющимися комбинациями биологически активных веществ.

Ключевыми стадиями SA следует считать: появление стимула к инициации ангиогенеза, миграция вершечных ЭК, пролиферация стеблевых ЭК с образованием тяжа, формирование просвета, слияние двух предшественников сосуда, созревание сосуда, ремоделирование сосудистой сети. Критическими моментами IA, которые также могут быть выделены в качестве стадий, являются: выпячивание ЭК, образование внутрипросветного тканевого столба, перфорация тканевого столба и инвазия отростками миофибробластов, рекрутирование перицитов, рост и окончательное созревание тканевых столбов, завершающееся разделением изначального сосуда на два новых.

На настоящий момент точные регуляторные реакции, обеспечивающие переключения между указанными механизмами, не выявлены. Вместе с тем накопленные данные позволяют предположить, что реализация IA находится в большей зависимости от гемодинамических условий, таких как напряжение сдвига. Сложная регуляция ангиогенеза обеспечивает точное приспособление формирующегося сосудистого русла к потребностям тканей. Сложность, взаимосвязанность и в ряде случаев недостаточная изученность регуляторных реакций на настоящем этапе затрудняют разработку эффективных и безопасных стратегий управления ангиогенным процессом, которые могут быть использованы в клинической практике. Детализация регуляции стадий и механизмов ангиогенеза открывает новые перспективы для развития технологий лечения широкого спектра заболеваний и патологических состояний.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России «Разработка микрокамерных раневых покрытий, обеспечивающих локальную модуляцию оксидативного гомеостаза тканей».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.Н.И.), написание и редактирование манускрипта (А.Н.И., Ю.Р.Ч.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. *Oliveira de Oliveira LB, Faccin Bampi V, Ferreira Gomes C, Braga da Silva JL, Encarnação Fiala Rechsteiner SM* (2014) Morphological characterization of sprouting and intussusceptive angiogenesis by SEM in oral squamous cell carcinoma: Sprouting and intussusceptive angiogenesis in oral cancer. *Scanning* 36: 293–300.
<https://doi.org/10.1002/sca.21104>
2. *Deev R, Plaksa I, Bozo I, Isaev A* (2017) Results of an International Postmarketing Surveillance Study of pl-VEGF165 Safety and Efficacy in 210 Patients with Peripheral Arterial Disease. *Am J Cardiovasc Drugs* 17: 235–242.
<https://doi.org/10.1007/s40256-016-0210-3>
3. *Lheureux S, Oaknin A, Garg S, Bruce JP, Madariaga A, Dhani NC, Bowering V, White J, Accardi S, Tan Q, Braunstein M, Karakasis K, Cirlan I, Pedersen S, Li T, Fariñas-Madrid L, Lee YC, Liu ZA, Pugh TJ, Oza AM* (2020) EVOLVE: A Multicenter Open-Label Single-Arm Clinical and Translational Phase II Trial of Cediranib Plus Olaparib for Ovarian Cancer after PARP Inhibition Progression. *Clin Cancer Res* 26: 4206–4215.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-4121>
4. *Kosolapov VP, Yarmonova MV* (2021) The analysis of high cardiovascular morbidity and mortality in the adult population as a medical and social problem and the search for ways to solve it. *Jour* 20: 58–64.
<https://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-1-58-64>
5. *Hasin Y, Seldin M, Lulis A* (2017) Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol* 18: 83.
<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
6. *Zhang Y, Wang H, Oliveira RHM, Zhao C, Popel AS* (2022) Systems biology of angiogenesis signaling: Computational models and omics. *WIREs Mech Dis* 14(4): e1550.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1550>
7. *Wang J-C, Li G-Y, Li P-P, Sun X, Li W-M, Li Y, Lu S-Y, Liu P-J* (2017) Suppression of hypoxia-induced excessive angiogenesis by metformin via elevating tumor blood perfusion. *Oncotarget* 8: 73892–73904.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.18029>
8. *Apte RS, Chen DS, Ferrara N* (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176: 1248–1264.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
9. *Zhang Y, Zhong Y, Liu W, Zheng F, Zhao Y, Zou L, Liu X* (2022) PFKFB3-mediated glycometabolism reprogramming modulates endothelial differentiation and angiogenic capacity of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 13: 391.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-03089-3>
10. *Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mihu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM* (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 59: 455–467.
11. *Noren DP, Chou WH, Lee SH, Qutub AA, Warmflash A, Wagner DS, Popel AS, Levchenko A* (2016) Endothelial cells decode VEGF-mediated Ca²⁺ signaling patterns to produce distinct functional responses. *Sci Signal* 9: ra20.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad3188>
12. *Balberova OV, Bykov EV, Shnayder NA, Petrova MM, Gavriluk OA, Kaskaeva DS, Soloveva IA, Petrov KV, Mozheyko EY, Medvedev GV, Nasyrova RF* (2021) The “Angiogenic Switch” and

- Functional Resources in Cyclic Sports Athletes. *Int J Mol Sci* 22: 6496.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126496>
13. *Mamer SB, Wittenkeller A, Imoukhuede PI* (2020) VEGF-A splice variants bind VEGFRs with differential affinities. *Sci Rep* 10: 14413.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71484-y>
 14. *Teran M, Nugent MA* (2015) Synergistic Binding of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Its Receptors to Heparin Selectively Modulates Complex Affinity. *J Biol Chem* 290: 16451–16462.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627372>
 15. *Unterleuthner D, Neuhold P, Schwarz K, Janker L, Neuditschko B, Nivarthi H, Crncec I, Kramer N, Unger C, Hengstschläger M, Eferl R, Moriggl R, Sommergruber W, Gerner C, Dolznig H* (2020) Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer. *Angiogenesis* 23: 159–177.
<https://doi.org/10.1007/s10456-019-09688-8>
 16. *Zhao C, Popel AS* (2015) Computational Model of MicroRNA Control of HIF-VEGF Pathway: Insights into the Pathophysiology of Ischemic Vascular Disease and Cancer. *PLoS Comput Biol* 11: e1004612.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004612>
 17. *Naik MU, Chatterjee S, Naik UP* (2020) Fibroblast Growth Factor-2-Induced Endothelial Cell Migration Is Regulated by Junctional Adhesion Molecule-A Through Its Tyrosine Phosphorylation and Interaction With Afadin. *The FASEB J* 34: 1–1.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.06430>
 18. *Weinstein N, Mendoza L, Gitler I, Klapp J* (2017) A Network Model to Explore the Effect of the Micro-environment on Endothelial Cell Behavior during Angiogenesis. *Front Physiol* 8: 960.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00960>
 19. *Vasuri F, Fittipaldi S, Abualhin M, Degiovanni A, Gargiulo M, Stella A, Pasquinelli G* (2014) Biochemical and immunomorphological evaluation of hepatocyte growth factor and c-Met pathway in patients with critical limb ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 48: 430–437.
<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.002>
 20. *Koudstaal S, Bastings MMC, Feyen DAM, Waring CD, van Slochteren FJ, Dankers PYW, Torella D, Sluijter JPG, Nadal-Ginard B, Doevendans PA, Ellison GM, Chamuleau SAJ* (2014) Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res* 7: 232–241.
<https://doi.org/10.1007/s12265-013-9518-4>
 21. *Salabarría A-C, Braun G, Heykants M, Koch M, Reuten R, Mahabir E, Cursiefen C, Bock F* (2019) Local VEGF-A blockade modulates the microenvironment of the corneal graft bed. *Am J Transplant* 19: 2446–2456.
<https://doi.org/10.1111/ajt.15331>
 22. *Yazdani S, Kasajima A, Tamaki K, Nakamura Y, Fujishima F, Ohtsuka H, Motoi F, Unno M, Watanabe M, Sato Y, Sasano H* (2014) Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. *Human Pathol* 45: 866–874.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.09.024>
 23. *Michalczyk ER, Chen L, Fine D, Zhao Y, Mascarinas E, Grippo PJ, DiPietro LA* (2018) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) as a Regulator of Wound Angiogenesis. *Sci Rep* 8: 11142.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29465-9>
 24. *Nagai T, Sato M, Kobayashi M, Yokoyama M, Tani Y, Mochida J* (2014) Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 16: 427.
<https://doi.org/10.1186/s13075-014-0427-y>
 25. *Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V* (2015) Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* 9: XE01–XE05.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12016.6135>
 26. *El-Kenawi AE, El-Remessy AB* (2013) Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *Br J Pharmacol* 170: 712–729.
<https://doi.org/10.1111/bph.12344>
 27. *Zhang X, Crawford R, Xiao Y* (2014) Anti-angiogenic factors are essential regulators in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 22: S132.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.02.243>
 28. *Granstam E, Aurell S, Sjövall K, Paul A* (2021) Switching anti-VEGF agent for wet AMD: evaluation of impact on visual acuity, treatment frequency and retinal morphology in a real-world clinical setting. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 259: 2085–2093.
<https://doi.org/10.1007/s00417-020-05059-y>

29. *Mabeta P, Hull R, Dlamini Z* (2022) LncRNAs and the Angiogenic Switch in Cancer: Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Genes (Basel)* 13: 152. <https://doi.org/10.3390/genes13010152>
30. *Luo H, Shen Y, Liao W, Li Q, Wu N, Zhong J, Xiao C, Gan J, Yang Y, Dong E, Zhang G, Liu B, Yue X, Xu L, Liu Y, Zhao C, Zhong Q, Yang H* (2022) The inhibition of protein translation promotes tumor angiogenic switch. *Mol Biomed* 3: 18. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00081-4>
31. *Mentzer SJ, Konerding MA* (2014) Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis* 17: 499–509. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9428-3>
32. *Kangsamaksin T, Murtomaki A, Kofler NM, Cuervo H, Chaudhri RA, Tattersall IW, Rosenstiel PE, Shawber CJ, Kitajewski J* (2015) NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov* 5: 182–197. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0650>
33. *Zalpoor H, Aziziyan F, Liaghat M, Bakhtiyari M, Akbari A, Nabi-Afjadi M, Forghaniesfidvajani R, Rezaei N* (2022) The roles of metabolic profiles and intracellular signaling pathways of tumor microenvironment cells in angiogenesis of solid tumors. *Cell Commun Signal* 20: 186. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00951-y>
34. *Travisano SI, Oliveira VL, Prados B, Grego-Bessa J, Piñeiro-Sabaris R, Bou V, Gómez MJ, Sánchez-Cabo F, MacGrogan D, de la Pompa JL* (2019) Coronary arterial development is regulated by a Dll4-Jag1-EphrinB2 signaling cascade. *eLife* 8: e49977. <https://doi.org/10.7554/eLife.49977>
35. *Kasprzak A* (2020) Angiogenesis-Related Functions of Wnt Signaling in Colorectal Carcinogenesis. *Cancers (Basel)* 12: E3601. <https://doi.org/10.3390/cancers12123601>
36. *Santos-Oliveira P, Correia A, Rodrigues T, Ribeiro-Rodrigues TM, Matafome P, Rodríguez-Manzanegue JC, Seïça R, Girão H, Travasso RDM* (2015) The Force at the Tip—Modelling Tension and Proliferation in Sprouting Angiogenesis. *PLoS Comput Biol* 11: e1004436. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004436>
37. *Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D* (2014) Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int* 2014: 756078. <https://doi.org/10.1155/2014/756078>
38. *Ruehle MA, Eastburn EA, LaBelle SA, Krishnan L, Weiss JA, Boerckel JD, Wood LB, Guldberg RE, Willett NJ* (2020) Extracellular matrix compression temporally regulates microvascular angiogenesis. *Sci Adv* 6: eabb6351. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb6351>
39. *Conway RE, Joiner K, Patterson A, Bourgeois D, Rampp R, Hannah BC, McReynolds S, Elder JM, Gilfilen H, Shapiro LH* (2013) Prostate specific membrane antigen produces pro-angiogenic laminin peptides downstream of matrix metalloprotease-2. *Angiogenesis* 16: 847–860. <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9360-y>
40. *Lai K-C, Lu C-C, Tang Y-J, Chiang J-H, Kuo D-H, Chen F-A, Chen I-L, Yang J-S* (2014) Allyl isothiocyanate inhibits cell metastasis through suppression of the MAPK pathways in epidermal growth factor-stimulated HT29 human colorectal adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 31: 189–196. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2865>
41. *Chambers SEJ, Pathak V, Pedrini E, Soret L, Gendron N, Guerin CL, Stitt AW, Smadja DM, Medina RJ* (2021) Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. *Stem Cells Transl Med* 10 Suppl 2: S54–S61. <https://doi.org/10.1002/sctm.21-0022>
42. *Charpentier MS, Conlon FL* (2014) Cellular and molecular mechanisms underlying blood vessel lumen formation. *Bioessays* 36: 251–259. <https://doi.org/10.1002/bies.201300133>
43. *Charpentier MS, Tandon P, Trincot CE, Koutleva EK, Conlon FL* (2015) A Distinct Mechanism of Vascular Lumen Formation in Xenopus Requires EGFL7. *PLoS One* 10: e0116086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116086>
44. *Davis GE, Stratman AN, Sacharidou A, Koh W* (2011) Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *Int Rev Cell Mol Biol* 288: 101–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386041-5.00003-0>
45. *Boas SEM, Merks RMH* (2014) Synergy of cell-cell repulsion and vacuolation in a computational model of lumen formation. *J R Soc Interface* 11: 20131049. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.1049>

46. *Lenard A, Daetwyler S, Betz C, Ellertsdottir E, Belting H-G, Huisken J, Affolter M* (2015) Endothelial Cell Self-fusion during Vascular Pruning. *PLoS Biol* 13: e1002126. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002126>
47. *Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, Krudewig A, Sauteur L, Belting H-G, Affolter M* (2013) In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Dev Cell* 25: 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.010>
48. *Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K* (2015) VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 761–766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423278112>
49. *Zhang Z, Warner KA, Mantesso A, Nör JE* (2022) PDGF-BB signaling via PDGFR- β regulates the maturation of blood vessels generated upon vasculogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Front Cell Dev Biol* 10: 977725. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.977725>
50. *Gianni-Barrera R, Bartolomeo M, Vollmar B, Djonov V, Banfi A* (2014) Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 42: 1637–1642. <https://doi.org/10.1042/BST20140234>
51. *Khan M, Aziz AA, Shafiq NA, Abbas T, Khanani AM* (2020) Targeting Angiopoietin in Retinal Vascular Diseases: A Literature Review and Summary of Clinical Trials Involving Faricimab. *Cells* 9: E1869. <https://doi.org/10.3390/cells9081869>
52. *Chu H, Sun Y, Gao Y, Guan X, Yan H, Cui X, Zhang X, Li X, Li H, Cheng M* (2019) Function of Kruppel-like factor 2 in the shear stress-induced cell differentiation of endothelial progenitor cells to endothelial cells. *Mol Med Report* 19(3): 1739–1746. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9819>
53. *Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J, de Vries CJM, Biessen EAL, van Berkel TJC, Pannekoek H, Horrevoets AJG* (2005) Endothelial KLF2 Links Local Arterial Shear Stress Levels to the Expression of Vascular Tone-Regulating Genes. *Am J Pathol* 167: 609–618. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63002-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63002-7)
54. *Korn C, Augustin HG* (2015) Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell* 34: 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.004>
55. *Shahik SMD, Salauddin A, Hossain MDS, Noyon SH, Moin AT, Mizan S, Raza MDT* (2021) Screening of novel alkaloid inhibitors for vascular endothelial growth factor in cancer cells: an integrated computational approach. *Genomics Inform* 19: e6. <https://doi.org/10.5808/gi.20068>
56. *Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Gayoso S, Carrasco JL, Díaz-Flores Lucio, González-Gómez M, Madrid JF* (2020) Intussusceptive Angiogenesis and Peg–Socket Junctions between Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells in Early Arterial Intimal Thickening. *IJMS* 21: 8049. <https://doi.org/10.3390/ijms21218049>
57. *Ackermann M, Tsuda A, Secomb TW, Mentzer SJ, Kondering MA* (2013) Intussusceptive remodeling of vascular branch angles in chemically-induced murine colitis. *Microvasc Res* 87: 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.02.002>
58. *Nitzsche B, Rong WW, Goede A, Hoffmann B, Scarpa F, Kuebler WM, Secomb TW, Pries AR* (2022) Coalescent angiogenesis-evidence for a novel concept of vascular network maturation. *Angiogenesis* 25: 35–45. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09824-3>
59. *Gifre-Renom L, Jones EAV* (2021) Vessel Enlargement in Development and Pathophysiology. *Front Physiol* 12: 639645. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.639645>

Mechanisms of Physiological Angiogenesis

A. N. Ivanov^a and Yu. R. Chabbarov^{a, *}

^aRazumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

*e-mail: chabbarov@bk.ru

Angiogenesis is the formation of blood vessels from existing vasculature to provide normal tissue perfusion. Angiogenesis is also necessary for the processes of growth and regeneration. Angiogenesis attracts the attention of researchers from the position of its therapeutic regulation: enhancement can contribute to significant progress in the treat-

ment of ischemic diseases, and inhibition is actively studied for the treatment of neoplastic diseases. Regulation of angiogenesis is impossible without accurate knowledge of its mechanism. There are two fundamental pathways for angiogenesis: sprouting angiogenesis, which is mediated by an existing vessel's endothelial cells migration into the extracellular matrix to form a vessel in the direction of angiogenic stimuli, and intussusceptive angiogenesis, which is mediated by dividing the formed vessel into two new ones as a result of the formation of a partition inside it that separates two independent lumens. This review examines the main stages of each type of physiological angiogenesis, their mechanisms and regulation.

Keywords: angiogenesis, endothelial cells, growth factors, microcirculation, blood vessel, regulation of angiogenesis, mechanisms of angiogenesis

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТА МИКРОБИОТЫ – МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ КООРДИНАЦИЮ, СИЛУ МЫШЦ И УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИ ДИСБИОЗЕ У МЫШЕЙ

© 2023 г. О. В. Яковлева¹, *, А. И. Муллакаева¹, А. Ф. Салихзянова¹,
Д. М. Сорокина¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: a-olay@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.03.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Согласно современным представлениям, состав и разнообразие кишечной микробиоты играют существенную роль в поддержании иммунитета, гомеостаза и в целом физиологических функций организма хозяина. В последние годы появились сообщения о позитивной роли микробиоты и ее метаболитов, особенно короткоцепочечных жирных кислот, в метаболизме и функциональной активности скелетных мышц. Целью нашей работы было проанализировать силу мышц и координацию движений у мышей после инъекции курса антибиотиков широкого спектра действия с одновременным пероральным введением метаболита микробиоты – одного из представителей короткоцепочечных жирных кислот – масляной кислоты. Кроме того, мы определили уровень малонового диальдегида, концентрацию общего глутатиона и активность глутатионпероксидаз в мышцах задних конечностей у мышей с введением антибиотиков и масляной кислоты. Введение антибиотиков мышам-подросткам в течение двух недель приводило к более высокой смертности и снижению прибавки в массе тела, а также вызывало значительные изменения в двигательном поведении, включая повышение горизонтальной двигательной активности, снижение вертикальной двигательной активности, мышечной силы, координации движений. Более высокий уровень окислительного стресса был обнаружен в тканях мышц задних конечностей мышей, получавших антибиотики. В то же время введение препарата масляной кислоты предотвращало наблюдаемые изменения и улучшало не только поведенческие нарушения, но и частично снижало уровень окислительного стресса. Таким образом, использование метаболитов нормальной микробиоты оказывает позитивное влияние на функциональные и биохимические показатели скелетных мышц при дисбиозе, что может быть использовано для предотвращения потери мышечной функции при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: антибиотик-индуцированный дисбактериоз, масляная кислота, двигательная активность, мышечная сила, координация движений, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0869813923060067, EDN: WHCVXS

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным исследованиям, микробиота кишечника оказывает значительный вклад в поддержание здоровья человека, а дисбиоз кишечника прямо

или опосредованно вовлечен в развитие ряда хронических заболеваний, таких как ожирение, диабет 1-го и 2-го типа, аутизм, синдром раздраженного кишечника и другие [1–5]. Доказано непосредственное влияние микробиоты на развитие и деятельность головного мозга, а негативные изменения в составе микробного сообщества могут стать причиной возникновения нервно-психических расстройств [6, 7]. Взаимодействие кишечной микробиоты с нервной системой описывают термином “ось кишечник–мозг”, в которой желудочно-кишечный тракт и головной мозг модулируют функции друг друга [8–11]. Прием антибактериальных препаратов является одним из главных факторов, влияющих на состав и разнообразие кишечной микробиоты, что приводит к нарушениям функций желудочно-кишечного тракта, иммунной и нервной систем [6, 7, 12, 13].

В последнее время все большее внимание уделяется роли микробиоты в поддержании массы тела и функции скелетных мышц, так называемой “оси кишечник–мышцы”, хотя влияние кишечной микробиоты на скелетные мышцы хозяина не является однозначным [14]. Так, было показано, что у мышей со стерильным кишечником (germ-free, GF) или мышей, получавших антибиотики, увеличивается масса тела [15, 16]. С другой стороны, соотношение мышечной массы к массе тела снижалось у GF мышей, а трансплантация микробиоты кишечника от мышей дикого типа привела к восстановлению этого соотношения [17]. Сходные изменения наблюдали и у мышей с введением антибиотиков [1, 18, 19]. При этом показатели мышечной массы улучшались при заселении естественной микрофлорой [1]. Несколько исследований показали снижение физической работоспособности, включая силу мышц и выносливость как у GF-мышей, так и мышей с введением антибиотиков [1, 17, 19, 20].

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), такие как ацетат, пропионат и бутират, являются ключевыми продуктами ферментации не усваиваемых углеводов с помощью бактерий-комменсалов, содержание которых в толстой кишке достигает 150 мМ [21]. Показаны позитивные влияния смеси КЦЖК на соотношение массы мышц к массе тела у GF-мышей [17] и кормления бутиратом у старых мышей [22]. Поскольку потеря мышечной функции и массы тела – это фактор риска и смертности при нервно-мышечных заболеваниях, а также при многих хронических заболеваниях (например, раковой кахексии, ожирении, диабете) [4, 23], поиск стратегий для предотвращения этого феномена является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования явился анализ массы тела, силы мышц и координации движений у мышей после инъекции курса антибиотиков и дополнительного введения препарата, содержащего масляную кислоту. Кроме того, мы проанализировали уровень окислительного стресса в скелетных мышцах мышей, получавших антибиотики и препарат масляной кислоты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследование проведено на 25-дневных мышах массой тела 15–20 г. Животные содержались в полипропиленовых клетках (по 4–5 мышей на клетку) при контролируемой температуре (22–24°C) с 12-часовым циклом день–ночь (свет включался в 08:00) и со свободным доступом к пище и воде

Животные были случайным образом разделены на 4 группы. Мыши группы Ab ($n = 37$) получали внутрибрюшинные (в/б) инъекции 10 мл/кг коктейля из антибиотиков 1 раз в сутки в течение 2 нед. Животные из группы Ab + BA ($n = 33$) дополнительно к в/б введению антибиотиков получали перорально 1 мл суспензии фармакологического препарата “Закофальк” (Др Фальк, Германия) в концентрации 7 мг/кг, соответствующей рекомендуемым дозам для человека.

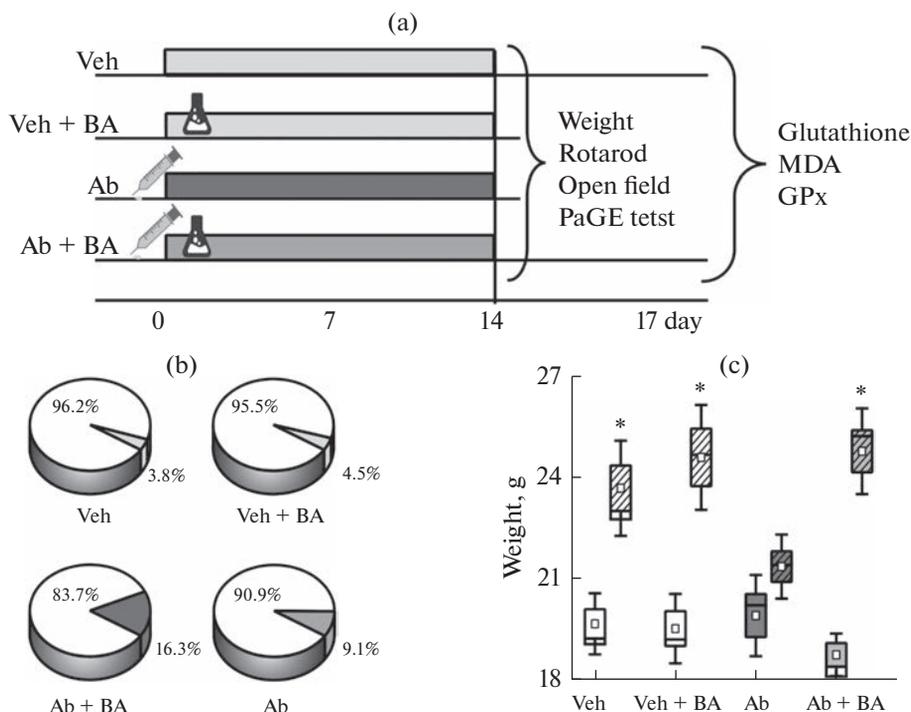


Рис. 1. Эффект антибиотиков на смертность и набор массы тела у мышей. (a) – Схема эксперимента. Veh – Контрольная группа; Veh + BA – контрольная группа мышей, получающих препарат “Закофальк”, содержащий масляную кислоту (BA); Ab – группа мышей, получающих инъекции коктейля антибиотиков; Ab + BA – группа мышей, дополнительно к введению антибиотиков получающих BA; MDA – малоновый диальдегид; GPx – глутатион пероксидазы, PaGE test – тест Сила хвата. (b) – Соотношение выживаемости (белый сектор) к смертности (серый сектор) мышей групп Veh; Veh + BA; Ab; Ab + BA. (c) – Масса тела мышей до и после двух недель эксперимента (заштрихованные квадраты) в группах Veh и Veh + BA (белые квадраты); Ab (темно-серые квадраты); Ab + BA (светло-серые квадраты). Квадраты – SEM, линия – медиана, круг внутри – среднее значение, усы – 5–95 квартиль. * – $p < 0.05$ относительно начальных значений.

Животным контрольной (Veh) группы ($n = 27$) вводили в/б физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животные группы Veh + BA ($n = 26$) дополнительно к инъекциям физиологического раствора получали суспензию “Закофальк”.

Коктейль антибиотиков для инъекций был приготовлен в растворе 0.9%-ного NaCl и содержал следующие антибиотики в мг/мл: неомицин 5.0; ванкомицин 25.0; амфотерицин В 0.1; ампициллин 10; метронидазол 5.0 [7, 24].

Сразу после окончания курса антибиотиков мы оценивали смертность, набор массы тела и проводили поведенческие тесты во всех экспериментальных группах. Биохимический анализ мышц задних конечностей выполняли по окончании поведенческих тестов. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1а.

Поведенческие тесты

Тест Открытое поле. В тесте Открытое поле оценивалась двигательная активность животных до и после инъекций. Тест проводился на круглой арене диаметром 60 см со стенкой высотой 36 см, разделенной на 36 квадратов 10×10 см, оборудованной видеосистемой (Open Science, Москва, Россия). Каждое животное поме-

щали в центр Открытого поля и давали возможность исследовать поле в течение 3 мин с регистрацией количества пересеченных квадратов, подъемов на задние лапы в свободной стойке и с опорой. Кроме того, оценивали общую двигательную активность, рассчитанную как сумма квадратов пересечений и количества вставаний на задние лапы. После каждого испытания открытое поле очищали 70%-ным этиловым спиртом и давали высохнуть [25].

Тест Ротарод. Равновесие и координацию движений передних и задних конечностей оценивали с помощью теста Ротарод (Нейроботикс, Россия). Каждую мышшь помещали на цилиндр со скоростью вращения 5 см/с и измеряли время до падения. Животных подвергали трем последовательным сеансам тестирования с интервалом 20–30 мин. Регистрировали наибольшее время (с) удержания до падения с вращающегося цилиндра [26].

Тест Сила хвата. Силу мышц конечностей оценивали с помощью теста Сила хвата. Мышей помещали на проволочную сетку и осторожно встряхивали, чтобы побудить животное схватиться за сетку. Сетку переворачивали вверх дном над клеткой и удерживали на высоте 45 см над дном открытой клетки. Оценивалось время (с), проведенное на сетке (до падения). Для анализа отбиралось наибольшее значение из трех попыток [27].

Перекисное окисление липидов и активность глутатионпероксидаз

Образцы ткани мышц задних конечностей замораживали и гомогенизировали в буферном растворе (0.15 М NaCl с фосфатным буфером, соотношение 1 : 10) для дальнейшего анализа. Малоновый диальдегид (МДА) измеряли спектрофотометрически по методике Ohkawa [28]. Гомогенаты тканей смешивали с 20%-ной трихлоруксусной кислотой и 0.03 М 2-тиобарбитуровой кислотой в соотношении 2 : 2 : 1. Смесь нагревали 45 мин при 95°C и центрифугировали 10 мин при 1000 g. В этих условиях МДА легко вступает в реакцию нуклеофильного присоединения с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя красный флуоресцентный метаболит МДА 1 : 2. Поглощение супернатанта контролировали при 532 нм ($\epsilon_{TBA-MDA} = 1.55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$) спектрофотометрически (ПЭ-5300ВИ, ЭКОХИМ, Россия). Уровни МДА выражали в мкг/г ткани.

Антиоксидантный потенциал определяли путем измерения активности глутатион-пероксидаз, оцениваемой по снижению уровня восстановленной формы глутатиона с использованием трет-бутилгидропероксида в качестве субстрата [29, 30]. 1 мл раствора глутатиона смешивали с 1 мл гомогената тканей; смесь разделяли на две центрифужные пробирки (опытную и контрольную) и инкубировали 5 мин. В пробирку добавляли раствор трет-бутилгидропероксида (5 мкМ, 0.02 мл). Через 10 мин в опытную и контрольную пробирки вливали по 0.2 мл холодной 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Образцы центрифугировали 15 мин при 1000 g и по 0.1 мл надосадочной жидкости из контрольных и пробирок переносили в химические пробирки, добавляли 2 мл фосфатного буфера (0.2 М, pH 8.0) и 0.05 мл реактива Элмана и перемешивали. Оптическую плотность контрольного и опытного образцов измеряли при 412 нм на спектрофотометре (ПЭ-5300ВИ, ЭКОХИМ, Россия). Активность глутатионпероксидазы выражали в мкМ/г ткани в мин.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили при помощи непараметрических методов с использованием пакета прикладных программ Origin Pro software (OriginLab Corp, США). Для проверки выборки на нормальное распределение применяли тест Шапиро-Уилка (размер выборки 25) и *F*-тест для равных дисперсий. Все групповые данные сравнивались при помощи ANOVA по Краскелу–Уоллису (Kruskal-

Wallis test) с последующим анализом U -критерия Манна–Уитни. Для оценки смертности использовали Хи-квадрат. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$; n – количество протестированных животных. Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ выживаемости и набора массы тела мышей

Анализ выживаемости мышей показал, что инъекции антибиотиков приводили к снижению выживаемости мышей до 83.7% животных ($\chi^2 = 8.64$), тогда как в контроле выживаемость составила 96.2% (рис. 1b). Экспериментальные группы, получающие препарат масляной кислоты, не отличались по выживаемости от контроля ($\chi^2 = 2.33$). Измерение массы тела мышей исследуемых групп показало, что введение антибиотиков приводило к замедлению набора массы тела животными относительно группы контроля и групп, получавших масляную кислоту (рис. 1c). Начальные значения массы тела мышей составили 19.5 ± 0.2 г. В группах Veh и Veh + BA набор массы тела составил 125 и 129% соответственно относительно начальных значений ($n = 25$, $p < 0.05$ и $n = 25$, $p < 0.05$). В группе Ab масса тела животных не увеличилась за 2 нед. инъекций и составила 107% от начальной ($n = 25$). Введение препарата “Закофальк” группе Ab + BA привело к увеличению массы тела до 126% от начальных значений ($n = 25$, $p < 0.05$).

Исследование поведенческих реакций в тесте Открытое поле

Анализ результатов теста Открытое поле показал, что у мышей, получавших инъекции антибиотиков, общая двигательная активность не отличалась от Veh и Ab + BA групп (рис. 2a). При этом горизонтальная активность в группе Ab усиливалась (рис. 2b). Количество пройденных квадратов составило 162.7 ± 10.2 шт., что значимо выше контроля (123.5 ± 7.9 шт., $n = 25$, $p < 0.05$). Количество пройденных квадратов у мышей группы Ab + BA не отличалось от контрольной группы (123.1 ± 8.1 шт., $n = 25$, $p > 0.05$). В связи с тем, что нами не наблюдалось достоверных отличий между группами Veh и Veh + BA по всем параметрам теста Открытое поле, данные группы Veh + BA здесь и далее не представлены.

Вертикальная двигательная активность отражает не только исследовательское поведение животных, но и координацию движений и считается по количеству свободных и пристеночных стоек. Общее количество стоек в группе Ab было значимо ниже (10.4 ± 2.3 шт., $n = 25$, $p < 0.05$) контроля и группы Ab + BA (13.6 ± 2.3 и 15.1 ± 1.8 шт., $n = 25$). Анализ стоек показал (рис. 2d), что в группе Ab наблюдалось резкое снижение количества свободных стоек (0.6 ± 0.3 шт., $n = 25$, $p < 0.05$) относительно групп Veh (4.2 ± 0.8 шт., $n = 25$) и Ab + BA (4.2 ± 0.7 шт., $n = 25$). Количество стоек с опорой на стенку Открытого поля (рис. 2c) в группах не отличалось (9.7 ± 1.5 , 9.6 ± 1.5 , 10.8 ± 1.5 шт., $n = 25$).

Исследование координации движений и мышечной силы

После двух недель инъекций антибиотиков в тесте Ротарод мыши демонстрировали меньшее время пребывания на вращающемся цилиндре (78.6 ± 12.1 с, $n = 25$, $p < 0.05$) относительно контроля (124.2 ± 9.7 с, $n = 25$) и группы Ab + BA (110.6 ± 20.0 с, $n = 25$, рис. 2e).

В тесте Сила хвата контрольные животные находились на сетке в течение 79.1 ± 6.6 с ($n = 25$, рис. 2f). В группе Ab время нахождения на сетке было значимо ниже кон-

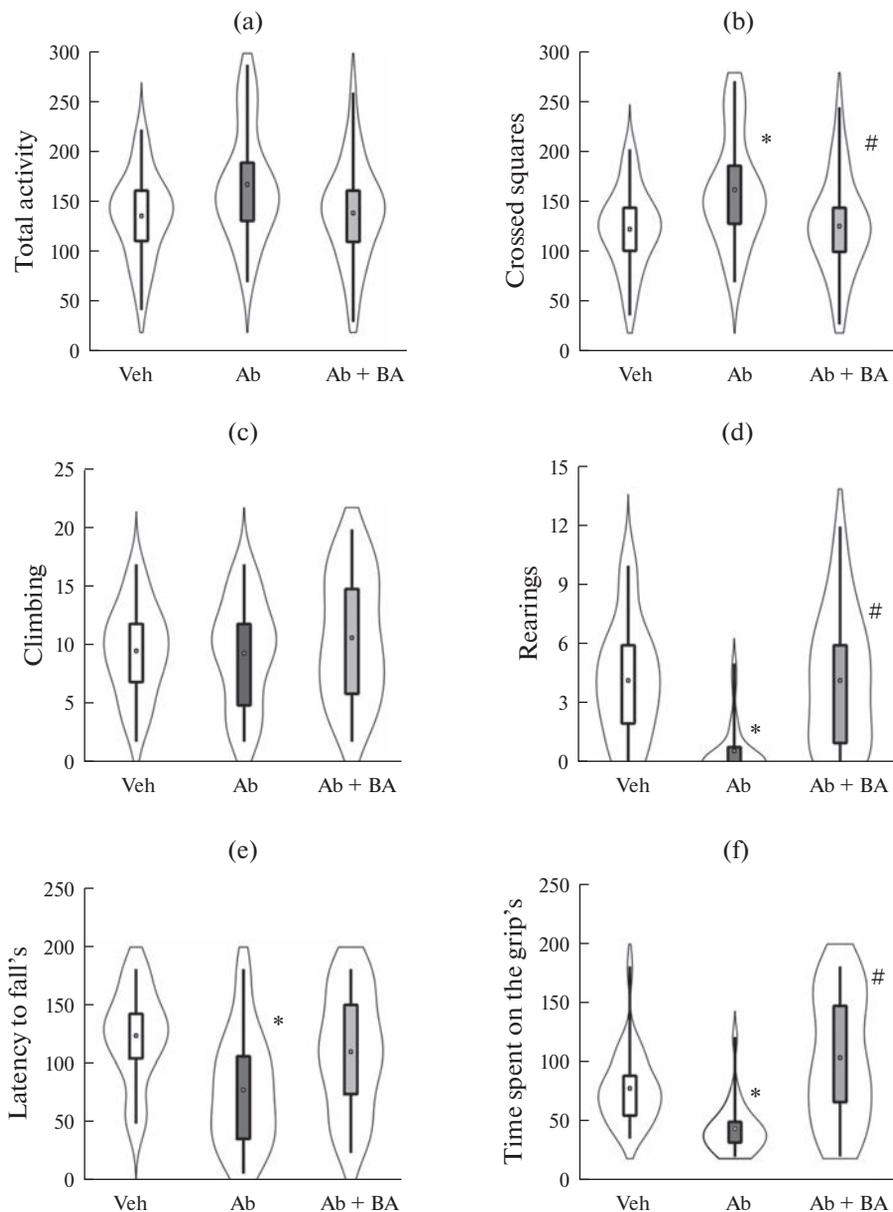


Рис. 2. Влияние антибиотиков и масляной кислоты на двигательную активность в тесте Открытое поле, координацию движений и силу мышц. Общая двигательная активность (а) и количество пересеченных квадратов (б), вертикальная двигательная активность – стойки с опорой на стенку (с) и свободные стойки (д) в тесте Открытое поле; время пребывания на вращающемся цилиндре в тесте Ротарод (е) и время пребывания на сетке в тесте Сила хвата (ф) у мышей групп Veh; Ab; Ab + BA. Результаты представлены в виде графика плотности распределения данных, где прямоугольники – 25–75%, усы – значения минимума/максимума, квадратик внутри – среднее значение. * – $p < 0.05$ относительно контрольных групп, # – $p < 0.05$ относительно группы Ab.

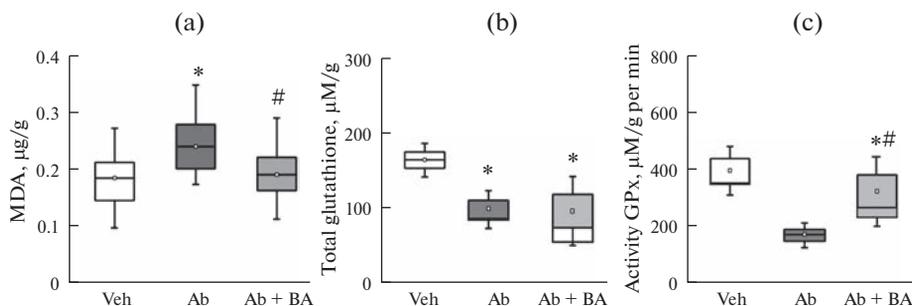


Рис. 3. Уровень окислительного стресса в скелетных мышцах задних конечностей мышей после введения антибиотиков и масляной кислоты. Уровень МДА (а), общий глутатион (б), активность глутатионпероксидазы (с) в мышцах задних конечностей мышей групп контроль (Veh, белые столбцы); Ab (серые столбцы); Ab + BA (светло-серые столбцы). Прямоугольники – 25–75%, черная линия – медиана, квадратик внутри – среднее значение, усы – значения минимума/максимума. * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, # – $p < 0.05$ по сравнению с группой Ab.

трольных значений и составило 45.1 ± 5.5 с ($n = 25$, $p < 0.05$). В группе Ab + BA этот параметр не отличался от контроля (104.3 ± 10.6 с; $n = 25$, рис. 2f).

Влияние масляной кислоты на уровень окислительного стресса в мышцах мышей с инъекциями антибиотиков

Для оценки степени окислительного стресса у мышей измеряли уровень МДА в тканях мышц задних конечностей. Уровень МДА увеличился в группе Ab до 0.24 ± 0.01 мкг/г ($n = 20$) по сравнению с контрольной группой 0.18 ± 0.01 мкг/г ($n = 20$, $p < 0.05$), что указывает на более высокую продукцию активных форм кислорода в мышцах (рис. 3а). У мышей группы Ab + BA уровень МДА был значительно ниже (0.19 ± 0.01 мкг/г, $n = 20$) и не отличался от контрольной группы.

Одним из самых распространенных антиоксидантов является глутатион и группа ферментов, использующая его для обезвреживания перекисей – глутатионпероксидазы. Мы проанализировали концентрацию глутатиона и ферментативную активность глутатионпероксидазы в мышечных тканях. Было обнаружено, что концентрация глутатиона снижалась у животных группы Ab (99.8 ± 11.9 мкМ/г, $p < 0.05$, $n = 20$) относительно контрольных значений (166.4 ± 10.8 мкМ/г, $n = 20$, рис. 3б). В группе Ab + BA содержание глутатиона также было ниже контроля и составило 98.4 ± 22.1 мкМ/г ($p < 0.05$, $n = 20$). Активность глутатионпероксидазы в мышцах мышей группы Ab составила 172.9 ± 19.0 мкМ/г/мин ($n = 20$, $p < 0.05$) и была ниже контрольных значений (399.2 ± 43.3 мкМ/г/мин, $n = 20$, рис. 3с). Активность глутатионпероксидазы в мышцах мышей из группы Ab + BA (321.7 ± 82.0 мкМ/г/мин, $n = 20$) была ниже, чем в контрольной группе, но выше чем у мышей группы Ab.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие микробиоты и скелетных мышц все больше привлекает внимание исследователей в связи с ее влиянием на метаболизм и фенотип мышечных волокон и, как следствие, на их функциональную активность [11]. Кроме того, выяснилось, что добавки с пробиотиками частично предотвращают атрофию скелетных мышц, связанную с онкологической кахексией и саркопенией [31]. В нашем исследовании для анализа роли микробиоты в поддержании двигательной активности и

силы мышц был использован коктейль антибиотиков широкого спектра действия, который приводил к истощению состава бактериальных таксонов, а также дисбалансу в бактериальных сообществах [7]. КЦЖК являются одними из метаболитов микробиоты, содержание которых снижается в условиях применения антибиотиков [32–35]. Поэтому для предотвращения негативных последствий применения антибиотиков нами был использован препарат “Закофальк”, содержащий одного из представителей КЦЖК – масляную кислоту в виде бутирата кальция. Содержание бутирата кальция в препарате составляет 305 мг, и рекомендуемая доза на массу тела у человека – 7 мг/кг. Второй компонент “Закофалька” – инулин – часто используется при лечении синдрома раздраженного кишечника с запорами и способствует снижению времени транзита кишечника. В экспериментах на мышцах показано, что инулин способствует утилизации жиров в мышцах [36, 37], увеличению числа бифидобактерий в толстом кишечнике и, как следствие, усилению естественного синтеза бутирата [38]. Содержание инулина в препарате составляет 250 мг, и при приеме препарата в рекомендуемых дозах организм получает 6 мг/кг инулина, что меньше рекомендуемых доз для человека – 140 мг/кг. Поэтому проявления позитивных эффектов инулина относительно бутирата будет существенно ниже, тем не менее, нельзя исключить позитивные свойства инулина в отношении микробиоты наряду с бутиратом.

В наших экспериментах в группе животных, получавших антибиотики, наблюдалось увеличение смертности и снижение скорости набора массы тела, что, вероятно, связано с развитием воспалительного процесса в желудочно-кишечном тракте, приводящего к нарушению усвояемости питательных веществ [7, 32]. Применение препарата масляной кислоты в группе Ab приводило к восстановлению динамики набора массы тела животных, что согласуется с данными о позитивных эффектах введения смеси КЦЖК или трансплантации микробиоты на массу и мышечную функцию скелетных мышц у GF-мышей [17, 39].

В тесте Открытое поле у мышей группы Ab не наблюдалось изменения общей двигательной активности, но увеличивалась горизонтальная активность, что может указывать на развитие тревожности [40] и требует дополнительного изучения. У мышей этой группы было выявлено снижение общего количества вертикальных стоек, что может быть связано как с уменьшением исследовательской активности, так и с нарушением координации движений. Вертикальная двигательная активность животных в Открытом поле представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (Climbing, стойка с опорой) или остаются на весу (Rearing, стойка без опоры) [25]. Дополнительный анализ с разделением стоек по двум видам не выявил отличий в числе стоек с опорой на стенку между группами, но показал резкое снижение количества стоек на задних лапах без опоры, требующих координации движения для поддержания данной позы, у мышей группы Ab. Снижение времени пребывания на движущемся цилиндре в тесте Ротарод у мышей группы Ab подтверждает предположение о нарушении координации движения. Кроме того, анализ мышечной силы по времени виса животного на сетке показал значительное снижение этого показателя у мышей этой группы Ab.

Снижение силы мышц при дефиците кишечной микробиоты было показано у GF-мышей в исследованиях *ex vivo* [1, 17], где одним из механизмов явилось нарушение сократительной способности миофибрилл за счет снижения экспрессии гена, кодирующего тропонин, а также генов, необходимых для нормальной сборки и развития ацетилхолинового рецептора в нервно-мышечном соединении. Эти изменения нивелировались, когда мышам GF трансплантировали нативную кишечную микробиоту [17]. Ряд исследований указывает также на снижение выносливости у мышей GF или при угнетении микробиоты, оцененной в тестах Плавание,

Бег на тредбане и в Открытом поле [1, 17, 19, 20, 41]. При этом использование пробиотиков у мышей улучшало мышечную массу, способствовало повышению мышечной выносливости и снижению мышечного повреждения, связанного с физическими нагрузками у мышей [41–43].

В нашем исследовании у мышей, получавших препарат масляной кислоты одновременно с антибиотиками, горизонтальная двигательная активность и количество свободных стоек в Открытом поле не отличалось от контроля. Кроме того, время, проведенное на вращающемся цилиндре в тесте Ротарод, и время виса на сетке, отражающей силу мышц конечностей мыши, было сопоставимо с группой контроля. Положительное влияние КЦЖК на силу мышц и выносливость было показано при введении других представителей КЦЖК – пропионата [44], ацетата [19] и смеси КЦЖК [17]. Более того, добавка бутирата в корм улучшала мышечную массу и физическую функцию у старых мышей (26 мес.) [22].

Регуляция функционирования скелетных мышц микробиотой кишечника может осуществляться за счет различных механизмов. Один из основных механизмов, оказывающих вклад в потерю мышечной массы и функции, это системное хроническое воспаление. Микробиота кишечника поддерживает интестинальный барьер, способствуя метаболическому и иммунному гомеостазу [23, 32, 45], а снижение бактериального разнообразия нарушает его целостность, что ведет к проникновению микробных продуктов, таких как липополисахариды, в сосудистое русло и вызывает системное воспаление, метаболические заболевания, снижает мышечную функцию и массу [23, 46]. Кроме того, метаболиты микробиоты поддерживают экспрессию транспортеров глюкозы и КЦЖК в тонком кишечнике, метаболизм глюкозы и липидов в различных тканях [1, 19, 47]. В скелетных мышцах эффекты КЦЖК могут быть опосредованы собственными рецепторами – GPR41 (FFAR3) и GPR43 (FFAR2) [17, 48–50], где КЦЖК модулируют метаболизм липидов, усиливая поглощение и окисление жирных кислот, а также содержание гликогена [1, 19, 51]. Таким образом, путем регуляции мышечного метаболизма и фенотипа волокон микробиота кишечника влияет на физическую работоспособность и сократимость мышц [1]. Интересно, что пробиотические добавки у мышей наряду с увеличением мышечной массы и силы хвата содействовали развитию медленного и окислительного фенотипа мышц, способствующего мышечной выносливости [1, 39].

В нашей работе в скелетных мышцах мышей группы Ab наблюдалось повышение уровня МДА, являющегося маркером окислительного стресса с одновременным снижением активности глутатионпероксидазы. При этом также уменьшался уровень общего глутатиона. Известно, что антибиотики вызывают окислительный стресс в клетках микроорганизмов, составляющих микрофлору кишечника, который, в свою очередь, может оказывать влияние и на клетки организма хозяина [52]. Действительно, у мышей, получавших антибиотики, повышались маркеры окислительного стресса в крови и тканях, а также увеличивалась экспрессия ключевых генов антиоксидантной защиты [52]. При этом оптимальный состав кишечной микробиоты оказывает влияние на синтез белка в скелетных мышцах, биогенез и функцию митохондрий, снижает уровень маркеров воспаления и выработку активных форм кислорода [23, 46]. Сниженная активность глутатионпероксидазы и каталазы в сыворотке крови и печени обнаружены у GF-мышей по сравнению с контрольной группой животных и мышей с реколонизацией [41]. На стареющих крысах в условиях стерильного содержания также было показано снижение активности ферментов антиоксидантной системы глутатиона [53]. В нашей работе применение препарата масляной кислоты в группе мышей Ab восстанавливало активность глутатионпероксидазы и снижало содержание МДА, при этом уровень глутатиона

оставался низким, что, вероятно, указывает на активное использование данного субстрата для обезвреживания активных форм кислорода.

Таким образом, изменения микробиоты, вызванные применением антибиотиков широкого спектра действия, приводят к развитию окислительного стресса в скелетных мышцах задних конечностей мышей, что сопровождается снижением силы мышц, а также нарушением координации движения и двигательной активности. Эти поведенческие нарушения нивелировались применением препарата, содержащего масляную кислоту, который также восстанавливал уровень МДА, активность глутатионпероксидазы и предотвращал смертность и потерю массы тела вследствие использования антибиотиков. Поскольку потеря фенотипа и мышечной функции сопровождается целым рядом патологических состояний, таких как сахарный диабет, онкология, наблюдается при старении, использование метаболитов нормальной микробиоты может стать перспективной стратегией для предотвращения таких состояний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, выполнены с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и были одобрены Локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 33 от 25.11.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и Кабинета министров Республики Татарстан (проект № 22-25-20045).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Г.Ф., С.Д.М. и Я.О.В.), сбор данных (М.А.И., С.А.Ф., С.Д.М.), обработка данных (Я.О.В., М.А.И., С.А.Ф.), написание и редактирование манускрипта (Я.О.В., С.Г.Ф., М.А.И., С.Д.М., С.А.Ф.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nay K, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C* (2019) Gut bacteria are critical for optimal muscle function: A potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317(1): E158–E171. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00521.2018>
2. *Li G, Jin B, Fan Z* (2022) Mechanisms Involved in Gut Microbiota Regulation of Skeletal Muscle. *Oxid Med Cell Longev* 2022: 151191. <https://doi.org/10.1155/2022/2151191>
3. *Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB* (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90: 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
4. *Evans WJ* (2010) Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr* 91(4): 1123S–1127S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28608A>
5. *Shaidullov IF, Sorokina DM, Sitdikov FG, Hermann A, Abdulkhakov SR, Sitdikova GF* (2021) Short chain fatty acids and colon motility in a mouse model of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 21(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01613-y>

6. *Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C* (2000) The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 118(4): 724–734.
[https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(00\)70142-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(00)70142-9)
7. *Arslanova A, Tarasova A, Alexandrova A, Novoselova V, Shaidullova I, Khusnutdinova D, Grigoryeva T, Yarullina D, Yakovleva O, Sitdikova G* (2021) Protective effects of probiotics on cognitive and motor functions, anxiety level, visceral sensitivity, oxidative stress and microbiota in mice with antibiotic-induced dysbiosis. *Life* 11(8): 764.
<https://doi.org/10.3390/life11080764>
8. *Adamo KB, Graham TE* (1998) Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* 84(3): 908–913.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.3.908>
9. *Dinan TG, Cryan JF* (2017) Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 595(2): 489–503.
<https://doi.org/10.1113/JP273106>
10. *Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI* (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 979–984.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
11. *Bindels LB, Delzenne NM* (2013) Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2186–2190.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.021>
12. *Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L* (2008) Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57(5): 591–599.
<https://doi.org/10.1136/gut.2007.140210>
13. *Padmaja S, Green-Johnson J* (2015) Butyric acid inhibits a Toll-like receptor 2 agonist-mediated increase of Toll-like receptor 3-induced chemokine production by HT-29 intestinal epithelial cells. *J Immunol* 194(1): 196.11.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.194.Supp.196.11>
14. *Lustgarten MS* (2019) Role of the gut microbiome and short-chain fatty acids on skeletal muscle mass. *Front Physiol* 10: 1435.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01435>
15. *Nobel YR, Cox LM, Kirigin FF, Bokulich NA, Yamaniishi S, Teitler I, Chung J, Sohn J, Barber CM, Goldfarb DS, Raju K, Abubucker S, Zhou Y, Ruiz VE, Li H, Mitreva M, Alekseyenko AV, Weinstein GM, Sodergren E, Blaser MJ* (2015) Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun* 6: 7486.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8486>
16. *Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M* (2010) The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 53(4): 606–613.
<https://doi.org/10.1007/s00125-010-1662-7>
17. *Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, Reza MM, Martin KA, Kundu P, Cox LM, Selkirk J, Poma JM, Zhang H, Padmanabhan P, Moret C, Gulyás B, Blaser MJ, Auwerx J, Holmes E, Nicholson J, Wahli W, Pettersson S* (2019) The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med* 11(502): eaan5662.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan5662>
18. *Manickam R, Oh HYP, Tan CK, Paramalingam E, Wahli W* (2018) Metronidazole Causes Skeletal Muscle Atrophy and Modulates Muscle Chronometabolism. *Int J Mol Sci* 9(8): 2418.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082418>
19. *Okamoto T, Morino K, Ugi S, Nakagawa F, Lemecha M, Ida S, Ohashi N, Sato D, Fujita Y, Mae-gawa H* (2019) Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316: E956–E966.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00510.2018.0193-1849/19>
20. *Huang WC, Chen YH, Chuang HL, Chiu CC, Huang CC* (2019) Investigation of the effects of microbiota on exercise physiological adaptation, performance, and energy utilization using a Gnotobiotic animal model. *Front Microbiol* 10: 1906.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01906>
21. *Frampton J, Murphy KG, Frost G, Chambers ES* (2020) Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab* 2(9): 840–848.
<https://doi.org/10.1038/s42255-020-0188-7>

22. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, Kinter M, Remmen HV (2015) The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell* 14(6): 957–970.
<https://doi.org/10.1111/accel.12387>
23. Przewłócka K, Folwarski M, Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Kaczor JJ (2020) Gut-Muscle Axis Exists and May Affect Skeletal Muscle Adaptation to Training. *Nutrients* 12(5): 1451.
<https://doi.org/10.3390/nu12051451>
24. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, Cotter PD, Dinan TG, Cryan JF (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun* 48: 165–173.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
25. De Paula Vieira A, de Passillé AM, Weary DM (2012) Effects of the early social environment on behavioral responses of dairy calves to novel events. *J Dairy Sci* 95(9): 5149–5155.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5073>
26. Karl T, Pabst R, Von Hörsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55(1): 69–83.
<https://doi.org/10.1078/0940-2993-00301>
27. Weydt P, Hong SY, Kliot M, Möller T (2003) Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *NeuroReport* 14(7): 1051–1054.
<https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000073685.00308.89>
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351–358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
29. Razygraev AV, Yushina AD, Titovich IA (2018) Correction to: A Method of Measuring Glutathione Peroxidase Activity in Murine Brain: Application in Pharmacological Experiment. *Bull Exp Biol Med* 165(4): 589–592.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4219-2>
30. Yakovlev AV, Dmitrieva SA, Krasnova AN, Yakovleva OV, Sitdikova GF (2022) Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia. *Neurochem J* 16(3): 243–250.
<https://doi.org/10.1134/S181971242203014X>
31. Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, Teliouis K, Ibrahim YM, Mirabal S, Erdman SE (2007) Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* 7: 11803–11816.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7730>
32. Mekonnen SA, Merenstein D, Fraser CM, Marco ML (2020) Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Curr Opin Biotechnol* 61: 226–234.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.01.005>
33. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D, Bargiela R, von Bergen M, Neulinger SC, Däumer C, Heinsen F-A, Latorre A, Barbas C, Seifert J, dos Santos VM, Ott SJ, Ferrer M, Moya A (2013) Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 62(11): 1591–1601.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303184>
34. Binder HJ (2010) Role of Colonic Short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol* 72: 297–313.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135817>
35. Theriot CM, Koenigs-knecht MJ, Carlson PE, Hatton GE, Nelson AM, Li B, Huffnagle GB, Li JZ, Young VB (2014) Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 5: 3114.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4114>
36. dos Reis SA, da Conceição LL, Rosa DD, dos Santos Dias MM, do Carmo Gouveia Peluzio M (2015) Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. *Nutr Hosp* 31(2): 528–534.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7706>
37. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J, Cani PD (2011) Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60: 2775–2786.
<https://doi.org/10.2337/db11-0227>
38. Rivière A, Selak M, Lantín D, Leroy F, De Vuyst L (2016) Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol* 7: 979.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

39. *Qiu Y, Yu J, Li Y, Yang F, Yu H, Xue M, Zhang F, Jiang X, Ji X, Bao Z* (2021) Depletion of gut microbiota induces skeletal muscle atrophy by FXR-FGF15/19 signalling. *Ann Med* 53(1): 508–522.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1900593>
40. *Nedogreeva OA, Stepanichev MY, Gulyaeva NV* (2020) Removal of the Olfactory Bulbs in Mice Leads to Changes in Affective Behavior. *Neurosci Behav Physiol* 50: 892–899.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00982-3>
41. *Hsu YJ, Chiu CC, Li YP, Huang WC, Huang YT, Huang CC, Chuang HL* (2015) Effect of Intestinal Microbiota on Exercise Performance in Mice. *J Strength Condit Res* 29(2): 552–558.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000644>
42. *Chen Y-M, Wei L, Chiu Y-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, Wang M-F, Huang C-C* (2016) *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice. *Nutrients* 8(4): 205.
<https://doi.org/10.3390/nu8040205>
43. *Jäger R, Shields KA, Lowery RP, De Souza EO, Partl JM, Hollmer C, Purpura M, Wilson JM* (2016) Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *Peer J* 4: e2276.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2276>
44. *Scheiman J, Lubner JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham LD, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, Yang Z, Hatjab MW, Avila-Pacheco J, Clish CB, Lessard S, Church GM, Kostic AD* (2019) Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 25(7): 1104–1109.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
45. *Rastelli M, Cani PD, Knauf C* (2019) The gut microbiome influences host endocrine function. *Endocr Rev* 40(5): 1271–1284.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00280>
46. *Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS* (2018) Gut microbiota contribute to age-related changes in skeletal muscle size, composition, and function: biological basis for a gut-muscle axis. *Calcif Tissue Int* 102(4): 433–442.
<https://doi.org/10.1007/s00223-017-0345-5>
47. *Guo A, Li K, Xiao Q* (2020) Fibroblast growth factor 19 alleviates palmitic acid-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress via the AMPK/PGC-1 α pathway in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 526(4): 1069–1076.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.002>
48. *Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Stepiewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ* (2003) The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278(13): 11312–11319.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
49. *Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B* (2003) Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1047–1052.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00488-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00488-1)
50. *Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, Nouvenne A, Tana C, Del Rio D, Maggio M, Ventura M, Meschi T* (2017) Aging gut microbiota at the cross-road between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: Is there a gut–muscle axis? *Nutrients* 9(12): 1303.
<https://doi.org/10.3390/nu9121303>
51. *Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, Cefalu WT, Ye J* (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58(7): 1509–1517.
<https://doi.org/10.2337/db08-1637>
52. *Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Molina A, Shirihai OS, Collins JJ* (2013) Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci Transl Med* 5(192): 192ra85.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006055>
53. *Chen LH, Snyder DL* (1992) Effects of age, dietary restriction and germ-free environment on glutathione-related enzymes in Lobund-Wistar rats. *Arch Gerontol Geriatr* 14(1): 17–26.
[https://doi.org/10.1016/0167-4943\(92\)90003-m](https://doi.org/10.1016/0167-4943(92)90003-m)

The Effect of the Microbiota Metabolite – Butyric Acid on Motor Coordination, Muscle Strength and the Level of Oxidative Stress in Skeletal Muscles in Mice with Dysbiosis

O. V. Yakovleva^{a, *}, A. I. Mullakaeva^a, A. F. Salikhzyanova^a,
D. M. Sorokina^a, and G. F. Sitdikova^a

^a*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^{*}*e-mail: a-olay@yandex.ru*

According to modern concepts, the composition and diversity of the intestinal microbiota play an essential role in maintaining immunity, homeostasis, and, in general, the physiological functions of the host organism. Recently the positive role of the microbiota and its metabolites especially short-chain fatty acids, in the metabolism and functional activity of skeletal muscles was reported. The aim of our work was to analyze muscle strength and motor coordination in mice after injection of broad-spectrum antibiotics with simultaneous administration of a microbiota metabolite – one of the representatives of short-chain fatty acids – butyric acid. In addition, we determined the level of malondialdehyde, the concentration of total glutathione and the activity of glutathione peroxidases in the muscles of the hind limbs in mice with administration of antibiotics and butyric acid. The administration of antibiotics to adolescent mice for two weeks induced higher mortality and decrease of weight, and also caused significant changes in motor behavior, including an increase in horizontal motor activity, decrease in vertical motor activity, muscle strength, and motor coordination. A higher level of oxidative stress was found in the muscle tissues of the hind limbs of mice treated with antibiotics. At the same time, oral administration of butyric acid prevented the observed changes and improved not only behavioral disorders, but also partially reduced the level of oxidative stress. In conclusion, metabolite of normal microbiota has a positive effect on the functional and biochemical parameters of skeletal muscles in dysbiosis, which can be used to prevent loss of muscle function in various pathological conditions.

Keywords: antibiotic-induced dysbiosis, butyric acid, motor activity, muscle strength, coordination of movements, oxidative stress

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ФИБРОЗА
В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС SPRAGUE-DAWLEY И WISTAR ПРИ РАЗВИТИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2023 г. Н. И. Агалакова¹, Е. В. Михайлова¹, А. А. Пьянков², О. В. Надей¹,
И. А. Ершов¹, М. М. Галагудза³, А. Я. Багров⁴, И. В. Романова¹. *

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

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

³Институт экспериментальной медицины НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Padakonn Pharma, Narva, Estonia

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 03.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Проведено сравнение степени развития уремической кардиомиопатии и фиброза сердечной ткани при хронической почечной недостаточности в модельных экспериментах на самцах крыс Sprague-Dawley и Wistar категории SPF. Для индукции ХПН у крыс проводили субтотальную нефрэктомия слева, а через 2 нед. — тотальную нефрэктомия справа. Контролем служили ложнооперированные животные. Через 4 нед. после второй операции у животных измеряли артериальное давление, а в тканях левого желудочка сердца методами ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга оценивали экспрессию факторов фиброза (транскрипционного фактора *Fli1*, проколлагена-I, коллагена-I и коллагена-IV). После нефрэктомии у крыс Sprague-Dawley выявлено значительное повышение систолического артериального давления и гипертрофия левого желудочка сердца. У крыс Wistar разница артериального давления между нефрэктомизированными и ложнооперированными животными была меньше, а отношение массы левого желудочка к массе тела не изменилось. Экспериментальная хроническая почечная недостаточность у крыс Sprague-Dawley сопровождалась 1.5–2.5-кратным подавлением экспрессии гена *Fli1* и снижением содержания белка *Fli1* в ткани сердца, в то время как у крыс Wistar достоверных различий не наблюдалось. Уровни проколлагена-I и коллагена-I в сердце крыс обеих линий не изменялись ни на уровне транскрипции, ни на уровне трансляции. Такая разница в развитии патологических процессов в ткани сердца животных двух линий свидетельствует о неэффективности примененной схемы нефрэктомии для индукции уремической кардиомиопатии и изучения про-фибротических механизмов у крыс Wistar.

Ключевые слова: почечная недостаточность, нефрэктомия, сердце, фиброз, *Fli1*

DOI: 10.31857/S086981392306002X, **EDN:** WGYLZJ

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) представляет собой многофакторное прогрессирующее патологическое состояние, неизбежно приводящее к необратимому снижению функции почек [1]. Этот синдром ежегодно диагностируется у миллионов людей по всему миру, достигая 10–15% от мировой популяции, и в большинстве случаев сопровождается развитием сердечно-сосудистых осложнений — уремической кардиомиопатии (УКП). Более того, у большинства пациентов уремическая кардиомиопатия развивается даже раньше ХПН, а риск инвалидности и неожиданной смерти из-за сердечно-сосудистых патологий выше, чем из-за терминальной почечной недостаточности, в целом в 15–30 раз чаще, чем от других заболеваний. Уремическая кардиомиопатия характеризуется гипертензией, множеством метаболических нарушений в клетках сердца и ремоделированием ткани сердца (гипертрофией левого желудочка сердца и фиброзом миокарда), приводящим к аритмии (систолической и диастолической дисфункции) [2, 3].

Экспериментальное моделирование ХПН является важнейшим подходом для изучения патофизиологических механизмов развития уремической кардиомиопатии и поиска новых терапевтических стратегий, направленных на снижение тяжести его течения. Одной из наиболее эффективных моделей ХПН у экспериментальных животных, быстро приводящих к УКП, является нефрэктомия (НЭ) разных типов, например, 5/6 и 2K1C (2-kidney-1-clip) [4]. В предыдущих работах было показано, что частичная НЭ (5/6 почек) у крыс и мышей приводит к появлению симптомов, характерных для уремической кардиомиопатии, в частности фиброзу поражению сердца [5–8]. Однако грызуны разных видов и линий вследствие генетических различий по-разному реагируют на НЭ, в результате чего степень и эффективность развития ХПН может различаться, и для появления выраженных симптомов требуется разное время или различные схемы НЭ [4, 9]. В предыдущих исследованиях механизмов развития сосудистого фиброза при уремической кардиомиопатии в качестве модельного объекта использовались крысы Sprague-Dawley [5–7]. Целью данной работы было оценить универсальность и эффективность модели 5/6 НЭ для индукции уремической кардиомиопатии и фиброза сердечной ткани у двух родственных линий крыс (Sprague-Dawley и Wistar).

Известно, что одним из универсальных сигнальных путей фиброза тканей сердечно-сосудистой системы при гипертензивных заболеваниях является активация внутриклеточного каскада, включающего подавление экспрессии транскрипционного фактора *Fli1*, что приводит к стимуляции экспрессии генов проколлагена и избыточному синтезу коллагенов различных типов [10]. Для того чтобы выяснить, какая из линий крыс является более подходящей экспериментальной моделью для изучения процессов развития фиброза сердечной ткани при ХПН, на уровне транскрипции и трансляции был проведен сравнительный анализ уровней экспрессии фактора *Fli1*, коллагенов I и IV.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Самцы крыс линий Sprague-Dawley ($n = 13$) и Wistar ($n = 12$) статуса SPF были получены из НПП “Питомник лабораторных животных” филиала Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Пушкино, Московская обл.) в возрасте 3 мес. Масса тела животных составляла 280–330 г. Крысы содержались на базе вивария Института экспериментальной медицины НМИЦ им. В.А. Алмазова при температуре 23–25°C, цикле освещении 12 ч день/ночь и с доступом к еде и воде *ad libitum*.

После 1-недельной адаптации крысы каждой линии были случайным образом разделены на 2 группы. Для индукции ХПН животным проводили субтотальную

Таблица 1. Характеристики праймеров, использованных для ПЦР в “реальном времени”

Ген	Положение	Последовательность (5'–3')	NCBI номер
<i>Collagen-I</i>	F R	TGG CAA CCT CAA GAA GTC CC ACA AGC GTG CTG TAG GTG AA	NM_053304.1
<i>Collagen-IV</i>	F R	AAA TGG CGC TCC TGA TCC AA TTC TTG TGG AGT TCT CGC CC	NM_001135009.1
<i>Fli1</i>	F R	CCAACGAGAGGAGAGTCATCG TTCCGTGTTGTAGAGGGTGGT	NM_002017.5
<i>18S*</i>	F R	GGACACGGACAGGATTGACA ACCCACGGAATCGAGAAAGA	NR_046237.1

* – Контрольный ген, кодирующий 18S субъединицу рибосомальной РНК.

НЭ слева (удаление коркового и части мозгового слоев), а еще через 2 нед. – тотальную НЭ справа. Контролем служили ложнопериоперированные животные. Для анестезии использовали изофлуран. Через 4 нед. после второй операции у животных измеряли артериальное давление (АД) с помощью установки для неинвазивного измерения фирмы ADInstruments (Австралия), состоящей из NIBP Controller (запись пульсограммы, измерение АД) и Power Lab 4/35 (преобразование и вывод сигнала на ПК в программу для анализа Lab Chart 8). В конце эксперимента под анестезией изофлураном крысам рассекали брюшную аорту, выделяли левые желудочки сердца и замораживали их на сухом льду. Экспрессию факторов фиброза (транскрипционного фактора *Fli1*, проколлагена-I, коллагена-I и коллагена-IV) в сердечной ткани оценивали методами ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга.

Анализ уровня экспрессии генов был проведен с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Для выделения тотальной РНК использовали RNA-extract (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК и ее чистоту ($A_{260}/A_{280} \geq 1.6$) определяли с помощью “Nanophotometer C40” (Implen, Германия). Синтез обратной транскрипции (ОТ) был проведен с 1 мкг тотальной РНК и набором ОТ MMLV RT kit (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Амплификацию проводили в смеси (25 мкл), содержащей ОТ-продукт (по 10 нг для генов, кодирующих коллагены, 20 нг для гена, кодирующего *Fli1*), по 0.4 мкМ прямого (F – forward) и обратного (R – reverse) праймеров (табл. 1), qPCRmix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) в 96-луночных ПЦР-планшетах (в триплетах) на приборе “Real-Time System CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler” (BioRad Laboratories, Inc., Singapore). Протокол циклов амплификации ранее был подробно описан ранее [11]. Чистоту ПЦР-продукта проверяли с помощью электрофореза в 30%-ном агарозном геле с бромистым этидием и оценивали с помощью гель-документирующей системы (Chemidoc, BioRad, Великобритания). Для количественной оценки уровня мРНК целевых генов относительно контрольного гена *18S* использовали метод delta-delta Ct.

Для иммуноблоттинга кусочки левого желудочка сердца гомогенизировали при 4°C в буфере RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, США). Белки в солюбилизованных пробах разделяли по молекулярной массе с помощью SDS-PAGE в 10%-ном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Health Care/Life Sciences, Pittsburgh, PA, США). Мембраны последовательно инкубировали с первичными антителами к *Fli1* (rabbit ab124791, Abcam; 1 : 500), проколлагену-I (mouse sc-166572, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США; 1 : 200), коллагену-I (mouse sc-393573, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, США; 1 : 200) и коллагену-IV (rabbit ab6586, Abcam; 1 : 500), а затем со вторичными HRP-конъюгированными антителами к кролику (Amersham RPN934, GE Health Care/Life Sciences, Ве-

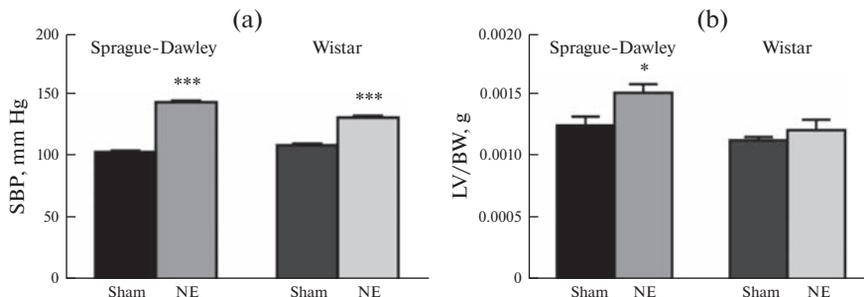


Рис. 1. Артериальное давление (а) и отношение массы левого желудочка к массе тела (б) у крыс Sprague-Dawley и Wistar после ложной операции (Sham) и нефрэктомии (NE). Обозначения: LV – левый желудочек, BW – масса тела. Достоверность отличий от Sham: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$, $n = 6-7$ в каждой группе.

ликобритания; 1 : 1000) или к мыши (Amersham RPN931; 1 : 2000). Для оценки уровня экспрессии контрольного белка GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) использовали первичные антитела мыши (Santa Cruz Biotechnology, США; 1 : 1000), а затем вторичные антитела козы против мыши (1 : 2000). Иммунопозитивный сигнал визуализировали с помощью реагентов Amersham ECL detection system (RPN2236) на пленку X-ray film (CEA, Göteborg, Швеция). Оптическую плотность полос определяли с помощью денситометрического анализа, используя программу Image Lab (BioRad, Hercules, CA, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, США), используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный тесты Тьюки или Даннета. Различия между пробами считали статистически достоверными при $p < 0.05$. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У животных обеих линий НЭ привела к значительному повышению систолического АД по сравнению с контрольными группами (рис. 1а). У крыс Sprague-Dawley АД повышалось от 105.3 ± 1.0 у ложнооперированных животных до 145.8 ± 1.2 мм рт. ст. у крыс после НЭ, в то время как у крыс Wistar – от 110.7 ± 1.4 мм рт. ст. до 133.4 ± 1.4 мм рт. ст. соответственно. Кроме того, развитие ХПН у крыс Sprague-Dawley сопровождалось увеличением массы левого желудочка сердца по отношению к массе тела, в то время как у животных линии Wistar это отношение статистически достоверно не изменилось (рис. 1б).

Сравнительный анализ экспрессии транскрипционного фактора Fli1, одного из ключевых факторов фиброза, показал, что экспериментальная ХПН у крыс Sprague-Dawley сопровождалась значительным подавлением экспрессии гена *Fli1* (рис. 2а). Содержание белка Fli1 в клетках сердца также снижалось в 2–2.5 раза (рис. 2б). У крыс Wistar после НЭ в нашем эксперименте уровень Fli1 достоверно не изменился ни на уровне транскрипции, ни на уровне трансляции (рис. 2а–с).

Экспрессия гена другого маркера фиброза – коллагена-I в тканях левого желудочка после НЭ не изменилась ни у крыс Sprague-Dawley, ни у животных Wistar. Уровни белка про-коллагена-I и коллагена-I также не различались в ткани сердца контрольных и НЭ-крыс обеих линий (рис. 3).

В ткани сердца крыс Sprague-Dawley после НЭ было выявлено значительное повышение уровня мРНК коллагена-IV и накопление белка коллагена-IV, в то время как у крыс Wistar ни уровень мРНК коллагена-IV, ни содержание белка коллагена-IV не изменялись (рис. 4).

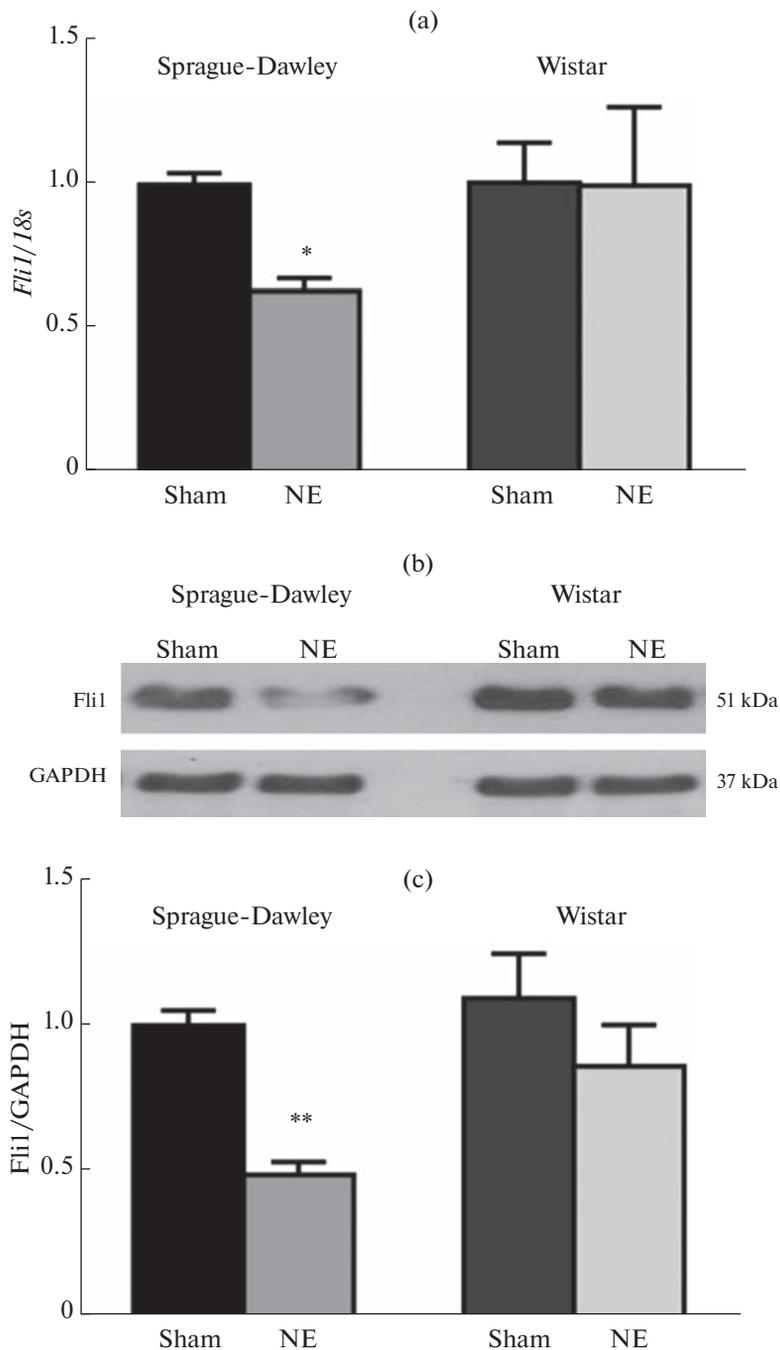


Рис. 2. Относительный уровень мРНК транскрипционного фактора Fli1 (а) и белка Fli1 (б, в) в тканях сердца крыс Sprague-Dawley и Wistar после ложной операции (Sham) и нефрэктомии (NE). * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$ по сравнению с Sham, $n = 6-7$ в каждой группе.

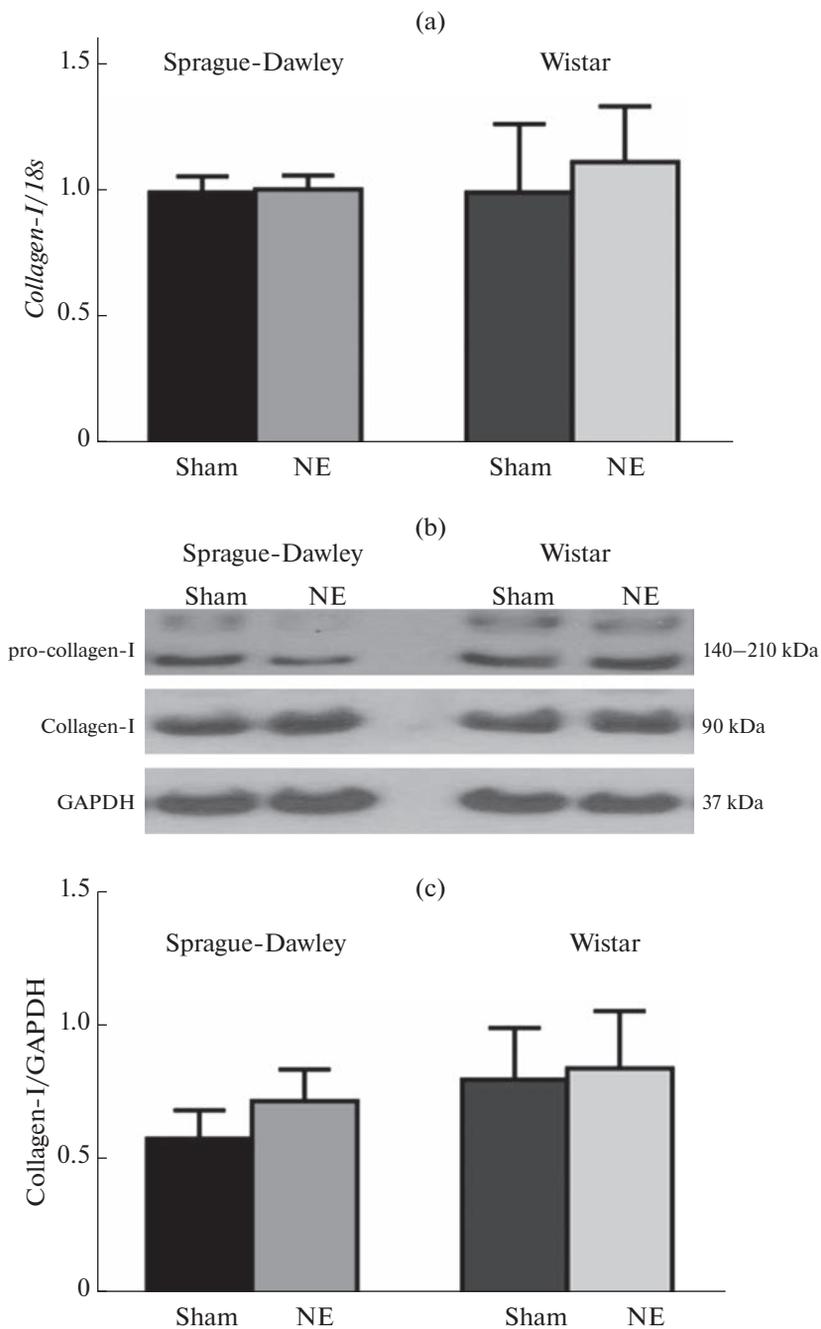


Рис. 3. Относительный уровень мРНК коллагена-I (a) и уровень белков проколлагена-I (b) и коллагена-I (b, c) в ткани сердца крыс Sprague-Dawley и Wistar после ложной операции (Sham) и нефрэктомии (NE). В каждой группе $n = 6$.

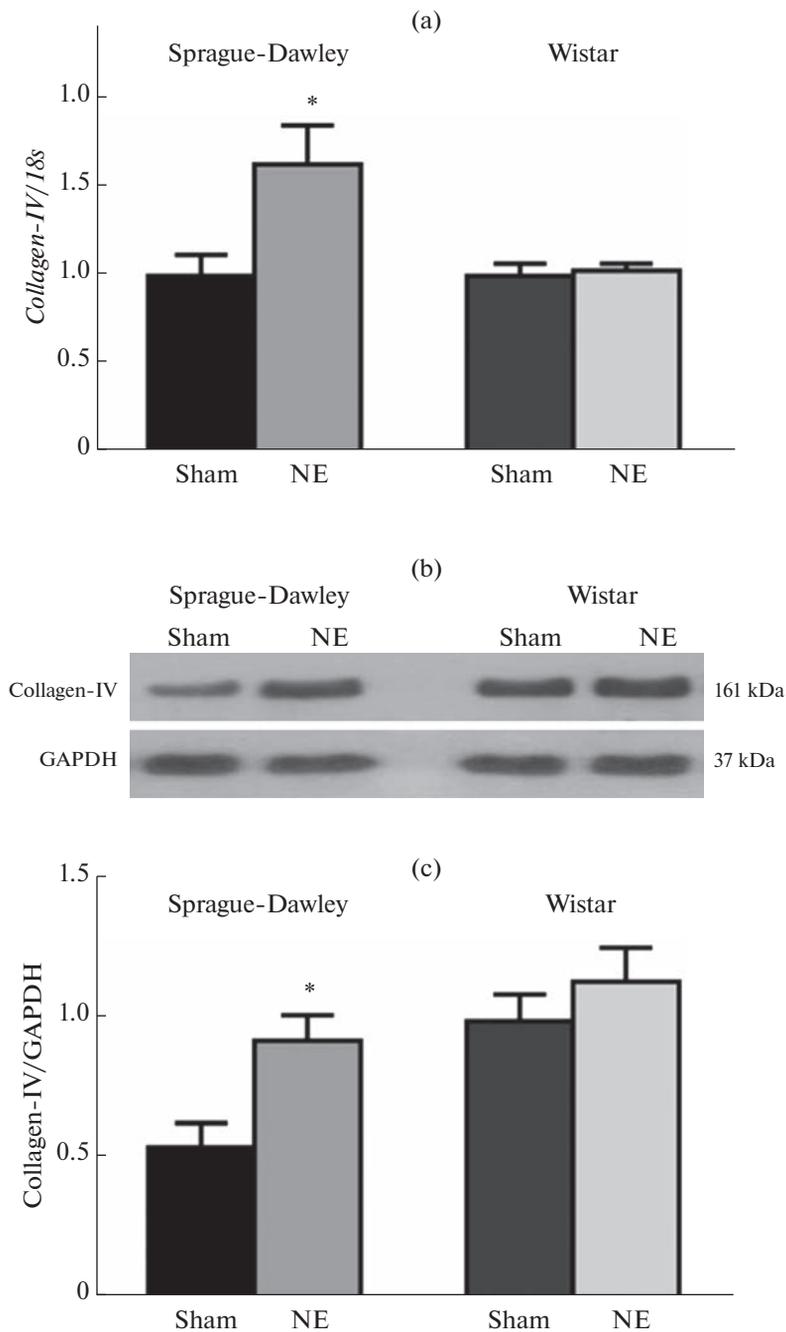


Рис. 4. Относительный уровень мРНК коллагена-IV (a) и уровень белка коллагена-IV (b, c) в ткани сердца крыс Sprague-Dawley и Wistar после ложной операции (Sham) и нефрэктомии (NE). (*) – достоверность отличий от Sham при $p < 0.05$, $n = 6$ в каждой группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хотя точные генетические отличия между животными линий Sprague-Dawley и Wistar не определены, в ряде исследований выявлены различные метаболические особенности, а также отличия реакций сердечно-сосудистой и респираторной систем в ответ на действие различных стимулов. Например, крысы Sprague-Dawley представляют собой менее активных и более быстро растущих животных, однако метаболические эффекты высокожировой диеты (набор массы тела и жировой ткани, размер адипоцитов, уровни адипонектина и лептина в плазме, снижение толерантности к глюкозе) более очевидны у крыс Wistar [12]. Кроме того, животные этих линий различаются по эндокринному профилю [13] и метаболизму глюкозы и аминокислот в клетках печени [14]. Эмбрионы Wistar более подвержены тератогенному воздействию, например, бис-диамин индуцирует более выраженные сердечно-сосудистые аномалии [15]. Повышение артериального давления в ответ на кратковременную гипоксию было более выражено у Sprague-Dawley [16], в то время как у Wistar гипоксия индуцировала более сильную полицитемию и гипертрофию правого желудочка, которые являются важнейшими признаками легочной гипертензии [17]. У крыс Sprague-Dawley наблюдались более стабильные ишемические повреждения и максимальное снижение мозгового кровоснабжения по сравнению с крысами Wistar после окклюзии средней мозговой артерии, хотя уровень смертности был выше у последних [18]. Наоборот, в исследовании Kunze и соавт. [19] уровень смертности после подобной процедуры была выше у Sprague-Dawley.

Результаты нашей работы продемонстрировали значительные отличия в восприимчивости крыс Sprague-Dawley и Wistar к НЭ и, как следствие, разную эффективность развития уремиической кардиомиопатии и фиброза сердечной ткани при ХПН. Хотя АД повышалось у животных обеих линий, степень гипертензии у крыс Sprague-Dawley была значительно выше, чем у Wistar (рис. 1). Разница АД между ложнооперированными и нефрэктомированными животными линии Sprague-Dawley составила ~40 мм рт. ст., в то время как у крыс Wistar АД повысилось только на ~23 мм рт. ст. Увеличение массы левого желудочка сердца по отношению к массе тела у Sprague-Dawley может косвенно указывать на развитие гипертрофии сердца, в отличие от крыс линии Wistar, у которых этот параметр не отличался от такового у ложнооперированных животных. Уровни экспрессии изучаемых маркеров фиброза в тканях левого желудочка сердца крыс двух линий также различались. Если в сердце крыс Sprague-Dawley экспрессия гена *Fli1* и белка *Fli1* подавлялась в 1.5–2.5 раза, в сердце Wistar содержание этого фактора оставалась относительно стабильным как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции (рис. 2). Содержание коллагена-IV также увеличивалось только в ткани сердца крыс Sprague-Dawley (рис. 4).

Данные, полученные для крыс Sprague-Dawley, согласуются с результатами предыдущих исследований, полученных на НЭ-животных этой линии [5–7] и мышцах линии B6 [8]. Экспериментальная уремиическая кардиомиопатия и фиброз тканей сердечно-сосудистой системы, индуцированные 5/6 НЭ, сопровождалась увеличением в плазме крови содержания одного из кардиотонических стероидов – маринобуфагенина. Более того, было показано, что сигнальный путь фиброза, включающий подавление экспрессии *Fli1* и избыточный синтез коллагена, зависел от прямого ингибирования активности Na/K-АТФазы маринобуфагенином.

Проявления уремиической кардиомиопатии и возможное развитие фиброза сердечной ткани у крыс Wistar в предыдущих исследованиях не оценивались. Однако в ряде работ была выявлена меньшая восприимчивость крыс Wistar к НЭ, хотя полученные данные противоречивы, возможно, вследствие использования разных суб-

линий животных и схем НЭ. Так, 30-дневная выживаемость крыс Sprague-Dawley после 150-минутной односторонней тепловой ишемии почки, реперфузии и двухсторонней НЭ составила 55% по сравнению с 67% таковой Wistar-Furth [20]. После 5/6 НЭ 75% крыс линии Wistar-Kyoto остались нормотензивными, а в оставшейся почке не наблюдалось гломерулярных повреждений [21]. В работе Fleck и соавтор. [9] долговременные последствия и умеренный фиброз почки после 5/6 НЭ наблюдался только у самок Wistar. В противоположность этому, в исследовании Appenroth и соавт. [22] 5/6 НЭ и временная тепловая ишемия не приводили к каким-либо фиброзным изменениям в почках самок Wistar даже после 20 нед. после операции. Резистентность Wistar к развитию ХПН по сравнению со Sprague-Dawley была выявлена и в работах, в которых использовали как 5/6 НЭ [23], так и одностороннюю НЭ + DOCA + NaCl [24], хотя у животных обеих линий наблюдалось снижение экспрессии нескольких типов эндотелиальной синтазы оксида азота. Однако стеноз почечной артерии по методу 2K1C (2-kidney-1-clip) у крыс Wistar индуцировал значительное увеличение массы сердца и повышение АД, а также увеличение содержания мочевины в плазме крови через 4 нед. после процедуры [25].

Хотя известно, что уремиическая кардиомиопатия развивается раньше, чем выраженные симптомы ХПН [2, 3], меньшая степень патологических процессов в ткани сердца крыс Wistar, наблюдаемая в нашей работе, свидетельствует о неэффективности примененной схемы НЭ для изучения про-фибротических процессов. По-видимому, 4 нед. после НЭ недостаточно для развития уремиической кардиомиопатии и полноценного фиброза, а для получения сравнимых со Sprague-Dawley показателей этим животным необходимо более длительное время или другая схема НЭ. Повышение АД у крыс Wistar может быть связано с активацией других механизмов. Развитие гипертензии и сосудистых осложнений, в том числе при заболеваниях почек, также может быть следствием активации вазоконстрикции, один из механизмов которой включает избыточную продукцию эндотелием вазоконстрикторных факторов, в частности эндотелина-1 [26, 27]. Например, в недавнем исследовании отсроченной кардиотоксичности доксорубицина развитие фиброза сердца у крыс Wistar через 2 мес. после достижения максимальной кумулятивной дозы (15 мг/кг) сопровождалось достоверным увеличением экспрессии гена эндотелина [28], хотя минимальная доза препарата (5 мг/кг) приводила к значимому снижению уровня этого фактора. Кроме того, формирование фиброзной ткани зависело от дозы доксорубицина. Например, у крыс, получавших минимальную дозу (5 мг/кг) доксорубицина, экспрессия генов, кодирующих коллаген-I и коллагена-II, снижалась по сравнению с контрольной группой, в то время как введение 10 и 15 мг/кг доксорубицина не влияло или увеличивало экспрессию этих генов соответственно. Кроме того, у всех животных, получавших доксорубицин, снижался уровень мРНК коллагена-III [28]. Мы не исключаем, что и в сердце крыс Wistar после схемы НЭ, примененной в нашей работе, может изменяться экспрессия коллагенов других типов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры соответствовали положениям Animal Welfare act (2006) и European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС), а также правилам, изложенным в "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" и руководству по содержанию животных Института экспериментальной медицины Центра им. В.А. Алмазова. Дизайн исследования одобрен Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Протокол 12/1 2020 от 24 декабря 2020 г.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования Института экспериментальной медицины Центра им. В.А. Алмазова и центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-00967-23-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (А.Я.Б., М.М.Г., Н.И.А.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (Н.И.А., О.В.Н., Е.В.М., И.А.Е.), обработка результатов (Н.И.А., О.В.Н., Е.В.М., А.А.П., И.В.Р.), написание и редактирование текста (Н.И.А., И.В.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Garikapati K, Goh D, Khanna S, Echampati K* (2021) Uraemic Cardiomyopathy: A Review of Current Literature. *Clin Med Insights Cardiol* 15: 1179546821998347. <https://doi.org/10.1177/1179546821998347>
2. *Patel N, Yaqoob MM, Aksentijevic D* (2022) Cardiac metabolic remodelling in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 18(8): 524–537. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00576-x>
3. *Law JP, Pickup L, Pavlovic D, Townend JN, Ferro CJ* (2023) Hypertension and cardiomyopathy associated with chronic kidney disease: epidemiology, pathogenesis and treatment considerations. *J Hum Hypertens* 37(1): 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41371-022-00751-4>
4. *Adam RJ, Williams AC, Kriegel AJ* (2022) Comparison of the surgical resection and infarct 5/6 nephrectomy rat models of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 322(6): F639–F654. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00398.2021>
5. *Kennedy DJ, Vetteth S, Periyasamy SM, Kanj M, Fedorova L, Khouri S, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Kolodkin NI, Lakatta EG, Fedorova OV, Bagrov AY, Shapiro JI* (2006) Central role for the cardiotoxic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 47: 488–495. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000202594.82271.92>
6. *Elkareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EG, Smaili S, Periyasamy SM, Hariri IM, Fedorova L, Liu J, Wu L, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Fedorova OV, Kashkin VA, Bagrov AY, Shapiro JI* (2007) Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 49(1): 215–224. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000252409.36927.05>
7. *Haller ST, Kennedy DJ, Shidyak A, Budny GV, Malhotra D, Fedorova OV, Shapiro JI, Bagrov AY* (2012) Monoclonal antibody against marinobufagenin reverses cardiac fibrosis in rats with chronic renal failure. *Am J Hypertens* 25(6): 690–696. <https://doi.org/10.1038/ajh.2012.17>
8. *Elkareh J, Periyasamy SM, Shidyak A, Vetteth S, Schroeder J, Raju V, Hariri IM, El-Okdi N, Gupta S, Fedorova L, Liu J, Fedorova OV, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Watson DK, Bagrov AY, Shapiro JI* (2009) Marinobufagenin induces increases in procollagen expression in a process involving protein kinase C and Fli-1: implications for uremic cardiomyopathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 296(5): F1219–F1226. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90710.2008>
9. *Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, Nizze H, Stein G* (2006) Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats – influence of sex, strain, and surgical procedure. *Exp Toxicol Pathol* 57(3): 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.09.005>
10. *Mikhailova EV, Romanova IV, Bagrov AY, Agalakova NI* (2023) Fli1 and Tissue Fibrosis in Various Diseases. *Int J Mol Sci* 24(3): 1881. <https://doi.org/10.3390/ijms24031881>
11. *Agalakova NI, Grigorova Y, Ershov I, Reznik VA, Mikhailova EV, Nadei OV, Samuilovskaya L, Romanova LA, Adair CD, Romanova IV, Bagrov A* (2022) Canrenone restores vasorelaxation im-

- paired by marinobufagenin in human preeclampsia. *Int J Mol Sci* 23: 3336.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063336>
12. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Conceição Calhau C (2016) High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 5(1): 11–21.
<https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1061723>
 13. Kühn ER, Bellon K, Huybrechts L, Heyns W (1983) Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Horm Metab Res* 15(10): 491–498.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-1018767>
 14. Garg R, Heinzle E, Noor F (2018) Hepatocytes of Wistar and Sprague Dawley rats differ significantly in their central metabolism. *J Cell Biochem* 119(1): 909–917.
<https://doi.org/10.1002/jcb.26255>
 15. Fujino H, Nakagawa M, Nishijima S, Okamoto N, Hanato T, Watanabe N, Shirai T, Kamiya H, Takeuchi Y (2005) Morphological differences in cardiovascular anomalies induced by bis-diamine between Sprague-Dawley and Wistar rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 45: 52–58.
<https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2005.00063.x>
 16. Bazilio DS, Rodrigues KL, Moraes DJA, Machado BH (2021) Distinct cardiovascular and respiratory responses to short-term sustained hypoxia in juvenile Sprague Dawley and Wistar Hannover rats. *Auton Neurosci* 230: 102746.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102746>
 17. Snow JB, Kanagy NJ, Walker BR, Resta TC (2009) Rat Strain Differences in Pulmonary Artery Smooth Muscle Ca²⁺ Entry Following Chronic Hypoxia. *Microcirculation* 16(7): 603–614.
<https://doi.org/10.1080/10739680903114268>
 18. Svoboda J, Litvinec A, Kala D, Pošusta A, Vávrová L, Jiruška P, Otáhal J (2019) Strain differences in intraluminal thread model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Physiol Res* 68(1): 37–48.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933958>
 19. Kunze A, Zierath D, Drogomiretskiy O, Becker K (2014) Variation in behavioral deficits and patterns of recovery after stroke among different rat strains. *Transl Stroke Res* 5(5): 569–576.
<https://doi.org/10.1007/s12975-014-0337-y>
 20. Raman RN, Pivetti CD, Ramsamooj R, Matthews DL, Demos SG, Troppmann C (2011) Factors influencing rat survival in a warm renal ischemia model: time to adapt the protocols. *Transplant Proc* 43(5): 1511–1514.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.01.177>
 21. Bidani AK, Mitchell KD, Schwartz MM, Navar LG, Lewis EJ (1990) Absence of glomerular injury or nephron loss in a normotensive rat remnant kidney model. *Kidney Int* 38: 28–38.
<https://doi.org/10.1038/ki.1990.163>
 22. Appenroth D, Lupp A, Kriegsmann J, Sawall S, Splinther J, Sommer M, Stein G, Fleck C (2001) Temporary warm ischaemia, 5/6 nephrectomy and single uranyl nitrate administration—comparison of three models intended to cause renal fibrosis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 53(4): 316–324.
<https://doi.org/10.1078/0940-2993-00197>
 23. Saracyn M, Czarzasta K, Brytan M, Murawski P, Lewicki S, Ząbkowski T, Zdanowski R, Cudnoch-Jędrzejewska A, Kamiński GW, Wańkiewicz Z (2017) Role of Nitric Oxide Pathway in Development and Progression of Chronic Kidney Disease in Rats Sensitive and Resistant to its Occurrence in an Experimental Model of 5/6 Nephrectomy. *Med Sci Monit* 23: 4865–4873.
<https://doi.org/10.12659/msm.903820>
 24. Erdely A, Freshour G, Tain YL, Engels K, Baylis C (2007) DOCA/NaCl-induced chronic kidney disease: a comparison of renal nitric oxide production in resistant and susceptible rat strains. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F192–F196.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00146.2006>
 25. Drábková N, Hojná S, Zicha J, Vaněčková I (2020) Contribution of selected vasoactive systems to blood pressure regulation in two models of chronic kidney disease. *Physiol Res* 69(3): 405–414.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.934392>
 26. de Oliveira MG, Nadruz W Jr, Mónica FZ (2022) Endothelial and vascular smooth muscle dysfunction in hypertension. *Biochem Pharmacol* 205: 115263.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115263>
 27. Martínez-Díaz I, Martos N, Llorens-Cebrià C, Álvarez FJ, Bedard PW, Vergara A, Jacobs-Cachá C, Soler MJ (2023) Endothelin receptor antagonists in kidney disease. *Int J Mol Sci* 24(4): 3427.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043427>
 28. Podyacheva EY, Shmakova TV, Andreeva DD, Toropov RI, Cheburkin YV, Danilchuk MS, Martynov MO, Toropova YG (2023) Molecular markers profile of fibrosis in rats exposed to different doses of doxorubicin. *J Evol Biochem Physiol* 59(2): 359–368.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023020059>

Comparative Analysis of the Fibrosis Factors Expression in the Heart Tissue of Sprague-Dawley and Wistar Rats during Development of Chronic Renal Failure

N. I. Agalakova^a, E. V. Mikhailova^a, A. A. Piankov^b, O. V. Nadei^a, I. A. Ershov^a, M. V. Galagudza^c, A. Y. Bagrov^d, and I. V. Romanova^{a, *}

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

^b*Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, St.-Petersburg, Russia*

^c*Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of the Health of the Russian Federation, St.-Petersburg, Russia*

^d*Padakonn Pharma, Narva, Estonia*

**e-mail: irinaromanova@mail.ru*

The severity of the development of uremic cardiomyopathy (UC) and fibrosis of cardiac tissue at chronic renal failure (CRF) was compared in the model experiments on male Sprague-Dawley and Wistar rats of the SPF category. To induce CRF in rats, subtotal nephrectomy (NE) was performed on the left, and after 2 weeks, total nephrectomy on the right. Sham-operated (Sham) animals served as controls. 4 weeks after the second surgery, blood pressure (BP) was measured in animals, and the expression of fibrotic factors (transcription factor Fli1, pro-collagen-I, collagen-I and collagen-IV) in the tissues of heart left ventricle was evaluated by real-time PCR and immunoblotting. After NE, Sprague-Dawley rats exhibited a significant increase in systolic blood pressure and left ventricular hypertrophy. In Wistar rats, the difference in BP between NE and Sham animals was smaller, and the ratio of left ventricular mass to body weight did not change. Experimental CRF in Sprague-Dawley rats was accompanied by a 1.5–2.5-fold suppression of the *Fli1* gene expression and a decrease in the content of Fli1 protein in the cardiac tissue, while no significant differences were observed in Wistar rats. The levels of pro-collagen-I and collagen-I in the heart of rats of both lines did not change either at the levels of transcription or translation. Such difference in development of pathological processes indicates ineffectiveness of applied NE scheme for induction of UC and investigation of pro-fibrotic processes in Wistar rats.

Keywords: renal failure, nephrectomy, heart, fibrosis, Fli1

**ВАЗОАКТИВНОЕ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ
ИНГИБИТОРА c-Jun-N-ТЕРМИНАЛЬНЫХ КИНАЗ У КРЫС
С ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПОПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

© 2023 г. С. Ю. Жилиев¹, Т. Ф. Платонова¹, А. И. Хлебников², И. А. Щепёткин^{2, 3},
И. Т. Демченко¹, Д. Н. Аточин^{2, 4, *}

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

²Томский Политехнический Университет, Томск, Россия

³Отдел микробиологии и клеточной биологии, университет штата Монтана,
Бозман, США

⁴Центр сердечно-сосудистых исследований и Отдел кардиологии,
Главный госпиталь Массачусетса, Гарвардская медицинская школа,
Чарльзтаун, Массачусетс, США

*E-mail: atochin@cvrc.mgh.harvard.edu

Поступила в редакцию 02.04.2023 г.

После доработки 08.05.2023 г.

Принята к публикации 08.05.2023 г.

Целью работы явилось изучение вазоактивного и нейропротекторного действия ингибитора c-Jun-N-терминальных киназ (JNK), IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) при хронической гипоперфузии головного мозга, вызванной невозвратной билатеральной перевязкой сонных артерий. Мозговой кровотока изменялся количественно (метод клиренса водорода) одновременно в теменной коре, гиппокампе, черной субстанции и стриатуме головного мозга бодрствующих крыс. Перевязка сонных артерий вызывала понижение кровотока в исследуемых мозговых структурах с более выраженным снижением в коре (на 48% от исходного уровня) и с наименьшим падением в черной субстанции (на 25% от исходного уровня). Пониженный уровень кровотока в этих мозговых структурах сохранялся на протяжении 14 дней измерений. Реакции мозговых сосудов на гиперкапнический стимул (5% CO₂) утрачивались в период 2-недельной гипоперфузии, а неврологический статус животных не улучшался. Введение препарата IQ-1 (50 мг/кг, интраперитонеально, каждые 48 ч в течение 14 сут) сопровождалось увеличением кровотока во всех структурах мозга. Максимальное увеличение кровотока наблюдалось в стриатуме, а минимальное – в черной субстанции. После введения IQ-1 восстанавливалась чувствительность мозговых сосудов к гиперкапническому стимулу и существенно улучшалось неврологическое состояние животных к концу 2-й нед. гипоперфузии головного мозга. Результаты показывают, что использование ингибитора JNK позволяют уменьшить цереброваскулярные нарушения и связанные с ними неврологические расстройства при гипоперфузионном повреждении головного мозга.

Ключевые слова: ингибитор c-Jun-N-терминальных киназ, хроническая гипоперфузия мозга, мозговой кровотока, нейропротекция, гиперкапнический стимул, стриатум, черная субстанция

DOI: 10.31857/S0869813923060079, **EDN:** WHDHNT

ВВЕДЕНИЕ

c-Jun-N-терминальные киназы (JNK) принадлежат к семейству митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), которые активируются в ответ на действие разнообразных стрессорных и повреждающих факторов. JNK включают 10 изоформ, кодируемых тремя генами: JNK1 (4 изоформы), JNK2 (4 изоформы) и JNK3 (2 изоформы) [1, 2]. JNK1 и JNK2 представлены во всех клетках организма, в то время как JNK3 экспрессируется преимущественно в сердце и в головном мозге [3]. Фактор транскрипции c-Jun является субстратом для JNK и после фосфорилирования может запускать процессы апоптоза в нейрональных клетках [4]. JNK вовлечены в регуляцию воспаления, играют важную роль в сигнальных путях, ведущих к апоптозу и некрозу, регулируют некоторые транскрипционные, равно как и не связанные с транскрипцией клеточные процессы, от которых зависит повреждение нейронов головного мозга и кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии [5, 6]. JNK вовлечены в патогенез диабета, атеросклероза, инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона [7, 2], опухолевого роста [3], воспалительных заболеваний, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности и гипертрофии миокарда [5]. Ингибиторы JNK привлекают к себе широкое внимание как потенциальные терапевтические средства для профилактики и лечения ишемических повреждений [8, 9].

Нами был синтезирован новый ингибитор JNK – IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]-хиноксалин-11-он оксим), который обладает повышенным аффинитетом в отношении изоформы JNK3 [10], выраженным нейропротекторным эффектом и способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [11]. С помощью filamentной модели локальной ишемии/реперфузии средней мозговой артерии нами показано, что размеры зоны некроза мозга у мышей достоверно уменьшались при введении IQ-1 по сравнению с контрольными значениями [11]. Выраженная нейропротекция с использованием IQ-1 была выявлена также при тотальной ишемии/реперфузии мозга крыс [12]. Одним из возможных механизмов нейропротекторного действия ингибитора может быть увеличение мозгового кровотока в связи с выделением оксида азота (NO) при биотрансформации молекулы IQ-1 [11]. Целью настоящей работы явилось изучение вазоактивного и нейропротекторного действия ингибитора IQ-1 у животных с хронической гипоперфузией головного мозга, вызванной невозвратной окклюзией 2 сонных артерий (модель 2VO [13]). Из клинической практики известно, что такое хроническое ограничение кровоснабжения мозга может развиваться в результате сердечной недостаточности, системной артериальной гипотензии, при патологии сосудов головного мозга (мальформация, атеросклероз) или действия других патогенетических факторов [13, 14]. Кроме того, при хронической гипоперфузии мозга отчетливо проявляется утрата когнитивных функций у животных [15, 16], что открывает возможность количественной оценки неврологического дефицита. В основе гипоперфузионного повреждения мозга лежит медленная, прогрессирующая гибель нервных клеток мозга, приводящая к таким клиническим проявлениям, как потеря памяти, деменция, нарушения движений, болезнь Альцгеймера и другим неврологическим заболеваниям [13].

Задачами исследований являлись: (а) – изучение действия ингибитора IQ-1 на мозговой кровоток и реактивность церебральных сосудов у животных на фоне хронической гипоперфузии мозга, вызванной невозвратной окклюзией общих сонных артерий, (б) – оценка влияния IQ-1 на неврологический статус крыс с хронической гипоперфузией головного мозга, (в) – сравнение вазомоторного действия IQ-1 с эффектом NO-донора S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения работы использовались следующие химические препараты: соединение IQ-1 (11*H*-индено[1,2-*b*]хиноксалин-11-он оксим) было синтезировано в научно-образовательном центре Н.М. Кижнера Томского Политехнического Университета (Россия), золетил (Zoletil Virbac, Франция), ксиланит (ЗАО Нита-фарм, Россия), атропина сульфат (ОАО Дальхимфарм, Россия), изофлуран (Лабораторное Каризоо, СА, Барселона, Испания), SNAP (Sigma-Aldrich, США), Tween-80 (Sigma-Aldrich, США).

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Wistar массой 287 ± 19 г, закупленных в питомнике животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия). Протокол опытов утвержден биоэтической комиссией ИЭФБ РАН по использованию животных в экспериментах в соответствии с международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований на животных (CIOMS, Geneva, 1985). При подготовке животных к опытам проводили две хирургические операции. На первом этапе животным имплантировали в мозг платиновые электроды для измерений мозгового кровотока. На втором этапе у животных с вживленными электродами проводилась перевязка 2 общих сонных артерий для создания модели хронической гипоперфузии головного мозга. Каждой крысе за неделю до опытов под наркозом в асептических условиях вводили платиновые игольчатые электроды диаметром 0.15 мм в мозговые структуры (теменная кора, гиппокамп, черная субстанция и стриатум) согласно атласу стереотаксических координат [17]. Вживление электродов в головной мозг крыс проводилось с использованием золетил-ксилазинового наркоза (из расчета на 100 г массы тела животного): золетил – 0.3 мг внутримышечно, ксиланит – 0.8 мг внутримышечно, атропина сульфат 0.1%-ный раствор – 0.01 мл подкожно. Хирургическую стадию наркоза верифицировали по исчезновению реакций на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса.

Каждый платиновый электрод изолировался стеклом за исключением кончика длиной 1.5 мм, который 3-кратно покрывался раствором нафiona (Nafion, Sigma-Aldrich) с последующим высушиванием. При таких размерах активной поверхности электрода объем участка мозга, в котором измеряется кровоток, составляет около 8 мм³. Для крепления электродов в височную кость черепа билатерально ввертывали два винта из нержавеющей стали. Электроды и винты фиксировались на кости зубопротезным цементом. Животных возвращали в виварий, в индивидуальные клетки и обеспечивали соответствующий послеоперационный уход.

Через 5–7 дней у животных с вживленными в мозг электродами под наркозом осуществлялась перевязка 2 общих сонных артерий (модель 2VO [18]). Для этого крыс помещали в индукционную камеру, подключенную к испарителю для изофлурана (Dvaro Испаритель, Дельфин, КНР). Для индукции применяли 4 об. % изофлурана при самостоятельном дыхании в потоке кислорода (2 л/мин). После потери двигательной активности крысу перемещали на подогреваемый операционный столик и анестезия продолжалась изофлураном (1.5 об. % в потоке кислорода, 1 л/мин) через намордную маску. После выделения левой и правой общих сонных артерий их необратимо перевязывали нейлоновой нитью (Ethilon 2/0, Ethicon, США). Рану ушивали, операционное поле обрабатывали антисептиком (5%-ный раствор йода). Животных на 5–7 ч помещали в бокс под согревающую лампу.

Абсолютные величины локального мозгового кровотока измерялись с помощью метода водородного клиренса [19]. Метод основан на определении скорости вымывания (клиренса) из мозговой ткани водорода, предварительно введенного в нее путем дыхания водородсодержащей смеси (2.5% H₂ в воздухе). Продолжительность ингаляции водородсодержащей смеси составляла 10–15 с. При непрерывном изме-

рении напряжения водорода в мозговой ткани скорость его вымывания прямо зависит от интенсивности кровотока, что положено в основу расчета абсолютных величин церебральной гемодинамики. Напряжение водорода в мозге измерялось полярографически с помощью ранее имплантируемых внутримозговых платиновых электродов и референтного (хлорсеребряного) электрода в виде клипсы, закрепленной на основании хвоста. Кривые клиренса водорода регистрировались с помощью приборов (Физиоблок-Пульс, Санкт-Петербург) и использовались для вычисления абсолютных значений мозгового кровотока (мл/мин/100 г ткани мозга) с помощью программно-аппаратного комплекса WINDAQ (DC-200, DATA, ОН, США). Метод водородного клиренса позволяет последовательно измерять мозговой кровоток с интервалом не менее 5 мин. Неврологический дефицит, возникающий при гипоперфузии мозга, оценивали при помощи шкалы McGraw в модификации Ганнушкиной [20, 21], определяющей степень неврологических нарушений легкого (1–3), среднего (3–6) и сильного (6–10) уровней тяжести.

В работе было использовано 47 крыс с вживленными платиновыми электродами, разделенных на 3 группы. В группе 1 ($n = 12$) у крыс с интактными сонными артериями оценивались реакции кровотока в стриатуме при разовом внутривентральном введении IQ-1 в дозе 25, 50 и 100 мг/кг. Целью этих опытов являлось определение вазоактивной дозы препарата IQ-1 для ее использования в последующих опытах. У части крыс этой группы измерялся кровоток в стриатуме при внутривентральном введении донора NO SNAP в дозе 2 мкг/кг. У оставшихся 35 животных с вживленными электродами проводилась билатеральная невозвратная окклюзия сонных артерий. В результате операции погибло 7 крыс. У выживших животных (группа 2, $n = 14$) измерения кровотока выполнялись одновременно в теменной коре, гиппокампе, стриатуме и черной субстанции. Кровоток измерялся в течение 2 нед. через каждые 2 сут. У части животных группы 2 ($n = 7$) тестировалась реактивность церебральных сосудов посредством оценки изменений локального мозгового кровотока в ответ на 30-секундную ингаляцию 5% CO₂ в воздухе (гиперкапническая проба). У всех животных группы 2 оценивался неврологический статус на фоне развития гипоперфузии мозга.

У животных группы 3 ($n = 14$) кровотоки в 4 структурах мозга измерялись после внутривентрального введения IQ-1 в дозе 50 мг/кг. Такая доза препарата была выбрана на основании результатов предварительных исследований на группе 1 животных. Препарат (порошок) тщательно размешивали в растворе (вода + Tween-80), после чего заданное количество препарата в объеме раствора 2 мл вводилось внутривентрально после перевязки сонных артерий. В каждом опыте кровоток измерялся до и после введения препарата в течение 2 ч. Измерения мозгового кровотока по такой схеме с курсовым введением IQ-1 (т.е. повторяющимся введением препарата каждые 48 ч в течение 14 дней) проводились на каждом животном. У части крыс группы 3 ($n = 6$) измерялся мозговой кровоток после внутривентрального введения NO-донора SNAP (2 мкг/кг). У всех животных в процессе 2-недельной гипоперфузии мозга оценивался неврологический статус на фоне курсового введения IQ-1. После завершения опытов проводили эвтаназию животных с использованием инъекции зоветила (3 мг) в хвостовую вену.

Для статистического анализа использовались абсолютные величины локального мозгового кровотока. Данные анализировали с помощью пакета программ Sigma-Plot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA). Рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку. Дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для сравнения величин кровотока, измеренных в разные временные интервалы мозговой гипоперфузии у контрольных животных и у крыс после введения IQ-1. Для выявления достоверности ($p < 0.05$) использовали парный t -критерий с точным тестом Фишера. Все данные представлены как $M \pm SEM$.

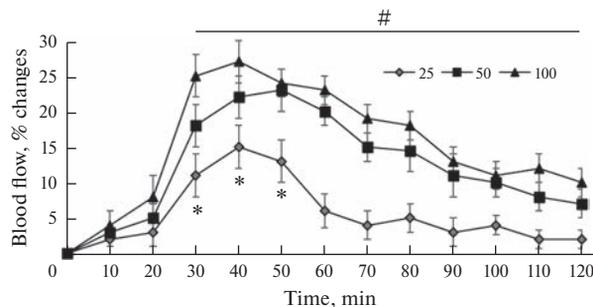


Рис. 1. Дозозависимые изменения кровотока в стриатуме крыс с интактными сонными артериями при внутрибрюшинном введении IQ-1 в дозах 25, 50 и 100 мг/кг.

* – $p < 0.05$ по сравнению с базовым значением для 25 мг/кг, # – $p < 0.05$ по сравнению с базовыми значениями для 50 и 100 мг/кг. Препарат вводился в момент времени “0”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усредненное значение кровотока в стриатуме крыс (группа 1, $n = 12$) с интактными сонными артериями составляло 69.0 ± 5.8 мл/мин/100 г ткани. Внутрибрюшинное введение IQ-1 в дозах 25, 50 и 100 мг/кг вызывало повышение кровотока в стриатуме, величина и продолжительность которого зависела от дозы (рис. 1). Достоверное повышение кровотока выявилось через 30 мин после введения препарата и сохранялось на протяжении 2 ч измерений. Внутрибрюшинное введение донора NO – SNAP в дозе 2 мкг/кг увеличивало кровоток в стриатуме на такую же величину, как и при введении IQ-1 в дозе 50 мг/кг. Указанная доза IQ-1 была выбрана нами в последующих исследованиях вазоактивного и нейропротекторного действия этого препарата у крыс с хронической гипоперфузией головного мозга.

У крыс группы 2 ($n = 14$) кровоток измерялся в 4 областях мозга в течение 2 нед. после невозвратной перевязки сонных артерий. Полученные данные демонстрируют наличие гетерогенности в кровоснабжении головного мозга до перевязки сонных артерий с наибольшим уровнем кровотока в черной субстанции и теменной коре (табл. 1).

Через 30 мин после перевязки сонных артерий кровоток достоверно снижался во всех исследуемых структурах головного мозга и сохранялся на достоверно низком уровне в течение 2 нед. по отношению к его значениям до начала гипоперфу-

Таблица 1. Динамика кровотока в 4-х структурах мозга у крыс после билатеральной перевязки сонных артерий (2VO)

Структура мозга	Кровоток (мл/мин/100 г ткани)								
	время измерений								
	до 2VO	30 мин 2VO	2 сут	4 сут	6 сут	8 сут	10 сут	12 сут	14 сут
Кора теменная	82 ± 6	43 ± 4 (-48%)*	$42 \pm 4^*$	$42 \pm 4^*$	$43 \pm 5^*$	$45 \pm 5^*$	$46 \pm 5^*$	$46 \pm 5^*$	$47 \pm 5^*$
Гиппокамп	59 ± 5	32 ± 4 (-46%)*	$32 \pm 4^*$	$33 \pm 4^*$	$32 \pm 3^*$	$36 \pm 4^*$	$37 \pm 3^*$	$38 \pm 4^*$	$39 \pm 5^*$
Черная субстанция	89 ± 8	67 ± 6 (-25%)*	$61 \pm 7^*$	$65 \pm 4^*$	$70 \pm 4^*$	$71 \pm 4^*$	$72 \pm 7^*$	$71 \pm 6^*$	73 ± 7
Стриатум	67 ± 6	38 ± 4 (-43%)*	$35 \pm 3^*$	$31 \pm 5^*$	$32 \pm 4^*$	$35 \pm 4^*$	$40 \pm 4^*$	$39 \pm 5^*$	$42 \pm 5^*$

* – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем до 2VO.

Таблица 2. Кровоснабжение мозга крыс при курсовом введении препарата IQ-1 на фоне церебральной гипоперфузии

Структура мозга	Кровоток (мл/мин/100 г ткани)								
	время измерений								
	до 2VO	30 мин 2VO	2 сут	4 сут	6 сут	8 сут	10 сут	12 сут	14 сут
Кора теменная	84 ± 6	46 ± 4 (-45%)*	42 ± 4	45 ± 4	46 ± 5	47 ± 3	50 ± 5	53 ± 4	55 ± 4 [#]
Гиппокамп	61 ± 5	35 ± 4 (-43%)*	34 ± 4	36 ± 4	38 ± 3	39 ± 4	40 ± 3	41 ± 5	45 ± 4 [#]
Черная субстанция	90 ± 7	69 ± 5 (-33%)*	70 ± 6	71 ± 4	72 ± 4	75 ± 4	73 ± 5	74 ± 5	82 ± 6 [#]
Стриатум	72 ± 6	41 ± 4 (-41%)*	43 ± 4	46 ± 5	45 ± 4	49 ± 4	46 ± 4	51 ± 5 [#]	57 ± 5 [#]

Представленные данные являются величинами кровотока, измеренными каждый раз перед введением IQ-1. * – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем до 2VO, [#] – $p < 0.05$ для всех значений уровня кровотока по сравнению с уровнем значений 30 мин 2VO.

зии. Незначительное повышение кровотока выявилось к концу наблюдений, однако величины этих изменений были статистически недостоверными по отношению к значениям церебральной гемодинамики первого дня гипоперфузии.

У крыс группы 3 ($n = 14$) после перевязки обеих сонных артерий уровень гипоперфузии оценивался путем измерений кровотока в 4 структурах мозга в течение 14 дней на фоне курсового введения препарата IQ-1 (50 мг/кг, внутривенно) через каждые 48 ч (табл. 2).

Анализ данных табл. 2 показал, что кровоснабжение 4 структур мозга через 30 мин после окклюзии сонных артерий достоверно понижалось: максимально в коре и минимально в черной субстанции. При введении IQ-1 каждые 2 сут проявилась общая для всех используемых мозговых структур тенденция постепенного повышения мозгового кровотока. Однако статистически достоверное увеличение локального кровоснабжения головного мозга выявилось только через 2 нед. после начала церебральной гипоперфузии. При сравнении значений локального кровотока у крыс групп 2 и 3 через 2 нед. гипоперфузии выявлен достоверно более высокий уровень кровотока животных с введением IQ-1 (рис. 2).

При оценке реактивности мозговых сосудов на гиперкапнический стимул (вдыхание 5% CO₂) кровоток в исследуемых структурах мозга крыс с интактными сонными артериями достоверно повышался на 19–37% ($p < 0.05$). После перевязки сонных артерий мозговой кровоток в ответ на гиперкапнический стимул достоверно не изменялся. При разовом введении IQ-1 на фоне гипоперфузии мозга дилаторные реакции церебральных сосудов на вдыхание 5% CO₂ прогрессивно усиливались и достигали достоверных значений 14–26% ($p < 0.05$) через 14 дней после ограничения мозгового кровотока.

Для оценки вазоактивной потенции IQ-1 изменения кровотока в стриатуме крыс после введения препарата сравнивались с цереброваскулярными реакциями в ответ на введение донора NO (SNAP). Выявлены односторонние и равноценные вазомоторные эффекты, и эффекты SNAP в дозе 2 мкг/кг при разных уровнях перфузии мозга, однако IQ-1 в дозе 50 мг/кг вызывал более значимые цереброваскулярные реакции в условиях гипоперфузии мозга (рис. 3).

У животных после двухсторонней окклюзии сонных артерий, не получавших ингибитор IQ-1, степень выраженности неврологических нарушений на 8-е сут гипоперфузии составляла 6.93 ± 0.18 баллов по шкале McGraw, что проявлялось в вялости, замедленности и маневности движений, одно- и двухсторонних птозах век, парезах конечностей и параличе задних конечностей у 2 из 12 наблюдаемых животных. Через 14 дней гипоперфузии мозга степень неврологического дефицита

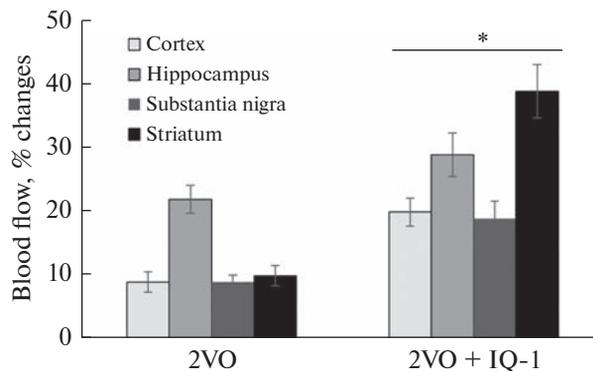


Рис. 2. Изменения мозгового кровотока через 2 нед. гипоперфузии у крыс без фармакологической поддержки (2VO) и при курсовом введении IQ-1 (2VO + IQ-1). По оси ординат: изменения кровотока в % (отношение 14 дней/30 мин 2VO по данным табл. 1 и 2). * – $p < 0.05$ по сравнению с 2VO.

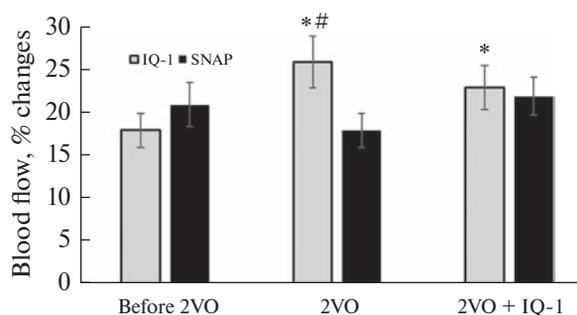


Рис. 3. Изменения кровотока в стриатуме крыс в ответ на введение IQ-1 и донора NO (SNAP). Before 2VO: до перевязки сонных артерий; 2VO: через 14 дней гипоперфузии мозга без курсового введения IQ-1; 2VO + IQ-1: через 14 дней гипоперфузии с курсовым введением IQ-1; * – $p < 0.05$ по сравнению с Before 2VO. # – $p < 0.05$ IQ по сравнению со SNAP.

уменьшилась до 5.73 ± 0.11 баллов. На фоне курсового введения IQ-1 животным неврологический дефицит на 8-е сут ишемии составил 4.06 ± 0.08 баллов, а через 14 дней – 2.13 ± 0.18 баллов, что достоверно отличается от аналогичного показателя первой группы крыс, не получавших фармакологическую поддержку ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новыми результатами настоящей работы являются: (1) IQ-1 (ингибитор JNK) обладает вазоактивными свойствами и вызывает дозозависимое увеличение мозгового кровотока, (2) вазодилататорное действие IQ-1 усиливается в условиях хронической гипоперфузии мозга, (3) курсовое введение IQ-1 восстанавливает реактивность церебральных сосудов к гиперкапнии в условиях мозговой гипоперфузии, (4) IQ-1 улучшает неврологический статус у крыс в условиях хронической гипоперфузии мозга.

В проведенных исследованиях вазоактивное и нейропротекторное действие IQ-1 изучалось на модели билатеральной окклюзии сонных артерий, используемой для оценки эффективности коррекции гипоперфузионных нарушений в головном мозге фармакологическими препаратами [13]. Невозвратная 2-сторонняя окклюзия сонных артерий в наших опытах вызывала острое понижение кровотока в теменной коре, гиппокампе, черной субстанции и стриатуме, с более выраженным снижением в коре и с наименьшим падением в черной субстанции. Разница в степени снижения кровотока в изучаемых структурах объясняется тем, что при билатеральной окклюзии сонных артерий нарушение кровоснабжения более выражено в переднем мозге, меньше в продолговатом мозге и в базальных ганглиях, где кровообращение осуществляется двумя позвоночными артериями [22, 23]. Пониженный уровень кровотока, утрата реактивности мозговых сосудов на гиперкапнический стимул и неврологические нарушения оставались стабильными в течение 14 дней, что свидетельствует об отсутствии или низкой эффективности естественных процессов восстановления на протяжении указанного периода. Курсовое введение препарата IQ-1 в период 2-недельной гипоперфузии прогрессивно повышало кровоток во всех структурах мозга. Максимальное повышение кровотока по отношению к началу гипоперфузии выявилось в стриатуме, а минимальное – в черной субстанции. Использование препарата IQ-1 восстанавливало чувствительность мозговых сосудов к гиперкапнии и существенно улучшало неврологическое состояние животных. Эти данные свидетельствуют о выраженном вазомоторном эффекте IQ-1 при хронической ишемии мозга, проявляющимся в прогрессивном увеличении кровоснабжения мозговых структур.

Нейропротекторная активность IQ-1 подтверждена при оценке неврологического статуса животных в гипоперфузионном периоде. При курсовом введении IQ-1 у животных наблюдался менее выраженный неврологический дефицит уже через 5–7 дней гипоперфузии, и сроки его восстановления заметно сокращались. Наблюдалось достоверное снижение среднего балла неврологического дефицита по сравнению с группой животных, которым IQ-1 не вводился. Уже в первые 3–5 дней после операции было зафиксировано снижение числа животных с тяжелыми неврологическими нарушениями и соответственно увеличение числа животных с умеренной степенью неврологического дефицита. Показатели смертности были ниже у крыс, получавших IQ-1 с первого дня после перевязки сонных артерий.

Выявленные в данных исследованиях вазоактивные свойства IQ-1 ставят вопрос о механизме его дилататорного действия в отношении церебральных сосудов. Наши предыдущие исследования показали, что IQ-1 подвергается ферментативному метаболизму в микросомах печени с выделением NO [11]. Эти данные допускают возможность рассматривать IQ-1 в качестве потенциального донора NO для церебральных сосудов. Косвенным подтверждением этому является сравнительная оценка вазоактивных свойств IQ-1 и SNAP, выполненная в данном исследовании. Сосудорасширяющее действие SNAP, основанное на выделении NO, хорошо известно в отношении церебральных сосудов [24]. В настоящей работе введение SNAP увеличивало кровоток в разных структурах мозга на 17–27%. Равный по величине вазодилататорный эффект вызывал IQ-1 у животных с гипоперфузией мозга, тогда как у интактных животных вазомоторный эффект изучаемого препарата был менее выражен. Одной из возможных причин разного по величине вазомоторного эффекта IQ-1 может быть состояние ГЭБ у животных с интактными и легированными сонными артериями. Известно, что ишемия мозга вызывает нарушения ГЭБ [1], что может облегчить проницаемость IQ-1 через барьер и повысить его биодоступность для вазомоторного действия. Полученные результаты предполагают, что эффективность IQ-1 усиливается на фоне возможной повышенной актив-

ности JNK, что позволяет скорректировать цереброваскулярные нарушения и связанные с ними неврологические расстройства [12].

IQ-1 продемонстрировал выраженные вазоактивные и нейропротекторные свойства на модели хронической гипоперфузии головного мозга у крыс, вызванной невозвратным легированием сонных артерий. Мы предполагаем, что благотворное влияние IQ-1 на исход хронической гипоперфузии мозга может быть комбинированным результатом как ингибирования ферментативной активности JNK в ткани головного мозга, так и образования NO, способствующего повышению микроциркуляции в тканях головного мозга, снижению вязкости крови и улучшению эндотелиальной функции. Полученные результаты предполагают, что IQ-1 можно рассматривать как нейропротектор многоцелевого действия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 9/2021 от 23.09.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01111) и частично в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00408-21-00).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Ю.Ж., И.Т.Д., Д.Н.А.); синтез соединения IQ-1 (А.И.Х.); сбор данных (С.Ю.Ж., И.Т.Д., Т.Ф.П.); обработка данных (С.Ю.Ж., И.Т.Д.); написание и редактирование манускрипта (С.Ю.Ж., И.Т.Д., А.И.Х. И.А.Щ., Д.Н.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérizard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15(11): 2760–2770.
2. Waetzig V, Herdegen T (2005) Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26(9): 455–461.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.07.006>
3. Bode AM, Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog* 46(8): 591–598.
<https://doi.org/10.1002/mc.20348>
4. Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, Schepetkin IA, Atochin DN (2018) c-Jun-N-terminal kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury. *Front Pharmacol* 9: 715.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00715>
5. Javadov S, Jang S, Agostini B (2014) Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther* 144(2): 202–225.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.013>
6. Nijboer CH, van der Kooij MA, van Bel F, Ohl F, Heijnen CJ, Kavelaars A (2010) Inhibition of the JNK/AP-1 pathway reduces neuronal death and improves behavioral outcome after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Behav Immun* 24(5): 812–821.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.008>

7. Johnson GL, Nakamura K (2006) The kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1341–1348.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.12.009>
8. Irving EA, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(6): 631–647.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200206000-00001>
9. Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Potapov AS, Kovrizhina AR, Matveevskaya VV, Belyanin ML, Atochin DN, Zanoza SO, Gaidarzhly NM, Lyakhov SA, Kirpotina LN, Quinn MT (2019) Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one derivatives and tryptanthrin-6-oxime as c-Jun N-terminal kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 161: 179–191.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.023>
10. Schepetkin IA, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Hanks TS, Kochetkova I, Pascual DW, Jutila MA, Quinn MT (2012) Identification and characterization of a novel class of c-Jun N-terminal kinase inhibitors. *Mol Pharmacol* 81(6): 832–845.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.077446>
11. Atochin DN, Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Seledtsov VI, Swanson H, Quinn MT, Huang PL (2016) A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Neurosci Lett* 618: 45–49.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.033>
12. Plotnikov MB, Chernysheva GA, Aliev OI, Smol'iakova VI, Fomina TI, Osipenko AN, Rydchenko VS, Anfinogenova YI, Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Atochin DN (2019) Protective Effects of a New C-Jun N-terminal Kinase Inhibitor in the Model of Global Cerebral Ischemia in Rats. *Molecules* 24(9): 1722–1746.
<https://doi.org/10.3390/molecules24091722>
13. Farkas E, Luiten PG, Bari F (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54(1): 162–180.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003>
14. Nussmeier NA (2002) A review of risk factors for adverse neurologic outcome after cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 34(1): 4–10.
15. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, Siqueira IR, A Netto C (2010) The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res* 43(12): 1178–1183.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2010007500124>
16. Ni J, Ohta H, Matsumoto K, Watanabe H (1994) Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 653(1–2): 231–236.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90394-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90394-8)
17. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13(2): 139–143.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3)
18. Eklöf B, Siesjö BK (1973) Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation in the rat. *Acta Physiol Scand* 87(1): 69–77.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1973.tb05367.x>
19. Demchenko IT, Luchakov YI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, Piantadosi CA (2005) Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(10): 1288–1300.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600110>
20. McGraw CP, Pashayan AG, Wendel OT (1976) Cerebral infarction in the Mongolian gerbil exacerbated by phenoxybenzamine treatment. *Stroke* 7(5): 485–488.
<https://doi.org/10.1161/01.str.7.5.485>
21. Ганнушкина ИВ (2000) Мозговое кровообращение при разных видах циркуляторной гипоксии мозга. *Вестник РАМН* 9: 22–27. [Gannushkina IV (2000) Cerebral circulation in different types of circulatory hypoxia of the brain. *Vestnik RAMN* 9: 22–27. (In Russ)].
22. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A (2003) Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(4): 266–272.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03825.x>
23. Tsuchiya M, Sako K, Yura S, Yonemasu Y (1992) Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res* 89(1): 87–92.
<https://doi.org/10.1007/BF00229004>
24. Dreier JP, Körner K, Görner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U (1995) Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab* 15(6): 914–919.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1995.116>

Vasoactive and Neuroprotective Action of c-Jun-N-Terminal Kinases Inhibitor in Rats with Chronic Brain Hypoperfusion

**S. Yu. Zhilyaev^a, T. F. Platonova^a, A. I. Khlebnikov^b,
I. A. Schepetkin^{b, c}, I. T. Demchenko^a, and D. N. Atochin^{b, d, *}**

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

^b*Tomsk Polytechnic University, Tomsk Russia*

^c*Department of Microbiology and Cell Biology, Montana State University, Bozeman, USA*

^d*Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts, USA*

**e-mail: atochin@cvrc.mgh.harvard.edu*

The aim of this study was to evaluate the vasoactive and neuroprotective effects of c-Jun-N-terminal kinase inhibitor IQ-1 (11*H*-indeno[1,2-*b*]quinoxalin-11-one oxime) in chronic cerebral hypoperfusion caused by irreversible bilateral ligation of carotid arteries. Cerebral blood flow was measured quantitatively (hydrogen clearance method) simultaneously in the parietal cortex, hippocampus, substantia nigra, and striatum of the brain of awake rats. It was found that ligation of the carotid arteries caused a decrease in blood flow in the brain structures with a more pronounced decrease in the cortex (by 48% of the initial level) and with the smallest drop in the substantia nigra (by 25% of the initial level). The reduced level of blood flow persisted for 14 days of measurements. The responses of the cerebral vessels to hypercapnic probes (5% CO₂) were lost during the 2-week hypoperfusion period, and the neurological status of the animals did not improve. The administration of IQ-1 (50 mg/kg, intraperitoneally, every 48 hours for 14 days) was accompanied by an increase in blood flow in all brain structures. The maximum increase in blood flow was observed in the striatum and the minimum in the substantia nigra. After the administration of IQ-1, the sensitivity of the cerebral vessels to the hypercapnic stimulus was restored and the neurological state of the animals significantly improved by the end of the second week of cerebral hypoperfusion. The results show that the use of the JNK inhibitor can reduce cerebrovascular disorders and associated neurological disorders in hypoperfusion brain injury.

Keywords: c-Jun-N-terminal kinase inhibitors, chronic cerebral hypoperfusion, cerebral blood flow, neuroprotection, hypercapnic probe, striatum, substantia nigra

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА НА КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ЕЕ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА H₂S-ГЕНЕРИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ

© 2023 г. В. В. Зинчук¹, *, Е. С. Билецкая¹

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

*E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 11.05.2023 г.

Принята к публикации 12.05.2023 г.

Сероводород относится к группе сигнальных агентов, называемых газотрансмиттерами, и играет важную роль во многих физиологических процессах, в частности в реализации кислородзависимых механизмов. Цель данного исследования — изучить значение сероводорода в эффекте озона на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс в опытах *in vitro*. Использовались озон (концентрация 6 мг/л) и препараты, влияющие на синтез сероводорода (пропаргилглицин, гидросульфид натрия и его комбинация с нитроглицерином). Применение ингибитора синтеза сероводорода пропаргилглицина привело к уменьшению эффекта озона на кислородтранспортную функцию крови (снижение PO₂, SO₂, P_{50реал}). При добавлении гидросульфида натрия не усиливалось воздействие этого газа на данные параметры, но в его комбинации с нитроглицерином увеличивалось влияние озона на кислородтранспортную функцию крови. Пропаргилглицин не влиял на прооксидантно-антиоксидантный баланс в условиях проведения опытов, а доноры сероводорода и монооксида азота увеличивали активность каталазы. Пропаргилглицин в условиях действия озона приводил к уменьшению уровня нитрат/нитритов, а гидросульфид натрия увеличивал их концентрацию. Комбинация гидросульфида натрия и нитроглицерина способствовала росту сероводорода в плазме крови.

Ключевые слова: озон, кровь, кислород, газотрансмиттер, монооксид азота, нитроглицерин, сероводород, пропаргилглицин

DOI: 10.31857/S0869813923060080, EDN: WHITZF

ВВЕДЕНИЕ

Озон используется в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19 [1], что связано с его положительным воздействием на функционирование различных систем организма, включающее бактерицидный, фунгицидный, вирулицидный, противовоспалительный, иммунокорректирующий и антигипоксический эффекты, подтвержденные клиническими и экспериментальными наблюдениями [2]. Широко распространен вариант использования озона в качестве аутогемотерапии, основанной на заборе крови у пациента, насыщении ее озоном и последующем обратном введении в организм, однако механизмы действия данного газа в этих условиях (*in vitro*) остаются не раскрытыми [3].

H₂S представляет собой газообразную сигнальную молекулу, играющую важную роль во многих физиологических процессах и относящуюся, как и монооксид азо-

та и монооксид углерода к группе сигнальных агентов, называемых газотрансмиттерами [4]. Данная молекула модулирует разнообразные физиологические функции на различных уровнях в экспериментальных и естественных условиях. Этот газотрансмиттер может образовываться как в ферментативных, так и в неферментативных реакциях. В ферментативной продукции H_2S в организме участвуют три фермента: цистатионин- γ -лиаза, цистатионин- β -синтаза (CSE) и 3-меркаптопируватсульфотрансфераза, последняя способствует синтезу H_2S в эритроцитах [5]. Сероводород оказывает влияние на механизмы транспорта кислорода кровью в том числе и за счет взаимодействия с монооксидом азота (NO) [6]. В ранее проведенном нами эксперименте озон повышал сродство гемоглобина к кислороду (СГК), при этом отмечался рост уровня H_2S [7].

Кроме того, H_2S участвует в регуляции окислительно-восстановительного баланса клетки. Снижение его синтеза сопровождается повышенным образованием активных форм кислорода, ростом активности перекисного окисления липидов, а введение доноров H_2S подавляет развитие окислительного стресса и активирует антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза [8, 6].

В связи с этим особый интерес представляет изучение действия озона в условиях модификации синтеза сероводорода. Цель работы – оценить эффект озона на кислородсвязывающие свойства крови и ее прооксидантно-антиоксидантный баланс при влиянии на H_2S -генерирующую систему в опытах *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Забор смешанной венозной крови осуществляли в условиях наркоза (50 мг/кг тиопентала натрия, интраперитонеально) из правого предсердия в предварительно подготовленный шприц с гепарином из расчета 50 ЕД на 1 мл крови. Опыты были выполнены на образцах крови, забранных от белых крыс-самцов массой 250–300 г ($n = 10$), предварительно содержавшихся в стандартных условиях вивария, проводились эксперименты *in vitro*. Образцы крови были разделены на 5 групп по 3 мл. К каждой аликвоте добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия в объеме 1 мл (в 1-ю без озонирования) и 0.1 мл растворов, содержащих газотрансмиттеры (в 3-ю – гидросульфид натрия, конечная концентрация 0.38 ммоль/л (Sigma-Aldrich)), в 4-ю – комбинация нитроглицерина (конечная концентрация 0.05 ммоль/л (SchwarzPharma AG)) и гидросульфида натрия 0.38 ммоль/л, в 5-ю – необратимый ингибитор фермента CSE – DL-пропаргилглицин (PAG, конечная концентрация 0.73 ммоль/л, (Chem-Impex International)) и изотонический раствор хлорида натрия (в 1-ю, 2-ю), после чего пробы перемешивались. Время инкубации составляло 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барбагировался озono-кислородной смесью, которая создавалась озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия). В эксперименте использовался озон (концентрация 6 мг/л).

Показатели КТФ (кислородтранспортная функция крови) крови определяли на газоанализаторе Stat Profile pH_{Ox} plus L в крови при 37°C после добавления озона: парциальное давление кислорода (PO_2), степень оксигенации (SO_2) и кислотно-основного состояния: парциальное давление углекислого газа (PCO_2), стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат (HCO_3^-), концентрация водородных ионов (рН), общая углекислота плазмы крови (TCO_2). СГК оценивали по показателю $P_{50\text{реал}}$ (PO_2 крови при 50%-ном насыщении ее кислородом), рассчитываемого по

значениям PO_2 и SO_2 на основании уравнения Хилла. Значение $P_{50\text{станд}}$ и положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) рассчитывали по формулам Sevinghaus [9]. Затем центрифугировали кровь 10 мин при 3000 об./мин, отбирали плазму, а эритроциты трижды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия.

Процессы свободнорадикального окисления оценивали по концентрации промежуточных и первичных продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитарной массе: малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК). По интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232–234 нм, свойственного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов, выявляли концентрацию ДК. На спектрофлуориметре СМ 2203 “Солар” (Беларусь) при длине волны 233 нм по отношению к контролю измеряли оптическую плотность [10]. По взаимодействию с 2-тиобарбитуровой кислотой, которая в кислой среде при высокой температуре способствует формированию триметинового комплекса розового цвета, определяли уровень МДА. При помощи спектрофотометра PV1251C “Солар” (Беларусь) при длине волны 540 нм по отношению к контролю измеряли интенсивность окраски [11]. Активность каталазы определяли спектрофотометрически (PV1251C “Солар”) в эритроцитарной массе по способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс при длине волны 410 нм [12]. По методу Taylor на спектрофлуориметре СМ 2203 “СОЛАР” (Беларусь) регистрировали концентрацию α -токоферола и ретинола [13]. По суммарному содержанию нитрат/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) в плазме крови спектрофотометрическим методом с реактивом Грисса при длине волны 540 нм оценивали продукцию эндогенного NO [14]. В плазме крови определяли уровень эндогенного сероводорода (H_2S) спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм [15]. Рассчитывали концентрацию газотрансмиттеров по калибровочным графикам и результаты выражали в мкмоль/л.

С использованием критерия Шапиро–Уилка проверяли все показатели на соответствие признака закону нормального распределения. В результате прибегнули к непараметрической статистике с применением программы “Statistica 10.0”. С помощью рангового дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса проводили сравнение трех и более независимых групп. С учетом размеров малой выборки, достоверность полученных данных множественных сравнений оценивалась с использованием U -критерия Манна–Уитни. Критерий Вилкоксона использовали при проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях. Уровень статистической значимости принимали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инкубация крови с озоном увеличивает основные показатели кислородтранспортной функции крови (табл. 1) и сопровождается сдвигом КДО вправо (рис. 1).

Введение ингибитора синтеза сероводорода (CSE) в этих условиях приводит к уменьшению: PO_2 на 25.8% ($p < 0.05$), SO_2 на 20.6% ($p < 0.05$) по сравнению группой, в которую вводили только озон. Показатель сродства гемоглобина к кислороду $P_{50\text{реал}}$ при этом уменьшается на 13.6% ($p < 0.05$), КДО в этой серии смещается влево (рис. 1).

При добавлении гидросульфида натрия в кровь, в условиях введения озона, не наблюдается усиления его эффекта на параметры кислородтранспортной функции крови. В то же время введение комбинации нитроглицерина и гидросульфида на-

Таблица 1. Кислородтранспортная функция крови в условиях изменения активности цистеин/цистин системы в опытах *in vitro*

Показатель	Контроль	O ₃	NaHS + O ₃	PAG + O ₃	NaHS + O ₃ + нитроглицерин
<i>n</i>	10	10	10	10	10
SO ₂ , %	29.75 [29.38; 31.18]	38.65 [36.80; 44.23] *	37.30 [35.08; 42.80]*	30.70 [26.73; 33.78]Ω#	44.80 [44.10; 46.20]*Ω# Ψ
PO ₂ , мм рт. ст.	19.65 [19.43; 19.98]	27.3 [26.23; 27.78]*	27.80 [24.50; 33.30]*	20.25 [20.10; 21.88]*Ω#	31.45 [30.93; 31.58]*Ω Ψ
pH, ед	7.374 [7.372; 7.377]	7.414 [7.403; 7.435]*	7.375 [7.371; 7.382]Ω	7.381 [7.352; 7.411]Ω	7.413 [7.395; 7.422]*# Ψ
PCO ₂ , мм рт. ст.	39.6 [39.40; 39.88]	34.30 [30.43; 35.90]*	36.75 [34.15; 37.48]*Ω	39.15 [37.78; 40.83]Ω	33.40 [31.05; 35.18]*# Ψ
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	23.55 [23.40; 23.78]	22.40 [20.88; 22.98]*	22.05 [22.00; 23.38]	23.65 [22.63; 23.95]	20.50 [20; 21.38]*Ω Ψ
TCO ₂ , ммоль/л	24.85 [24.63; 24.98]	23.5 [21.9; 24.08]*	23.20 [23.10; 24.58]	24.75 [23.83; 25.05]	21.70 [21.15; 22.58]*# Ψ
ABE, ммоль/л	-1.70 [-1.80; -1.63]	-2.20 [-4.075; -1.225]	-2.70 [-3.38; -1.88]*	-1.45 [-3.08; -1.03]	-4.05 [-4.6; -3.28]*Ω# Ψ
SBE, ммоль/л	-0.70 [-0.80; -0.7]	-1 [-2.55; -0.075]	-1.75 [-2.10; -0.93]*	-0.65 [-1.88; 0.10]	-2.50 [-3.33; -1.78]*Ω Ψ
SBC, ммоль/л	22.9 [22.8; 22.98]	22.95 [21.45; 23.58]	22.10 [21.70; 22.73]*	22.85 [21.73; 23.58]	21.40 [20.78; 21.98]*Ω Ψ
P _{50реал} , мм рт. ст.	27.63 [27.58; 27.68]	32.18 [31.58; 32.92]*	30.44 [29.54; 31.65]*	27.82 [26.78; 28.34]Ω#	41.05 [36.80; 43.70]*Ω# Ψ
P _{50станд} , мм рт. ст.	26.8 [26.71; 26.82]	32.5 [31.25; 34.175]*	31.50 [29.20; 36.50]*	26.65 [26.50; 26.78]Ω#	40.65 [36.5; 43.05]*Ω# Ψ

Данные представлены как медиана [25-й квартиль–75-й квартиль]. Изменения в сравнении с контрольной группой (*); с группой O₃ (Ω); с группой NaHS + O₃ (#); с группой PAG + O₃ (Ψ).

трия приводит к увеличению PO₂ на 15.2% ($p < 0.05$), SO₂ на 15.9% ($p < 0.05$). Показатель сродства гемоглобина к кислороду P_{50реал} растет на 27.6% ($p < 0.05$) и соответственно КДО сдвигается вправо (рис. 1) по сравнению группой, в которую вводили только озон. Также наблюдается увеличение P_{50станд} на 25.1% ($p < 0.05$). Значимых изменений параметров кислотно-основного состояния не отмечается.

В табл. 2 представлены данные о характере изменения показателей процессов перекисного окисления липидов и состояния системы антиоксидантной защиты. Добавление озона в исследуемую кровь проводит к росту активности продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитарной массе: МДА на 31.2% ($p < 0.05$), ДК на 234.9% ($p < 0.05$). При этом увеличиваются уровни антиоксидантной защиты: в эритроцитарной массе содержание каталазы возрастает на 35.5% ($p < 0.05$), в плазме количество ретинола повышается на 14.5% ($p < 0.05$), α-токоферола на 46.3% ($p < 0.05$) по отношению к контрольной группе.

Введение пропаргилглицина не приводит к существенным изменениям показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса в сравнении с группой, в которую добавляли только озон. Добавление донора синтеза сероводорода не потенцирует эффект озона на концентрацию промежуточных и первичных продуктов перекисного окисления липидов. В то же время активность каталазы в группах с гидросульфидом натрия возрастает на 27.1% ($p < 0.05$), нитроглицерина с гидросульфидом натрия на 23.6% ($p < 0.05$) по отношению к группе в которую добавляли только озон. Однако уровни ретинола и α-токоферола в данных группах не меняются.

Суммарное содержание NO₃⁻/NO₂⁻ в плазме крови (табл. 3) под действием O₃ возрастает на 41.7%, $p < 0.05$.

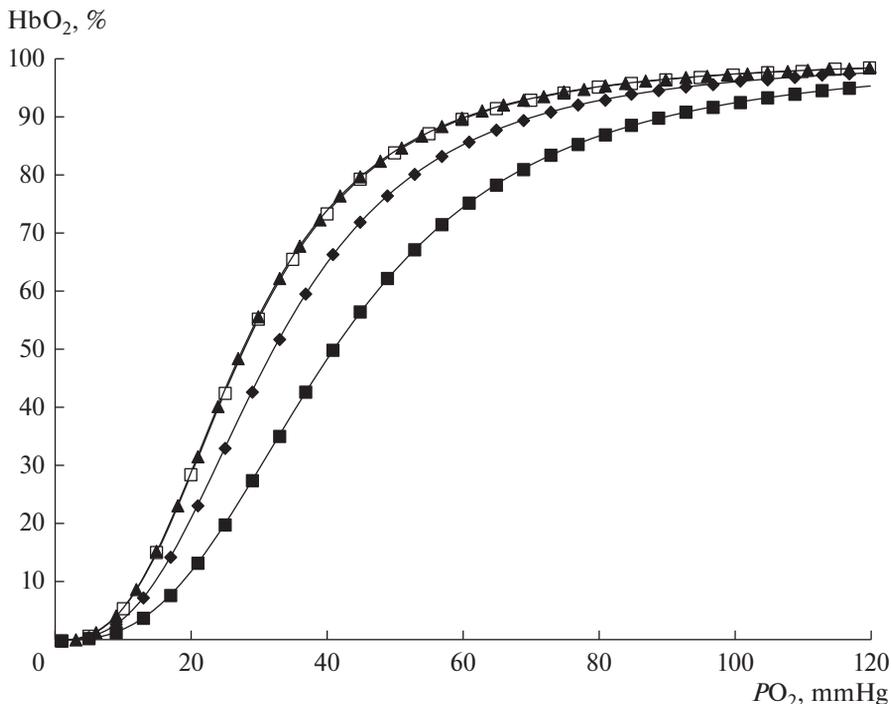


Рис. 1. Эффект озона на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и PCO_2 в условиях изменения активности цистеин/цистин системы: \blacktriangle – контроль; \blacklozenge – озон; \square – пропаргилглицин + озон; \blacksquare – гидросульфид натрия + озон + нитроглицерин.

Пропаргилглицин снижает уровни метаболитов NO и H_2S на 49.5% ($p < 0.05$) и на 17.4% ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с группой, в которую вводили только озон. При добавлении гидросульфида натрия в этих условиях концентрация нитрат/нитритов увеличивается на 63.4% ($p < 0.05$); комбинация нитроглицерина и

Таблица 2. Параметры проокислительно-антиокислительного баланса в условиях изменения активности цистеин/цистин системы в опытах *in vitro*

Показатель	Контроль	O ₃	NaHS + O ₃	PAG + O ₃	NaHS + O ₃ + нитроглицерин
<i>n</i>	10	10	10	10	10
МДА, мкмоль/л	18.07 [16.68; 19.10]	23.71 [21.17; 26.50]*	23.77 [19.56; 27.83]*	22.79 [18.96; 26.98]*	21.91 [20.69; 26.43]*
ДК, ЕД/мл	4.99 [4.54; 5.72]	16.71 [16.10; 17.95]*	16.84 [15.15; 17.63]*	16.31 [12.40; 16.68]*	16.45 [14.99; 17.42]*
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мин/г Нб	10.86 [10.30; 11.72]	14.71 [14.21; 15.33]*	18.69 [18.50; 19.11]* Ω	14.10 [12.28; 17.80]* Ψ	18.18 [18.10; 18.29]* $\Omega\#\Psi$
Ретинол, мкмоль/л	0.83 [0.81; 0.84]	0.95 [0.91; 0.97]*	0.97 [0.96; 1.04]*	0.95 [0.94; 0.97]*	0.98 [0.94; 1.07]*
α -токоферол, мкмоль/л	8.70 [8.52; 8.92]	12.73 [12.25; 14.91]*	12.60 [11.49; 12.67]*	12.40 [11.94; 13.76]*	12.23 [12.16; 13.23]*

Данные представлены как медиана [25-й квартиль–75-й квартиль]. Изменения в сравнении с контрольной группой (*); с группой O₃ (Ω); с группой NaHS + O₃ (Ψ); с группой PAG + O₃ (Ψ).

Таблица 3. Концентрация нитрат/нитритов и сероводорода в плазме крови под действием озона в условиях изменения активности цистеин/цистин системы в опытах *in vitro*

Показатель	Контроль	O ₃	NaHS + O ₃	PAG + O ₃	NaHS + O ₃ + + нитроглицерин
<i>n</i>	10	10	10	10	10
NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ мкмоль/л	16.19 [15.42; 16.81]	22.94 [22.21; 24.05]*	37.49 [34.92; 39.15]*Ω	11.59 [10.89; 12.17]*Ω#	54.87 [53.47; 56.49]*Ω#Ψ
H ₂ S мкмоль/л	7.52 [7.19; 8.93]	11.28 [7.29; 12.44]	18.55 [15.59; 19.28]*Ω	9.32 [7.46; 11.52]#	24.14 [22.74; 25.35]*Ω#Ψ

Данные представлены как медиана [25-й квартиль–75-й квартиль]. Изменения в сравнении с контрольной группой (*); с группой O₃ (Ω); с группой NaHS + O₃ (#); с группой PAG + O₃ (Ψ).

гидросульфида натрия существенно увеличивает данный параметр на 139.2% ($p < 0.05$) по сравнению с группой, в которую вводили только озон. Уровень газотрансмиттера H₂S (табл. 3) под действием озона возрастает на 50.0%, ($p < 0.05$) в сравнении с контрольной группой. Добавление гидросульфида натрия увеличивает данный параметр на 64.5% ($p < 0.05$), а комбинация нитроглицерина и гидросульфида натрия приводит к росту данного показателя на 114.0% ($p < 0.05$) по сравнению с группой, в которую вводили только озон.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде работ обсуждается возможность изменение СГК под действием озона [16, 17], однако его непосредственного измерения в экспериментальных условиях не осуществлялось. Результаты наших предыдущих исследований свидетельствуют о том, что озон изменяет СГК, реализуя свой эффект за счет газотрансмиттера NO [7].

Согласно полученным нами данным, ингибитор синтеза сероводорода в условиях действия озона уменьшает PO₂, SO₂, P_{50реал} крови и сопровождается сдвигом КДО влево, а введение гидросульфида натрия в исследуемый образец, не меняет эффект озона на параметры КТФ крови. Форменные элементы крови и прежде всего эритроциты, а также компоненты плазмы принимают активное участие в метаболизме сероводорода, контролируя его концентрацию [18]. Эта сигнальная молекула метаболизируется в красных кровяных клетках при участии гемоглобина с образованием тиосульфатов и гидрополисульфидов, участвующих в биосигнализация [19].

В частности, сульфид поглощается антипортером AE-1 эритроцитарной мембраны в обмен на Cl⁻ (влияя на СГК), а также сульфид реагирует с метгемоглобином, образуя соответствующий комплекс –SH₂/–SH– [20]. Кроме того, эффекты сероводорода связаны с персульфидацией белков (как эритроцитов, так и плазмы) – превращением тиоловой группы цистеина (–SH) в соответствующий персульфид (–SSH) [21], что обеспечивает элиминацию сероводорода. Газотрансмиттер сероводород задействован в реализации эффекта озона на СГК [7]. Как известно, H₂S участвует в окислительной модификации белковых молекул посредством сульфгидрации через H₂S-опосредованное окисление цистеина до персульфидов, способствуя их химической реорганизации [22]. Кроме того, H₂S способствует активации дифосфоглицератмутаза, стимулирующей синтез 2,3-дифосфоглицерата и уменьшающей СГК [23]. Также взаимодействие гемоглобина с данным газом приводит к образованию сульфгемоглобина, который снижает СГК [24]. В основе механизмов действия озона лежит его высокая реакционная способность к соединениям, содержащим двойную углеродную связь [25], в частности фосфолипидов,

входящих в состав клеточных мембран. В результате образуются промежуточные перекисные соединения, так называемые озониды [26], которые при введении в организм в малых терапевтических дозах модифицируют липидный бислой мембран эритроцитов, улучшают реологические свойства крови, приводят к активации внутриклеточной защитной антиоксидантной системы по триггерному механизму и кислородзависимых реакций, а также улучшают снабжение тканей кислородом [27]. Можно предположить, судя по нашим результатам, что имеющихся в естественных условиях количеств сероводорода достаточно для реализации эффекта озона на КТФ крови, в связи с чем добавление донора сероводорода не меняет кислородсвязывающих свойств крови, а ингибитор сероводорода увеличивает СГК.

H_2S в отличие от NO действует не как типичная сигнальная молекула, но взаимодействуя с ним, может выступать медиатором NO -сигнальной активности [28]. Как показали наши исследования, H_2S в комбинации с донором NO (нитроглицерином) приводит к росту PO_2 , SO_2 , $P_{50\text{реал}}$ и способствует более выраженному сдвигу КДО вправо, т.е. увеличивает эффект озона на эти показатели крови. Показано, что комбинированная обработка донорами NO и H_2S приводит к NO -сигнальной активности за счет образования более активных динитрозильных комплексов железа с персульфидными лигандами в клетке [28]. Молекула NO взаимодействует с цистеином, преобразуя его пространственную структуру и увеличивая энергию химических связей. Также эндогенный сероводород может влиять на различные изоформы NO -синтазы, приводя к взаимоусилению физиологических эффектов [22].

Важно отметить, что введение ингибитора синтеза сероводорода уменьшает концентрацию нитрат/нитритов в плазме крови в сравнении с группой, в которую вводили только озон. Однако содержание метаболитов NO при добавлении гидросульфида натрия в условиях введения озона растет. Механизм данного явления основан на усилении фосфорилирования конститутивной изоформы NO -синтазы с последующим увеличением продукции NO [29]. Также стоит подчеркнуть, что сероводород опосредует восстановление нитритов до NO через ксантинооксидазу [30]. Одним из предполагаемых эффектов озона на реологические свойства крови является активация NO -синтазы, усиливается синтез оксида азота, вследствие чего увеличивается количество транспортируемого кислорода [31].

Ингибирование синтеза H_2S в условиях наших опытов не меняет активность процессов перекисного окисления липидов. Газотрансмиттер сероводород может проявлять восстановительные свойства через различные механизмы. H_2S преобразовывает липопротеины низкой плотности в липоспирты и ингибирует окисление гемоглобина, предотвращает рост процессов свободно-радикального окисления липидов. Данный газ снижает высвобождение активных форм кислорода за счет стимуляции интерлейкина 6 [6]. Сульфгидратация, опосредованная H_2S , представляет собой защитный механизм в условиях окислительного стресса. В нашем исследовании не наблюдается снижения продуктов перекисного окисления липидов. Согласно данным Bieza и соавт. [22], генерация H_2S в естественных условиях может быть недостаточной для обеспечения прямого антиоксидантного ответа, что предполагает участие иных механизмов, судя по нашим данным, связанных с кислородсвязывающими свойствами крови, при окислительном стрессе, индуцированном действием озона [32]. В то же время стоит отметить увеличение активности каталазы при введении гидросульфида натрия и его комбинации с нитроглицерином в проведенном нами исследовании, что может быть связано с усилением гидросульфидом натрия эффектов монооксида азота, синтез которого создает условия для поддержания окислительно-восстановительного баланса и сохранения целостности клеточной мембраны [33].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о сложном неоднозначном вкладе сероводорода в эффект озона на кислородсвязывающие свойства крови и ее прооксидантно-антиоксидантный баланс:

1. Ингибитор синтеза газотрансмиттера сероводорода приводит к снижению эффекта озона на КТФ крови (уменьшает PO_2 , SO_2 , $P_{50\text{реал}}$, наблюдается сдвиг КДО влево). Введение гидросульфида натрия не усиливает воздействие этого газа на данные параметры. Донор газотрансмиттера NO в комбинации с H_2S увеличивает влияние данного газа на КТФ крови.

2. Модификация синтеза газотрансмиттера H_2S (использование как ингибитора, так и донора) не влияет на активность процессов перекисного окисления липидов в условиях введения озона. В то же время, доноры H_2S и NO увеличивают активность каталазы, не меняя при этом концентрации ретинола и α -токоферола.

3. Введение пропаргилглицина в условиях действия озона приводит к уменьшению уровня нитрат/нитритов, а гидросульфид натрия увеличивает их концентрацию. Комбинация гидросульфида натрия и нитроглицерина способствует росту сероводорода в плазме крови. Полученные данные демонстрируют сложную природу синергичного взаимодействия данных газотрансмиттеров, имеющих значение для модификации КТФ крови.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Республики Беларусь, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике и деонтологии учреждения образования Гродненский государственный медицинский университет, протокол № 1 от 14 января 2019 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований Республики Беларусь № договора 30-24/549-21.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследований и подготовку материалов статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tirelli U, Franzini M, Valdenassi L, Piscanti S, Taibi R, Torrisi C, Pandolfi S, Chirumbolo S (2021) Fatigue in post-acute sequelae of SARS-CoV2 (PASC) treated with oxygen-ozone auto-hemotherapy – preliminary results on 100 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25(18): 5871–5875.
https://doi.org/10.26355/eurrev_202109_26809
2. Pchepiorka R, Moreira MS, Lascane NADS, Catalani LH, Allegrini S Jr, de Lima NB, Gonçalves EF (2020) Effect of ozone therapy on wound healing in the buccal mucosa of rats. *Arch Oral Biol* (119): 104889.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104889>
3. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA (2017) Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* 7(3): 212–219.
<https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752>

4. Robert B, Subramaniam S (2022) Gasotransmitter-Induced Therapeutic Angiogenesis: A Bio-material Prospective. *ACS Omega* 7(50): 45849–45866.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05599>
5. Głowacka U, Brzozowski T, Magierowski M (2020) Synergisms, discrepancies and Interactions between Hydrogen Sulfide and Carbon Monoxide in the Gastrointestinal and Digestive System Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Biomolecules* 10(3): 445–460.
<https://doi.org/10.3390/biom10030445>
6. Yang YW, Deng NH, Tian KJ, Liu LSh, Wang Z, Wei DH, Liu HT, Jiang ZhS (2022) Development of hydrogen sulfide donors for anti-atherosclerosis therapeutics research: Challenges and future priorities. *Front Cardiovasc Med* (9): 909178.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.909178>
7. Зинчук ВВ, Билецкая ЕС, Гуляй ИЕ (2021) Влияние озона на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантный баланс в условиях изменения образования монооксида азота в экспериментах *in vitro*. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107(1): 16–27. [Zinchuk VV, Biletskaya ES, Gulyai IE (2021) Effect of ozone on blood oxygen transport function and pro-oxidant–antioxidant balance in under conditions of changing nitrogen monoxide formation *in vitro* experiments. *Russ J Physiol* 107(1): 16–27. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813921010106>
8. Mys LA, Strutynska NA, Goshovska YV, Sagach VF (2020) Stimulation of the endogenous hydrogen sulfide synthesis suppresses oxidative-nitrosative stress and restores endothelial-dependent vasorelaxation in old rats. *Can J Physiol Pharmacol* 98(5): 275–281.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0411>
9. Saveringhaus JW (1966) Blood gas calculator. *J Appl Physiol* 21(5): 1108–1116.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.3.1108>
10. Mendes R, Cardoso C, Pestana C (2009) Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chem* (112): 1038–1045.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.052>
11. Diplock AT, Symons MCR, Rice-Evans CA (1991) Techniques in free radical research. In: *Lab Techn in Biochem and Mol Biol* (22): 290.
12. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, Токарева ВЕ (1988) Метод определения активности каталазы. *Лаб дело* (1): 16–19. [Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokareva VE (1988) Method for determination of catalase activity. *Lab Delo* (1): 16–19. (In Russ)].
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2451064/>
13. Taylor SL, Lamden MP, Tappel AL (1976) Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids* 11(7): 530–538.
<https://doi.org/10.1007/BF02532898>
14. Bryan NS, Grisham MB (2007) Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 43(5): 645–657.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>
15. Norris EJ, Culbertson CR, Narasimhan S, Clemens MG (2011) The liver as central regulator of hydrogen sulfide. *Shock* 36(3): 242–250.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182252ee7>
16. Ross BK, Hlastala MP, Frank R. (1979) Lack of ozone effects on oxygen hemoglobin affinity. *Arch Environ Health* 34(3): 161–163.
<https://doi.org/10.1080/00039896.1979.10667389>
17. Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, Giunta L, Mascolo L, Tirelli A, Coppola L (2001) Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann Hematol* 80(12): 745–748.
<https://doi.org/10.1007/s002770100377>
18. Munteanu C, Rotariu M, Turnea M, Dogaru G, Popescu C, Spînu A, Andone I, Postoiu R, Ionescu EV, Oprea C, Albadi I, Onose G (2022) Recent Advances in Molecular Research on Hydrogen Sulfide (H₂S) Role in Diabetes Mellitus (DM)-A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 23(12): 6720.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126720>
19. Fadyukova OE, Koshelev VB *Effect of Hydrogen* (2020) Sulfide on Deformability of Rat Erythrocytes. *Bull Exp Biol Med* 169(6): 664–667.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04965-9>
20. Cortese-Krott MM (2020) Red Blood Cells as a “Central Hub” for Sulfide Bioactivity: Scavenging, Metabolism, Transport, and Cross-Talk with Nitric Oxide. *Antioxid Redox Signal* 33(18): 1332–1349.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8171>
21. Kolupaev YE, Yemets AI, Yastrebov TO, Blume YB (2023) The role of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulation of redox homeostasis at extreme temperatures in plants. *Front Plant Sci* (14): 1128439.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1128439>

22. Bieza S, Mazzeo A, Pellegrino J, Doctorovich F (2022) H₂S/Thiols, NO[•], and NO⁻/HNO: Interactions with Iron Porphyrins. ACS Omega 7(2): 1602–1611. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06427>
23. Wang G, Huang Y, Zhang N, Liu W, Wang C, Zhu X, Ni X (2021) Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2,3-BPG Production in Erythrocytes. Oxid Med Cell Longev 2021: 8877691. <https://doi.org/10.1155/2021/8877691>
24. Kolluru GK, Prasai PK, Kaskas AM, Letchuman V, Pattillo B (2016) Oxygen tension, H₂S, and NO bioavailability: is there an interaction? J Appl Physiol 120(2): 263–270. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00365.2015>
25. Hancock SE, MacCarone AT, Poad BLJ, Trevitt AJ, Mitchell TW, Blanksby SJ (2019) Reaction of ionised steryl esters with ozone in the gas phase. Chem Phys Lipids (221): 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.12.013>
26. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I (2009) The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. Med Res Rev 29(4): 646–682. <https://doi.org/10.1002/med.20150>
27. Wen Q, Chen Q (2020) An Overview of Ozone Therapy for Treating Foot Ulcers in Patients With Diabetes. Am J Med Sci 360(2): 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.05.012>
28. Christie AE, Fontanilla TM, Roncalli V, Cieslak MC, Lenz PH (2014) Diffusible gas transmitter signaling in the copepod crustacean *Calanus finmarchicus*: identification of the biosynthetic enzymes of nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) using a de novo assembled transcriptome. Gen Comp Endocrinol (202): 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2014.04.003>
29. Feng J, Lu X, Li H, Wang S (2022) The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states. Renal Fail 44(1): 1289–1308. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2107936>
30. Rajendran S, Shen X, Glawe J, Kolluru GK, Kevil CG (2019) Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Growth and Remodeling. Compr Physiol 9(3): 1213–1247. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180026>
31. Colakerol A, Temiz MZ, Tavukcu HH, Aykan S, Ozsoy S, Sahan A, Kandirali E, Semercioz A (2021) Effects of ozone treatment on penile erection capacity and nitric oxide synthase levels in diabetic rats. Int J Impot Res 33(5): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41443-020-0301-1>
32. Orlandin JR, Pinto Santos SI, Machado LC, Neto PF, Bressan FF, Godoy Pieri NC, Recchia K, de Paula Coutinho M, Ferreira Pinto PA, Santucci A, Travagli V, Ambrosio CE (2022) Evaluation of targeted oxidative stress induced by oxygen-ozone *in vitro* after ischemic induction. Redox Rep 27(1): 259–269. <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2143104>
33. Sojitra B, Bulani Y, Putcha UK, Kanwal A, Gupta P, Kuncha M, Banerjee SK (2012) Nitric oxide synthase inhibition abrogates hydrogen sulfide-induced cardioprotection in mice. Mol Cell Biochem 360(1–2): 61–69. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1044-6>

**Impact of Ozone on the Oxyge Affinity Blood Properties
and Prooxidant–Antioxidant
Balance under Effect of H₂S-Generating System**

V. V. Zinchuk^a, * and E. S. Biletskaya^a

^aGrodna State Medical University, Grodna, Belarus

*e-mail: zinchuk@grsmu.by

Hydrogen sulfide belongs to the group of signaling agents called gaseous transmitters and plays an important role in many physiological processes, in particular, in the realization of oxygen-dependent mechanisms. The aim of this study was to evaluate the significance of hydrogen sulfide in the effect of ozone on the oxygen affinity blood properties and the prooxidant-antioxidant balance *in vitro* experiment. Ozone (6 mg/L concentration) and drugs that affect the synthesis of hydrogen sulfide (propargylglycine, sodium hydrosulfide and its combination with nitroglycerin) were used. The use of propargylglycine, an inhibitor of the synthesis of hydrogen sulfide, leads to a decrease in the effect of ozone on the blood oxygen transport function (decrease in PO_2 , SO_2 , P_{50real}). When so-

dium hydrosulfide is added, the effect of this gas on these parameters does not increase, but in its combination with nitroglycerin, the effect of ozone on the blood oxygen transport function increases. Propargylglycine does not affect the prooxidant-antioxidant balance under the conditions of the experiment, and donors of hydrogen sulfide and nitrogen monoxide increase the activity of catalase. Propargylglycine under the action of ozone leads to a decrease in the level of nitrate/nitrite, and sodium hydrosulfide increases their concentration. The combination of sodium hydrosulfide and nitroglycerin leads to the accumulation of hydrogen sulfide in the blood plasma.

Keywords: ozone, blood, oxygen, gaseous transmitter, nitrogen monoxide, nitroglycerin, hydrogen sulfide, propargylglycine

**КАРДИОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕВОГО БЕЛКА
ПРИ ВЫСОКОСОЛЕВОЙ ДИЕТЕ У ЯВАНСКИХ МАКАК**

© 2023 г. А. Н. Куликов¹, О. Н. Береснева^{1, *}, Г. Т. Иванова², М. М. Парастаева¹,
Е. О. Богданова^{1, 3}, И. Г. Каюков¹, А. Г. Кучер¹, С. В. Орлов⁴

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Отдел экспериментальных и научных исследований Межрегионального лабораторного центра,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Научно-исследовательский институт медицинской приматологии,
Краснодарский край, Сочи–Адлер, Россия

*E-mail: beresnevaolga@list.ru

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 12.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Избыточное потребление соли сопровождается развитием кардиоваскулярных нарушений, не всегда связанных с ростом артериального давления (АД). Учитывая кардиопротективное действие соевых белков при хронической болезни почек, встал вопрос о возможности нивелировать диетарными интервенциями, в частности протеинами сои, повреждающее действие высокосолевого рациона на сердечно-сосудистую систему. Цель работы – изучить влияние длительного применения диеты с высоким содержанием NaCl и соевым белком на ремоделирование миокарда и гистоморфологию кожи обезьян. Исследование выполнено на самцах яванских макак (*Macaca fascicularis*). Контрольная группа получала стандартный рацион (2 г NaCl/кг корма). Вторая – высокосолевого рациона (8 г NaCl/кг корма), третья – высокосолевого рациона и соевый протеин SUPRO760 (200 г/кг корма). ЭхоКГ, регистрацию АД и ЧСС выполняли исходно, через 4 и 12 мес. Через 12 мес. проводили гистологическое исследование кожно-мышечного лоскута. У всех животных в течение 12 мес. АД и ЧСС значительно не изменялись. У макак на высокосолевого рациона к концу исследования отмечено ухудшение систолической и диастолической функций левого желудочка (ЛЖ). У животных, получавших дополнительно соевый протеин, эти изменения нивелировались. Через 12 мес. у макак, получавших соевый протеин, масса миокарда ЛЖ была меньше, а сократимость ЛЖ выше, чем у животных, потреблявших избыток соли без соевого белка. У обезьян на высокосолевого рациона выявлены накопление коллагеновых волокон в гиподерме, гиалинизация цитоплазмы гладкомышечных клеток капилляров, периваскулярный и периневральный отек сетчатого слоя дермы. У животных, получавших соевый белок, ремоделирование капилляров кожи было менее выражено. Таким образом, высокое потребление соли приводит к неблагоприятным структурным и функциональным нарушениям сердца и сосудов у яванских макак, не связанным с повышением АД. Включение в рацион соевого изолята снижает последствия негативного влияния высокосолевого рациона на сердечно-сосудистую систему.

Ключевые слова: обезьяны, высокосолевого рациона, соевый протеин, артериальное давление, ремоделирование миокарда, эхокардиография

DOI: 10.31857/S0869813923060055, **EDN:** WHBVEN

ВВЕДЕНИЕ

Высокое содержание соли в пищевом рационе является одной из причин гипертонии и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1, 2]. Традиционно считали, что высокое потребление соли способствует задержке жидкости и приводит к развитию артериальной гипертензии (АГ) по объем зависящему пути. Однако в последние годы обсуждают и другой механизм роста артериального давления (АД) при повышенном содержании натрия в рационе, согласно которому нарастание резистивности мелких сосудов кожи может быть одной из причин, способствующих росту АД независимо от экспансии объема [3, 4].

Сторонники солевой гипотезы показали, что уменьшение количества потребляемой соли всего от 1.8 до 2.5 г/день приводит к снижению уровня артериального давления и последующему уменьшению сердечно-сосудистых событий [5]. Это относится к солечувствительной гипертензии, которая определяется как повышение значений АД не менее чем на 5% вследствие солевой нагрузки [6]. Однако далеко не все исследователи согласны с тем, что резкое снижение поступления натрия в организм приносит очевидную пользу. Более того есть работы, доказывающие обратное – наличие *J*-зависимости кардиоваскулярного риска и общей смертности у людей с очень низким потреблением соли [7–9].

Потенциальные негативные последствия строгого ограничения потребления натрия для населения в целом связаны с тем, что этот ион играет важную роль в регуляции различных физиологических процессов [10]. Кроме того, существуют значительные индивидуальные различия в гемодинамическом эффекте высокого потребления соли. Так, широко известен феномен “сольрезистентности”, когда высокое потребление хлористого натрия у людей не приводит к повышению АД, по-видимому, этот же феномен отмечен у некоторых видов животных, в частности у крыс [3, 11, 12]. Кроме того, необходимо отметить, что взаимоотношения между пищевым натрием, артериальной гипертензией и повреждениями кардиоваскулярной системы далеко не однозначны. Особый интерес вызывают представления о том, что рацион с высоким содержанием поваренной соли является независимым фактором развития ремоделирования органов, не ассоциированным с ростом АД [12, 13]. Так, независимо от изменения АД, высокое потребление хлорида натрия вызывает дисфункцию эндотелия и ремоделирование сердца, в частности гипертрофию левого желудочка (ЛЖ). Результаты ряда наших предыдущих исследований также показали, что у крыс Wistar высокое содержание хлорида натрия в рационе не всегда ассоциируется с увеличением АД, зато связано с гипертрофией ЛЖ. Причиной отсутствия повышения АД в таком случае, возможно, является способность почек значительно увеличивать экскрецию натрия [12], а кожных депо связывать его избыток [14, 15]. Действует ли такой механизм у млекопитающих других биологических видов, в частности приматов, остается неизвестным. Следует отметить, что многие стороны процесса ремоделирования миокарда на фоне большого поступления натрия с пищей в настоящее время изучены недостаточно. Также важно указать, что длительное высокое потребление натрия приводит к уменьшению количества кожных капилляров, что на самом деле может представлять собой первый шаг в развитии гипертонии. У предрасположенных лиц может быть ослаблена сосудорасширяющая реакция кожи, что приводит к развитию солечувствительной гипертонии [16].

В дополнение к вышеуказанным механизмам в последнее время огромный интерес вызывает определение роли аминокислот в патофизиологии солечувствительной АГ. Показано, что существенную роль в прогрессировании дисфункции почек при чувствительности к соли играет лизин [17, 18]. Экспериментальные исследования показали, что добавление лизина в рацион чувствительных к соли крыс

Dahl ослабляло развитие АГ и уменьшало повреждение почек. Защитное действие лизина на почки опосредовано усилением диуреза и экскреции углеродных метаболитов [19].

Недавно установлено, что введение в пищевой рацион соевых продуктов способно оказывать определенное нефро- и кардиопротективное действие при хронической болезни почек, как у людей, так и у экспериментальных животных [4, 20, 21]. Результаты наших более ранних исследований также позволяют предполагать, что назначение изолированных протеинов сои на фоне высокосолевого рациона может уменьшить проявления ремоделирования миокарда у крыс [22]. В литературе имеются данные о благоприятном антиатерогенном воздействии пищевого рациона, включающего соевый протеин, у обезьян [23, 24]. Однако ни в одном исследовании не изучали феномен прямого воздействия хлорида натрия на миокард у приматов. Соответственно, не ясно, может ли у них повреждающее действие избытка соли на сердечно-сосудистую систему нивелироваться другими диетарными интервенциями, в частности протеинами сои.

В связи с этим мы провели исследование, целью которого стало изучение влияния длительного применения рационов питания с различным содержанием хлорида натрия и соевого белка на ремоделирование миокарда и кожи у яванских макак.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на взрослых самцах яванских макак (*Macaca fascicularis*, питомник ФГБНУ “НИИ МП”, возраст в начале эксперимента – 6–8 лет, масса тела – 5.15–9.7 кг). Животные были распределены на три группы (по 6 особей в каждой), сопоставимые по массе и возрасту. Первая группа (контроль) получала стандартный рацион (гранулированный корм, пищевая ценность – 340 ккал/100 г корма), содержащий 2 г NaCl/кг корма. Вторая (HS-группа) – рацион с высоким содержанием соли (8 г NaCl/кг корма), третья (HS + Soy-группа) – высокосолевого рациона в сочетании с изолированным соевым протеином SUPRO-760 (все белковые составляющие “стандартного рациона” заменены на соевый белок – 200 г/кг корма; ProteinTechnologyInternational, USA). Соевый изолят SUPRO-760 содержит более 90% полноценного протеина, сравнимого с белками молока, яиц и мяса. Он хорошо усваивается, содержит все необходимые аминокислоты и 306 мг % изофлавонов.

Во время эксперимента обезьяны содержали в индивидуальных клетках. Период адаптации к условиям индивидуального содержания перед проведением исследований составил 30 дней. В помещении поддерживали естественную продолжительность светового дня. Температура воздуха составляла $23 \pm 3^\circ\text{C}$, относительная влажность – $52.5 \pm 17.5\%$. Животных обследовали клинически, регистрировали массу тела (весы электронные MERCURY M-ER 333F, MERCURYWP TECH GROUP CO., LTD, Seoul, the Republic of Korea) и рост. На момент включения в исследование все обезьяны по данным ветеринарного обследования были здоровы. Срок эксперимента составил 12 мес.

Систолическое (АДс) и диастолическое (АДд) артериальное давление (АД) у макак регистрировали осциллометрическим методом на ветеринарном тонометре МЛ-410 ВЭТ (“Микролюкс”, Россия) под наркозом. В качестве наркоза использовали тилетамин/золазепам – Золетил 100 – в дозе 0.05 мл/кг (серия 75 TD, Virbac, Франция) и ксилазин – Ксила 2% (серия 358047, INTERCHEMIE, Голландия) – в дозе 0.1 мл/кг.

Эхокардиографическое исследование (ЭхоКГ). ЭхоКГ выполняли всем экспериментальным животным исходно, через 4 и через 12 мес. наблюдения. После регистрации АД у наркотизированных животных проводили ЭхоКГ секторным датчиком с частотой 3–5 МГц на ультразвуковой системе Chison SonoTouch 60 (Китай).

Для максимального контакта геля и ультразвукового датчика с кожей у обезьян выщипывали шерсть над областью сердца. ЭхоКГ выполняли в *B*-режиме (двумерное сканирование), *M*-режиме (одномерное сканирование), а так же в режимах импульсного и тканевого доплера.

В парастернальном сечении по длинной оси ЛЖ измеряли: конечно-диастолический размер ЛЖ (КДРлж, см), конечно-систолический размер ЛЖ (КСРлж, см), толщину межжелудочковой перегородки в диастолу (Тмжп-д, см) и в систолу (Тмжп-с, см), толщину задней стенки ЛЖ в диастолу (Тзс-д, см) и в систолу (Тзс-с, см), передне-задний размер левого предсердия (ЛП-п-зад, см). В четырехкамерном сечении из верхушечного доступа измеряли: размер основания правого желудочка (ПЖ-баз, см), размер правого предсердия по короткой оси (ПП-гориз, см), величину систолической экскурсии плоскости митрального кольца (MAPSE, см), величину систолической экскурсии плоскости трикуспидального кольца (TAPSE, см). Частоту сердечных сокращений (ЧСС, мин⁻¹) оценивали по временному интервалу двух сердечных циклов при регистрации движений передней створки митрального клапана в *M*-режиме. Из пятикамерной апикальной проекции регистрировали кровотоки в выходном тракте ЛЖ.

По итогам измерений рассчитывали показатели систолической функции и моделирования ЛЖ, а также некоторые параметры центральной гемодинамики, такие как ударный объем (УО, мл) и сердечный выброс (СВ, л/мин). Фракцию укорочения левого желудочка (ФУ, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ФУ} = [(КДРлж - КСРлж) / КДРлж] \times 100\%;$$

фракцию выброса левого желудочка методом Тейхольца (ФВ_Т, %):

$$\text{ФВ} = [(7 / (2.4 + КДРлж)) \times КДРлж^3 - (7 / (2.4 + КСРлж)) \times КСРлж^3] / [(7 / (2.4 + КДРлж)) \times КДРлж^3] \times 100\%;$$

относительную толщину стенки левого желудочка (ОТС, ед) по формуле:

$$\text{ОТС} = (\text{Тзс-д} \times 2) / \text{КДРлж}.$$

Массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ, г) оценивали по формуле:

$$\text{ММЛЖ} = 0.8 \times \left\{ 1.04 \times \left[(\text{КДРлж} + \text{Тмжп-д} + \text{Тзс-д})^3 - \text{КДРлж}^3 \right] \right\} + 0.6.$$

Диастолическую функцию ЛЖ оценивали с помощью исследования доплеровского спектра трансмитрального кровотока при расположении контрольного объема на уровне кончиков открытых створок митрального клапана. Измеряли: максимальную скорость трансмитрального потока в раннюю диастолу (*E*, см/с), максимальную скорость трансмитрального потока в систолу предсердий (*A*, см/с), время изоволюметрического расслабления левого желудочка (*IVRT*, с). Кроме того, исследовали максимальную скорость экскурсии фиброзного кольца митрального клапана в раннюю диастолу (*e'*, см/с) и рассчитывали отношение *E/e'* для косвенной оценки давления наполнения ЛЖ.

Гистологическое исследование. Фрагменты кожно-мышечного лоскута забирали у обезьян со сроком эксперимента 12 мес. в день выполнения ЭхоКГ. Образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (рН 7.4). Обезвоживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, США) в готовом растворе IsoPREP (Биовитрум, Россия) и парафиновой среде HISTOMIX (Биовитрум, Россия). Срезы толщиной 1.5–2 мкм изготавливали с использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США). Затем срезы депарафинировали, дегидратировали, окрашивали гематоксилином и эозином и трихром по Маллори. Микроско-

пическое исследование выполняли на микроскопе AXIO LAB.A1 (Carl Zeiss) при ув. $\times 200$, $\times 400$.

Распространенность коллагеновых волокон в гиподерме оценивали полуколичественно в баллах в гистологических препаратах, окрашенных по Маллори (0 – $< 10\%$; 1 балл – $10\text{--}25\%$; 2 балла – $26\text{--}50\%$; 3 балла – $> 50\%$).

Статистический анализ. Результаты исследования представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). При предварительном тестировании методами Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка выяснилось, что исследуемые переменные соответствуют закону нормального распределения, поэтому при статистическом анализе данных были использованы методы параметрической статистики: mixed ANOVA при сравнении данных 3-х исследуемых групп (с *post-hoc* анализом по критерию Тьюки) и однофакторный дисперсионный анализ для связанных выборок при исследовании динамики того или иного показателя в каждой из групп в ходе 12-ти месячного наблюдения. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные всех 3-х экспериментальных групп в начале исследования не отличались по уровню АД и эхокардиографическим показателям ($p > 0.05$ для каждого из показателей). В течение всего периода наблюдения значимых изменений АД и ЧСС у макак исследуемых групп не выявлено (рис. 1).

Также у животных контрольной группы в течение 12 мес. значимых изменений, исследованных эхокардиографических показателей, не наблюдалось (рис. 2–4).

У макак HS-группы, получавших высокосолевой рацион, через 4 мес. солевой нагрузки значимых изменений эхокардиографических показателей не выявлено. Однако к 12-му мес. наблюдения отмечено снижение ФУ и ФВ по сравнению с величинами, оцененными в 4 мес. Кроме того, значительно снизилась по сравнению с исходной величина E – пиковой скорости трансмитрального кровотока, указывающая на замедление релаксации ЛЖ (рис. 3). Перечисленные изменения могут свидетельствовать об ухудшении систолической и диастолической функций ЛЖ на фоне длительного воздействия избытка натрия в диете (рис. 2, 3). Кроме того, у этих животных наблюдалась тенденция к увеличению массы миокарда левого желудочка, которая, однако, не достигла уровня статистической значимости (рис. 4).

Использование протеинов сои в качестве источника белка на фоне избытка соли в диете макак HS + Soy-группы предупреждало снижение ФВ и ФУ. Более того, к моменту завершения исследования у животных данной группы значительно увеличилась величина систолической экскурсии плоскости митрального кольца (TAPSE), появились признаки улучшения диастолической функции ЛЖ в виде повышения величины e' – максимальной скорости экскурсии фиброзного кольца митрального клапана в раннюю диастолу, а также снижения отношения E/e' . Уменьшилась и толщина межжелудочковой перегородки, что можно трактовать как признак позитивного ремоделирования миокарда (рис. 2–4). Таким образом, введение протеинов сои в рацион макак, получавших избыток соли, способствовало сохранению сократимости, улучшению диастолической функции, а замедляло развитие изменений структуры ЛЖ.

К моменту завершения эксперимента макаки, получавшие рацион с избытком соли (HS-группа), имели снижение фракции укорочения ЛЖ, увеличение толщины задней стенки ЛЖ в систолу и массы ЛЖ, по сравнению с животными, дополнительно получавшими протеины сои (HS + Soy-группа). Кроме того, обезьяны, получавших соевый изолят, по перечисленным параметрам не отличались от контрольных животных (рис. 2–4).

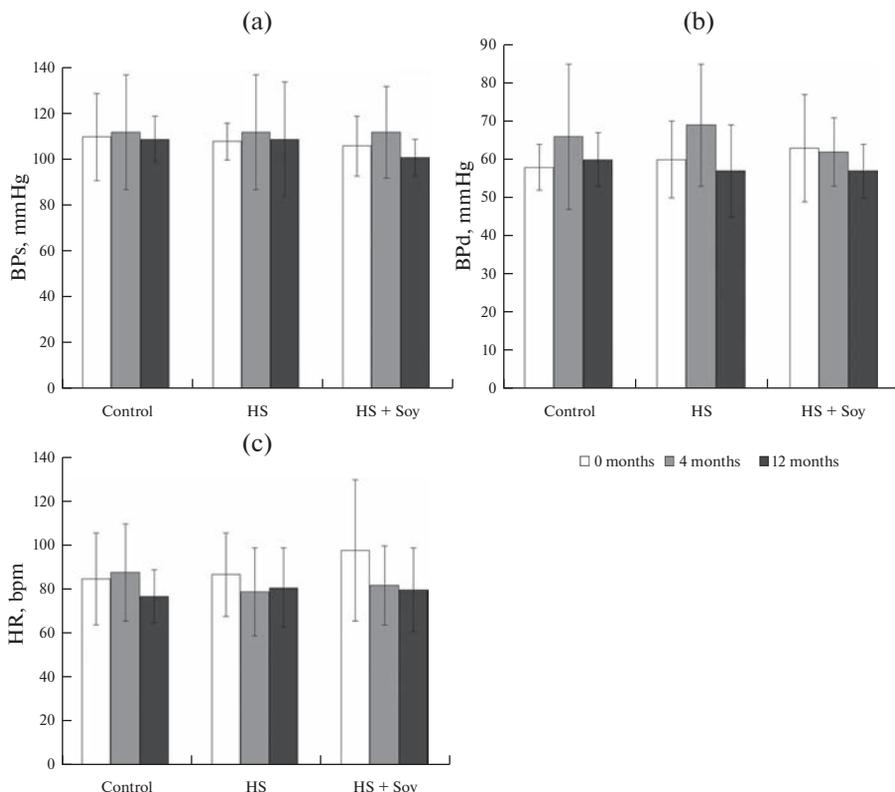


Рис. 1. Динамика уровня артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у яванских макак, получавших различную по количеству соли диету. Уровень систолического АД (а), диастолического АД (б) и ЧСС (с) у животных перед началом эксперимента (0 months), через 4 (4 months) и 12 (12 months) мес. наблюдения. Экспериментальные группы: Control ($n = 6$) – контрольные животные, получавшие стандартную диету (2 г NaCl/кг корма), HS ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевою диету (8 г NaCl/кг корма), HS + Soy ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевою диету (8 г NaCl/кг корма) и соевый белковый изолят SUPRO-760 (200 г/кг корма). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Остальные исследованные эхокардиографические показатели (конечно-диастолический размер ЛЖ, толщина задней стенки ЛЖ в диастолу, толщина межжелудочковой перегородки в систолу, конечно-систолический размер ЛЖ, передне-задний размер левого предсердия, базальный размер правого желудочка, размер правого предсердия по горизонтальной оси, относительная толщина стенки левого желудочка, величина систолической экскурсии плоскости трикуспидального кольца, максимальная скорость трансмитрального потока в систолу предсердий) у макак каждой группы значимо не изменялись в течение всего срока наблюдения, также отсутствовали межгрупповые различия данных показателей в соответствующие сроки наблюдения.

В конце эксперимента (через 12 мес.) у обезьян исследовали морфологию артериол, расположенных в гиподерме на границе с кожей, а также капиллярные пучки и нервные волокна в сетчатом слое дермы (рис. 5). По сравнению с контрольной группой (рис. 5а–5с), у животных, получавших рацион с высоким содержанием NaCl и стандартным белком (рис. 5д–5ф), наблюдали большую распространен-

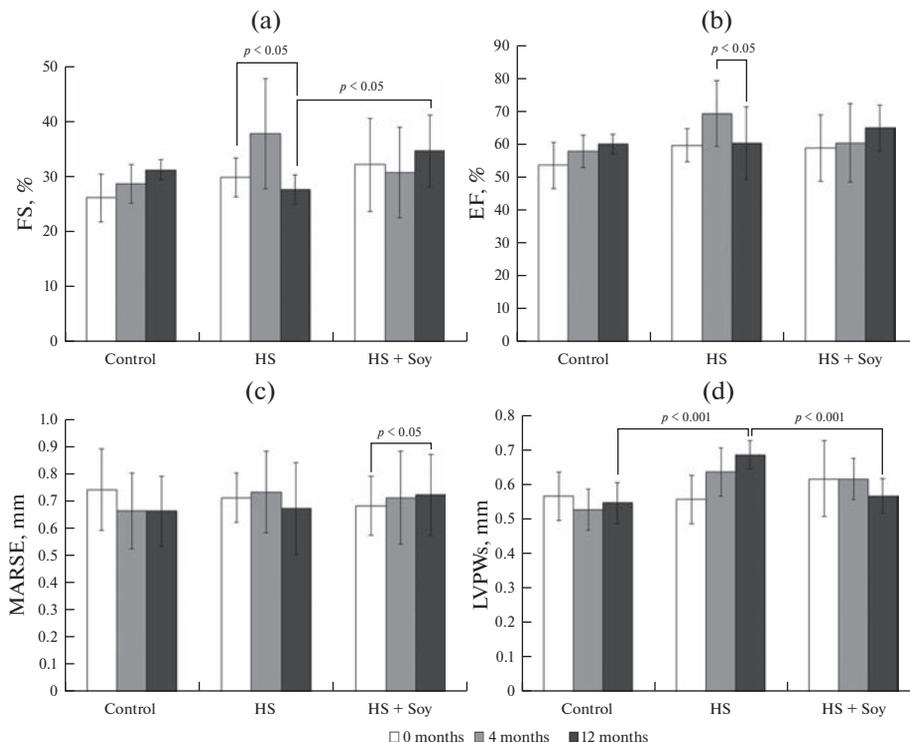


Рис. 2. Влияние высокосолевой диеты и соевых протеинов на эхокардиографические показатели сократимости левого желудочка у яванских макак. (а) – Фракция укорочения (FS), (б) – фракция выброса (EF) левого желудочка, (с) – величина систолической экскурсии плоскости митрального кольца (MAPSE), (д) – толщина задней стенки ЛЖ в систолу (LVPWs) у животных перед началом эксперимента (0 months), через 4 (4 months) и 12 (12 months) мес. наблюдения. Экспериментальные группы: Control ($n = 6$) – контрольные животные, получавшие стандартную диету (2 г NaCl/кг корма), HS ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевую диету (8 г NaCl/кг корма), HS + Soy ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевую диету (8 г NaCl/кг корма) и соевый белковый изолят SUPRO-760 (200 г/кг корма). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), p – значимость различий.

ность коллагеновых волокон в гиподерме (рис. 5e): распространенность коллагеновых волокон в группах Control, HS + Soy соответствовала 0 баллов, в группе HS – 1 баллу. Также в гиподерме крыс, получавших высокосолевую диету без соевого протеина, толщина стенок артериол была больше в среднем на 18%, чем у животных остальных групп (рис. 5f).

В капиллярно-венозных пучках сетчатого слоя дермы животных с высокосолевой диетой наблюдали признаки периваскулярного отека и гиалинизацию ГМК стенок капилляров, также присутствовал периневральный отек (рис. 6b). В группе животных, получавших соевый белок, ремоделирование капилляров было менее выраженным, однако сохранялись признаки периваскулярного и эндоневрального отека (рис. 6с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что избыточное употребление соли далеко не всегда приводит к повышению АД у животных и человека, это свойство называют “солерезистент-

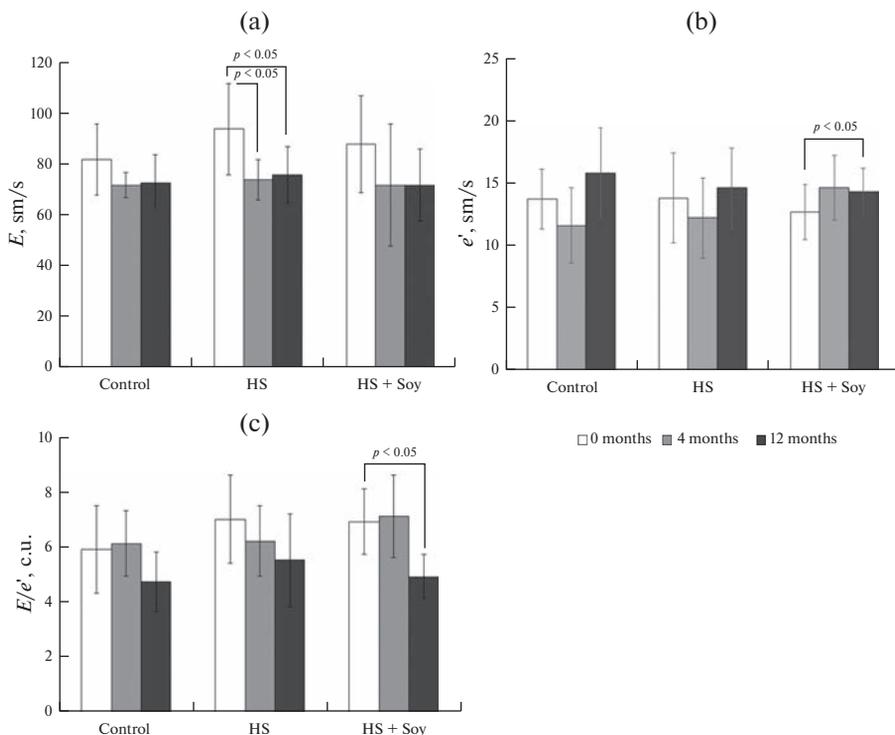


Рис. 3. Влияние высокосолевого рациона и соевых протеинов на эхокардиографические показатели диастолической функции левого желудочка у яванских макаков. (а) – Максимальная скорость трансмитрального потока в раннюю диастолу (E), (б) – максимальная скорость экскурсии фиброзного кольца митрального клапана в раннюю диастолу (e'), (с) – соотношение E/e' у животных перед началом эксперимента (0 months), через 4 (4 months) и 12 (12 months) мес. наблюдения. Экспериментальные группы: Control ($n = 6$) – контрольные животные, получавшие стандартную диету (2 г NaCl /кг корма), HS ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевого рациона (8 г NaCl /кг корма), HS + Soy ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевого рациона (8 г NaCl /кг корма) и соевый белковый изолят SUPRO-760 (200 г /кг корма). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), p – значимость различий.

ность” [5], в отличие от т. н. “солечувствительности”, описываемой как гипертензивный ответ [5, 25]. Однако насколько такая “резистентность” обеспечивает безопасность? Существует множество ретроспективно и экспериментально полученных фактов, указывающих на то, что длительное и обильное употребление соли само по себе вызывает существенные неблагоприятные сдвиги в работе сердечно-сосудистой и других систем, не опосредованные повышением АД [26]. В тоже время большинство этих данных получено в экспериментах на мелких лабораторных животных, преимущественно на грызунах [27, 28]. Справедливо и то, что результаты подобных работ следует с осторожностью переносить на человека, а этические ограничения не позволяют выполнять длительные активные исследования на людях [29]. В такой ситуации наиболее оправданным решением выглядит использование приматов для моделирования перегрузки натрием у человека, что и было реализовано в ходе проведенного исследования.

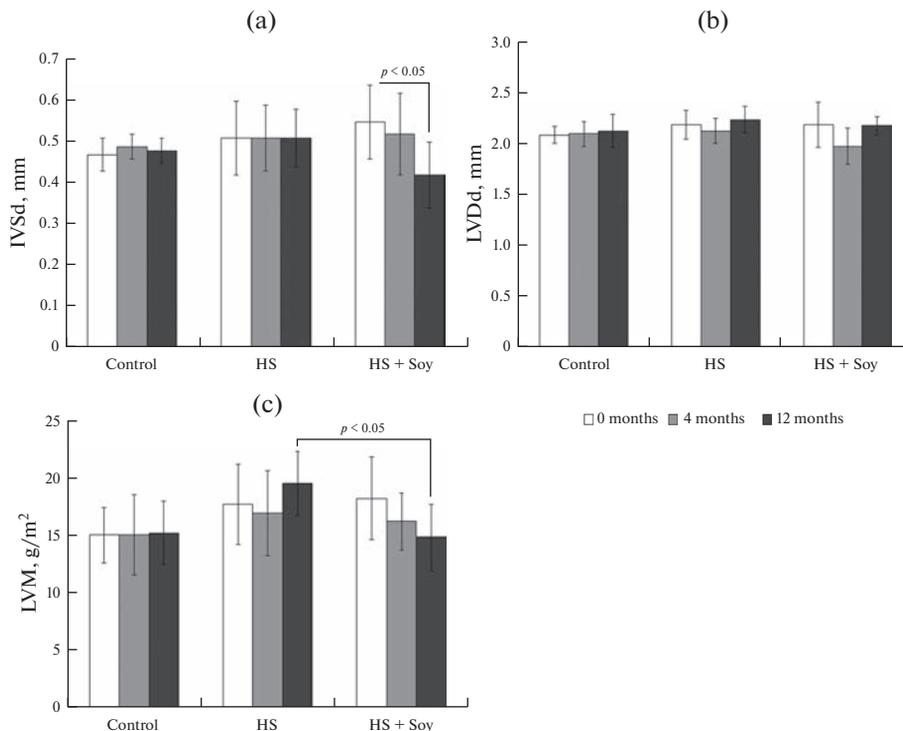


Рис. 4. Влияние высокосолевого рациона и соевых протеинов на показатели морфометрии сердца при эхокардиографии у яванских макаков. (а) – Толщина межжелудочковой перегородки в диастолу (IVSd), (б) – конечно-диастолический размер левого желудочка (LVDd), (с) – масса миокарда ЛЖ (LVM) у животных перед началом эксперимента (0 months), через 4 (4 months) и 12 (12 months) мес. наблюдения. Экспериментальные группы: Control ($n = 6$) – контрольные животные, получавшие стандартную диету (2 г NaCl/кг корма), HS ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевого рациона (8 г NaCl/кг корма), HS + Soy ($n = 6$) – животные, получавшие высокосолевого рациона (8 г NaCl/кг корма) и соевый белковый изолят SUPRO-760 (200 г/кг корма). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), p – значимость различий.

При изучении экспериментальной модели избыточного потребления хлорида натрия с пищей у яванских макаков установлено, что высокосолевого рацион не вызывает значимых изменений АД через 4 и 12 мес. наблюдения. Зато отмечены морфологические и функциональные изменения работы сердца при эхокардиографическом исследовании. Так у макаков, получавших избыток соли (группа 2), к 12 мес. наблюдения возникли отчетливые нарушения диастолической функции в виде снижения скорости раннего диастолического наполнения ЛЖ (E) и признаки снижения систолической функции ЛЖ, выражающиеся в понижении фракции укорочения и фракции выброса ЛЖ, наблюдалась тенденция к росту массы миокарда ЛЖ. При исследовании кожи у животных отмечены изменения стенки артериол и избыточное накопление коллагеновых волокон в гиподерме, а также гиалинизация цитоплазмы гладкомышечных клеток капилляров, периваскулярный и периневральный отек сетчатого слоя дермы.

Эти данные перекликаются с результатами других исследователей. Так, в работе Whaley-Connell и соавт. [30] было показано, что у трансгенных (mRen2) крыс со

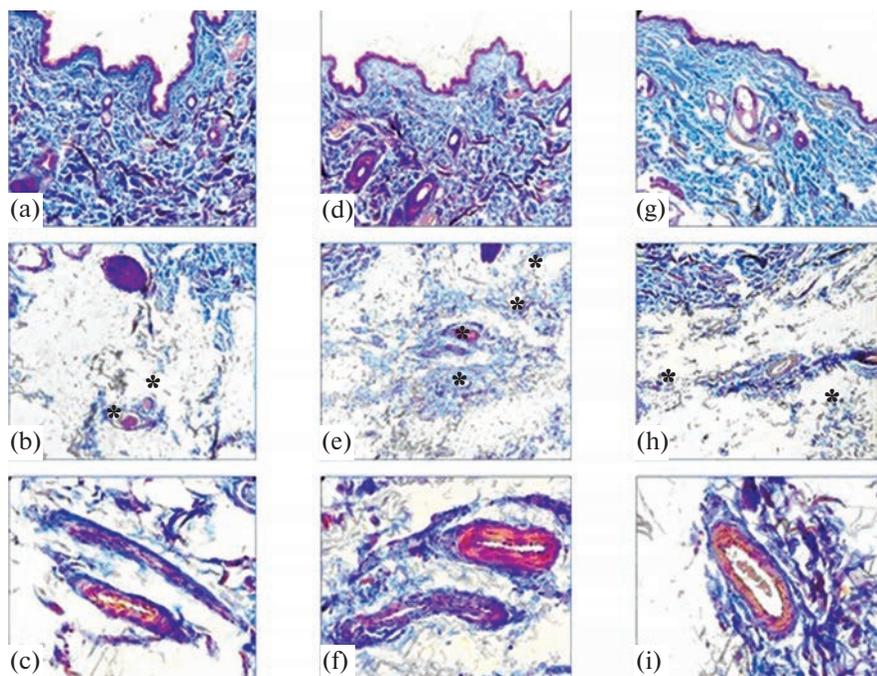


Рис. 5. Микрофотографии кожи яванских макак (срок эксперимента 12 мес.; окраска трихром по Маллори; 1, 2 ряд горизонтально – ув. $\times 200$, 3 ряд – ув. $\times 400$): а–с – стандартный рацион (контрольная группа); (а) – эпидермис и дерма; (б) – гиподерма; (с) – артериола и венула гиподермы; (d–f) – рацион с высоким содержанием NaCl и стандартным белком: (d) – эпидермис и дерма; (е) – гиподерма; (f) – артериола и венула гиподермы; (g–i) – рацион с высоким содержанием NaCl и соевым белком: (g) – эпидермис и дерма; (h) – гиподерма; (i) – артериола гиподермы. * – Коллагеновые волокна гиподермы.

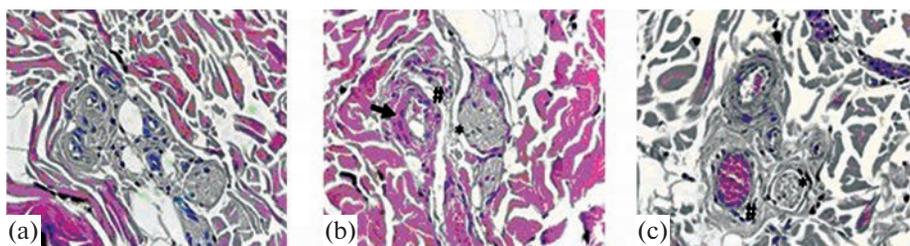


Рис. 6. Микрофотографии пучка капилляров с нервом сетчатого слоя дермы у яванских макак (срок эксперимента 12 мес.; окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$): (а) – стандартный рацион (контрольная группа); (b) – рацион с высоким содержанием NaCl и стандартным белком (стрелка – глианизация цитоплазмы гладкомышечных клеток стенки капилляра, # – признаки периваскулярного отека, * – признаки периневрального отека); (с) – рацион с высоким содержанием NaCl и соевым белком (# – признаки периваскулярного отека, * – признаки эндоневрального отека).

сверхэкспрессией трансгена мышинового ренина избыток соли в рационе приводит возникновению диастолической дисфункции ЛЖ, не связанной с нарастанием массы миокарда или АГ. По итогам китайского популяционного и когортного исследований установлено, что избыточное потребление соли прямо связано с индексом ремоделирования ЛЖ и негативно ассоциировано с параметрами диастоли-

ческой функции (скорость продольной деформации в период раннего и позднего диастолического наполнения), а также с фракцией укорочения и фракцией выброса ЛЖ [31].

Наши предыдущие исследования, проведенные на крысах, показали, что при высоком поступлении натрия с пищей даже в случаях отсутствия роста АД, в миокарде животных отмечаются отчетливые проявления ремоделирования в виде гипертрофии и, преимущественно, периваскулярного фиброза [6]. Это позволяет предполагать наличие механизма прямого воздействия хлорида натрия на мышцу сердца у крыс.

Изменения кожи у макак, длительно получавших избыток соли, также демонстрируют развитие фиброза и изменение стенок сосудов в гиподерме, наличие периваскулярного и периневрального отека. Многие исследователи указывают на то, что чрезмерное поступление соли приводит не только к ремоделированию миокарда, но и к развитию фиброза миокарда, почек, артерий разного калибра, включающих аорту и коронарные артерии [32–34].

В числе механизмов негативного влияния избытка соли на миокард и сосуды рассматривают: профибротический эффект, опосредованный гиперэкспрессией TGF- β 1 и провоспалительных цитокинов [35, 36]; эндотелиальную дисфункцию, вызванную прямым или косвенным угнетением образования оксида азота [37, 38], повышенную продукцию эндотелина-1 [34], угнетение экспрессии рецепторов AT2 [39], рецептора эстрогена, связанного с G-белком (GPER) [40]; прямое повреждение гликокаликса и клеток эндотелия [41, 42], а так же усиление его апоптоза [43–45]. Возможно, значительная часть этих эффектов ассоциирована или контролируется изменениями экспрессии ряда нуклеарных факторов транскрипции [46, 47].

В контексте “солевого повреждения” особый интерес представляла группа экспериментальных животных, получавших наряду с избытком соли соевые протеины (группа 3). У этих макак через 4 мес. наблюдения при эхокардиографии отмечена тенденция к снижению E – скорости релаксации ЛЖ. Однако к истечению года показатели диастолической функции улучшились, что выразалось в увеличении скорости ранней диастолической деформации миокарда (e') и снижении соотношения E/e' , отражающего, вероятно, снижение давления наполнения ЛЖ. Косвенным показателем улучшения диастолического наполнения может выступать и уменьшение толщины межжелудочковой перегородки в диастолу. Кроме того, у животных данной группы отмечены признаки повышения сократительной активности ЛЖ в виде увеличения систолической экскурсии митрального кольца (MAPSE) и тенденции к росту ФВ.

К моменту завершения исследования макаки, получавшие наряду с избытком соли протеины сои, не отличались по эхокардиографическим параметрам и уровню АД от животных контрольной группы, но отличались от макак на высокосолевом рационе меньшей массой миокарда ЛЖ и лучшей сократимостью ЛЖ. Кроме того, по данным гистологического исследования кожи выраженность отеочно-фибротических изменений у них также была меньше. Можно полагать, что у яванских макак соевый белковый изолят оказывает кардиопротективный эффект в условиях солевой перегрузки.

В качестве потенциального механизма, объясняющего такой эффект, можно рассматривать влияние изофлавонов, содержащихся в соевом изоляте, таких, например, как генистеин, выступающий в роли фитоэстрогена. Предполагают, что он, связываясь с ГСПГ (глобулином, связывающим половые гормоны), увеличивает концентрацию свободных эстрогенов в организме [48]. В ряде работ приводят доказательства антиканцерогенного, ангиопротективного, антифибротического и органопротективного эффектов генистеина, но существует также возможность позитивного эпигеномного воздействия содержащихся в сое микроРНК [48–50].

Возвращаясь к возможным проэстрогенным эффектам изофлавонов уместно упомянуть одно исследование, в котором изучали воздействие активации рецептора эстрогена связанного с G-белком (GPER) у самок крыс mRen2.Lewis, находящихся на высокосолевого питания [40]. Было показано, что активация GPER предупреждает развитие “солевой” концентрической гипертрофии ЛЖ и улучшает его диастолическую функцию (увеличивает e' и снижает отношение E/e'). Примечательно, что этот эффект не был опосредован изменением АД.

Еще одним важным аспектом полученных в нашей работе данных являются отчетливые изменения кожи у макак с избыточным количеством соли в питании. Наличие периваскулярного и периневрального отека косвенно указывает на то, что кожа может выполнять роль депо натрия в организме при его избыточном поступлении.

Существуют доказательства того, что натрий накапливается без соразмерной задержки воды в коже и предположительно связан с протеогликанами [14, 51]. Это позволило Titze и соавт. [51] сформулировать гипотезу о том, что высокое потребление соли приводит к увеличению производства и сульфатации гликозаминогликанов в коже (и таким образом – накоплению положительных ионов Na^+), а диета с низким содержанием соли – к снижению полимеризации и сульфатации гликозаминогликанов и высвобождению Na^+ из кожного резервуара. Таким образом, становится возможным “осмотически неактивное накопление Na^+ ” при котором не будут возникать гиперволемиа и АГ. Изучили регуляторные механизмы внеклеточного осмотически неактивного накопления Na^+ , в которых важную роль играют моноциты, снабженные транскрипционным фактором для связывающего протеина, усиливающего тонус (TonEBP/Nfat5). Было показано, что при повышении локальной осмолярности TonEBP связывается с промоторами многих генов, индуцируя их экспрессию и запуская тем самым клеточную и внеклеточную защиту от осмотического стресса. В том числе TonEBP связывается с промоторной областью фактора роста эндотелия сосудов-C (VEGF-C), увеличивая секрецию VEGF-C макрофагами в интерстиций. VEGF-C в свою очередь индуцирует гиперплазию кожной лимфатической капиллярной системы и увеличение плотности лимфатических капилляров, что способствует выведению Na^+ или Cl^- из кожи [52]. Высказано предположение, что нарушение этих механизмов и является причиной “солечувствительности”.

Возвращаясь к результатам наших экспериментов, необходимо отметить убедительные гистологические признаки периваскулярного отека кожи, что, возможно, противоречит гипотезе “осмотически неактивного накопления натрия”. Однако вышеперечисленные изменения могут быть и следствием дистрофии, вызванной повреждающим действием избытка соли на сердечнососудистую систему. В любом случае проблема метаболизма натрия в норме и при патологии требует дальнейших исследований. В литературе нам удалось найти лишь одно исследование, посвященное влиянию изменений солевой нагрузки у яванских макак на реактивность рецепторов ангиотензина II [53].

Результаты настоящей работы можно рассматривать как подтверждение гипотезы о том, что высокое потребление натрия хлорида с пищей приводит к неблагоприятным структурным и функциональным изменениям сердца и сосудов, не опосредованным повышением АД. Включение в рацион соевого изолята, вероятно, снижает последствия этого негативного влияния. Конкретные механизмы такого положительного воздействия еще предстоит исследовать.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Условия содержания макак соответствовали стандартам, указанным ГОСТ 33218-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ух-

да за нечеловекообразными приматами” и в “Постановлении об утверждении СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”.

Все манипуляции, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии ФГБНУ “НИИ МП”.

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00221 А “Физиологические механизмы адаптации сердечнососудистой системы и почек к высокому поступлению хлорида натрия с пищей у млекопитающих разных видов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Н.К. – сбор и обработка данных, написание статьи; О.Н.Б. – планирование эксперимента, сбор данных, написание статьи; Г.Т.И. – сбор данных, написание статьи; М.М.П. – планирование эксперимента, участие в обсуждении результатов и написании статьи; Е.О.Б. – выполнение гистологического исследования; И.Г.К. – идея работы, планирование эксперимента, участие в обсуждении результатов; А.Г.К. – идея работы, планирование эксперимента, участие в обсуждении результатов; С.В.О. – редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurtz TW, Pravenec M, DiCarlo SE (2022) Mechanism-based strategies to prevent salt sensitivity and salt-induced hypertension. *Clin Sci (Lond)* 136: 599–620.
<https://doi.org/10.1042/CS20210566>
2. Ertuglu LA, Eljovich F, Laffer CL, Kirabo A (2021) Salt-Sensitivity of Blood Pressure and Insulin Resistance. *Front Physiol* 12:2260.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.793924>
3. Kanbay M, Chen Y, Solak P, Sanders PW (2011) Mechanisms and consequences of salt sensitivity and dietary salt intake. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20: 37–43.
<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32834122f1>
4. Selvarajah V, Connolly K, McEniery C, Wilkinson I (2018) Skin Sodium and Hypertension: A Paradigm Shift? *Curr Hypertens Rep* 20: 94.
<https://doi.org/10.1007/s11906-018-0892-9>
5. Mishra S, Ingole S, Jain R (2018) Salt sensitivity and its implication in clinical practice. *Indian Heart J* 70: 56–564.
<https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.10.006>
6. Maaliki D, Itani MM, Itani HA (2022) Pathophysiology and genetics of salt-sensitive hypertension. *Front Physiol* 13: 1001434.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1001434>
7. Stolarz-Skrzypek K, Kuznetsova T, Thijs L, Tikhonoff V, Seidlerová J, Richart T, Jin Y, Olszanec-ka A, Malyutina S, Casiglia E, Filipovský J (2011) Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. *Jama* 305: 1777–1785.
<https://doi.org/10.1001/jama.2011.574>
8. O'Donnell M, Yusuf S, Mente A, Gao P, Mann JF, Teo K, McQueen M, Sleight P, Sharma AM, Dans A, Probstfield J (2011) Urinary sodium and potassium excretion and risk of cardiovascular events. *JAMA* 306: 2228–2239.
<https://doi.org/10.1001/jama.2011.1729>
9. Mente A, O'Donnell M, Yusuf S (2021) Sodium intake and health: what should we recommend based on the current evidence? *Nutrients* 13: 3232.
<https://doi.org/10.3390/nu13093232>

10. O'Donnell M, Mente A, Alderman MH, Brady AJB, Diaz R, Gupta R, López-Jaramillo P, Luft FC, Lüscher TF, Mancina G (2020) Salt and cardiovascular disease: Insufficient evidence to recommend low sodium intake. *Eur Heart J* 41: 3363–3373.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa586>
11. Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, Buring JE, Rexrode KM, Kumanyika SK, Appel LJ, Whelton PK (2007) Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: Observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ* 334: 885–888.
<https://doi.org/10.1136/bmj.39147.604896.55>
12. Парастаева ММ, Береснева ОН, Иванова ГТ, Швед НВ, Кучер АГ, Зубина ИМ, Каюков ИГ (2016) Артериальная гипертензия и потребление соли: вклад в ремоделирование сердца. *Нефрология* 20: 97–105. [Parastaeva MM, Beresneva ON, Ivanova GT, Shved NV, Kucher AG, Zubina IM, Kayukov IG (2016) Hypertension and salt intake: contribution to cardiac remodeling. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 20: 97–105. (In Russ)].
13. Mente A, O'Donnell M, Rangarajan S, McQueen M, Dagenais G, Wielgosz A, Lear S, Ah STL, Wei L, Diaz R, Avezum A, Lopez-Jaramillo P (2018) Urinary sodium excretion, blood pressure, cardiovascular disease, and mortality: a community-level prospective epidemiological cohort study. *Lancet* 392: 496–506.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31376-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31376-X)
14. Иванова ЛН, Арчибасова ВК, Штеренталь И (1978) Натрийдепонирующая функция кожи у белых крыс. *Физиол Ж СССР им ИМ Сеченова* 64: 358–363. [Ivanova LN, Archibasova VK, Shterental' I (1978) Sodium-depositing function of the skin in white rats. *Fiziol Zh SSSR Im IM Sechenova* 64: 358–363. (In Russ)].
15. Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, Luft F (2014) Spooky sodium balance. *Kidney Int* 85: 759–767.
<https://doi.org/10.1038/ki.2013.367>
16. Cheng Y, Song H, Pan X, Xue H, Wan Y, Wang T (2018) Urinary metabolites associated with blood pressure on a low- or high-sodium diet. *Theranostics* 8: 1468–1480.
<https://doi.org/10.7150/thno.22018>
17. Rinschen MM, Palygin O, El-Meanawy A, Domingo-Almenara X, Palermo A, Dissanayake LD, Golosova D, Schaifroth MA, Guijas C, Demir F, Jaegers J, Gltiozi ML, Xue J, Hoehne M, Benzing T (2022) Accelerated lysine metabolism conveys kidney protection in salt-sensitive hypertension. *Nat Commun* 13: 4099.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31670-0>
18. Rinschen MM, Palygin O, Guijas C, Palermo A, Palacio-Escat N, Domingo-Almenara X, Montenegro-Burke R, Saez-Rodriguez J, Staruschenko A, Siuzdak G (2019) Metabolic rewiring of the hypertensive kidney. *Sci Signal* 12: eaax9760.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aax>
19. McGraw NJ, Krul ES, Grunz-Borgmann E, Parrish AR (2016) Soy-based renoprotection. *World J Nephrol* 5: 233–257.
<https://doi.org/10.5527/wjnv5.i3.233>
20. Jheng H-F, Hirotsuka M, Goto T, Shibata M, Matsumura Y, Kawada T (2017) Dietary low-fat soy milk powder retards diabetic nephropathy progression via inhibition of renal fibrosis and renal inflammation. *Mol Nutr Food Res* 61: 61.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600461>
21. Caponio GR, Wang DQ-H, Di Ciaula A, De Angelis M, Portincasa P (2020) Regulation of cholesterol metabolism by bioactive components of soy proteins: Novel translational evidence. *Int J Mol Sci* 22:227.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010227>
22. Каюков ИГ, Береснева ОН, Парастаева ММ, Иванова ГТ, Куликов АН, Кучер АГ, Каралоглы ДД, Орлов СВ (2019) Протеины сои противодействуют ремоделированию сердца у крыс Wistar, получающих рацион с высоким содержанием хлорида натрия. *Нефрология* 23: 92–99. [Kayukov IG, Beresneva ON, Parastaeva MM, Ivanova GT, Kulikov AN, Kucher AG, Karal-ogly DD, Orlov SV (2019) Soybean proteins counteract heart remodeling in Wistar rats fed a high sodium chloride diet. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 23: 92–99. (In Russ)].
<https://doi.org/10.36485/1561-6274-2019-236-92-99>
23. Wagner JD, Zhang L, Greaves KA, Shadoan MK, Schwenke DC (2000) Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. *Metabolism* 49: 1188–1196.
<https://doi.org/10.1053/meta.2000.8620>
24. Walker SE, Adams MR, Franke AA, Register TC (2000) Effects of dietary soy protein on iliac and carotid artery atherosclerosis and gene expression in male monkeys. *Atherosclerosis* 196: 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.007>
25. Majid DS, Prieto MC, Navar LG (2015) Salt-Sensitive Hypertension: Perspectives on Intrarenal Mechanisms. *Curr Hypertens Rev* 11: 38–48.
<https://doi.org/10.2174/1573402111666150530203858>

26. *Robinson AT, Edwards DG, Farquhar WB* (2019) The influence of dietary salt beyond blood pressure. *Curr Hypertens Rep* 21: 42.
<https://doi.org/10.1007/s11906-019-0948-5>
27. *Yuan BH, Leenen FH* (1991) Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol* 261: H1397–H1401.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.5.H1397>
28. *Safar ME, Thuilliez C, Richard V, Benetos A* (2000) Pressure-independent contribution of sodium on large artery structure and function in hypertension. *Cardiovasc Res* 46: 269–276.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00426-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00426-5)
29. *Jaques DA, Wuerzner G, Ponte B* (2021) Sodium intake as a cardiovascular risk factor: a narrative review. *Nutrients* 13: 3177.
<https://doi.org/10.3390/nu13093177>
30. *Whaley-Connell AT, Habibi J, Aroor A, Ma L, Hayden M R, Ferrario CM, Demarco VG, Sowers JR* (2013) Salt loading exacerbates diastolic dysfunction and cardiac remodeling in young female Ren2 rats. *Metabolism* 62: 1761–1771.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.08.010>
31. *Li K, Song H, Wei F, Liu D, Zhao Y, Yin H, Cui Y, Zhang H, Liu Z* (2022) High salt intake damages myocardial viability and induces cardiac remodeling via chronic inflammation in the elderly. *Front Cardiovasc Med* 9: 95269.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.952691>
32. *Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI* (1998) Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 98: 2621–2628.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.98.23.2621>
33. *Grigorova YN, Juhasz O, Zernetkina V, Fishbein KW, Lakatta EG, Fedorova OV, Bagrov AY* (2016) Aortic fibrosis, induced by high salt intake in the absence of hypertensive response, is reduced by a monoclonal antibody to marinobufagenin. *Am J Hypertens* 29: 641–646
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpv155>
34. *Xiao H, Lu H, Xue Y, Jia Z, Dai M, He K, Zhao R* (2023) Deleterious effect in endothelin receptor-mediated coronary artery smooth muscle contractility in high-salt diet rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 33: 234–244.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2022.10.010>
35. *Wu C, Yosef N, Thalhammer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK* (2013) Induction of pathogenic TH 17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496: 513–517.
<https://doi.org/10.1038/nature11984>
36. *Namai-Takahashi A, Sakuyama A, Nakamura T, Miura T, Takahashi J, Kurosawa R, Masahiro Kohzaki M, Ito O* (2019) Xanthine oxidase inhibitor, febuxostat ameliorates the high salt intake-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in Dahl Salt-Sensitive rats. *Am J Hypertens* 32: 26–33
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpy143>
37. *Li J, White J, Guo L, Zhao X, Wang J, Smart EJ, Li XA* (2009) Salt inactivates endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *J Nutr* 139: 447–451.
<https://doi.org/10.3945/jn.108.097451>
38. *Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Sugiura R, Kuno T, Nakamura K, Kunitomo M* (2001) Downregulation of vascular soluble guanylate cyclase induced by high salt intake in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 134: 737–744.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjpp.0704300>
39. *Gonzalez M, Lobos L, Castillo F, Galleguillos L, Lopez NC, Michea L* (2005) High-salt diet inhibits expression of angiotensin type 2 receptor in resistance arteries. *Hypertension* 45: 853–859.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000161990.98383.ad>
40. *Jessup JA, Lindsey SH, Wang H, Chappell MC, Groban L* (2010) Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats. *PLoS One* 5: e15433.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015433>
41. *Patik JC, Lennon SL, Farquhar WB, Edwards DG* (2021) Mechanisms of dietary sodium-induced impairments in endothelial function and potential countermeasure. *Nutrients* 13: 270.
<https://doi.org/10.3390/nu13010270>
42. *Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH* (2004) Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H575–H583.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2003>
43. *Dmitrieva NI, Burg MB* (2007) High NaCl promotes cellular senescence. *Cell Cycle* 6: 3108–3113.
<https://doi.org/10.4161/cc.6.24.5084>
44. *Siu PM, Bae S, Bodyak N, Rigor DL, Kang PM* (2007) Response of caspase-independent apoptotic factors to high salt diet-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 42: 678–686.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.01.001>
45. *Kataoka K, Tokutomi Y, Yamamoto E, Nakamura T, Fukuda M, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S* (2011) Apoptosis signal-regulating kinase1 deficiency eliminates cardiovas-

- cular injuries induced by high-salt diet. *J Hypertens* 29: 76–84.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833fc8b0>
46. *Zhu Q, Hu J, Wang L, Wang W, Wang Z, Li PL, Li N* (2021) Overexpression of MicroRNA-429 transgene into the renal medulla attenuated salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. *Am J Hypertens* 34: 1071–1077.
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpab089>
 47. *Орлов СВ, Береснева ОН, Зарайский МИ, Карал-Оглы ДД, Парастаева ММ, Иванова ГТ, Кучер АГ, Куликов АН, Смирнов АВ, Каюков ИГ* (2021) Изменения экспрессии микроРНК в моче яванских макак (*Macaca fascicularis*) при высоком потреблении поваренной соли. *Вопросы питания* 90: 94–102. [*Orlov SV, Beresneva ON, Zaraisky MI, Karal-Ogly DD, Parastaeva MM, Ivanova GT, Kucher AG, Kulikov AN, Smirnov AV, Kayukov IG* (2021) Urinary miRNA expression in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) fed high salt rations. *Vopr Pitan* 90: 94–102. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-4-94-102>
 48. *Тарумов РА, Гребенюк АН, Башарин ВА, Ковтун ВЮ* (2014) Биологические свойства фитоэстрогена генистеина (обзор литературы). *Медицина экстремальных ситуаций* 48: 55–68 [*Tarumov RA, Grebenyuk AN, Basharin VA, Kovtun VYu* (2014) Biological properties of genistein phytoestrogen (literature review). *Emergency Medicine* 48: 55–68. (In Russ)].
 49. *Береснева ОН, Парастаева ММ, Кучер АГ, Иванова ГТ, Каюков ИГ, Смирнов АВ* (2011) Ренопротективные эффекты соевой белковой диеты. *Нефрология* 15: 26–34. [*Beresneva ON, Parastaeva MM, Kucher AG, Ivanova GT, Kayukov IG, Smirnov AV* (2011) Renoprotective effects of soy protein diet. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 15: 26–34. (In Russ)].
 50. *Смирнов АВ, Кучер АГ, Добронравов ВА, Береснева ОН, Парастаева ММ, Сиповский ВГ, Зарайский МИ, Иванова ГТ, Сиповская ЕБ, Каюков ИГ* (2012) Диетарный соевый протеин замедляет развитие интерстициального почечного фиброза у крыс с односторонней обструкцией мочеточника: введение в нутритивную эпигеномику. *Нефрология* 16: 75–83. [*Smirnov AV, Kucher AG, Dobronravov VA, Beresneva ON, Parastaeva MM, Sipovskiy VG, Zaraisky MI, Ivanova GT, Sipovskaya EB, Kayukov IG* (2012) Dietary soy protein slows the development of interstitial renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction: an introduction to nutritional epigenomics. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 16: 75–83. (In Russ)].
 51. *Titze J, Lang R, Illies C, Schwind K, Kirsch K, Dietsch P, Luft F, Hilgers K* (2003) Osmotically inactive skin Na⁺ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1108–F1117.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00200.2003>
 52. *Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, Luft F* (2014) Spooky sodium balance. *Kidney Int* 85: 759–767.
<https://doi.org/10.1038/ki.2013.367>
 53. *Platia MP, Catt KJ, Hodgen GD, Aguilera G* (1986) Regulation of primate angiotensin II receptors during altered sodium intake. *Hypertension* 8:1121–1122.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.8.12.1121>

Cardioprotective Effect of Soy Protein on a High-Salt Diet in Cynomolgus Monkeys

A. N. Kulikov^a, O. N. Beresneva^{a, *}, G. T. Ivanova^b, M. M. Parastaeva^a,
 E. O. Bogdanova^{a, c}, I. G. Kayukov^a, A. G. Kucher^a, and S. V. Orlov^d

^aFirst Pavlov Saint-Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

^bPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^cDepartment of Experimental and Scientific Research, Interregional Laboratory Center, St. Petersburg, Russia

^dFederal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Medical Primatology”, Krasnodar Territory, Sochi-Adler, Russia

*e-mail: beresnevaolga@list.ru

Excessive salt intake is accompanied by the development of cardiovascular disorders, not always associated with an increase in blood pressure (BP). Given the cardioprotective effect of soy proteins in chronic kidney disease, the question arose of the possibility of leveling dietary interventions, in particular soy proteins, the damaging effect of a high-salt diet on the cardiovascular system. The aim of this work is to study the effect of long-term use of a diet high in NaCl and soy protein on myocardial remodeling and skin histomorphology in monkeys. The study was performed on male Javan macaques (*Macaca fascicularis*). The control group received a standard diet (2 g NaCl/kg feed). The second was a high-salt diet (8 g NaCl/kg feed), the third was a high-salt diet and SUPRO760

soy protein (200 g/kg feed). Echocardiography, registration of BP and heart rate were performed at baseline, after 4 and 12 months. After 12 months, a histological examination of the musculocutaneous flap was performed. In all animals, BP and heart rate did not change significantly during 12 months. In macaques on a high-salt diet, by the end of the study, deterioration in systolic and diastolic functions of the left ventricle (LV) was noted. In animals receiving additional soy protein, these changes leveled out. After 12 months, macaques fed soy protein had LV myocardial mass smaller and higher LV contractility than animals fed excess salt without soy protein. In monkeys on a high-salt diet, accumulation of collagen fibers in the hypodermis, hyalinization of the cytoplasm of capillary smooth muscle cells, perivascular and perineural edema of the reticular dermis were revealed. In animals treated with soy protein, skin capillary remodeling was less pronounced. Thus, high salt intake leads to adverse structural and functional disorders of the heart and blood vessels in cynomolgus monkeys, not associated with an increase in blood pressure. The inclusion of soy isolate in the diet reduces the negative effects of a high-salt diet on the cardiovascular system.

Keywords: monkeys, high-salt diet, soy protein, blood pressure, myocardial remodeling

ВЛИЯНИЕ ГИБЕРНАЦИИ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И КАЛИЕВЫЕ ТОКИ В МИОКАРДЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА

© 2023 г. Т. С. Филатова¹, Д. В. Абрамочкин¹, *

¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

**E-mail: abram340@mail.ru*

Поступила в редакцию 06.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 12.05.2023 г.

Гибернирующие млекопитающие способны снижать температуру своего тела до значений, близких к 0°C. При этом их сердце чрезвычайно устойчиво к развитию аритмий, вызванных снижением температуры. В данной работе впервые были исследованы калиевые токи в миокарде зимоспящего млекопитающего на примере длиннохвостого суслика (*Citellus undulatus*) и их изменение при гибернации. С помощью метода пэтч-кламп были исследованы транзиторный выходящий ток I_{to} и фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} в изолированных желудочковых и предсердных кардиомиоцитах летних (активных) и зимних (гибернирующих) сусликов. В работе выявлено, что при комнатной температуре, при положительных поддерживаемых потенциалах пиковая амплитуда тока I_{to} в кардиомиоцитах гибернирующей группы животных статистически значительно ниже, чем таковая у летней группы. Подавление тока I_{to} при гибернации было выражено сильнее в желудочковом миокарде по сравнению с предсердным. Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} при адаптации к гибернации усиливался в желудочковом миокарде зимней группы животных. В предсердном миокарде статистически значимых различий тока I_{K1} между группами не было обнаружено. Также в работе регистрировали потенциалы действия в изолированных желудочковых кардиомиоцитах. Длительность потенциалов действия на уровнях реполяризации 50 и 90% не различалась между группами, также не было выявлено различий в максимальной скорости нарастания переднего фронта потенциалов действия и уровне потенциала покоя. В совокупности, выявленные различия в амплитуде токов I_{to} и I_{K1} между активными и гибернирующими сусликами могут способствовать увеличению длительности рефрактерного периода и поддержанию потенциала покоя при низкой температуре.

Ключевые слова: сердце, гибернация, потенциал действия, пэтч-кламп, ионные токи, I_{to} , I_{K1}

DOI: 10.31857/S0869813923060031, EDN: WGZKYU

ВВЕДЕНИЕ

В умеренных широтах адаптация к низким температурам в зимний период является серьезным испытанием для всех организмов. Некоторые виды млекопитающих развили уникальную стратегию выживания – а именно способность впадать в спячку или гибернировать [1]. При этом температура их тела снижается от физиологического уровня (36–38°C) до значений, близких к 0°C и в некоторых случаях ни-

же [2], а большая часть физиологических процессов и метаболизм замедляются — так, потребление кислорода может падать до 2–3% от уровня его потребления бодрствующим животным. Сердце гибернирующего животного, однако, продолжает функционировать и сокращаться — хотя и с меньшей частотой: у мелких видов гибернирующих животных (например, сусликов) частота сокращений сердца снижается от 200–300 до 3–10 уд./мин [3]. Способность поддерживать нормальную работу сердца при низких температурах является уникальной для гибернирующих видов среди млекопитающих. У прочих видов млекопитающих при снижении температуры тела (или сердца *in situ*) ниже 27°C развиваются различные аритмии, вплоть до фибрилляции желудочков [4, 5], а при температуре ниже 17°C работа сердца прекращается [6]. Напротив, сердце гибернирующих видов животных весьма устойчиво к так называемым холодовым аритмиям, в том числе при снижении температуры во время входа в гибернацию и при ее повышении во время пробуждения животного [4, 7].

Физиологические механизмы, стоящие за этим, являются предметом разносторонних исследований. Показано, что одним из факторов, провоцирующих фибрилляцию желудочков при гипотермии является гетерогенность электрической активности, а также неравномерное замедление скорости проведения возбуждения, что значительно сильнее выражено в миокарде не гибернирующих животных [8]. Одним из механизмов, противодействующих этому, может быть увеличение уровня экспрессии коннексинов в миокарде гибернирующих животных [9] — это делает электрические свойства миокарда более гомогенными.

Еще одним возможным противоаритмическим механизмом, предложенным в качестве возможной защиты от холодовых аритмий при гибернации, является экстраемальное увеличение длительности рефрактерного периода. Показано, что у гибернирующих млекопитающих длительность рефрактерного периода может превышать длительность потенциалов действия, что, предположительно, может предотвращать замыкание контуров циркуляции возбуждения и препятствовать развитию фибрилляции желудочков при низких температурах [10, 11].

Таким образом, реполяризация миокарда и ее возможное remodelирование, по всей видимости, играют роль в адаптации к условиям гибернации. Предыдущие исследования показали изменение амплитуды Ca^{2+} тока *L*-типа в миокарде сусликов при входе в гибернацию [12]. Однако прочие ионные токи, включая калиевые, вносящие основной вклад в реполяризацию миокарда, у гибернирующих видов не были изучены. Данное исследование ставило своей целью изучение возможного изменения в наборе калиевых токов, участвующих в реполяризации миокарда зимоспящих животных, при адаптации к условиям гибернации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Дикие длиннохвостые суслики (*Citellus undulatus*) обоих полов были пойманы в горах Алтая и транспортированы в лабораторию в Москве. С августа по конец сентября животных содержали в индивидуальных клетках при световом периоде 12 : 12 и температуре $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Животных кормили *ad libitum* зерновой смесью с семенами подсолнечника с добавлением свежих овощей. С начала октября для входа в гибернацию сусликов содержали в металлических боксах, наполненных сеном, которые помещали в холодную комнату с контролем температуры. Температуру постепенно снижали (по 1°C в день) до достижения уровня 2°C при фотопериоде 2 : 22. После одной недели содержания при 2°C освещение полностью выключали. Температуру тела животных измеряли с помощью бесконтактного термометра. Эксперименты на зимних гибернирующих сусликах проводились, когда животные были в состоя-

нии глубокой гибернации. Каждое животное из зимней группы использовали не ранее, чем через 10 дней после последнего эпизода бодрствования. Суслики из летней группы имели массу тела 400–450 г ($n = 4$), в зимней группе – 350–400 г ($n = 4$).

Выделение кардиомиоцитов

Кардиомиоциты выделяли с использованием методики, описанной ранее [13]. Животных анестезировали изофлураном (3.5% изофлурана в смеси с кислородом со скоростью 2 л/мин) и декапитировали. Грудную клетку вскрывали, сердце быстро вырезали и помещали на аппарат Лангендорфа. Сердце ретроградно перфузировали через аорту бескальциевым раствором, содержащим (в мМ): NaCl 116; KCl 4; NaH_2PO_4 1.7; NaHCO_3 25; MgCl_2 0.55; пируват натрия 5; таурин 20; глюкоза 11; бычий сывороточный альбумин 1 г/мл; pH 7.4 поддерживали путем аэрации карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2) при 37°C. После 10 мин перфузии и вымывания крови сердцебиение останавливалось. Перфузию переключали на раствор аналогичного состава с добавлением 0.5 мг/мл коллагеназы II типа (Worthington, США), 0.035 мг/мл протеазы XIV типа (Sigma Aldrich, США) и 7.5 мкМ CaCl_2 . После 40–60 мин обработки ферментами перфузию останавливали. Предсердия и желудочки разделяли, разрезали на мелкие фрагменты и пипетировали, высвобождая изолированные кардиомиоциты в раствор Kraftbrühe содержащий (в мМ): MgSO_4 3; KCl 30; KH_2PO_4 30; ЭГТА 0.5; глутамат калия 50; HEPES 20; таурин 20; глюкоза 10; pH 7.2 доводили с помощью KOH [14]. Изолированные миоциты хранили в растворе Kraftbrühe при комнатной температуре и использовали для работы в течение 8 ч.

Регистрация ионных токов

Ионные токи и потенциалы действия регистрировали в изолированных кардиомиоцитах суслика, используя стандартный метод пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме поддержания потенциала (voltage-clamp) или тока (current-clamp), соответственно. Записи были получены с использованием усилителя НЕКА ЕРС 800 (НЕКА Elektronik, Германия) и программного обеспечения WinWSP 4.8.7 (University of Strathclyde, Великобритания). Небольшую порцию суспензии клеток помещали в экспериментальную камеру (RC-26; Warner Instrument Corporation, США; объем 150 мкл), монтированную на инвертированном микроскопе, и перфузировали со скоростью около 1.5 мл/мин внешним физиологическим раствором, содержащим (в мМ): NaCl 150; KCl 3; CaCl_2 1.8; глюкоза 10; HEPES 10; pH 7.4 доводили с помощью NaOH. Токи и потенциалы действия регистрировали при комнатной температуре (24°C). При регистрации токов I_{Ca} и I_{K} к внешнему раствору добавляли блокатор Ca^{2+} каналов нифедипин (20 мкМ) для подавления Ca^{2+} тока L-типа, а также 4-аминопиридин (100 мкМ) для блокирования ультрабыстрого тока задержанного выпрямления I_{Kur} . Пэтч-пипетки вытягивали из боросиликатных стеклянных капилляров без филамента (Sutter Instrument, США) и заполняли пипеточным раствором. Сопrotивление заполненных пипеток составляло 2–3 МΩ. Пипеточный раствор для регистрации K^+ токов имел следующий состав (в мМ): KCl 140; MgCl_2 1; ЭГТА 5; MgATP 4; Na_2GTP 0.3; HEPES 10; pH 7.2 доводили с помощью KOH. Для записи потенциалов действия в режиме поддержания тока использовали пипеточный раствор сходного состава, но со сниженной концентрацией ЭГТА (0.025 мМ), соответствующей буферной емкости цитоплазмы и более подходящей для регистрации мембранного потенциала.

Статистический анализ

Анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США); статистический анализ проводили с использованием обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего для n клеток. Амплитуду токов нормировали на емкость клеток и выражали в пА/пФ (рА/рФ). Нормальность распределения выборок оценивали с помощью теста Шапиро–Уилка. Сравнение между двумя экспериментальными группами проводили с помощью t -теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Транзиторный выходящий ток I_{to}

При деполяризации от поддерживаемого потенциала -80 мВ до -40 мВ и более положительных потенциалов в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах суслика активировался выходящий, быстро инактивирующийся ток, чувствительный к 4-аминопиридину (3 мМ) и определенный как калиевый транзиторный выходящий ток I_{to1} (далее обозначаемый как I_{to}). Возможно присутствующий хлорный кальцийзависимый ток I_{to2} в эксперименте не регистрировали, т.к. вход кальция в кардиомиоциты был подавлен нифедипином во внешнем растворе [15]. Также при деполяризации активировался ультрабыстрый калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kur} , чувствительный к 100 мкМ 4-аминопиридина – однако ток I_{Kur} имел крайне низкую амплитуду по сравнению с током I_{to} и был исключен из анализа. На рис. 1 представлены репрезентативные записи тока I_{to} , протокол изменения мембранного потенциала, а также вольт-амперные характеристики I_{to} в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах суслика. В предсердных клетках, полученных как от летних активных (SA) сусликов, так и от зимних гибернирующих (WH) животных, амплитуда тока была выше, чем в желудочковых, при большинстве тестовых потенциалов (рис. 1b, 1c). Адаптация к низким температурам и гибернация приводили к существенному снижению пиковой амплитуды I_{to} – причем в желудочках оно было выражено сильнее (статистически значимые отличия наблюдались при менее положительных потенциалах), чем в предсердиях.

Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1}

Фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} регистрировали с использованием пилообразного протокола (см. рис. 2) после подавления токов I_{to} и I_{Kur} (3 мМ 4-аминопиридина во внешнем растворе). В предсердных миоцитах SA и WH сусликов амплитуда I_{K1} (как входящей, так и выходящей компоненты) была статистически значимо ниже, чем в желудочковых клетках. В желудочковых миоцитах гибернирующих сусликов амплитуда I_{K1} была статистически значимо выше по сравнению с I_{K1} в желудочковых клетках SA группы (рис. 2a). Однако в предсердных кардиомиоцитах мы не выявили статистически значимых различий в амплитуде как входящей, так и выходящей амплитуды I_{K1} между SA и WH группами (рис. 2b).

Потенциалы действия

Из-за разницы в плотности фонового тока входящего выпрямления I_{K1} , ответственного за поддержание потенциала покоя в сердечной ткани позвоночных [16], зарегистрировать потенциалы действия (ПД) в режиме поддержания тока было возможно только в желудочковых кардиомиоцитах, где ток I_{K1} был более выражен

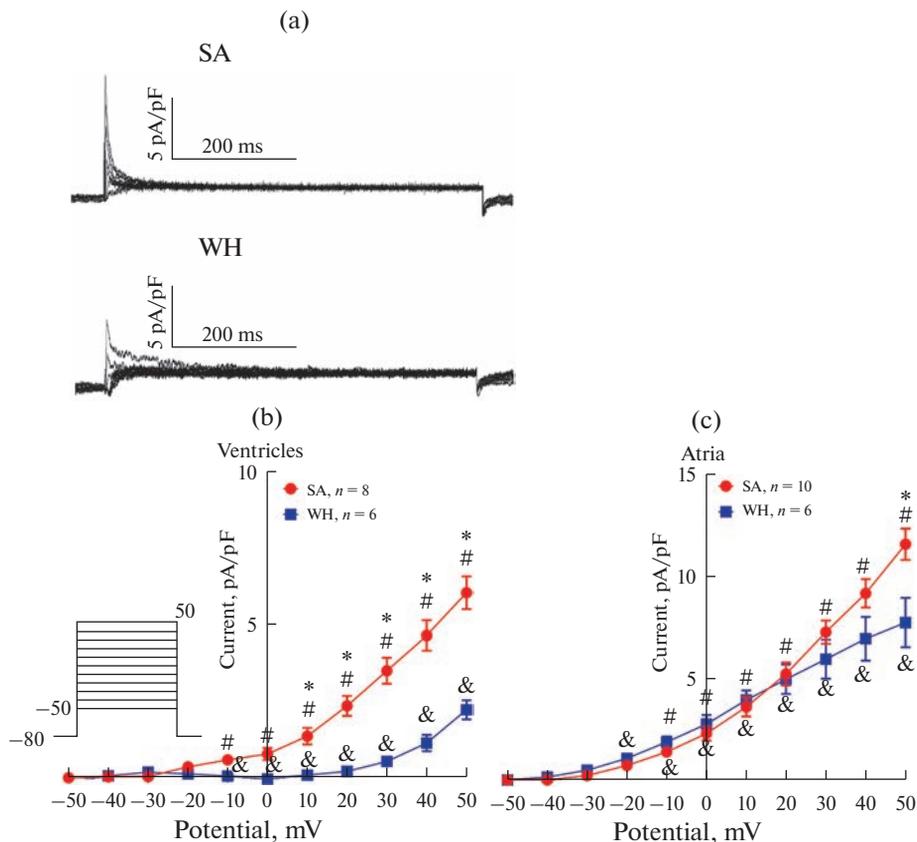


Рис. 1. Влияние гибернации на транзитный выходящий ток I_{to} . Репрезентативные записи тока I_{to} в желудочковых кардиомиоцитах суслика (а), а также его вольт-амперные характеристики в желудочковых (б) и предсердных (с) кардиомиоцитах суслика. Протокол изменения мембранного потенциала показан на врезке. * – $p < 0.05$, различия между SA и WH группами, t -тест Стьюдента; # – $p < 0.05$, различия между желудочковыми и предсердными миоцитами в SA группе, t -тест Стьюдента; & – $p < 0.05$, различия между желудочковыми и предсердными миоцитами в WH группе, t -тест Стьюдента.

(см. рис. 2). Анализировали такие параметры, как длительность ПД на уровнях 50 и 90% реполяризации (ДПД50 и ДПД90 соответственно), а также максимальную скорость нарастания переднего фронта ПД. На рис. 3 представлены репрезентативные записи ПД, а также гистограммы, отражающие сравнение анализируемых параметров.

Мы не обнаружили статистически значимых различий между SA и WH группами в конфигурации ПД. Мембранный потенциал покоя также не различался между группами и составлял -82.66 ± 0.72 мВ в кардиомиоцитах от SA сусликов и -81.25 ± 0.93 мВ у WH сусликов ($p = 0.3$, t -тест Стьюдента).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование, помимо рассмотрения влияния гибернации, впервые затрагивает изучение калиевых токов в миокарде одного из наиболее известных гибернирующих видов млекопитающих – длиннохвостого суслика. Мы впервые по-

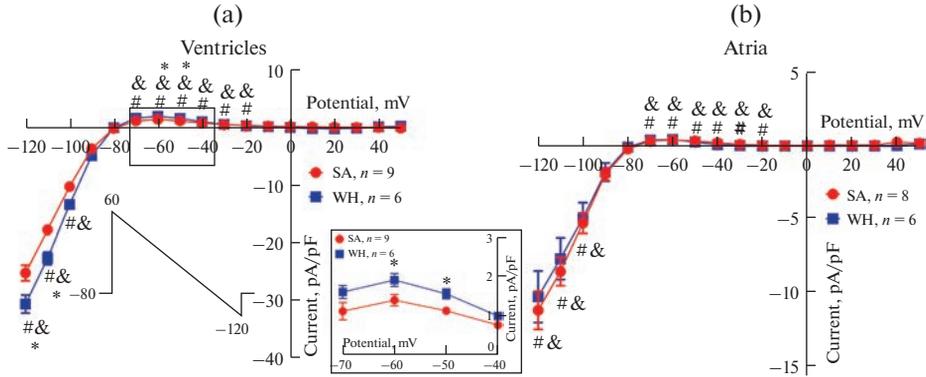


Рис. 2. Влияние гибернации на фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} . Вольт-амперные характеристики тока I_{K1} в желудочковых (а) и предсердных (б) кардиомиоцитах суслика. На врезке показаны различия в выходящей компоненте I_{K1} в желудочковых клетках. * – $p < 0.05$, различия между SA и WH группами, t -тест Стьюдента; # – $p < 0.05$, различия между желудочковыми и предсердными миоцитами в SA группе, t -тест Стьюдента; & – $p < 0.05$, различия между желудочковыми и предсердными миоцитами в WH группе, t -тест Стьюдента.

казали присутствие в миокарде суслика высокоамплитудного тока I_{to} ; прочие мажорные калиевые токи задержанного выпрямления, такие как I_{Kr} и I_{Ks} , в миокарде суслика обнаружены не были. Это делает электрофизиологический фенотип сердца сусликов весьма сходным с таковым для миокарда лабораторных грызунов — в частности крыс, для которых также характерны большой ток I_{to} и низкоамплитудный I_{Kur} [17]. Таким образом, ввиду того что для разных калиевых токов характерна различная степень температурной зависимости, мы полагаем, что наиболее корректно при сравнении с сусликами в качестве группы не зимоспящих животных использовать именно крыс.

Также в данной работе мы впервые показали, что гибернация приводит к снижению амплитуды транзитного выходящего тока I_{to} — который, исходя из его большой амплитуды и сходности электрофизиологических фенотипов миокарда крысы и суслика, может быть основным реполяризирующим током в миокарде суслика. При этом, однако, длительность ПД на различных уровнях реполяризации в группе WH осталась неизменной. Более ранние исследования показали, что адаптация к зимнему периоду и гибернация приводят к снижению амплитуды кальциевого тока L -типа в желудочковом миокарде сусликов [12]. Поскольку кальциевый ток участвует в формировании фазы плато ПД [18], а I_{to} в миокарде сусликов предположительно (аналогично роли в миокарде крысы) вносит основной вклад в реполяризацию [17], то в совокупности эти разнонаправленные изменения выраженности I_{CaL} и I_{to} могут привести к тому, что длительность ПД практически не изменяется. Если снижение кальциевого тока при гибернации может предотвращать перегрузку кардиомиоцитов кальцием, то снижение амплитуды I_{to} может служить механизмом, предотвращающим чрезмерное укорочение ПД и сокращение длительности рефрактерного периода. В свою очередь, увеличение длительности рефрактерного периода, вплоть до развития постреполяризационной рефрактерности, может быть одним из механизмов, предотвращающих возникновений аритмий при снижении температуры [10]. Помимо прямого влияния на длительность ПД, изменение амплитуды I_{to} у гибернирующих животных может также определять уровень мем-

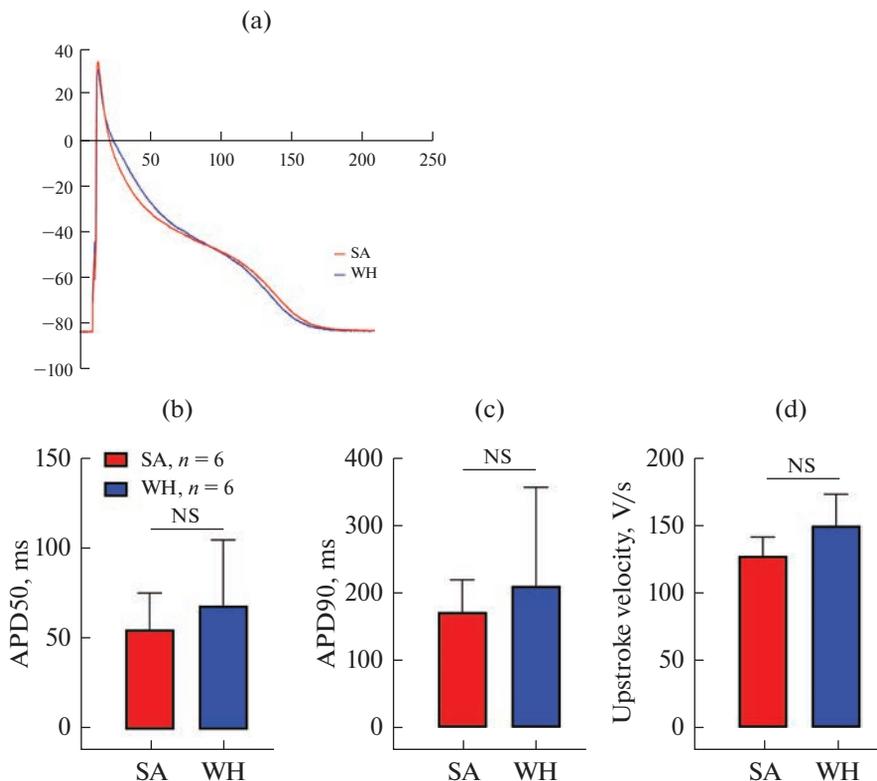


Рис. 3. Влияние гибернации на конфигурацию потенциалов действия в желудочковых кардиомиоцитах суслика. Репрезентативные записи ПД (а), сравнение длительности ПД на уровне 50% (б) и 90% (с) реполяризации и максимальной скорости нарастания переднего фронта ПД (д). NS – отсутствие статистически значимых различий, *t*-тест Стьюдента.

бранного потенциала в фазе плато [19] – и, соответственно, опосредованно влиять на вход кальция и длительность мембранного потенциала. Также в данной работе мы показали, что гибернация ведет к разнонаправленным изменениям в амплитудах токов I_{to} и I_{K1} – что также может быть причиной отсутствия изменений в длительности ПД, регистрируемых в миокарде групп WH и SA.

Мы также впервые показали, что по крайней мере в желудочковом миокарде суслика гибернация приводит к усилению тока I_{K1} . Данная адаптация может быть важна для поддержания нормального уровня потенциала покоя при снижении температуры тела во время гибернации. В самом деле, предыдущие исследования показали, что в миокарде суслика при снижении температуры мембрана деполяризуется по крайней мере в значительно меньшей степени по сравнению с таковым в миокарде не гибернирующих животных [11, 20]. С другой стороны, при анализе зарегистрированных нами потенциалов действия мы не обнаружили заметной гиперполяризации мембраны кардиомиоцитов, полученных от животных в состоянии гибернации – чего можно было бы ожидать при усилении тока I_{K1} . Можно предположить, что изменения в амплитуде тока I_{K1} , вызванные гибернацией, оказались недостаточны для значимого изменения уровня мембранного потенциала. Однако ввиду того, что регистрируемый потенциал покоя при регистрации ПД ме-

тодом пэтч-кламп в значительной степени зависит от качества контакта между мембраной клетки и пэтч-пипетки, что, в свою очередь, зависит от процесса выделения и качества изолированных кардиомиоцитов [21], результаты данной части исследования должны быть интерпретированы с осторожностью.

Отсутствие различий в длительности ПД на различных уровнях реполяризации в желудочковых кардиомиоцитах хорошо согласуется с полученными ранее данными о длительности ПД в миокарде SA и WH сусликов, а также крыс [11]. С другой стороны, аналогичные исследования, выполненные на предсердном миокарде сусликов, показали некоторое увеличение длительности ПД в миокарде гибернирующей группы при равной температуре и длине цикла стимуляции [10] – предположительно, это может быть связано с изменением амплитуды ультрабыстрого тока задержанного выпрямления I_{Kur} , который не рассматривался в данном исследовании. Мы в данной работе показали, что изменение амплитуды мажорных калиевых токов, участвующих в реполяризации и поддержании потенциала покоя (а именно I_{to} и I_{K1}), в разной степени выражено в желудочковом и предсердном миокарде. В совокупности это может указывать на то, что при гибернации ремоделирование электрической активности миокарда предсердий и желудочков происходит по-разному.

Таким образом, данное исследование впервые рассматривает изменения в выраженности реполяризирующих калиевых токов при адаптации к гибернации. Выявленные различия в амплитуде токов I_{to} и I_{K1} между активными и гибернирующими сусликами могут предположительно вносить вклад в увеличение длительности рефрактерного периода и поддержание потенциала покоя при низких температурах, предотвращая развитие аритмий и способствуя выживанию животных.

СОБЛЮДЕНИЕ БИОЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, директиве 2010/63/ЕС по обращению с лабораторными животными. Протоколы исследования были одобрены биоэтическим комитетом НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (задание № 122012100156-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Д.В.А., сбор данных – Д.В.А., Т.С.Ф., обработка данных – Д.В.А., Т.С.Ф., написание и редактирование рукописи – Д.В.А., Т.С.Ф.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyman CP, Chatfield PO (1955) Physiology of Hibernation in Mammals. *Phys Rev* 35: 403–425. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1955.35.2.403>

2. *Barnes BM* (1989) Freeze Avoidance in a Mammal: Body Temperatures Below 0°C in an Arctic Hibernator. *Science* 244: 1593–1595.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2740905>
3. *Andrews MT* (2007) Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *BioEssays* 29: 431–440.
<https://doi.org/10.1002/BIES.20560>
4. *Johansson BW* (1996) The hibernator heart – Nature’s model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 31: 826–832.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00192-1)
5. *Burlington RF, Darvish A* (1988) Low-Temperature Performance of Isolated Working Hearts from a Hibernator and a Nonhibernator. *Physiol Zool* 61: 387–395.
<https://doi.org/10.1086/PHYSZOO.61.5.30161260>
6. *White JD* (1980) Cardiac Arrest in Hypothermia. *JAMA* 244: 2262–2262.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.1980.03310200014007>
7. *Johansson BW* (1985) Ventricular Repolarization and Fibrillation Threshold in Hibernating Species. *Eur Heart J* 6: 53–62.
https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/6.SUPPL_D.53
8. *Egorov YV, Glukhov AV, Efimov IR, Rosenshtraukh LV* (2012) Hypothermia-induced spatially discordant action potential duration alternans and arrhythmogenesis in nonhibernating versus hibernating mammals. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 303(8): H1035–H1046.
<https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00786.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH40201205500008.JPEG>
9. *Fedorov VV, Glukhov AV, Sudharshan S, Egorov Y, Rosenshtraukh LV, Efimov IR* (2008) Electrophysiological mechanisms of antiarrhythmic protection during hypothermia in winter hibernating versus nonhibernating mammals. *Hear Rhythm* 5: 1587–1596.
<https://doi.org/10.1016/J.HRTHM.2008.08.030>
10. *Kuzmin VS, Abramov AA, Egorov YV, Rosenshtraukh LV* (2019) Hypothermia-Induced Postrepolarization Refractoriness Is the Reason of the Atrial Myocardium Tolerance to the Bioelectrical Activity Disorders in the Hibernating and Active Ground Squirrel *Citellus undulatus*. *Dokl Biol Sci* 486: 63–68.
<https://doi.org/10.1134/S0012496619030050/FIGURES/3>
11. *Kuz'min VS, Abramov AA, Egorov IV, Rozenshtraukh LV* (2014) Hypothermia induced alteration of refractoriness in the ventricular myocardium of ground squirrel *Citellus undulatus*. *Ros Fiziol Zhurnal Im IM Sechenova* 100: 1399–1408.
12. *Alekseev AE, Markevich NI, Korystova AF, Terzic A, Kokoz YM* (1996) Comparative analysis of the kinetic characteristics of L-type calcium channels in cardiac cells of hibernators. *Biophys J* 70: 786–797.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79618-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79618-2)
13. *Abramochkin DV, Filatova TS, Pustovit KB, Dzhumaniiazova I, Karpushev AV* (2021) Small G–protein RhoA is a potential inhibitor of cardiac fast sodium current. *J Physiol Biochem* 77: 13–23.
<https://doi.org/10.1007/s13105-020-00774-w>
14. *Isenberg G, Klockner U* (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium.” *Pflügers Arch Eur J Physiol* 395: 6–18.
<https://doi.org/10.1007/BF00584963>
15. *Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S* (1996) Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol Circ Physiol* 270: H2157–H2168.
<https://doi.org/10.1152/AJPHEART.1996.270.6.H2157>
16. *Ibarra J, Morley GE, Delmar M* (1991) Dynamics of the inward rectifier K⁺ current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes. *Biophys J* 60: 1534–1539.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82187-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82187-7)
17. *Apkon M, Nerbonne JM* (1991) Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 97: 973–1011.
<https://doi.org/10.1085/JGP.97.5.973>
18. *Linz KW, Meyer R* (2000) Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Arch* 439: 588–599.
<https://doi.org/10.1007/S004249900212>
19. *Dong M, Yan S, Chen Y, Niklewski PJ, Sun X, Chenault K, Wang HS* (2010) Role of the Transient Outward Current in Regulating Mechanical Properties of Canine Ventricular Myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 21: 697–703.
<https://doi.org/10.1111/J.1540-8167.2009.01708.X>
20. *Liu B, Arlock P, Wohlfart B, Johansson BW* (1991) Temperature effects on the Na and Ca currents in rat and hedgehog ventricular muscle. *Cryobiology* 28: 96–104.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90011-C](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90011-C)
21. *Wilson JR, Clark RB, Banderali U, Giles WR* (2011) Measurement of the membrane potential in small cells using patch clamp methods. *Channels* 5: 530.
<https://doi.org/10.4161/CHAN.5.6.17484>

The Influence of Hibernation on Electrical Activity and Potassium Currents in Myocardium of Long-Tailed Ground Squirrel

T. S. Filatova^a and D. V. Abramochkin^{a, *}

^aDepartment of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: abram340@mail.ru

Hibernating mammals are capable of reducing the temperature of their bodies down to 0°C. During this process, their heart is highly resistant to the occurrence of arrhythmias caused by temperature fall. In this research we have for the first-time studied potassium currents in the myocardium of a hibernating mammal on the example of long-tailed ground squirrel (*Citellus undulatus*) and its change upon hibernation. Using patch clamp method, we studied transient outward current I_{to} and background inward rectifier current I_{K1} in isolated ventricular and atrial myocytes from summer (active) and winter (hibernating) ground squirrels. The study revealed, that at room temperature and at positive holding potentials peak amplitude of I_{to} in cardiomyocytes from hibernating group of animals is lower than that of the summer group. The downregulation of I_{to} upon hibernation was more pronounced in ventricular myocardium in comparison to that in atrial. Background inward rectifier current I_{K1} was enhanced in ventricular myocardium of winter group of animals, upon the adaptation to hibernation. In atrial myocardium there were no statistically significant differences of I_{K1} between the two groups. We also recorded action potentials in isolated ventricular cardiomyocytes. The duration of action potentials at the levels of 50 and 90% repolarization did not differ between the groups, we also did not find significant differences in maximum upstroke velocity and in the level of resting membrane potential. Taken together, the revealed differences in the amplitude of I_{to} and I_{K1} between active and hibernating ground squirrels can serve as mechanisms increasing the duration of refractory period and to maintaining the level of resting membrane potential at low temperatures.

Keywords: heart, hibernation, action potential, patch clamp, ionic currents, I_{to} , I_{K1}

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ЭПИДУРАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА ДЕЦЕРЕБРИРОВАННОЙ КРЫСЫ

© 2023 г. П. Ю. Шкорбатова^{1, 2}, В. А. Ляховецкий¹, О. В. Горский^{1, 2},
Н. В. Павлова¹, Е. Ю. Баженова¹, Д. С. Калинина^{2, 3},
П. Е. Мусиенко^{1, 2}, Н. С. Меркульева^{1, *}

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

²Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

³Научно-технологический университет “Сириус”, г.т Сириус, Краснодарский край, Россия

*E-mail: mer-natalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 12.05.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Децеребрированные препараты часто используются в экспериментальной нейрофизиологии для изучения многоуровневых физиологических процессов. Для исследования локомоции в острых опытах традиционно используется модель децеребрированной кошки. Мы задались вопросом, возможно ли заменить ее при электрической эпидуральной стимуляции спинного мозга на модель децеребрированной крысы. На остром препарате 16-ти децеребрированных на преколиккулярном уровне крыс линии Вистар изучены возможность вызова локомоции, а также тоническая активность мышц и мышечные вызванные потенциалы. У 10 проводили гистологический контроль уровня децеребрации. Квадрипедальную ходьбу удалось вызвать у пяти животных, бипедальную ходьбу задними конечностями — у одного животного; при этом параметры вызванной локомоции не зависят от степени повреждения *substantia nigra*. Тоническая активность и амплитуда сенсорного компонента вызванных потенциалов мышц задних конечностей (*mm. tibialis anterior* и *gastrocnemius medialis*) зависят от ростокаудального уровня децеребрации животных — они выше при повреждении черной субстанции (*substantia nigra*). Таким образом, рассматриваемая модель позволяет успешно исследовать тоническую активность мышц и вызванные мышечные потенциалы, однако использование этой модели при изучении контролируемой локомоции требует проведения дополнительных исследований.

Ключевые слова: децеребрированная крыса, эпидуральная стимуляция, тоническая активность, локомоция, вызванный потенциал

DOI: 10.31857/S0869813923060092, **EDN:** WHJWUM

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальная физиология подразумевает проведение опытов на животных. До начала XX в. моделями в различных исследованиях служили лягушки, обезьяны, кролики, кошки и собаки, а с начала XX в. — и грызуны [1]. При этом вклад различных уровней нервной системы в регуляцию физиологических процессов, как правило, изучался на редуцированных моделях — животных, декортицированных или децеребрированных на различных уровнях. Децеребрированные препараты до сих пор успешно применяются в нейробиологии [2–4]. Одним из преиму-

ществ таких препаратов является возможность работы без анестезии [5], применение которой изменяет физиологические показатели работы организма: частоту дыхания и сердечных сокращений, кровяное давление [6], а также влияет на нейрональную активность [7].

В исследованиях локомоции традиционно, начиная с работ Тиле и Шеррингтона [8, 9], преимущественно использовались децеребрированные кошки [10]. Децеребрированный препарат, в отличие от интактной кошки, позволяет исследовать механизмы локомоции, управляемой спинальными и стволовыми нейронными сетями. Ходьба децеребрированной кошки в остром эксперименте более стабильна и хорошо координирована, чем у спинальной [11]. В настоящее время кошек все реже используют в качестве лабораторных животных по этическим соображениям [12] (тем не менее, см. работы [13, 14]). Хорошей альтернативой в таком случае могут стать децеребрированные препараты грызунов (крыс и мышей), обладающих рядом преимуществ, среди которых: большая доступность животных, генетическая однородность линий, возможность использования трансгенных моделей [15].

Актуальность исследования обусловлена тем, что ряд методов посттравматического восстановления ходьбы у человека [16] направлен на модуляцию спинальных сетей, например, посредством электрической стимуляции спинного мозга, что диктует важность их изучения на животных моделях. Следует отметить, что степень восхождения спинного мозга крысы сходна с таковой у человека (сегменты спинного мозга крысы смещены относительно одноименных позвонков более rostro-стрально, чем у кошки). Кроме того, в отличие от кошки, которая является пальце-ходящей, крыса, как и человек – стопоходящие [17]. Эти особенности могут быть существенны при выборе именно крысы в качестве животной модели для изучения спинальных нейронных сетей, а также трансляции в клиническую практику экспериментальных результатов применения электростимуляции спинного мозга.

Мы задались вопросом, возможно ли использование децеребрированных крыс в качестве замены кошек для исследования локомоторных сетей в острых экспериментах. Однако, в известных нам из литературных источников исследованиях локомоции широко используются преимущественно хронические спинальные крысы [17–20]. В отличие от спинальной, локомоторные способности децеребрированной крысы изучены лишь во время спонтанной ходьбы [21] или же при стимуляции мезэнцефалической локомоторной области (МЛО) [21–24]. Исследований ЭС поясничного утолщения для инициации локомоции на модели децеребрированной крысы до сих пор не проводилось.

Цель работы – изучение особенностей функционирования сенсомоторной системы децеребрированной крысы при электрической эпидуральной стимуляции (ЭС) поясничного утолщения спинного мозга в остром эксперименте. Практическая задача работы – оценка качества локомоции, потенциально возможной на модели децеребрированной крысы. Поскольку особенности локомоции кошки значительно зависят от уровня децеребрации [25], анализировали также зависимость различных показателей возбудимости спинальных и супраспинальных сетей крысы (тоническая активность, вызванные ответы мышц конечностей [26, 27]) от уровня децеребрации. Основное внимание уделялось активности задних конечностей как основной мишени ЭС поясничного утолщения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выборка. Опыты были выполнены на 16-и децеребрированных крысах, самцах линии Вистар массой тела 250–300 г. Экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Директивы Совета Европы 2010/63EU Европейского парламента о защите животных, используемых в экспериментальных и других

научных целях. Протокол исследования № 131-03-06 от 12 декабря 2022 г. был одобрен Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ.

Хирургические процедуры. Животных наркотизировали смесью изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) на кислороде (4–5% для индукции и 1–2% для поддержания анестезии, скорость 0.8 л/мин, наркозно-дыхательный аппарат Зоомед, Россия). Производили билатеральную имплантацию биполярных миографических электродов в мышцы передних (двуглавую (*mm. biceps brachii*, Bi) и трехглавую (*triceps brachii*, Tr) мышцы плеча) и задних конечностей (переднюю большеберцовую (*mm. tibialis anterior*, TA) и медиальную икроножную (*gastrocnemius medialis*, GM) мышцы голени). Одному животному имплантировали электроды справа в большую приводящую (*mm. adductor magnus*, Add) и среднюю ягодичную (*gluteus medius*, G1)) мышцы задних конечностей, а также в дорсальный аддуктор хвоста (*m. abductor caudae dorsalis*, ACD). Электроды представляли собой пару проводов из нержавеющей стали в тефлоновой изоляции (AS632, Cooner Wire, Chatsworth, CA, США) диаметром 0.15 и 0.3 мм (в зависимости от размера исследуемой мышцы) с участками без изоляции длиной 0.5 мм.

Перед выполнением децеребрации этилоном 4.0 (Ethicon, США) накладывали лигатуры на сонные артерии, затем голову крысы закрепляли в стереотаксис и производили разрез кожи головы по средней сагиттальной линии (рис. 1a). Далее удаляли надкостницу и выравнивали голову животного так, чтобы точка сращения затылочных и теменных костей (*lambda*) и точка сращения теменных и лобных костей (*bregma*) находились на горизонтальной линии (рис. 1b). При помощи микрощипцов Люэра выполняли билатеральную краниотомию, включающую удаление теменной и частично лобной костей, не затрагивая медиального шва между ними (рис. 1c). Для предотвращения кровотечения из переднего сагиттального синуса накладывали лигатуры этилоном 4.0 на краниальный и каудальный участки этих костей с подхватом синуса (рис. 1d). Далее костный мостик между лигатурами удаляли, как описано у Добсона и Харриса [28] (рис. 1e). После снятия твердой мозговой оболочки, кюреткой удаляли кору головного мозга так, чтобы открыть доступ к пластинке четверохолмия. Затем лезвием, закрепленным в держателе стереотаксиса под углом 65°–90°, выполняли отсечение части головного мозга ретроально от передних холмиков (рис. 1f, g), эту часть затем удаляли при помощи шпателя. В полость черепа помещали ватные тампоны и, при необходимости, гемостатические губки. Температуру тела в процессе процедуры децеребрации поддерживали на уровне 34–35°C, как рекомендовано [29]. Вся процедура подготовки и собственно децеребрации занимала около 40 мин.

Гистологический контроль. После окончания эксперимента животных глубоко анестезировали смесью изофлурана на кислороде (4–5%) и проводили транскраниальную перфузионную фиксацию головного и спинного мозга 4% раствором параформальдегида (Merck, USA) на 0.1 М фосфатном буфере (Росмедбио, Россия). После вскрытия позвоночного канала определяли точное положение точек ЭС относительно сегментов спинного мозга. Затем извлекали головной мозг и помещали в 30% раствор сахарозы. Для определения rostroкаудального уровня децеребрации (у 10 животных) на замораживающем микротоме изготавливали парасагиттальные срезы головного мозга толщиной 50 мкм, которые затем монтировали на предметные стекла и окрашивали 4% кризилвиолетом (pH 4.5) по методу Ниссля. При микроскопии срезов билатерально отмечали положение красных ядер (*nucleus ruber*) и черной субстанции (*substantia nigra*, SN), а также оценивали степень их повреждения.

Электрофизиологическое исследование. Для проведения электрофизиологических экспериментов была разработана экспериментальная установка (рис. 1h). Позвоночник крысы закрепляли зажимами в области поперечных отростков позвонков VT11–VT12 и VL4–VL5 в специально сконструированной раме. Производили

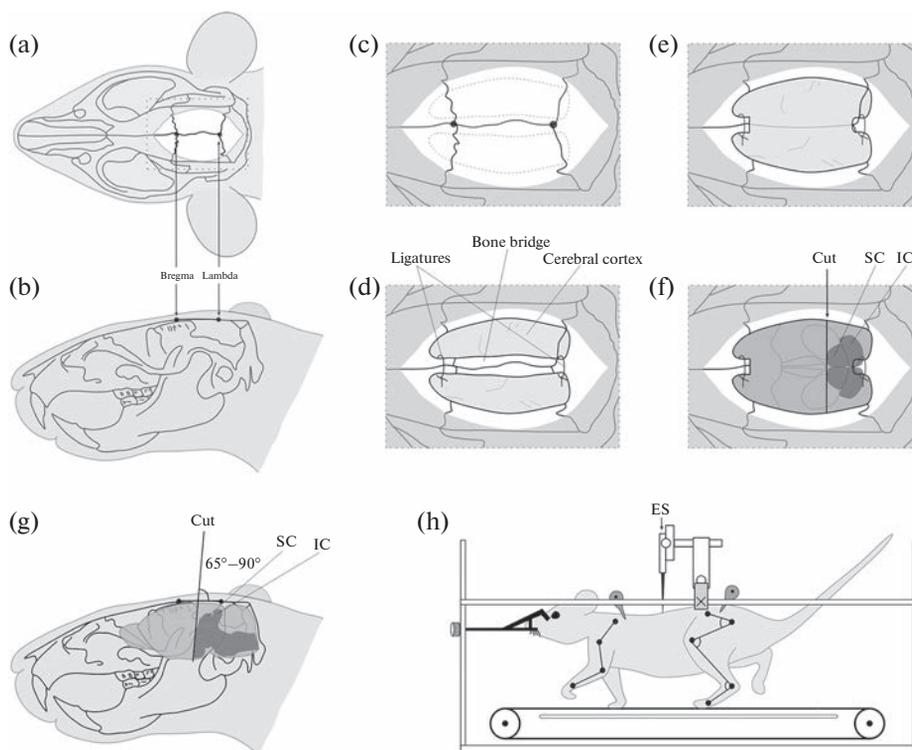


Рис. 1. Методика проведения эксперимента. (a–g) Череп животного на различных этапах проведения децеребрации: (a) – местоположение разреза кожи и точек “lambda” и “bregma” на черепе, вид сверху; (b) – местоположение точек “lambda” и “bregma”, и горизонтальная линия между ними на черепе, вид сбоку; (c) – местоположение предполагаемых краниотомий (пунктиром) справа и слева относительно точек “lambda” и “bregma”; (d) – местоположение накладываемых лигатур (ligatures) и костный мостик (bone bridge) после выполнения краниотомий билатерально. (e) – Вид на поверхность коры головного мозга после удаления костного мостика. (f) – Положение децеребрационного среза относительно пластинки четверохолмия после удаления коры головного мозга, SC – передние холмики, IC – задние холмики; (g) – положение и угол децеребрационного среза относительно линии “лямбда–брегма”, вид сбоку; (h) – схема экспериментальной установки для регистрации вызванных потенциалов и вызова ходьбы.

ламинэктомию позвонков VT13–VL2, чтобы открыть доступ к сегментам L1–S3 спинного мозга. ЭС дорсальной поверхности спинного мозга осуществляли прямоугольными бифазными импульсами монополярно (Model 2100, A-M Systems, Sequim, WA, США) при помощи серебряного шарикового электрода диаметром 0.5 мм. Индифферентный электрод, изготовленный из иглы 21G, располагался под кожей живота. За 20–30 мин до начала эксперимента анестезию отключали, а температуру тела животного повышали до 37°C [29]. Эксперимент начинали через 40–50 мин после проведения децеребрации.

Для вызова ходьбы передние и задние конечности крысы помещали на движущуюся ленту моторизованного тредбана. Рандомизированно осуществляли ЭС (5–40 Гц, 25–300 мкА) различных точек поверхности спинного мозга внутри ламинэктомии. Расстояние между соседними точками ЭС составляло 2 мм. Поскольку положение поясничных и крестцовых сегментов спинного мозга крысы относительно позвонков варьирует (см. различия положений сегментов в [30] (рис. 1) и [31] (рис. 1b, Supplement)), точное определение стимулируемого сегмента производили

post-mortem на основании положения дорсальных корешков. К ЭС последующей точки переходили в случае получения стабильной квадрипедальной ходьбы в данной точке или же после длительного безуспешного перебора различных сочетаний частоты и силы тока ЭС. Эксперимент прекращали, если стабильную квадрипедальную ходьбу при переборе всех точек ЭС вызвать не удавалось, или при ухудшении состояния животного. Длительность эксперимента не превышала 9 ч.

При записи тонической активности и вызванных потенциалов передние и задние конечности крысы касались неподвижной ленты тредбана. Вызванные потенциалы мышц регистрировали при ЭС (частота 1 Гц, длительность импульса 0.2–0.3 мс, сила тока 10–100 мкА, шаг 10 мкА) сегмента L2. На каждом токе регистрировали 10 ответов. Для анализа вызванных потенциалов использовали среднюю амплитуду сенсорного компонента, выделенного на основе своей латентности (более 6 мс), ответов TA и GM, полученную на субмаксимальном токе, 70 мкА. На этом токе сенсорный компонент был выражен у большинства животных. Сигналы от ЭМГ электродов усиливались (Model 1700, A-M Systems, Sequim, WA, США) и оцифровывались с частотой дискретизации 20 кГц (LTR-EU-16, АЦП LTR11, L-Card, Москва, Россия).

Для анализа тонической активности ректифицировали и усредняли ЭМГ-активность на протяжении 3–5 с, в течение которых крыса была неподвижна. При локомоции ЭМГ активность фильтровали в диапазоне 100–2000 Гц, ректифицировали и усредняли в рамках цикла ходьбы, определяемого на основе покадрового анализа видео. Нормировка осуществлялась в рамках каждой мышцы каждого животного так, чтобы площадь под кривой ЭМГ составляла 100%. Обработка ЭМГ проводилась в пакете прикладных программ для решения задач технических вычислений MATLAB (Mathworks, Natick, MA, США) с помощью специализированных скриптов, разработанных авторами статьи.

Исследование кинематики. Чтобы охарактеризовать кинематику локомоторных движений задних конечностей, на гребне подвздошной кости, головке бедра, латеральном мышечке бедра, латеральной стороне лодыжки и пятом плюсневом суставе были установлены маркеры, а вид сбоку (слева и справа) шагающей крысы был записан на видео (100 кадров/с). Для расчета длины и длительности шага, а также объема движения в суставах видеозаписи анализировались покадрово. Углы в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах измеряли в тот момент, когда конечность была максимально согнута во время фазы переноса, и в момент, когда она была максимально вытянута в фазе опоры. Диапазоны изменения углов были рассчитаны как разность между этими значениями для каждого сустава.

Аналогично [32], для оценки качества межконечностной координации и последующего сравнения с известными значениями показателей локомоции децеребрированных кошек, рассчитывали коэффициенты асимметрии длины и периода шага. Лучшей межконечностной координации отвечает меньший коэффициент асимметрии. Коэффициент асимметрии длины шага вычисляли как: $|S_{\text{left}} - S_{\text{right}}| / S_{\text{left}} + S_{\text{right}}$, где S_{left} и S_{right} – длины шагов левой и правой конечности соответственно. Длина шага рассчитывалась как расстояние между положением лапы в начале и в конце фазы опоры. Коэффициент асимметрии периода шага рассчитывали аналогично: $|T_{\text{left}} - T_{\text{right}}| / T_{\text{left}} + T_{\text{right}}$, где T_{left} и T_{right} – периоды шагов левой и правой конечности соответственно. От каждого животного для анализа брали одну пробу с минимальным значением асимметрии длительности шага.

Ранее мы выявили, что такие характеристики вызванной ЭС локомоции, как длительность задержки ходьбы (время от начала стимуляции до начала ходьбы) и выраженность постэффекта (длительность ходьбы после прекращения стимуля-

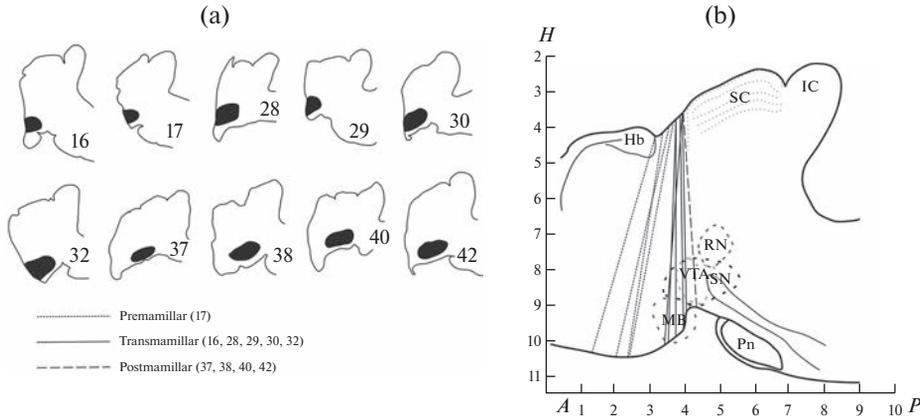


Рис. 2. Положение децеребрационного разреза относительно черной субстанции (SN) и других структур мозга. (а) – Рисунки парасагиттальных срезов среднего мозга отдельных крыс после децеребрации, SN отмечена черным. (б) – Положение децеребрационных разрезов всех исследованных крыс на схеме среднего мозга. SC – Передние холмики, IC – задние холмики, RN – красное ядро, MB – мамиллярные тела, YTA – вентральная тегментальная область, Hb – хабенула, Pn – ножки мозжечка.

ции) различны у разных видов локомоции [33]. Поэтому в данной работе мы также оценили эти характеристики.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическую значимость отличий распределений различных параметров в зависимости от степени повреждения SN оценивали с помощью непарного критерия Манна–Уитни на уровне $p < 0.05$ (объектом исследования являлась задняя конечность животного) с помощью программного обеспечения для статистической обработки данных Prism 7.0 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологическое исследование. Согласно описанию процедуры децеребрации, у всех животных передние холмики были интактными билатерально (преколиккулярный уровень децеребрационного среза). Гистологическое исследование парасагиттальных срезов мозга децеребрированных крыс, у которых была возможность взять гистологический материал ($n = 10$), показало, что у 4-х животных мамиллярные тела были сохранены (премамиллярный уровень), у 5-ти разрез проходил по мамиллярным телам (трансамиллярный уровень) и у одного животного мамиллярные тела были удалены (постмамиллярный уровень). У всех крыс были интактными красные ядра; у части животных (6/10) была в разной степени повреждена SN (трансамиллярный и постмамиллярный уровень), тогда как у остальных (4/10) она оставалась интактной (премамиллярный уровень). Примеры гистологических срезов мозга крыс с разной степенью повреждения SN, а также схема положения децеребрационного разреза у всех животных относительно структур головного мозга, представлены на рис. 2.

Общие особенности поведения децеребрированных крыс. Все децеребрированные крысы, как с постмамиллярной, так и с трансамиллярной и премамиллярной перерезкой, обнаруживали высокую степень активности после децеребрации: они проявляли способность к спонтанным ритмическим локомоторно-подобным движениям конечностей, перемежающихся с периодами покоя, у них частично оста-

вались способности к установочным рефлексам (периодически они поднимали голову и плечевой пояс). В периоды активности они отвечали вздрагиванием, поворотом головы или локомоторной активностью на звуки, прикосновения и ноцицептивные стимулы (уколы), даже в более выраженной степени, чем интактные животные. Этим была вызвана необходимость продолжать ингаляционную анестезию после проведения процедуры децеребрации, во время закрепления животного в стереотаксической раме. Некоторые животные начинали спонтанно ходить при движении ленты тредбана или прикосновении к плантарной поверхности стопы или хвосту.

Локомоция под действием ЭС. Из 16-ти крыс вызов локомоции при ЭС был возможен у 13-ти. У различных животных, а также в различных пробах у одного животного, число задействованных при локомоции конечностей было разным, то есть наблюдалась квадрипедальная, трипедальная (участвовали две передние конечности и одна задняя), бипедальная (участвовали две передних, две задних или одна передняя и одна задняя конечности) или унипедальная (одна задняя конечность) ходьба. Конечности, не принимающие участие в ходьбе, как правило, были согнуты и прижаты к телу. На рис. За указано число крыс, у которых удалось хотя бы в одной пробе вызвать локомоцию с максимальным числом движущихся конечностей. Например, если у животного в 10 пробах с различными параметрами ЭС была вызвана трипедальная ходьба, а в одной – квадрипедальная, то оно отнесено в столбец “квадрипедально”, в табл. 1 указаны параметры ЭС, необходимые для вызова именно квадрипедальной ходьбы. Из рисунка видно, что бипедальную ходьбу задними конечностями удалось вызвать у 1 из 16 крыс (6%), квадрипедальную – у 5 из 16 крыс (31%). Число задействованных конечностей (в дальнейшем, режим ходьбы) не зависело от того, какой сегмент спинного мозга стимулировали (табл. 1).

Следует отметить, что некоторые животные, у которых не удавалось вызвать квадрипедальную ходьбу при помощи ЭС, были способны к спонтанной координированной квадрипедальной ходьбе. Также отметим, что для разных животных использовали разную частоту ЭС: часть крыс могли ходить максимальным числом конечностей на более низких частотах (3–5 Гц, 69%), другие – на более высоких (20–40 Гц, 31%). При этом четкой зависимости между локомоторными способностями и частотой стимуляции мы не выявили: как в пределах индивидуального животного, так и при групповом сравнении.

Пример работы мышц передних и задних конечностей при квадрипедальной ходьбе приведен на рис. 3б. Как можно видеть, контрлатеральные экстензоры (Тг, GM) передних и задних конечностей работают в фазе с ипсилатеральными флексорами (Vi, TA), в то время как ипсилатеральные экстензоры и флексоры работают, как правило, в противофазе, что свидетельствует о сохранности межконечностной координации. При квадрипедальной или бипедальной ходьбе задними конечностями в среднем активность экстензора GM имеет менее выраженный максимум в фазу опоры по сравнению с активностью флексора TA, которая имеет ярко выраженный максимум в фазу переноса (рис. 3с). У животного, у которого были имплантированы электроды в мышцы Add и Gl, в фазу опоры регистрировалась не только активность GM, но и этих двух мышц; также наблюдались ритмические движения хвоста (ритмическая активность ACD) (рис. 4). Выявленная согласованная работа мышц приводит к стабильной ходьбе. Однако такую координированную ходьбу, продолжающуюся значительное количество проб подряд, удалось вызвать лишь у двух животных.

Длительность задержки квадрипедальной ходьбы была крайне вариабельной и составляла от 0.5 с до 10 с для различных животных. Постэффект практически от-

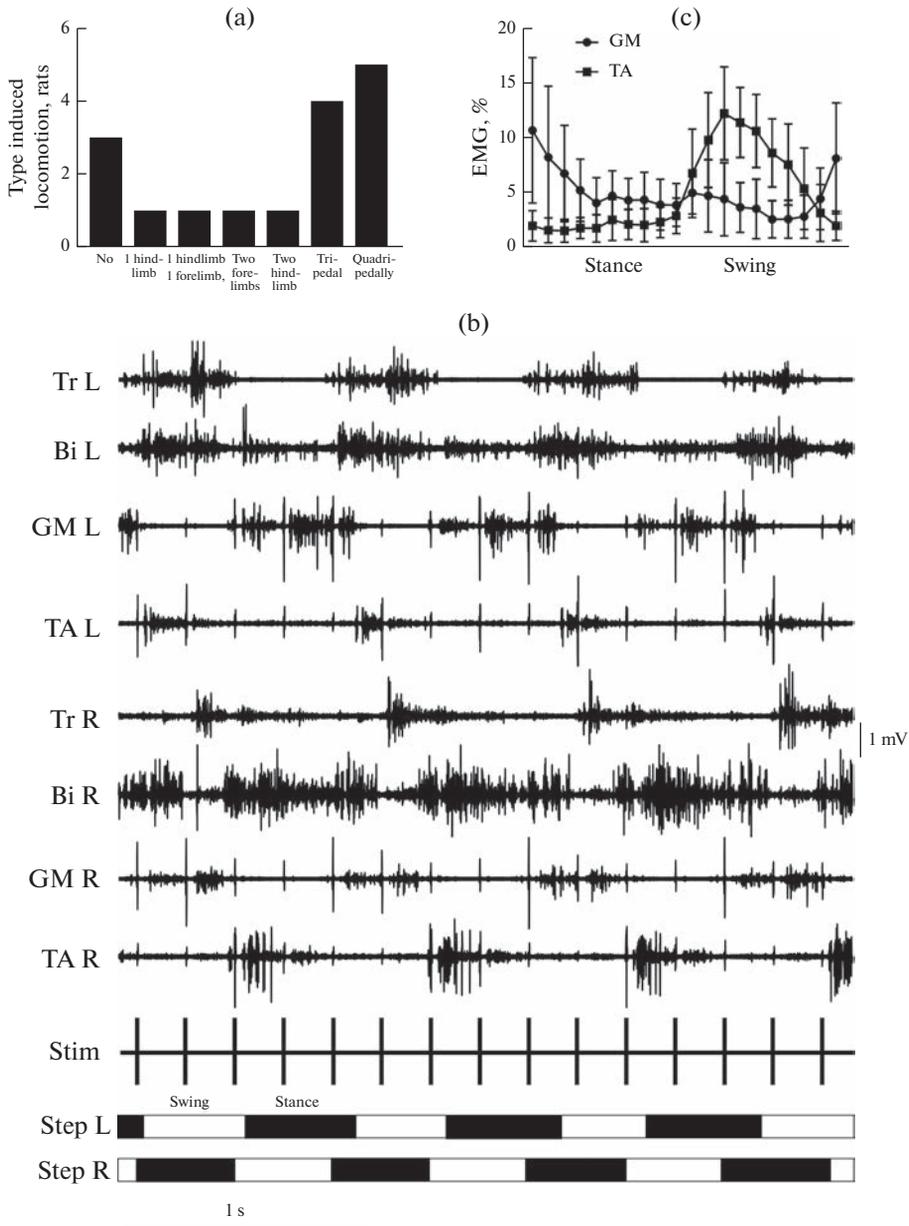


Рис. 3. Ходьба, обусловленная эпидуральной стимуляцией. (a) – Число крыс, у которых удалось вызвать различные режимы ходьбы: по – отсутствие ходьбы, 1 hindlimb – одной задней конечностью, 1 hindlimb, 1 forelimb – одной передней и одной задней, two forelimbs – бипедальн передними, two hindlimbs – бипедально задними, tripedal – трипедально, quadripedally – квадрипедально. Для каждой крысы указан режим ходьбы с максимальным числом движущихся конечностей. (b) – ЭМГ мышц передних и задних конечностей, отвечающих преимущественно за флексию и экстензию, при квадрипедальной ходьбе крысы. Tr – *triceps brachii*, Bi – *biceps brachii*, TA – *tibialis anterior*, GM – *gastrocnemius medialis*. L – левая конечность, R – правая конечность, Stim – канал стимуляции, Step – периодичность фаз ходьбы, перенос (swing, белые прямоугольники) и опора (stance, черные прямоугольники). (c) – ЭМГ в цикле шага при квадрипедальной ходьбе или бипедальной ходьбе задними конечностями ($n = 12$ мышц). Среднее \pm стандартное отклонение.

Таблица 1. Эпидуральная стимуляция при попытках вызова ходьбы. Для каждого животного указаны параметры вызова режима ходьбы с максимальным числом движущихся конечностей

№ крысы	Стимуляция спинного мозга			Режим ходьбы
	сегмент	частота, Гц	сила тока, мкА	
16	L5	5	20–120	Нет
17	L3	3	180	Квадрипедальная
18	S1	40	100	Трипедальная
25	L3	20–40	100–300	Нет
28	L1	5	190	Трипедальная
29	L2–L4, L6, S3	5	100–200	Квадрипедальная
30	L6	5	90	1 задняя, 1 передняя
32	L6-S1	20	25	Бипедальная задние
33	L4	5	70	Унипедальная
34	L3	10	40	Бипедально передние
35	L3, L6	20	90	Трипедальная
36	L4	5–20	20–380	Нет
37	L4	5	90–100	Квадрипедальная
38	L6	20	70	Квадрипедальная
40	L5–L6	5	50–80	Квадрипедальная
42	L3–L4	5	300	Трипедальная

существовал; после отключения ЭС одна крыса совершила 2 шага, а пять крыс полностью прекращали ходьбу.

Усредненные характеристики кинематики задних конечностей 6-ти крыс, у которых наблюдалась квадрипедальная ходьба или бипедальная ходьба обеих задних конечностей, представлены на рис. 5. Средняя длина шага составила 5.9 ± 2.4 см, средняя длительность – 0.8 ± 0.3 с (длительность переноса: 0.3 ± 0.1 с, длительность опоры: 0.5 ± 0.3 с). Асимметрия длины и длительности шага составили 0.15 ± 0.12 и 0.06 ± 0.05 соответственно. Наибольший объем движения наблюдался в голеностопном суставе ($93^\circ \pm 35^\circ$), наименьший – в коленном суставе ($13^\circ \pm 10^\circ$), объем движения в тазобедренном суставе составил $20^\circ \pm 14^\circ$.

Зависимость характеристик ходьбы децеребрированной крысы от rostroкаудального уровня децеребрации. Распределение крыс по режимам ходьбы не зависело от того, повреждена ли SN. И при поврежденной, и при интактной SN у ряда крыс удавалось вызвать квадрипедальную, а у иных – лишь унипедальную ходьбу (рис. 6g). ЭМГ активность TA и GM в цикле шага при би- или квадрипедальной ходьбе также не зависит от повреждения SN (рис. 6h, i). Между тем в группе крыс с поврежденной SN длительность шага выше, чем в группе крыс с интактной SN (0.66 ± 0.14 с и 1.05 ± 0.23 с соответственно, $p < 0.01$), за счет увеличения длительности опоры, которая составляет 0.64 ± 0.30 с, по сравнению с 0.31 ± 0.08 с у крыс с интактной SN ($p < 0.01$).

Вызванные мышечные потенциалы и тоническая активность. Амплитуда сенсорного компонента вызванных ответов TA и GM при стимуляции сегмента L2 (рис. 6a) у крыс с поврежденной SN несколько выше по сравнению с крысами с интактной SN (рис. 6b, 6c). У крыс с поврежденной SN амплитуда ответов TA составляет 0.30 ± 0.27 мВ, у крыс с интактной SN 0.21 ± 0.25 мВ ($p = 0.63$); в группе крыс с поврежденной SN амплитуда ответов GM составляет 0.85 ± 0.84 мВ, у крыс с интактной SN 0.15 ± 0.18 мВ ($p = 0.03$). Сходным образом, у крыс с поврежденной SN тоническая активность этих мышц (рис. 6d) выше, чем у крыс с интактной SN: как у TA (1.19 ± 0.62 и 0.58 ± 0.37 мкВ соответственно, $p = 0.01$), так и у GM (1.45 ± 1.15 и 0.66 ± 0.42 мкВ соответственно, $p = 0.22$) (рис. 6e, 6f).

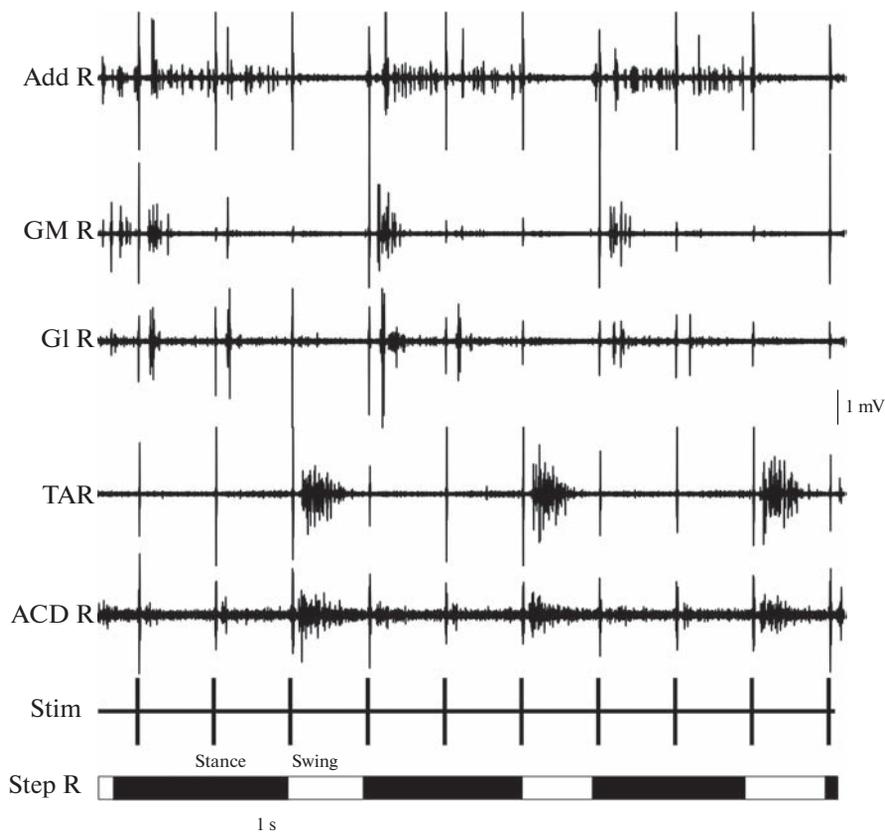


Рис. 4. ЭМГ мышц, предположительно отвечающих за постуральный контроль, при квадрипедальной ходьбе крысы. Add – *adductor magnus*, GM – *gastrocnemius medialis*, GI – *gluteus*, TA – *tibialis anterior*, ACD – *abductor caudae dorsalis*. R – правая конечность, Stim – канал стимуляции, Step – периодичность фаз ходьбы, перенос (swing, белые прямоугольники) и опора (stance, черные прямоугольники).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общие особенности поведения децеребрированных крыс. Децеребрированные крысы рассматриваются как модель для изучения пищевого поведения [34], регуляции дыхания [29, 35], работы сердечно-сосудистой [36, 37] и мочевыделительной системы [38]. Однако при изучении локомоторной системы децеребрированный препарат крысы применяется не так широко, как препарат децеребрированной кошки [3–5, 39–42]. Это может быть связано с тем, что децеребрированные крысы обладают высоким уровнем спонтанной активности. Они совершают локомоторные движения и даже “попытки” бега [29], часто непредсказуемо реагируют на различные внешние раздражители, такие как укол [43] или прикосновение [44]. Высоким уровнем спонтанной активности эти препараты напоминают преколликулярный-премамиллярный препарат кошки [45], который способен к спонтанной локомоции при свободно движущейся ленте тредбана в остром эксперименте. Однако, как в нашей работе, так и в работах других авторов, спонтанную активность проявляли крысы не только с премамиллярной [36, 46], но и с постмамиллярной [21, 44] перерезкой. Отсутствие спонтанной активности у преколликулярно-постмамиллярно

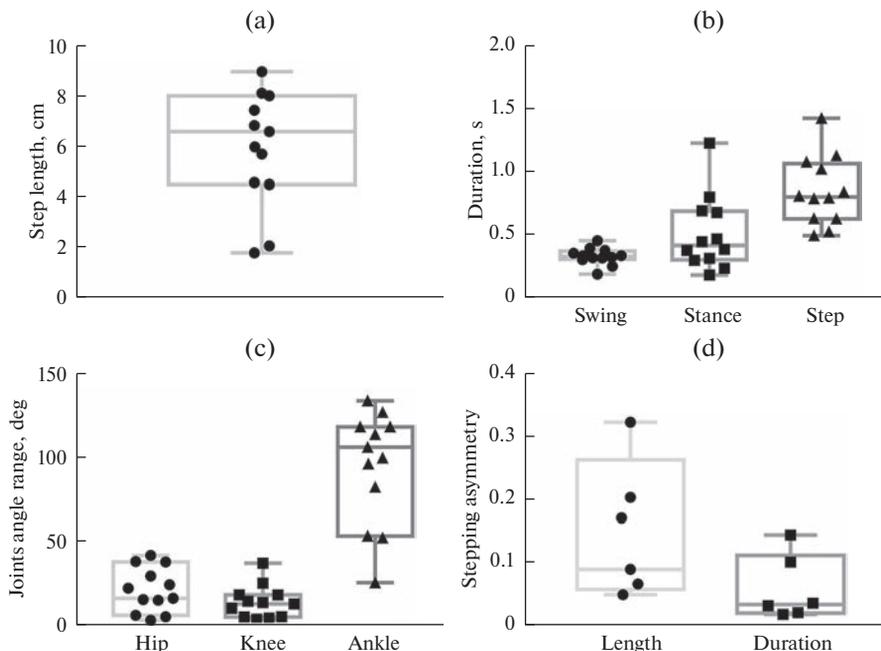


Рис. 5. Характеристики локомоции задних конечностей децеребрированной крысы при эпидуральной стимуляции. (а) Длина шага, см ($n = 12$ задних конечностей). (б) – Длительность фаз ходьбы, с: Swing – перенос, Stance – опора, Step – шаг ($n = 12$ задних конечностей). (с) – Объем движения в суставах: Hip – тазобедренный, Knee – коленный, Ankle – голеностоп ($n = 12$ задних конечностей). (д) – Асимметрия длины (Length) и длительности (Duration) шага ($n = 6$ пар задних конечностей).

децеребрированной кошки делает ее моделью, более удобной для управления путем внешних воздействий, по сравнению с преколликулярно-постмамиллярной крысой. Тем не менее модель преколликулярно-постмамиллярной децеребрированной крысы позволила провести картирование мышечных сенсорных и моторных потенциалов, вызванных с помощью предложенного нами метода чрескостной стимуляции спинного мозга [47].

Отсутствие спонтанной ходьбы кошки связано с тем, что некоторые структуры головного мозга оказываются отсечены более каудальной плоскостью децеребрации. Между тем большая часть структур рассматриваемой зоны у крысы занимает приблизительно такое же, как у кошки, положение по отношению к плоскости среза. Немногими исключениями, согласно литературным данным, являются красные ядра и вентральная область покрышки (VTA) (см. [25, рис. 1; 48]). Гистологический анализ показал, что при используемых уровнях децеребрации крысы красные ядра, влияющие на активность флексоров передних и задних конечностей [49, 50], остаются интактными (рис. 2). Между тем красные ядра не влияют на возможность инициации локомоции как таковой. Напротив, VTA, которая, согласно некоторым литературным данным, отвечает за возникновение спонтанной локомоции [48], повреждается у части крыс выборки при проведении постмамиллярной и (у части крыс) трансмамиллярной децеребрации. Однако повреждение VTA незначительно влияет на их спонтанную активность, возможно, из-за небольшого объема этого повреждения (рис. 2). Результаты позволяют предполагать большую, по сравнению с кошкой, функциональную роль стволовых и мезэнцефальных структур головного мозга крысы в инициации и управлении локомоторной активностью.

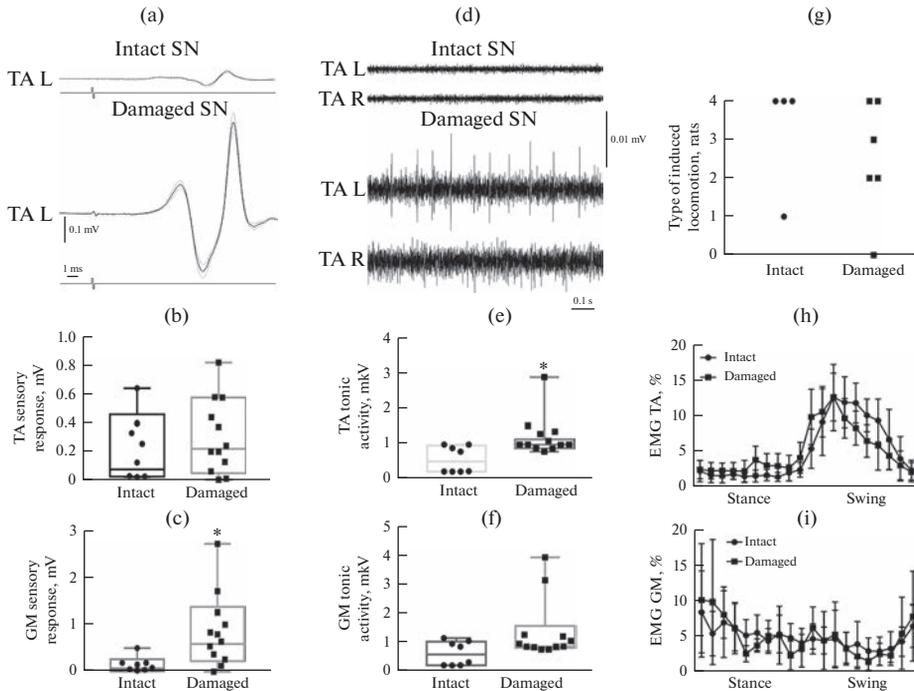


Рис. 6. Влияние повреждения *substantia nigra* (SN) на сенсорный компонент вызванного ответа, тоническую активность мышц и режим ходьбы. (a) – Пример усредненных вызванных ответов при интактной (intact) и поврежденной (damaged) SN. Амплитуда сенсорного компонента вызванного ответа TA (b) и GM (c) при электрической эпидуральной стимуляции сегмента L2 (сила тока 70 мкА) при интактной ($n = 8$ мышц) и поврежденной ($n = 12$ мышц) SN. (d) – Пример тонической ЭМГ. Тоническая активность TA (e) и GM (f) при интактной ($n = 8$ мышц) и поврежденной ($n = 12$ мышц) SN. (g) – Число лап, активных при локомоции. ЭМГ в цикле шага TA (h) и GM (i) при квадрипедальной ходьбе или бипедальной ходьбе задними конечностями при интактной ($n = 8$ мышц) и поврежденной ($n = 12$ мышц) SN. Stance – опора, Swing – перенос, L – левая конечность, R – правая конечность, TA – *tibialis anterior*, GM – *gastrocnemius medialis*. Среднее \pm Стандартное отклонение. * – $p < 0.05$

Локомоция, обусловленная ЭС. При рассечении головного мозга на преколликулярном уровне, спинальная зона вызова ходьбы вперед с помощью ЭС у крыс столь же широка в rostrocaudальном направлении (сегменты L2-S1, см. табл. 1), как и у кошек [32], но несколько смещена рострально, так как мотонейронные пулы задних конечностей у крысы расположены в более роstralных, чем у кошки, сегментах спинного мозга [51, 52]. Параметры ЭС для вызова ходьбы децеребрированных крыс и кошек [32] сходны (как правило, частота 5 Гц, сила тока 50–200 мкА, см. табл. 1). Также у этих двух моделей сходен период шагов.

Распределение децеребрированных крыс по режимам вызываемой ЭС ходьбы отличается от такового для децеребрированной кошки. Во-первых, наш собственный опыт показывает, что вызвать бипедальную ходьбу вперед задними конечностями у децеребрированной кошки значительно легче, чем у децеребрированной крысы (обеими задними конечностями ходило лишь 38% крыс, и то – если засчитывать единичные успешные попытки).

Во-вторых, при ЭС поясничного утолщения децеребрированные кошки, как правило, ходят бипедально [53], а не квадрипедально (квадрипедальная ходьба вызывается стимуляцией шейного отдела [53–55]). Напротив, среди способных к ло-

комоции крыс, пять ходили квадрипедально и лишь одна – бипедально задними конечностями.

Структуры, частично ответственные за контроль локомоции передних конечностей (поля Фореля, субталамическое ядро) [56], расположены у крысы и у кошки приблизительно на одинаковом уровне по отношению к плоскостям децеребрации. Однако у кошки при премаиллярной децеребрации спонтанная квадрипедальная ходьба наблюдается менее, чем у половины животных [57]; при движении передних конечностей нередко заметно нарушение координации [58]. При более каудальных положениях плоскости децеребрации у кошки спонтанная локомоция отсутствует, а ходьбу передних конечностей, вызванную стимуляцией МЛО или движением ленты тредбана, возможно получить только после дополнительной спинализации препарата в нижнегрудном отделе [59, 60].

Известно, что восходящая проприоспинальная система значительно модулирует активность локомоторных сетей шейного утолщения [61, 62]. Одно из возможных объяснений вышеупомянутых феноменов – большее возбуждающее влияние проприоспинальных волокон крысы по сравнению с кошкой, у которой при тех же уровнях децеребрации доминируют тормозные проприоспинальные влияния [59]. Принимая во внимание небольшой размер крыс, можно предположить, что у них во время ЭС происходила активация этих волокон, локализованных в пределах латерального канатика [63], и как следствие – активация шейного генератора шаганий.

В-третьих, наши собственные данные показывают, что при ЭС дорсальной поверхности спинного мозга децеребрированные кошки, как правило, не демонстрируют ходьбу вперед только одной задней конечностью; даже латеральное смещение электрода от центральной линии незначительно влияет на качество бипедальной ходьбы вперед [33], что отражает сохранность межконечностной координации. Унилатеральная ходьба возможна, например, при интраспинальной микроstimуляции – у спинальных кошек [64, 65] или же при унилатеральной стимуляции дорсального корешка спинного нерва – у децеребрированных [66] или спинальных [65] кошек. Напротив, в настоящем исследовании, из 12 крыс, способных к локомоции задними конечностями, половина демонстрировали нарушения межконечностной координации: четыре крысы ходили трипедально, одна – унипедально и одна – одной задней и одной передней конечностями. Подобные данные получены и на хронических спинальных крысах во время ЭС [17]. Число спинальных крыс, способных к координированной ходьбе при ЭС сегмента L2, стимуляция которого наиболее часто приводила к вызову локомоции, составляло лишь 74%; остальные крысы при такой ЭС ходили унилатерально. Латеральное смещение электрода при ЭС хронических спинальных крыс также приводит к унипедальной ходьбе [18]. Предположительно полученные данные свидетельствуют о большем вкладе в вызванную ЭС локомоцию децеребрированной крысы спинальных нейронных сетей, даже незначительный дисбаланс в активности которых приводит к нарушению межконечностной координации и локомоции в целом.

В пользу этого предположения также свидетельствует то, что и асимметрия длины, и асимметрия длительности шага децеребрированной крысы выше, чем у децеребрированной кошки [67]. Отметим, что у спинальных кошек асимметрия ходьбы при интраспинальной микроstimуляции также выше, чем при ходьбе, обусловленной щипанием хвоста [65].

Важно отметить, что длительность задержки вызванной ЭС ходьбы крысы выше, а длительность пост-эффекта ниже, чем у кошки [33], что, вероятно, говорит о меньшей степени рекрутируемости спинальных сетей крысы в используемом экспериментальном дизайне.

Поддержание равновесия при локомоции, обусловленной ЭС. Объем движения в тазобедренном суставе у децеребрированной крысы был подобен объему движения

интактной крысы, известному из литературных данных [68]. При этом объем движения в коленном суставе был ниже, а в голеностопе — выше, чем при ходьбе интактного животного [68]. Иной объем движения в суставах может быть связан с особенностями закрепления животного в стереотаксической раме, равно как и активность GM в фазе опоры, которая была выражена в меньшей степени, чем активность TA в фазу переноса. Однако при этом в фазу опоры наблюдалась активность мышц Add и Gl, подобная той, что наблюдается у интактной крысы [21]. Такая активность, присущая и децеребрированной кошке при незакрепленном тазе [40], может быть связана с тем, что крыса в нашем эксперименте фиксировалась в стереотаксической раме только за остистые отростки позвонков; таз при этом оставался свободным. Вместе с выявленной нами циклической активностью мышц хвоста (ACD), аналогичной функции хвоста у кошек [69] и собак [70], активность Add и Gl может использоваться для поддержания равновесия децеребрированной крысы при ходьбе.

Влияние rostro-каудального уровня децеребрации на характеристики модели крысы. Поскольку децеребрация неизбежно приводит к нарушению целостности ряда структур головного мозга, в частности тех, что отвечают за моторный контроль, мы сравнили локомоторные способности у двух групп: с поврежденной и интактной SN. Ретикулярная часть SN (SNr) оказывает модулирующее действие на активность локомоторных сетей (см. [22, 71, 72]). При повреждении SN вследствие преколликулярно-постмамиллярной децеребрации вызов локомоции во время стимуляции МЛО у крысы [22] и кошки ([25], см. рис. 1, наиболее каудальная плоскость децеребрации) невозможен. Между тем другим авторам [21] удалось вызвать локомоцию крысы при таком же экспериментальном дизайне. Нам удалось инициировать локомоцию и при поврежденной SN, что, возможно, еще раз свидетельствует о большем вкладе спинальных нейронных сетей в локомоцию, обусловленную ЭС спинного мозга.

Мы также обнаружили разный уровень тонической активности мышц и амплитуды сенсорного компонента вызванного ответа мышц у животных с поврежденной и интактной SN. Более высокий уровень тонической активности и большая амплитуда сенсорного компонента при повреждении SN хорошо согласуются с данными об увеличении как тонической активности [73], так и амплитуды ответа TA и GM, вызванного пассивным движением [74], при разрушении нигростриарных путей при инъекции оксидопамина в SN крысы.

Таким образом, для использования крысы, децеребрированной на преколликулярном уровне, в задаче изучения контролируемой локомоции необходимо проведение дополнительных исследований. При этом имеющаяся модель позволяет успешно исследовать общую тоническую активность мышц и их вызванные ответы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Этического комитета в области исследований на животных СПбГУ, протокол № 131-03-06 от 12 декабря 2022 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-15-00235.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Санкт-Петербургскому Государственному Университету за предоставленных животных (93018770).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stahnisch FW* (2010) Chapter 11: on the use of animal experimentation in the history of neurology. *Handb Clin Neurol* 95: 129–148.
[https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(08\)02111-8](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(08)02111-8)
2. *Whelan PJ* (1996) Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog Neurobiol* 49: 481–515.
3. *Domínguez-Rodríguez LE, Stecina K, García-Ramírez DL, Mena-Avila E, Milla-Cruz JJ, Martínez-Silva L, Zhang M, Hultborn H, Quevedo JN* (2020) Candidate interneurons mediating the resetting of the locomotor rhythm by extensor group I afferents in the cat. *Neuroscience* 450: 96–112.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.017>
4. *Aguilar Garcia IG, Dueñas-Jiménez JM, Castillo L, Osuna-Carrasco LP, De La Torre Valdovinos B, Castañeda-Arellano R, López-Ruiz JR, Toro-Castillo C, Treviño M, Mendizabal-Ruiz G, Duenas-Jimenez SH* (2020) Fictive scratching patterns in brain cortex-ablated, midcollicular decerebrate, and spinal cats. *Front Neural Circuits* 27: 14.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00001>
5. *Silverman J., Garnett NL., Giszter SF, Heckman CJ, Kulpa-Eddy JA, Lemay MA, Perry CK, Pinter M* (2005) Decerebrate mammalian preparations: unalleviated or fully alleviated pain? A review and opinion. *Contempor Topics Lab Animal Sci* 44: 34–36.
6. *Sapru HN, Krieger AJ* (1979) Cardiovascular and respiratory effects of some anesthetics in the decerebrate rat. *Eur J Pharmacol* 53: 151–158.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90160-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90160-2)
7. *Ho SM, Waite PM* (2002) Effects of different anesthetics on the paired-pulse depression of the h reflex in adult rat. *Exp Neurol* 177: 494–502.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8013>
8. *Thiele FH* (1905) On the efferent relationship of the optic thalamus and Deiter's nucleus to the spinal cord, with special reference to the cerebellar influx of Dr Hughlings Jackson and the genesis of the decerebrate rigidity of Ord and Sherrington. *J Physiol* 32: 358–384.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1905.sp001089>
9. *Sherrington CS* (1910) Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J Physiol* 40: 28–121.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1910.sp001362>
10. *Frigon A* (2020) Fundamental contributions of the cat model to the neural control of locomotion. In *The Neural Control of Movement* (P. 315–348). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816477-8.00013-2>
11. *Мусиенко ПЕ, Горский ОВ, Килимник ВА, Козловская ИБ, Courtine G, Edgerton VR, Герасименко ЮП* (2013) Регуляция позы и локомоции у децеребрированных и спинализованных животных. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 99: 392–405. [*Musienko PE, Gorskiy OV, Kilimnik VA, Kozlovskaya IB, Courtine G, Edgerton VR, Gerasimenko YuP* (2013) Neuronal control of posture and locomotion in decerebrated and spinalized animals. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 99: 392–405. (In Russ)].
12. *Макарова МН* (2021) Кошки в лабораторных исследованиях. Обзор литературы. Лабораторные животные для научных исследований. 1: 86–104. [*Makarova MN* (2021) Cats in laboratory studies. Literature review *Laboratornyye Zhivotnyye Dlya Nauchnykh Issledovaniy*. 1: 86–104. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-09>

13. *Harnie J, Audet J, Klishko AN, Doelman A, Prilutsky BI, Frigon A* (2021) The spinal control of backward locomotion. *J Neurosci* 41: 630–647.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0816-20.2020>
14. *Fathi Y, Erfanian A* (2022) Decoding bilateral hindlimb kinematics from cat spinal signals using three-dimensional convolutional neural network. *Front Neurosci* 16: 801818.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.801818>
15. *Roussel M, Lemieux M, Bretzner F* (2020) Using mouse genetics to investigate supraspinal pathways of the brain important to locomotion. In *The Neural Control of Movement* (P. 269–313). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816477-8.00012-0>
16. *Hofstoetter US, Freundl B, Binder H, Minassian K* (2018) Common neural structures activated by epidural and transcatheter lumbar spinal cord stimulation: Elicitation of posterior root-muscle reflexes. *PLoS One* 13: e0192013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192013>
17. *Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR* (2005) Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett* 383: 339–344.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.049>
18. *Capogrosso M, Wenger N, Raspopovic S, Musienko P, Beauparlant J, Bassi Luciani L, Courtine G, Micera S* (2013) A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits. *J Neurosci* 33: 19326–19340.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1688-13.2013>
19. *Wang S, Zhang LC, Fu HT, Deng JH, Xu GX, Li T, Ji XR, Tang PF* (2021) Epidural electrical stimulation effectively restores locomotion function in rats with complete spinal cord injury. *Neural Regen Res* 16: 573–579.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.290905>
20. *Gerasimenko Y, Preston C, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR, Shah PK* (2019) Rostral lumbar segments are the key controllers of hindlimb locomotor rhythmicity in the adult spinal rat. *J Neurophysiol* 122: 585–600.
<https://doi.org/10.1152/jn.00810.2018>
21. *Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF* (1984) Hindlimb muscle activity during locomotion in the rat (*Rattus norvegicus*) (Rodentia: Muridae). *J Zool Lond* 203: 427–440.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb02342.x>
22. *Skinner RD, Garcia-Rill E* (1984) The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. *Brain Res* 323: 385–389.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90319-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90319-6)
23. *Garcia-Rill E, Kinjo N, Atsuta Y, Ishikawa Y, Webber M, Skinner RD* (1990) Posterior midbrain-induced locomotion. *Brain Res Bull* 24: 499–508.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90103-7](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90103-7)
24. *Yang CT, Vaca L, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Judy JW* (2005) Neural-Ensemble activity of spinal cord L1/L2 during stepping in a decerebrate rat preparation. *Conference Proceedings. 2nd Internat IEEE EMBS Conf Neural Engineer* 66–69.
<https://doi.org/10.1109/CNE.2005.1419554>
25. *Grillner S, Shik ML* (1973) On the descending control of the lumbosacral spinal cord from the “mesencephalic locomotor region”. *Acta Physiol Scand* 87: 320–333.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1973.tb05396.x>
26. *Ivanenko YP, Gurfinkel VS, Selionov VA, Solopova IA, Sylos-Labini F, Guertin PA, Lacquaniti F* (2017) Tonic and rhythmic spinal activity underlying locomotion. *Curr Pharm Des* 23: 1753–1763.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170125152246>
27. *Vargas Luna JL, Brown J, Krenn MJ, McKay B, Mayr W, Rothwell JC, Dimitrijevic MR* (2021) Neurophysiology of epidurally evoked spinal cord reflexes in clinically motor-complete post-traumatic spinal cord injury. *Exp Brain Res* 239: 2605–2620.
<https://doi.org/10.1007/s00221-021-06153-1>
28. *Dobson KL, Harris J* (2012) A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. *Exp Physiol* 97: 693–698.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.064840>
29. *Ghali GZ, Ghali MGZ* (2020) Microneurosurgical techniques and perioperative strategies utilized to optimize experimental supracollicular decerebration in rats. *J Integ Neurosci* 19: 137–177.
<https://doi.org/10.31083/j.jin.2020.01.1153>
30. *Gilerovich EG, Moshonkina TR, Fedorova EA, Shishko TT, Pavlova NV, Gerasimenko YP, Otellin VA* (2008) Morphofunctional characteristics of the lumbar enlargement of the spinal cord in rats. *Neurosci Behav Physiol* 38: 855–860.
<https://doi.org/10.1007/s11055-008-9056-8>
31. *Wenger N, Moraud EM, Gandar J, Musienko P, Capogrosso M, Baud L, Le Goff CG, Barraud O, Pavlova N, Dominici N, Minev IR, Asboth L, Hirsch A, Duis S, Kreider J, Mortera A, Haverbeck O,*

- Kraus S, Schmitz F, DiGiovanna J, van den Brand R, Bloch J, Detemple P, Lacour SP, Bézard E, Micera S, Courtine G* (2016) Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury. *Nat Med* 22: 138–145.
<https://doi.org/10.1038/nm.4025>
32. *Merkulyeva N, Veshchitskii A, Gorsky O, Pavlova N, Zelenin PV, Gerasimenko Y, Deliagina TG, Musienko P* (2018) Distribution of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion. *J Neurosci* 38: 4695–4707.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2951-17.2018>
33. *Merkulyeva N, Lyakhovetskii V, Gorskii O, Musienko P* (2022) Differences in backward and forward treadmill locomotion in decerebrate cats. *J Exp Biol* 225: jeb.244210.
<https://doi.org/10.1242/jeb.244210>
34. *Darling RA, Ritter S* (2009) 2-Deoxy-D-glucose, but not mercaptoacetate, increases food intake in decerebrate rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R382–R386.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90827.2008>
35. *Zhou D, Huang Q, Fung ML, Li A, Darnall RA, Nattie EE, St John WM* (1996) Phrenic response to hypercapnia in the unanesthetized, decerebrate, newborn rat. *Respir Physiol* 104: 11–22.
[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(95\)00098-4](https://doi.org/10.1016/0034-5687(95)00098-4)
36. *Bedford TG, Loi PK, Crandall CC* (1985) A model of dynamic exercise: the decerebrate rat locomotor preparation. *J Appl Physiol* 72: 121–127.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.1.121>
37. *Ghali MGZ* (2021) Dynamic changes in arterial pressure following high cervical transection in the decerebrate rat. *J Spinal Cord Med* 44: 399–410.
<https://doi.org/10.1080/10790268.2019.1639974>
38. *Yoshiyama M, Roppolo JR, Takeda M, de Groat WC* (2013) Effects of urethane on reflex activity of lower urinary tract in decerebrate unanesthetized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F390–F396.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00574.2012>
39. *Asanome M, Matsuyama K, Mori S* (1998) Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decerebrate cat. *Neurosci Res* 30: 257–269.
40. *Musienko P, Courtine G, Tibbs JE, Kilimnik V, Savochin A, Garfinkel A, Roy RR, Edgerton VR, Gerasimenko Y* (2012) Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrate rat. *J Neurophysiol* 107: 2072–2082.
<https://doi.org/10.1152/jn.00730.2011>
41. *Musienko PE, Zelenin PV, Lyalka VF, Gerasimenko YP, Orlovsky GN, Deliagina TG* (2012) Spinal and supraspinal control of the direction of stepping during locomotion. *J Neurosci* 32: 17442–17453.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3757-12.2012>
42. *Musienko PE, Deliagina TG, Gerasimenko YP, Orlovsky GN, Zelenin PV* (2014) Limb and trunk mechanisms for balance control during locomotion. *J Neurosci* 34: 5704–5716.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-13.2014>
43. *Pickering AE, Paton JF* (2006) A decerebrate, artificially-perfused in situ preparation of rat: utility for the study of autonomic and nociceptive processing. *J Neurosci Meth* 155: 260–271.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.01.011>
44. *Grill HJ, Norgren R* (1978) Neurological tests and behavioral deficits in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res* 14: 299–312.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90570-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90570-x)
45. *Шук МЛ, Северин ФВ, Орловский ГН* (1966) Управление ходьбой и бегом посредством электрической стимуляции среднего мозга. *Биофизика XI*: 659–666. [*Shik ML, Severin FV, Orlovsky GN* (1966) Control of walking and running by means of electric stimulation of the mid-brain. *Biophysica XI*: 659–666. (In Russ)].
46. *Fouad K, Pearson KG* (1997) Effects of extensor muscle afferents on the timing of locomotor activity during walking in adult rats. *Brain Res* 749: 320–328.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01328-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01328-5)
47. *Shkorbatova P, Lyakhovetskii V, Pavlova N, Popov A, Bazhenova E, Kalinina D, Gorskii O, Musienko P* (2020) Mapping of the spinal sensorimotor network by transvertebral and transcutaneous spinal cord stimulation. *Front Systems Neurosci* 14: 555593.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.555593>
48. *Ishii K, Asahara R, Komine H, Liang N, Matsukawa K* (2020) Pivotal role of the ventral tegmental area in spontaneous motor activity and concomitant cardiovascular responses in decerebrate rats. *Brain Res* 1729: 146616.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146616>
49. *Orlovsky GN* (1972) Activity of rubrospinal neurons during locomotion. *Brain Res* 46: 99–112.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90008-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90008-x)

50. *Basile GA, Quartu M, Bertino S, Serra MP, Boi M, Bramanti A, Anastasi GP, Milardi D, Cacciola A* (2021) Red nucleus structure and function: from anatomy to clinical neurosciences. *Brain Struct Funct* 226: 69–91.
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02171-x>
51. *Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF* (1983) Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75–85.
<https://doi.org/10.1002/cne.902170107>
52. *Vanderhorst VG, Holstege G* (1997) Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46–76.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970526\)382:1<46::AID-CNE10969861\(19970526\)382:1<46::AID-CNE10969861\(19970526\)382:1>>1.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970526)382:1<46::AID-CNE10969861(19970526)382:1<46::AID-CNE10969861(19970526)382:1<46::AID-CNE10969861(19970526)382:1>>1.0.CO;2-3)
53. *Lavrov I, Musienko PE, Selionov VA, Zdunowski S, Roy RR, Edgerton VR, Gerasimenko Y* (2015) Activation of spinal locomotor circuits in the decerebrated cat by spinal epidural and/or intraspinal electrical stimulation. *Brain Res* 1600: 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.003>
54. *Iwahara T, Atsuta Y, Garcia-Rill E, Skinner RD* (1992) Spinal cord stimulation-induced locomotion in the adult cat. *Brain Res Bull* 28: 99–105.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90235-p](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90235-p)
55. *Bogacheva IN, Musienko PE, Shcherbakova NA, Moshonkina TR, Savokhin AA, Gerasimenko YuP* (2014) Analysis of locomotor activity in decerebrate cats using electromagnetic and epidural electrical stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 44: 552–559.
<https://doi.org/10.1007/s11055-014-9950-1>
56. *Waller WH* (1940) Progression movements elicited by subthalamic stimulation. *J Neurophysiol* 3: 300–307.
57. *Garcia-Rill E, Skinner RD, Fitzgerald JA* (1983) Activity in the mesencephalic locomotor region during locomotion. *Exp Neurol* 82: 609–622.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(83\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(83)90084-5)
58. *Орловский ГН* (1969) Спонтанная и вызванная локомоция таламической кошки. *Биофизика* XIV: 1095–1102. [*Orlovsky GN* (1969) Spontaneous and evoked locomotion of the thalamic cat. *Biophysica* XVI: 1095–1102. (In Russ)].
59. *Будакова НН, Шик МЛ* (1974) Шагательные движения передних конечностей и феномен Шиффа–Шеррингтона. *Бюлл exper биол мед* 77: 6–10. [*Budakova NN, Shik ML* (1974) Stepping movements of the forelimbs and Shiff-Sherrington phenomenon. *Byull eksper biol med* 77: 6–10. (In Russ)].
60. *Yamaguchi T* (1992) Muscle activity during forelimb stepping in decerebrate cats. *Jpn J Physiol* 42: 489–399.
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.42.489>
61. *Juvin L, Simmers J, Morin D* (2005) Propriospinal circuitry underlying interlimb coordination in mammalian quadrupedal locomotion. *J Neurosci* 25: 6025–6035.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0696-05.2005>
62. *Reed WR, Shum-Siu A, Onifer SM, Magnuson DSK* (2006) Inter-enlargement pathways in the ventrolateral funiculus of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 142: 1195–1207.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.017>
63. *Miller S, Reitsma DJ, van der Meché FG* (1973) Functional organization of long ascending propriospinal pathways linking lumbo-sacral and cervical segments in the cat. *Brain Res* 62: 169–188.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90626-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90626-4)
64. *Barthélemy D, Leblond H, Provencher J, Rossignol S* (2006) Non-locomotor and locomotor hindlimb responses evoked by electrical microstimulation of the lumbar cord in spinalized cats. *J Neurophysiol* 96: 3273–3292.
<https://doi.org/10.1152/jn.00203.2006>
65. *Barthélemy D, Leblond H, Rossignol S* (2007) Characteristics and mechanisms of locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation in spinal cats. *J Neurophysiol* 97: 1986–2000.
<https://doi.org/10.1152/jn.00818.2006>
66. *Будакова НН* (1971) Шагательные движения, вызываемые у мезэнцефалической кошки ритмическим раздражением дорсального корешка. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* LVII: 1632–1640. [*Budakova NN* (1971) Stepping movements evoked by a rhythmic stimulation of a dorsal root in mesencephalic cat. *Fiziol zhurnal SSSR im IM Sechenova* LVII: 1632–1640. (In Russ)].
67. *Lyakhovetskii V, Merkulyeva N, Gorskii O, Musienko P* (2021) Simultaneous bidirectional hindlimb locomotion in decerebrate cats. *Sci Rep* 11: 3252.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82722-2>
68. *Thota AK, Watson SC, Knapp E, Thompson B, Jung R* (2005) Neuromechanical control of locomotion in the rat. *J Neurotrauma* 22: 442–465.
<https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.442>

69. Walker C, Vierck CJ Jr, Ritz LA (1998) Balance in the cat: role of the tail and effects of sacro-caudal transection. *Behav Brain Res* 91: 41–47.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00101-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00101-0)
70. Wada N, Hori H, Tokuriki M (1993) Electromyographic and kinematic studies of tail movements in dogs during treadmill locomotion. *J Morphol* 217: 105–113.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1052170109>
71. Takakusaki K (2013) Neurophysiology of gait: from the spinal cord to the frontal lobe. *Mov Disord* 28: 1483–1491.
<https://doi.org/10.1002/mds.25669>
72. de Vrind VAJ, van 't Sant LJ, Rozeboom A, Luijendijk-Berg MCM, Omrani A, Adan RAH (2021) Leptin receptor expressing neurons in the substantia nigra regulate locomotion, and in the ventral tegmental area motivation and feeding. *Front Endocrinol* 12: 680494.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.680494>
73. Double KL, Crocker AD (1993) Quantitative electromyographic changes following modification of central dopaminergic transmission. *Brain Res* 604(1–2): 342–344.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90388-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90388-4)
74. Wolfarth S, Konieczny J, Smiałowska M, Schulze G, Ossowska K (1996) Influence of 6-hydroxy-dopamine lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway on the muscle tone and electromyographic activity measured during passive movements. *Neuroscience* 74: 985–996.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00418-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00418-6)

Electric Epidural Stimulation of the Spinal Cord of the Decerebrated Rat

P. Yu. Shkorbatova^{a, b}, V. A. Lyakhovetskii^a, O. V. Gorsky^{a, b}, N. V. Pavlova^a,
E. Yu. Bazhenova^a, D. S. Kalinina^{b, c}, P. E. Musienko^{a, b}, and N. S. Merkulyeva^{a, *}

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

^b*Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^c*Sirius Science and Technology University, Krasnodar region, settl. Sirius, Russia*

**e-mail: mer-natalia@yandex.ru*

Decerebrated animals are often used in experimental neurophysiology to study multilevel physiological processes. The model of a decerebrated cat is traditionally used to study locomotion in acute experiments. We wondered if it would be possible to replace it with electrical epidural stimulation of the spinal cord with a decerebrated rat model. On an acute preparation of 16 Wistar rats decerebrated at the precollicular level, the tonic muscles activity, muscles evoked potentials and the possibility of inducing locomotion during electrical epidural stimulation of the spinal cord, were studied. Histological control of the level of decerebration was performed in 10 rats. Quadrupedal walking was induced in five animals, bipedal hindlimb walking – in one animal; the parameters of the evoked locomotion do not depend on the *substantia nigra* degree of damage. The tonic activity and the amplitude of the sensory component of the evoked potential of the hindlimb muscles (*mm. tibialis anterior* and *gastrocnemius medialis*) depend on the rostrocaudal level of decerebration – they are higher when the *substantia nigra* is damaged. Thus, the model under consideration makes it possible to successfully study muscle tonic activity and evoked muscle potentials; however, the use of this model in the study of controlled locomotion requires additional research.

Keywords: decerebrated rat, epidural stimulation, tonic activity, locomotion, evoked potential