

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 5

май

2024



НАУКА

— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Роль NLRP3 инфламмасомы в патогенезе ишемического инсульта
С. Д. Казаков, Е. М. Каменских, Е. В. Удун 641
- Роль метилирования ДНК в моделях заболеваний ЦНС на примере рыб зебраданио
*Л. В. Юшко, А. Д. Шевляков, М. А. Ромазева, К. В. Апухтин, А. Д. Волгин,
Д. А. Абрамов, М. М. Котова, А. В. Калусев* 661
- Обонятельная дисфункция при ожирении и диабете 2-го типа
Е. В. Бигдай, А. А. Зуйкова, А. В. Поздняков 680
- Синергическое трио метаболических регуляторов, поддерживающих порочный круг патологических процессов при посттравматическом стрессовом расстройстве
М. В. Кондашевская, К. А. Артемьева, Л. М. Михалева 704

Экспериментальные статьи

- Ключевые анаболические маркеры в *m. soleus* человека после 21-суточной антиортостатической гипокинезии
С. П. Белова, С. А. Тыганов, К. А. Зарипова, Б. С. Шенкман 723
- Глибенкламид предотвращает воспаление, воздействуя на активацию NLRP3 инфламмасом *in vitro*
Е. Д. Хилажева, Ю. А. Панина, А. И. Мосягина, О. С. Белозор, Ю. К. Комлева 736
- Значение гормонов надпочечников в реализации стресс-протекторного эффекта малых доз L-тироксина
Е. А. Гусакова, И. В. Городецкая 753
- Изоосмотическая стрикция сосудистых гладкомышечных клеток аорты крысы при активации пуринаргических рецепторов: роль хлорного транспорта
*Л. В. Смаглий, В. С. Гусакова, С. В. Гусакова, М. А. Пшемский,
С. О. Кошуба, Е. А. Голованов* 769
- Метилогобогащенная диета матери улучшает эпизодическую память и не влияет на память об условно-рефлекторном страхе у потомства крыс линии WAG/RIJ
Е. А. Федосова, А. Б. Шацкова, К. Ю. Саркисова 783
- Подавление асептического воспаления снижает выраженность ремоделирования ветвей легочной артерии и улучшает течение хронической тромбоэмболической легочной гипертензии в эксперименте
*А. А. Карпов, А. А. Крылов, Л. А. Шиленко, А. М. Михайлова, Д. Д. Ваулина,
Д. Ю. Ивкин, Н. П. Исакова, А. В. Воротилов, Н. Ю. Семенова,
В. А. Цинзерлинг, М. М. Галагудза* 799
- Влияние кардарина на экспрессию генов белков, вовлеченных в эпилептогенез, в гиппокампе крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии
А. Р. Харисова, А. И. Рогинская, О. Е. Зубарева 814
- Экспрессия молекул, характеризующих метаболическую и цитотоксическую активность разных субпопуляций натуральных киллеров периферической крови при беременности
Е. Г. Орлова, О. А. Логинова, О. Л. Горбунова, С. В. Ширишев 837
- Осознаваемые и неосознаваемые процессы в задаче арифметического прайминга зависят от уровня арифметического навыка
*В. М. Князева, Н. В. Полякова, Д. Г. Федоров,
Д. Д. Ситникова, А. А. Александров* 849
-

CONTENTS

Reviews

The Role of NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of Ischemic Stroke <i>S. D. Kazakov, E. M. Kamenskih, and E. V. Udut</i>	641
The Role of DNA Methylation in Zebrafish Models of CNS Diseases <i>L. V. Yushko, A. D. Shevlyakov, M. A. Romazeva, K. V. Apukhtin, A. D. Volgin, D. A. Abramov, M. M. Kotova, and A. V. Kalueff</i>	661
Olfactory Dysfunction in Obesity and Type 2 Diabetes <i>E. V. Bigday, A. A. Zuykova, and A. V. Pozdnyakov</i>	680
Synergic Trio of Metabolic Regulators Supporting the Vicious Circle of Pathological Processes in Post-Traumatic Stress Disorder <i>M. V. Kondashevskaya, K. A. Artemyeva, and L. M. Mikhaleva</i>	704

Experimental articles

Key Anabolic Markers in Human <i>M. Soleus</i> After 21-Day Head-Down Tilt Bedrest <i>S. P. Belova, S. A. Tyganov, K. A. Zaripova, and B. S. Shenkman</i>	723
Glibenclamide Prevents Inflammation by Targeting NLRP3 Inflammasome Activation <i>in Vitro</i> <i>E. D. Khilazheva, Yu. A. Panina, A. I. Mosiagina, O. S. Belozor, and Yu. K. Komleva</i>	736
The Importance of Adrenal Hormones in the Implementation Stress-Protective Effect of Small Doses of L-thyroxine <i>E. A. Gusakova, and I. V. Gorodetskaya</i>	753
Isosmotic Striction of Rat Aorta Smooth Muscle Cells During Activation of Purinergic Receptors: Role of Chlorine Transport <i>L. V. Smaglin, V. S. Gusakova, S. V. Gusakova, M. A. Pshemyskiy, S. O. Koshuba, and E. A. Golovanov</i>	769
Maternal Methyl-Enriched Diet Improves Episodic Memory and Does Not Affect the Conditioned Fear Memory in Offspring of WAG/RIJ Rats <i>E. A. Fedosova, A. B. Shatskova, and K. Yu. Sarkisova</i>	783
Suppression of Aseptic Inflammation Reduces the Severity of Remodeling of the Pulmonary Artery Branches and Improves Progressing of Experimental Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension <i>A. A. Karpov, A. A. Krylov, L. A. Shilenko, A. M. Mihailova, D. D. Vaulina, D. Yu. Ivkin, N. P. Isakova, A. V. Vorotilov, N. Y. Semenova, V. A. Zinserling, and M. M. Galagudza</i>	799
Effect of Cardarin on Gene Expression of Proteins Involved in Epileptogenesis in Rat Hippocampus in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy <i>A. R. Kharisova, A. I. Roginskaya, and O. E. Zubareva</i>	814
Expression of Molecules Characterizing Metabolic and Cytotoxic Activity of Natural Killer Different Subpopulations of Peripheral Blood During Pregnancy <i>E. G. Orlova, O. A. Loginova, O. L. Gorbunova, and S. V. Shirshov</i>	837
Conscious and Unconscious Processes in the Arithmetic Priming Task Depend on the Arithmetic Skill <i>V. M. Knyazeva, N. V. Polyakova, D. G. Fedorova, D. D. Sitnikova, and A. A. Aleksandrov</i>	849

ОБЗОРЫ

РОЛЬ NLRP3 ИНФЛАММАСОМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2024 г. С. Д. Казаков^{1,*}, Е. М. Каменских¹, Е. В. Удуд¹

¹*Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Томск, Россия*

**E-mail: docstastomsk@gmail.com*

Поступила в редакцию 31.01.2024 г.

После доработки 26.03.2024 г.

Принята к публикации 28.03.2024 г.

Ишемический инсульт (ИИ) – распространенное заболевание с высокой смертностью и риском инвалидизации населения во всем мире. К настоящему моменту вопрос патогенетической терапии остается до конца нерешенным в связи с ограниченной эффективностью и безопасностью реперфузионных мероприятий. Недавние исследования показали, что нейровоспаление играет важную роль в развитии ИИ и может являться терапевтической мишенью. NLRP3 инфламмасома является одним из важнейших медиаторов, опосредующих постишемические воспалительные реакции посредством активации каспазы-1, которая расщепляет предшественники интерлейкинов 1 β и 18 до активных провоспалительных цитокинов, которые высвобождаются во внеклеточную среду. В данном обзоре приведены данные о структуре, процессе активации NLRP3 инфламмасы при ИИ. Описаны факторы и механизмы как способствующие активации данной инфламмасы, так и подавляющие ее.

Ключевые слова: инсульт, ишемия, нейровоспаление, иммунитет, инфламмасома

DOI: 10.31857/S0869813924050014, **EDN:** BLSSVT

ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются одной из основных причин высокой смертности и инвалидизации населения от сердечно-сосудистых заболеваний во всем мире. По данным за 2020 г. в мировой популяции насчитывалось 89.13 млн человек, перенесших ОНМК, и было зарегистрировано 11.71 млн новых случаев заболевания [1]. Смертность среди пациентов, перенесших ОНМК, составляет от 55 до 78% в первый год после выписки из стационара [2].

Среди ОНМК по этиологии и патогенезу выделяют геморрагические и ишемические инсульты. Ишемический инсульт (ИИ) преобладает в структуре ОНМК (составляет более 80% всех случаев ОНМК) и занимает второе место в мире по уровню смертности после болезней сердца [3–6]. В связи с этим остается актуальным вопрос изучения механизмов и способов нейропротекции, поиска новых молекулярных мишеней для разработки перспективных фармакологических агентов.

Известно, что степень ишемического повреждения тканей головного мозга связана со степенью и продолжительностью снижения кровотока [7]. Размер очага ИИ ассоци-

ирован с грубым неврологическим дефицитом, приводящим к стойкой инвалидизации, а в наиболее тяжелых случаях – летальному исходу [7, 8].

Патофизиологический процесс ИИ сложен и включает в себя нарушение внутриклеточного ионного гомеостаза, ацидоз, повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , усиление генерации активных форм кислорода (АФК), цитокин-опосредованную цитотоксичность, активацию системы комплемента, разрушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [9–14]. Данные факторы влияют на функции нейронов, глиальных и сосудистых клеток [11, 15, 16]. При этом важно отметить, что методики артериальной реканализации, являющиеся основным методом лечения ИИ, могут вызывать нежелательные явления. Так, при реперфузии ишемизированной ткани головного мозга скорость клеточного метаболизма и потребление кислорода резко повышаются, что приводит к повреждению митохондрий, увеличению уровня АФК, повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и инфильтрации нейтрофилов, что усугубляет повреждение посредством воспалительной реакции [17].

Воспаление представляет собой защитную реакцию, направленную на устранение основных причин повреждения клеток. Несмотря на то, что воспаление способно устранить инфекционные агенты и токсические вещества, воспалительные реакции в тканях головного мозга повышают степень повреждения в течение нескольких часов после начала ишемии [18]. В результате нарушения функционирования клеток центральной нервной системы (ЦНС) происходит высвобождение множества молекулярных сигналов, включая молекулярные паттерны, связанные с патогенами (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), и молекулярные паттерны, связанные с повреждением (damage-associated molecular pattern, DAMP) [19]. Они способны активировать врожденную иммунную систему через рецепторы распознавания образов (pattern recognition receptors, PRR), что может способствовать ишемическому повреждению головного мозга [19].

Инфламмасомы представляют собой внутриклеточные белковые комплексы, являющиеся частью врожденного иммунитета. Известно, что инфламмасома семейства рецепторов, содержащих нуклеотидсвязывающий домен и богатые лейцином повторы (nucleotide-binding domain and leucine-rich-repeat-containing receptor, NLR), содержащая пириновый домен 3 (NLRP3 инфламмасома) является одним из важнейших медиаторов воспаления [20]. Активация инфламмасы приводит к пироптозу – виду клеточной гибели, при которой обнаруживаются признаки набухания и разрыва клеточной мембраны, сопровождающиеся образованием пор [21]. Через данные поры во внеклеточное пространство выделяются многочисленные факторы воспаления, усиливая воспалительную реакцию и усугубляя повреждение. Таким образом, лечение, нацеленное на сигнальные пути NLRP3, может стать новой мишенью терапии ИИ за счет подавления воспалительной реакции [22].

В данной статье описана структура NLRP3 инфламмасы, пути активации и факторы регуляции при ИИ. Представленные механизмы потенциально могут быть использованы для разработки новых стратегий терапии ИИ.

СТРУКТУРА NLRP3 ИНФЛАММАСОМЫ, ПРОЦЕСС АКТИВАЦИИ

В 2002 г. команда исследователей под руководством Tschopp из Университета Лозанны сообщила об обнаружении белкового комплекса, активирующего каспазу-1 – NLRP1 инфламмасы [23]. В последующие годы были идентифицированы и изучены другие типы инфламмасом, которые различались по структуре и факторам активации. Одной из наиболее изученных является инфламмасома NLRP3. NLRP3 инфламмасома представляет собой белковый комплекс, состоящий из трех субъединиц: одноименного сенсорного белка, адаптерного белка и эффектора (каспазы-1) [24, 25]. Сенсорный белок состоит из трех доменов: центрального домена связывания нуклеотидов и олиго-

меризации (nucleotide-binding and oligomerization domain, NOD, также известного как NACHT), домена, содержащего обогащенные лейцином повторы (leucine-rich repeat, LRR), и пиринового домена (pyrin domain, PYD). Адаптерный белок представляет собой связанный с апоптозом пятнышкообразный белок, содержащий домен рекрутирования каспазы (caspase activation and recruitment domain, CARD), также известный как ASC.

Сборка инфламмасы NLRP3 начинается с цитозольных PRR, которые способны распознавать PAMP [26] и DAMP [27–30]. Среди PRR выделяют Toll-подобные рецепторы (toll-like receptor, TLR) и лектиновые рецепторы C-типа (C-type lectin receptor, CLR), которые являются трансмембранными белками, локализируются в плазматической мембране и эндосомах и взаимодействуют с DAMP и PAMP во внеклеточной среде [25]. Рецептор гена I, индуцируемого ретиноевой кислотой (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor, RLR), рецептор отсутствующий при меланоме 2 (absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptor, ALR), а также вышеупомянутый NLR находятся во внутриклеточных компартментах [25].

Путь активации NLRP3 инфламмасы состоит из двух этапов: прайминга и активации. На этапе прайминга PAMP и DAMP через PRR активируют сигнальный путь ядерного фактора κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B), что приводит к усилению экспрессии белка NLRP3, предшественников провоспалительных интерлейкинов 1β (про-IL- 1β) и 18 (про-IL-18) [31]. На этапе активации различные факторы, как например, АФК, аденозинтрифосфат (АТФ), отток ионов K^+ , Ca^{2+} -перегрузка инициируют сборку и активацию NLRP3 инфламмасы [31–35] (рис. 1). При этом NLRP3 агрегируется в олигомеры, затем рекрутирует ASC через домен PYD, далее ASC рекрутирует прокаспазу-1 посредством взаимодействия домена CARD и индуцирует активацию каспазы-1 [36]. Активированная каспаза-1 расщепляет про-IL- 1β и про-IL-18 с образованием активных IL- 1β и IL-18 [36]. Как известно, IL- 1β и IL-18 участвуют в патогенезе ишемического повреждения головного мозга. Так, у мышей, лишенных обеих форм данных цитокинов, наблюдалось уменьшение размера инфаркта на 70% по сравнению с мышами дикого типа [37]. Таким образом, активация NLRP3 инфламмасы может играть ключевую роль в повреждении тканей при ИИ.

ПРОДУКЦИЯ NLRP3 ИНФЛАММАСОМЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Известно, что NLRP3 инфламмоса экспрессируется в иммунных клетках и в клетках центральной нервной системы [38, 39].

Возможность продуцировать NLRP3 была исследована для глиальных клеток. Gustin и соавт. в 2015 г. продемонстрировали способность формировать активную инфламмосу NLRP3 клетками микроглии в мозге мышей [40]. Так, клетки микроглии после обработки липополисахаридом (ЛПС) экспрессировали NLRP3, ASC, каспазу-1, IL- 1β . В то же время уровень NLRP3 и ASC в астроцитах после воздействия ЛПС оставался низким. Исследователи также не наблюдали секрецию IL- 1β астроцитами, это, в том числе позволило сделать вывод, что NLRP3 инфламмоса не продуцируется в астроцитах мозга мышей [40]. Активация NLRP3 инфламмасы в клетках микроглии была выявлена при церебральной ишемии/реперфузии (И/Р) у крыс и мышей, во время которой наблюдалось усиление экспрессии NLRP3, ASC и каспазы-1 [41, 42].

Более противоречивыми являются данные об активации NLRP3 инфламмасы в нейронах. Так, Yang и соавт. показали, что при окклюзии средней мозговой артерии (СМА) у мышей NLRP3 инфламмоса экспрессировалась в микроглии и эндотелиальных клетках, но не в нейронах [43]. Однако по другим данным, экспрессия NLRP3

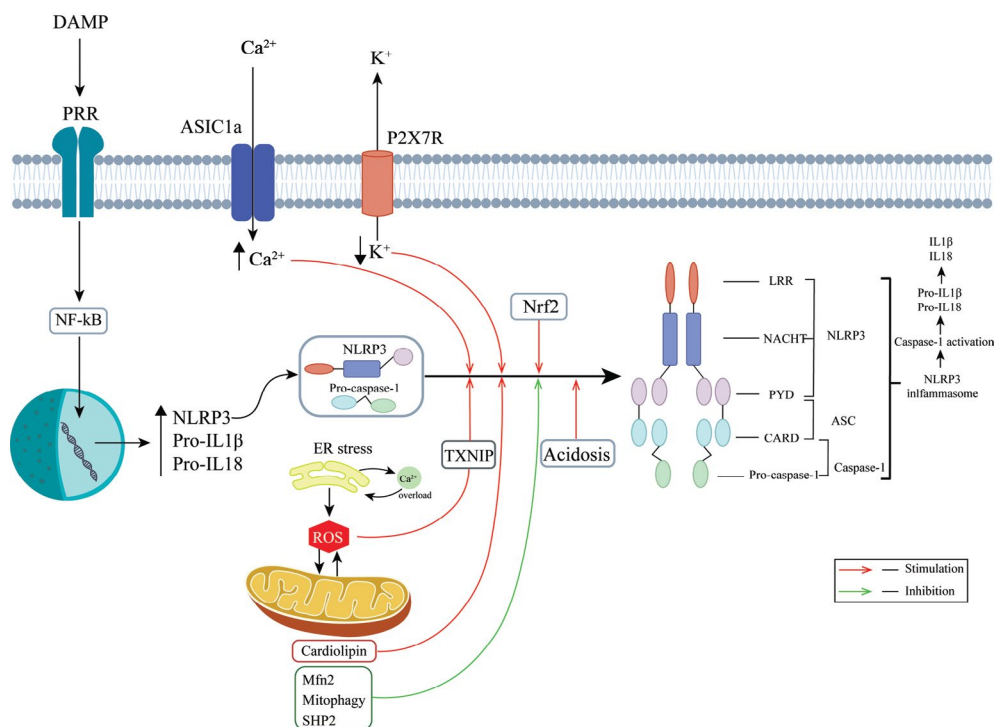


Рис. 1. Структура NLRP3 инфламмасы и гипотетические факторы активации. Обозначения: ASC – связанный с апоптозом пятнышкообразный белок, содержащий домен активации и рекрутирования каспазы; ASIC1a – кислото-чувствительный ионный канал; CARD – домен активации и рекрутирования каспазы; DAMP – молекулярные паттерны, связанные с повреждением; IL18 – интерлейкин 18; IL1β – интерлейкин 1β; LRR – домен, содержащий обогащенные лейцином повторы; Mfn2 – митофузин 2; NACHT – центральный домен связывания нуклеотидов и олигомеризации; NF-κB – ядерный фактор-κB, NLRP3 – NOD-подобный рецептор, содержащий пириновый домен 3; Nrf2 – ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору 2; P2X7R – пуриnergический лиганд-зависимый ионный канал 7; PRR – рецептор распознавания образов; PYD – пириновый домен; SHP2 – тирозинфосфатаза 2, содержащая домен гомологии Src 2; TXNIP – тиоредоксин-взаимодействующий белок; ROS – активные формы кислорода; ER – эндоплазматический ретикулум.

инфламмасы, а также уровень IL-1β и IL-18 повышались в первичных кортикальных нейронах мышей с ИИ *in vivo*, а также в условиях кислородно-глюкозной депривации (КГД) *in vitro* [22]. Подобное противоречие результатов исследований может быть обусловлено различными протоколами моделирования ишемии. В более позднем исследовании Gong и соавт. в 2018 г. продемонстрировали, что при И/Р головного мозга крыс экспрессия NLRP3 инфламмасы наблюдается сначала в клетках микроглии и лишь позднее в нейронах и в значительно меньшем количестве в эндотелиальных клетках [44]. В 2022 г. в исследовании Shi и соавт. было показано, что у крыс с окклюзией СМА по сравнению с ложнооперированными животными происходит повышение содержания NLRP3, ASC, каспазы-1, IL-1β и IL-18 в клетках периферической коры зоны инсульта [45].

Эксперименты с использованием селективного блокатора NLRP3 инфламмасы указывают на ее важную роль в повреждении клеток при ИИ. Так, MCC950, селектив-

ный ингибитор NLRP3 инфламмасы, дозозависимым образом уменьшал размер инфаркта, снижал экспрессию NLRP3, ASC, каспазы 1 и провоспалительных цитокинов у мышей с окклюзией СМА [46]. Эти данные были подтверждены в другом исследовании, в котором MCC950 снижал уровень матричной рибонуклеиновой кислоты (РНК, мРНК), NLRP3, каспазы-1, IL-1 β , уменьшал выраженность неврологической дисфункции и повышал 28-дневную выживаемость у мышей с диабетом после церебральной И/Р [47].

ФАКТОРЫ АКТИВАЦИИ NLRP3 ИНФЛАММАСОМЫ ПРИ ИИ

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ

Повреждение митохондрий и их дисфункция являются важным звеном патогенеза ИИ [48, 49]. Более того, митохондрии участвуют в активации NLRP3 инфламмасы, что приводит к нейровоспалению и пироптозу [50]. Так, Gong и соавт. в своей работе на модели крыс с временной окклюзией СМА подчеркивали, что после И/Р митохондриальная дисфункция играет важную роль в активации NLRP3 инфламмасы в клетках микроглии [44]. Какие процессы активируются при И/Р в митохондриях и каким образом они могут влиять на активацию NLRP3 инфламмасы?

Многими научными коллективами было показано, что при И/Р происходит открытие митохондриальных пор (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) [51, 52]. При открытии mPTP высвобождаются DAMP (например, такие как АТФ, АФК, кардиолипин), которые способны активировать NLRP3 инфламмасому [53]. Однако в то же время митофагия и ряд митохондриальных белков, таких как тирозинфосфатаза 2, содержащая домен гомологии Src 2 (src homology region 2 domain-containing phosphatase-2, SHP2), митофузин 2 (Mitofusin-2, Mfn2) и ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2), подавляя активацию NLRP3 инфламмасы [54].

Помимо этого, известно, что компоненты NLRP3 инфламмасы транслоцируются в митохондрии посредством адаптерного митохондриального противовирусного сигнального белка (mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS) [55]. В локализации NLRP3 инфламмасы на митохондриях также участвуют микротрубочки, опосредуя Ca^{2+} -зависимую ассоциацию ASC с белком NLRP3 [56, 57]. Кардиолипин, специфичный для митохондрий фосфолипид, является одним из DAMP и может перемещаться с внутренней митохондриальной мембраны на внешнюю, где способен напрямую связываться с NLRP3, способствуя его активации [58].

Таким образом, механизмы участия митохондрий в активации NLRP3 инфламмасы при ИИ достаточно обширны и включают в себя различные факторы. Роль некоторых из них рассмотрена ниже.

АФК. Известно, что при ишемии тканей головного мозга происходит повышение внутриклеточного уровня АФК [59]. Уровень АФК может увеличиваться за счет нарушения цепи переноса электронов, активации НАДФН-оксидазы, ксантиндегидрогеназы, фосфолипазы A2 или NO-синтазы (NO synthase, NOS) [60–62]. Важную роль в усилении продукции АФК при И/Р играет стресс эндоплазматического ретикулаума (ЭР), при котором происходит активация вышеупомянутой НАДФН-оксидазы [63]. К чему может привести повышенная генерация и увеличение содержания АФК? В первую очередь повышение уровня АФК приводит к накоплению ионов Ca^{2+} в митохондриях, что еще больше усугубляет их повреждение [64]. Однако АФК способны не только усиливать повреждение митохондрий, но и приводить к активации NLRP3 инфламмасы [34].

Показано, что митохондриальные АФК (мтАФК) важны для прайминга и активации NLRP3. Так, было обнаружено, что мтАФК регулирует инициацию NLRP3 путем уси-

ления его транскрипции [65]. Помимо этого, от мтАФК зависит деубиквитинирование NLRP3, являющееся нетранскрипционным сигналом прайминга [66]. В исследовании, проведенном на макрофагах мышей (RAW 264.7) с использованием поглотителя АФК, было продемонстрировано, что элиминация мтАФК ингибирует деубиквитинирование NLRP3 и подавляет активацию NLRP3 инфламмасы, индуцированную ЛПС [67]. Wang и соавт. в 2019 г. показали, что мтАФК индуцировали активацию NLRP3 инфламмасы и NLRP3-зависимое повреждение лизосом [68]. Удаление мтАФК устраняло данные эффекты [69].

Продemonстрировано, что поглотитель АФК N-ацетилцистеин (NAC) эффективно снижал экспрессию белка NLRP3, содержание IL-1 β и каспазы-1 *in vitro* на модели клеток BV2, обработанных ЛПС [70]. NAC также предотвращал ЛПС-индуцированное повышение экспрессии NLRP3, секреции IL-1 β и каспазы-1 в макрофагах человека, полученных из линии THP-1 [71]. Juliana и соавт. сообщали, что NAC и миметик митохондриальной супероксиддисмутазы Mito-TEMPO ингибировали активацию NLRP3 инфламмасы в макрофагах N1–8, но не в макрофагах NG5 [72].

Имеются данные, согласно которым передача сигнала мтАФК-NLRP3 происходила в микроглиальных клетках BV2 после кислородно-глюкозной депривации/реоксигенации (КГД/Р) [73]. Ингибирование высвобождения мтАФК подавляло активацию NLRP3 инфламмасы и снижало NLRP3-опосредованное повреждение микроглии при церебральной И/Р у крыс [73].

Важно отметить, что повышенный уровень АФК способствует диссоциации тиоредоксин-взаимодействующего белка (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) и его транслокации из ядра в цитоплазму [74]. Известно, что TXNIP способен связываться с доменом LRR рецептора NLRP3, тем самым индуцируя активацию NLRP3 инфламмасы [75].

Показано, что АФК повышали экспрессию TXNIP у крыс и мышей при церебральной И/Р [76]. При этом сверхэкспрессия TXNIP усугубляла повреждение головного мозга, способствовала активации NLRP3 инфламмасы, каспазы-1 и высвобождению IL-1 β [76, 77]. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что активация сигнального пути АФК/TXNIP/NLRP3 индуцировала пироптоз в первичных кортикальных нейронах при КГД/Р [76], в то время как нокдаун TXNIP значительно снижал экспрессию NLRP3 [78]. Данные результаты свидетельствуют о том, что АФК участвуют в TXNIP-опосредованной активации NLRP3 инфламмасы.

Кардиолипин. Помимо АФК, при ИИ наблюдается высвобождение из митохондрий кардиолипина [53]. Кардиолипин является анионным фосфолипидом на внутренней мембране данных органелл, где он участвует в процессе окислительного фосфорилирования [79]. Окисление и гидролиз кардиолипина являются одними из ключевых механизмов повреждения головного мозга, вызванного И/Р [80]. Имеются данные, что кардиолипин может активировать NLRP3 инфламмасому после ишемии [81]. Так, кардиолипин напрямую взаимодействует с LRR и с каспазой-1 NLRP3 инфламмасы [52]. Помимо этого, активация NLRP3 инфламмасы может происходить вследствие того, что рецептор NLRP3 связывается с митохондриями с помощью кардиолипина при участии мтАФК [82]. В исследовании, выполненном на макрофагах мышей (линия клеток J774A.1), продемонстрировано, что блокада синтеза кардиолипина снижает активацию NLRP3 инфламмасы [58]. Добавление кардиолипина в клетки с нарушенным синтезом данного фосфолипида приводит к активации NLRP3 инфламмасы и запускает активацию каспазы-1 [58].

Митохондриально-ассоциированная мембрана (mitochondria-associated membrane, МАМ). Взаимодействие ЭР с митохондриями опосредовано МАМ – мембранной структурой, которая играет ключевую роль в обмене Ca²⁺ между этими двумя органеллами [83]. Примечательно, что усиление взаимодействия митохондрий и ЭР посредством МАМ усугубляет митохондриальную дисфункцию и повышает генерацию АФК [84].

Показано, что активация NLRP3 инфламмасы связана с перемещением белка NLRP3 в митохондрии и MAM [58, 85]. При повреждении митохондрий вследствие И/Р происходит накопление NLRP3 и ASC в MAM [85]. Исследование, проведенное на мышцах с нокаутом MAM-родственного белка р66Shc, которым выполняли окклюзии СМА, показало, что нокаут р66Shc способствовал сохранению целостности ГЭБ, снижению площади инфаркта, уменьшению неврологического дефицита и повышению выживаемости [86]. Однако по имеющимся данным, нельзя однозначно сделать вывод о роли MAM в активации NLRP3 инфламмасы.

Митофагия. Известно, что митохондрии, поврежденные вследствие ишемии, удаляются с помощью митофагии – механизма, связанного с аутофагией [87]. Митофагия является важным механизмом снижающим гибель клеток вследствие дисфункции митохондрий [87]. Учитывая важную роль этих органелл в активации NLRP3 инфламмасы, логично предположить, что митофагия способна оказывать нейропротекторное действие путем ингибирования данной активации.

Действительно, в экспериментах на крысах, которым выполняли окклюзию СМА, было продемонстрировано, что индукция митофагии защищает ткани головного мозга от И/Р путем ингибирования активации NLRP3 инфламмасы [88]. Ингибитор митофагии mitochondrial division inhibitor-1 (mdivi-1) нивелировал данный защитный эффект [88].

В исследовании, выполненном на крысах с двусторонней окклюзией общей сонной артерии для моделирования хронической церебральной гипоперфузии, было показано, что при данном воздействии наблюдается гиперактивация микроглии, повышение уровня АФК, активация NLRP3 инфламмасы и высвобождение IL-1 β [89]. Ингибирование митофагии 3-метиладенином (3-МА) приводило к увеличению уровня NLRP3, каспазы-1 и IL-1 β [89]. Zhou и соавт. продемонстрировали что ингибитор митофагии/аутофагии 3-МА в клетках THP1 приводил к накоплению поврежденных митохондрий и усилению генерации АФК. Повышенная генерация АФК, вызванная 3-МА, сопровождалась дозозависимой секрецией IL-1 β [85].

Mfn2. Mfn2 представляет собой белок внешней мембраны митохондрий и играет ключевую роль в слиянии митохондрий. Сообщалось, что при индукции экспрессии Mfn2 у крыс в условиях церебральной И/Р наблюдается снижение экспрессии NLRP3 и IL-1 β в микроглии или астроцитах [90]. Ichinohe и соавт. показали, что Mfn2 способен связываться с белком NLRP3, а также что Mfn2 необходим для активации NLRP3 инфламмасы [91]. Однако поскольку это исследование было сосредоточено на механизме активации NLRP3 инфламмасы РНК-вирусами, требуются дальнейшие исследования для более полного понимания роли Mfn2 в активации NLRP3 инфламмасы другими триггерами, в том числе при ИИ.

Nrf2. Nrf2 является фактором транскрипции, регулирующим антиоксидантный ответ при окислительном стрессе [92]. При этом известно, что нокаут Nrf2 усугубляет окислительный стресс и воспаление [93].

Было отмечено, что при усилении экспрессии Nrf2 в клетках THP-1, обработанных ЛПС и АТФ, происходило снижение экспрессии NLRP3, каспазы-1 и IL-1 β [71]. В клетках с дефицитом Nrf2 наблюдалось также повышение уровня каспазы-1, что было связано с усилением транскрипции NLRP3, вызванной избытком АФК [71]. Способность Nrf2 подавлять АФК-индуцированную активацию NLRP3 инфламмасы была также показана *in vitro* в микроглиальных клетках BV2 при КГД/Р [94].

Помимо этого, продемонстрировано, что нокдаун эндогенного Nrf2 с помощью микроРНК (миРНК) Nrf2 увеличивал экспрессию TXNIP, NLRP3, каспазы-1 и IL-1 β в головном мозге крыс после окклюзии СМА [95]. Эти данные были подтверждены в другом исследовании, в котором крысам выполняли окклюзию СМА с последующей реперфузией [96]. Для индукции экспрессии Nrf2 использовали трет-бутилгидрохинон, а миРНК Nrf2, Trx1 для нокдауна. При повышении экспрессии Nrf2 содержание

TXNIP в цитоплазме, NLRP3, каспазы-1, IL-18 и IL-1 β значительно снижалось [96]. Нокдаун Nrf2 приводил к противоположным результатам. При этом нокдаун тиоредоксина 1 (thioredoxin1, Trx1) вызывал те же эффекты, что и ингибирование Nrf2, однако был устранен протекторный эффект Nrf2 [96]. Следовательно, Nrf2 оказывал протекторный эффект, подавляя активацию NLRP3 инфламماسомы во время И/Р через комплекс TRX/TXNIP.

SHP2. SHP2 является необходимым посредником в сигнальных путях, важных для выживания нейронов при И/Р [97]. Так, повреждение и гибель нейронов при церебральной И/Р была значительно выше у трангенных мышей с неактивным белком SHP2 по сравнению с мышами дикого типа [97].

SHP2 также является регулятором активации NLRP3 [98]. Guo и соавт. сообщали, что при воздействии индукторов активации NLRP3 инфламماسомы (АТФ, урата натрия и нигерицина) SHP2 транслоцируется в митохондрии и связывается с адениннуклеотидтрансферазой 1 (Adenine Nucleotide Transferase 1, ANT1), которая предотвращает открытие mPTP, тем самым ингибируя активацию NLRP3 инфламماسомы [98]. При этом нокдаун SHP2, как и ингибирование с помощью NSC87877 или PHPS1, усиливали активацию NLRP3 инфламماسомы [98].

Таким образом, SHP2 может участвовать в подавлении активации NLRP3 инфламماسомы, однако требуются дальнейшие исследования для оценки данного эффекта при ИИ.

НАРУШЕНИЕ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА

Ионы Ca^{2+} . Внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} может повышаться при усилении притока из внеклеточного пространства или при усилении их выхода из ЭР [99]. Накопление Ca^{2+} является одним из основных факторов открытия mPTP, что приводит не только к высвобождению митохондриальных компонентов, активирующих NLRP3 инфламмасому, но и к гибели клетки [100, 101]. При некротической или пиропототической гибели клетки происходит повышение концентрации ионов Ca^{2+} в межклеточном пространстве. Это приводит к распространению повреждения за счет активации на соседних нейрональных и глиальных клетках Ca^{2+} -чувствительных рецепторов (Calcium-Sensing Receptor, CaSR) и G-белок сопряженных рецепторов GPR6CA, что, в свою очередь, ведет к увеличению содержания внутриклеточного Ca^{2+} , снижению уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и к последующей активации NLRP3 [102–104].

Согласно данным Wang и соавт., трихлорид гадолиния, агонист CaSR, усиливал экспрессию NLRP3, расщепленной каспазы-1 и IL-1 β в ипсилатеральной коре головного мозга мышей после инсульта [105]. NPS-2143, ингибитор CaSR, предотвращал данный эффект [105]. Показано также, что нокдаун CaSR снижал активацию NLRP3 инфламماسомы [104].

Помимо вышеуказанного механизма повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , в условиях ишемии наблюдается активация кальциевого канала TRPM2 (transient receptor potential melastatin 2), что также может приводить к Ca^{2+} перегрузке. Известно, что TRPM2 способствует активации NLRP3 при повреждении нейронов в условиях КГД [106]. Данный эффект не проявляется при нокдауне гена TRPM2 [106]. Таким образом, CaSR и TRPM2 могут играть важную роль в Ca^{2+} -опосредованной активации NLRP3 инфламماسомы.

Нельзя не отметить, что высокая внутриклеточная концентрация Ca^{2+} может приводить к активации митохондриального унипортера кальция (mitochondrial calcium uniporter, MCU) и усилению транспорта Ca^{2+} в митохондрии, что ведет к снижению их трансмембранного потенциала и впоследствии к активации NLRP3 инфламماسомы [107].

Эффект блокаторов кальциевых каналов L-типа подтверждает участие ионов Ca^{2+} в активации NLRP3 инфламмасы. Так, никардипин, блокатор кальциевых каналов, эффективно ингибировал прайминг NLRP3 инфламмасы в моноцитарных клетках THP-1 [108]. Блокатор кальциевых каналов верапамил снижал экспрессию NLRP3 в мозговой ткани мышей с внутримозговым кровоизлиянием [109].

Однако возможно, что АФК и ионы Ca^{2+} , хотя и играют важную роль, но не являются обязательными факторами активации NLRP3 инфламмасы. Muñoz-Planillo и соавт. в своем исследовании сообщали, что при использовании различных активаторов NLRP3 инфламмасы обязательным общим триггером активации явился только отток ионов K^+ через клеточную мембрану, а не усиление генерации АФК или повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [33].

Ионы K^+ . Известно, что при ИИ в поврежденных клетках происходит усиление выходящего тока ионов K^+ и снижение его внутриклеточной концентрации [110, 111]. В свою очередь, снижение внутриклеточной концентрации K^+ является важным фактором активации NLRP3 инфламмасы.

Установлено, что нигерицин и BB15C1, ионофоры K^+ , индуцировали олигомеризацию NLRP3 *in vitro* в клетках НЕК-293Т почки человека [112]. Данный эффект устранялся внеклеточным KCl [112]. Показано, что повышение концентрации внеклеточного K^+ до 130 мМ блокирует процессинг и высвобождение каспазы-1 и IL-1 β , вызванное нигерицином, в макрофагах мышей [113]. Продемонстрировано также, что высокая концентрация внеклеточного K^+ ингибирует активацию NLRP3 в моноцитах человека [113].

Повышение внеклеточной концентрации K^+ может приводить к активации паннексина 1 [114]. Каналы паннексина 1 способны транспортировать молекулы мессенджеров, в частности АТФ, что способствует активации пуринергического лиганд-зависимого ионного канала 7 (purinergic receptor P2X ligand-gated ion channel 7, P2X7R), который, в свою очередь, активирует каналы паннексина 1 с образованием петли положительной обратной связи, вызывая тем самым чрезмерный выход ионов K^+ из клетки с одновременным снижением входящего K^+ тока [115, 116]. Таким образом, участие P2X7R в активации NLRP3 инфламмасы требует отдельного внимания.

P2X7R. P2X7R представляет собой неселективный АТФ-управляемый катионный канал, расположенный на мембранах различных иммунных клеток и некоторых клеток ЦНС. В ЦНС P2X7R преимущественно локализуется на клетках микроглии, резидентных макрофагах головного мозга [117]. Экспрессия P2X7R с низкой плотностью также отмечена в астроцитах и олигодендроцитах [118, 119].

Известно, что при ИИ происходит накопление молекул АТФ в поврежденных тканях, что приводит к активации P2X7R [120]. Активация P2X7R, в свою очередь, способствует увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , оттоку ионов K^+ и активации NLRP3 инфламмасы [121, 122]. Xinchun и соавт. продемонстрировали, что экспрессия P2X7R увеличивалась *in vivo* в ишемизированной ткани головного мозга мышей после церебральной И/Р, а также *in vitro* в кортикальных нейронах при КГД [122]. Бриллиантовый синий G (Brilliant Blue G, BBG), блокатор P2X7R, значимо снижал размер инфаркта головного мозга, апоптоз нейронов (количество TUNEL $^+$ клеток) и уменьшал неврологические нарушения, вызванные ишемическим повреждением [122]. BBG также значимо снижал экспрессию NLRP3, ASC и каспазы-1 как *in vivo*, так и *in vitro* [122]. Следовательно, P2X7R играет важную роль в активации NLRP3 инфламмасы при ИИ.

Ацидоз. В условиях гипоксии тканей головного мозга наблюдается усиление анаэробного гликолиза. Это позволяет кратковременно поддерживать энергетический баланс клеток, однако приводит к генерации большого количества лактата и протонов, и, как следствие, к локальному снижению pH [123]. Данные негативные эффекты вызывают необратимую гибель клеток головного мозга [124]. Таким образом, лактоацидоз тесно связан с ИИ [125].

Согласно нескольким исследованиям, снижение pH может являться триггером активации NLRP3 инфламмасомы. Так, Rajamäki и соавт. в своем исследовании показали, что внутриклеточный ацидоз приводит к повышению содержания мРНК, кодирующей рецептор NLRP3, активации каспазы-1 и усилению секреции IL-1 β в макрофагах THP-1 по механизму, включающему в себя отток ионов K⁺ [126]. Помимо этого, снижение pH внеклеточной среды может активировать кислото-чувствительные ионные каналы (Acid-Sensing Ion Channels, ASIC), проницаемые для ионов Ca²⁺ [127]. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ может приводить к активации NLRP3 инфламмасомы, как описано выше. Известно, что ASIC1a экспрессируются в нейронах ЦНС, в том числе в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке [128]. В экспериментах показано, что интрацеребровентрикулярная инъекция PcTX1, ингибитора ASIC1a, уменьшала объем инфаркта на 60% после окклюзии СМА у крыс и мышей [127, 129]. Нокаут гена ASIC1a обеспечивал сопоставимую степень нейропротекции от ишемического повреждения [127]. Ca²⁺-проницаемые ASIC были обнаружены и в нейронах головного мозга человека [130]. Активация этих каналов, как и на модели животных, способствовала повреждению нейронов, которое было ослаблено блокадой каналов ASIC1a [130].

Таким образом, ацидоз, возникающий при ИИ, вероятно, способствует активации NLRP3 инфламмасомы опосредованно, по механизму, включающему в себя отток ионов K⁺ и приток ионов Ca²⁺.

ОЦЕНКА РОЛИ ИНФЛАММАСОМЫ NLRP3 ПРИ ИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Описано наличие NLRP3, каспазы-1, IL-1 β и IL-18 в аутопсийных биоптатах ткани мозга, полученных от пациентов, перенесших ИИ [131]. В исследовании Lv и соавт. на популяции пациентов в Китае ($n = 234$) было установлено, что мужчины, носители гетерозиготных однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) rs2043211 в гене CARD8 и rs10754558 в гене NLRP3, имеют более высокий риск развития ИИ [132].

В другом исследовании более высокие значения сывороточных концентраций ASC, каспазы-1, IL-18 наблюдали у пациентов с ИИ по сравнению с контрольной группой. Последующий анализ продемонстрировал высокую диагностическую способность белков инфламмасомы NLRP3 для верификации ИИ: area under the curve (AUC) = 0.75 для каспазы-1 (95% доверительный интервал (ДИ): 0.5369–0.9631; чувствительность – 85%; специфичность – 50%) и AUC = 0.9975 для ASC (95% ДИ: 0.9914–1.004; чувствительность – 100%; специфичность – 96%) [133]. Lu и соавт. наблюдали пиковые концентрации IL-1 β и NLRP3 в крови через 24 ч после дебюта ИИ, кроме того, уровень IL-1 β коррелировал с размером очага ишемического повреждения головного мозга, а уровень NLRP3 – с тяжестью неврологического дефицита по шкале инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) [134]. При исследовании состава тромбов, извлеченных при механической тромбоэкстракции (МТЭ) из окклюзированных сосудов пациентов с ИИ, выявлено более высокое содержание каспазы-1, ASC, IL-1 β по сравнению с их концентрацией в плазме как у пациентов с ИИ, так и у здоровых добровольцев [135]. Присутствие в тромботических массах каспазы-1 и ASC было ассоциировано с наличием в них цитруллинированного гистона H3 – маркера нетоза, что может говорить об индукции инфламмасомой NLRP3 этого процесса, принимающего ключевую роль в тромбообразовании. Более того, повышенное содержание IL-1 β в тромбе было связано с большим количеством проходов, необходимых для достижения полной реканализации, а следовательно, и с меньшей эффективностью МТЭ [135].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что NLRP3 инфламмосома играет важную роль при постишемических повреждениях головного мозга. Митохондриальная дисфункция и нарушение ионного баланса являются одними из важнейших факторов, влияющих на активацию указанной инфламмосомы. АФК участвуют в TXNIP-опосредованной активации NLRP3 инфламмосомы, могут усиливать экспрессию NLRP3 и запускать первый этап активации путем деубиквитинирования NLRP3. Кардиолипид способен активировать NLRP3 инфламмосому, взаимодействуя напрямую или при участии АФК. Нарушение баланса ионов Ca^{2+} , K^{+} , а также связанные с этим эффекты также ведут к активации NLRP3 инфламмосомы и усилению повреждения. В то же время митофагия, Nrf2 оказывают нейропротекторное действие, подавляя NLRP3-опосредованное воспаление при ИИ. Для уточнения роли MAM, Mfn2, SHP2 в активации NLRP3 инфламмосомы при ИИ требуются дальнейшие исследования.

Наряду с этим клинические данные демонстрируют возможность использования белковых компонентов инфламмосомы NLRP3 в качестве биомаркеров для расчета риска развития, диагностики, прогнозирования исхода и эффективности терапии ИИ.

Понимание молекулярных механизмов развития NLRP3-опосредованного воспаления может способствовать открытию новых важных терапевтических мишеней и созданию принципиально новых фармакологических агентов для профилактики и лечения ИИ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (С.Д.К.), сбор данных (С.Д.К., Е.М.К.), обработка данных (С.Д.К., Е.М.К.), написание и редактирование манускрипта (С.Д.К., Е.М.К., Е.В.У.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта РНФ «Разработка прецизионного метода прогнозирования развития геморрагической трансформации после системной тромболитической терапии ишемического инсульта путем оценки активности нейровоспаления», соглашение № 23–25–00342 от 17.01.2023 г. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capirossi C, Laiso A, Renieri L, Capasso F, Limbucci N (2023) Epidemiology, organization, diagnosis and treatment of acute ischemic stroke. Eur J Radiol Open 11: 100527. <https://doi.org/10.1016/j.ejro.2023.100527>
2. Толпыгина СН, Чернышева МИ, Загребельный АВ, Воронина ВП, Кутишенко НП, Дмитриева НА, Лерман ОВ, Лукина ЮВ, Лукьянов ММ, Окишина ЕЮ, Парсаданян НЭ, Марцевич СЮ, Драпкина ОМ (2023) Врачебное наблюдение и отдаленная выживаемость больных, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, в регистре РЕГИОН-М. Рос кардиол журн 28: 5463. [Tolpygina SN, Chernysheva MI, Zagrebelny AV, Voronina VP, Kutishenko NP, Dmitrieva NA, Lerman OV, Lukina YuV, Lukyanov MM, Okshina EYu, Parsadanyan NE, Martsevich SYu, Drapkina OM (2023) Medical follow-up and long-term survival of patients with cerebrovascular accident: data from the REGION-M registry. Ros kardiolog zhurn 28(8): 5463. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2023-5463>

3. *GBD2016 Neurology Collaborators* (2019) Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18: 459–480.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
4. *Feigin VL, Nguyen G, Cercy K, Johnson CO, Alam T, Parmar PG, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abeje AN, Abyu GY, Ademi Z, Agarwal G* (2018) Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med* 379: 2429–2437.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804492>
5. *Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF* (2018) Heart disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137: e67–e492.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>
6. *Mandalaneni K, Rayi A, Jillella DV* (2023) Stroke Reperfusion Injury. *Treasure Island (FL)*.
7. *Feske SK* (2021) Ischemic Stroke. *Am J Med* 134: 1457–1464.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2021.07.027>
8. *Ma C, Liu S, Zhang S, Xu T, Yu X, Gao Y, Zhai C, Li C, Lei C, Fan S, Chen Y, Tian H, Wang Q, Cheng F, Wang X* (2018) Evidence and perspective for the role of the NLRP3 inflammasome signaling pathway in ischemic stroke and its therapeutic potential (Review). *Int J Mol Med* 42: 2979–2990.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3911>
9. *Woodruff TM, Thundiyil J, Tang S-C, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV* (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6: 11.
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-11>
10. *Van Putten MJAM, Fahlke C, Kafitz KW, Hofmeijer J, Rose CR* (2021) Dysregulation of Astrocyte Ion Homeostasis and Its Relevance for Stroke-Induced Brain Damage. *Int J Mol Sci* 22(11): 5679.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115679>
11. *Li H-Q, Xia S-N, Xu S-Y, Liu P-Y, Gu Y, Bao X-Y, Xu Y, Cao X* (2021) γ -Glutamylcysteine Alleviates Ischemic Stroke-Induced Neuronal Apoptosis by Inhibiting ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2021: 2961079.
<https://doi.org/10.1155/2021/2961079>
12. *Pawluk H, Woźniak A, Grzešek G, Kołodziejewska R, Kozakiewicz M, Kopkowska E, Grzechowiak E, Kozera G* (2020) The Role of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Pathogenesis of Ischemic Stroke. *Clin Interv Aging* 15: 469–484.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S233909>
13. *Nian K, Harding IC, Herman IM, Ebong EE* (2020) Blood-Brain Barrier Damage in Ischemic Stroke and Its Regulation by Endothelial Mechanotransduction. *Front Physiol* 11: 605398.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.605398>
14. *Arias E, Nadkarni N, Fang R, Haynes M, Batra A, Muller W, Sullivan D* (2022) Inhibition of PECAM-1 Significantly Delays Leukocyte Extravasation into the Subcortex Post-Stroke. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 36 Suppl 1.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R5646>
15. *Famakin BM* (2014) The Immune Response to Acute Focal Cerebral Ischemia and Associated Post-stroke Immunodepression: A Focused Review. *Aging Dis* 5: 307–326.
<https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500307>
16. *Eitelmann S, Everaerets K, Petersilie L, Rose CR, Stephan J* (2023) Ca^{2+} -dependent rapid uncoupling of astrocytes upon brief metabolic stress. *Front Cell Neurosci* 17.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1151608>
17. *Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, Bitto A, Crea G, Pisani A, Squadrito F, Trichilo V, Bruschetta D, Micali A, Altavilla D* (2016) ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 2183026.
<https://doi.org/10.1155/2016/2183026>
18. *Hu X, De Silva TM, Chen J, Faraci FM* (2017) Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res* 120: 449–471.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427>
19. *Cuartero MI, Ballesteros I, Lizasoain I, Moro MA* (2015) Complexity of the cell-cell interactions in the innate immune response after cerebral ischemia. *Brain Res* 1623: 53–62.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.047>
20. *Zhou W, Chen C, Chen Z, Liu L, Jiang J, Wu Z, Zhao M, Chen Y* (2018) NLRP3: A Novel Mediator in Cardiovascular Disease. *J Immunol Res* 2018: 5702103.
<https://doi.org/10.1155/2018/5702103>

21. *Chen X, He W-T, Hu L, Li J, Fang Y, Wang X, Xu X, Wang Z, Huang K, Han J* (2016) Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res* 26: 1007–1020.
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.100>
22. *Fann DY-W, Lee SY, Manzanero S, Tang SC, Gelderblom M, Chunduri P, Bernreuther C, Glatzel M, Cheng YL, Thundiyil J, Widiapradja A, Lok KZ, Foo SL, Wang YC, Li YI, Drummond GR, Basta M, Magnus T, Jo DG, Mattson MP, Sobey CG, Arumugam TV* (2013) Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis* 4: e790.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2013.326>
23. *Martinon F, Burns K, Tschopp J* (2002) The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Mol Cell* 10: 417–426.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
24. *Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y* (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19: 477–489.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
25. *Takeuchi O, Akira S* (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–820.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
26. *Janeway CAJ* (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13: 11–16.
[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90198-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90198-G)
27. *Liston A, Masters SL* (2017) Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nat Rev Immunol* 17: 208–214.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.151>
28. *Karasawa T, Takahashi M* (2017) Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 24: 443–451.
<https://doi.org/10.5551/jat.RV17001>
29. *Zindel J, Kubes P* (2020) DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol* 15: 493–518.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>
30. *Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R* (2020) DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 20: 95–112.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>
31. *Feng Y-S, Tan Z-X, Wang M-M, Xing Y, Dong F, Zhang F* (2020) Inhibition of NLRP3 Inflammasome: A Prospective Target for the Treatment of Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci* 14: 155.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00155>
32. *Alishahi M, Farzaneh M, Ghaedrahmati F, Nejabatdoust A, Sarkaki A, Khoshnam SE* (2019) NLRP3 inflammasome in ischemic stroke: As possible therapeutic target. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc* 14: 574–591.
<https://doi.org/10.1177/1747493019841242>
33. *Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G* (2013) K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38: 1142–1153.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
34. *Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J* (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11: 136–140.
<https://doi.org/10.1038/ni.1831>
35. *Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E* (2016) Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun* 7: 10555.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10555>
36. *Zhang T, Ding S, Wang R* (2021) Research Progress of Mitochondrial Mechanism in NLRP3 Inflammasome Activation and Exercise Regulation of NLRP3 Inflammasome. *Int J Mol Sci* 22.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910866>
37. *Boutin H, LeFevre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ* (2001) Role of IL-1 α and IL-1 β in ischemic brain damage. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21: 5528–5534.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05528.2001>
38. *Ratajczak MZ, Bujko K, Cymer M, Thapa A, Adamiak M, Ratajczak J, Abdel-Latif AK, Kucia M* (2020) The Nlrp3 inflammasome as a “rising star” in studies of normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 34: 1512–1523.
<https://doi.org/10.1038/s41375-020-0827-8>
39. *Gao L, Dong Q, Song Z, Shen F, Shi J, Li Y* (2017) NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflamm Res* 66: 17–24.
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-0981-7>

40. *Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, Tardivel A, Heuschling P, Dostert C* (2015) NLRP3 Inflammasome Is Expressed and Functional in Mouse Brain Microglia but Not in Astrocytes. *PLoS One* 10: e0130624.
41. *Liu H, Wu X, Luo J, Zhao L, Li X, Guo H, Bai H, Cui W, Guo W, Feng D, Qu Y* (2020) Adiponectin peptide alleviates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating AMPK/GSK-3 β . *Exp Neurol* 329: 113302. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113302>
42. *Zhao J, Piao X, Wu Y, Liang S, Han F, Liang Q, Shao S, Zhao D* (2020) Cepharanthine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by reducing NLRP3 inflammasome-induced inflammation and oxidative stress via inhibiting 12/15-LOX signaling. *Biomed Pharmacother* 127: 110151. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110151>
43. *Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F* (2014) NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 34: 660–667. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.242>
44. *Gong Z, Pan J, Shen Q, Li M, Peng Y* (2018) Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Neuroinflammat* 15: 242. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1282-6>
45. *Shi M, Chen J, Liu T, Dai W, Zhou Z, Chen L, Xie Y* (2022) Protective Effects of Remimazolam on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Inhibiting of NLRP3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis. *Drug Des Devel Ther* 16: 413–423. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S344240>
46. *Ye Y, Jin T, Zhang X, Zeng Z, Ye B, Wang J, Zhong Y, Xiong X, Gu L* (2019) Meisoindigo Protects Against Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Regulating Microglia/Macrophage Polarization via TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Front Cell Neurosci* 13: 553. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00553>
47. *Hong P, Li F-X, Gu R-N, Fang Y-Y, Lai L-Y, Wang Y-W, Tao T, Xu S-Y, You Z-J, Zhang H-F* (2018) Inhibition of NLRP3 Inflammasome Ameliorates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Diabetic Mice. *Neural Plast* 2018: 9163521. <https://doi.org/10.1155/2018/9163521>
48. *Liu F, Lu J, Manaenko A, Tang J, Hu Q* (2018) Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging Dis* 9: 924–937. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1126>
49. *Tian H, Chen X, Liao J, Yang T, Cheng S, Mei Z, Ge J* (2022) Mitochondrial quality control in stroke: From the mechanisms to therapeutic potentials. *J Cell Mol Med* 26: 1000–1012. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17189>
50. *He Z, Ning N, Zhou Q, Khoshnam SE, Farzaneh M* (2020) Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* 146: 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005>
51. *Yang Y, Tian Y, Guo X, Li S, Wang W, Shi J* (2021) Ischemia Injury induces mPTP opening by reducing Sirt3. *Neuroscience* 468: 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.003>
52. *Carinci M, Vezzani B, Patergnani S, Ludewig P, Lessmann K, Magnus T, Casetta I, Pugliatti M, Pinton P, Giorgi C* (2021) Different Roles of Mitochondria in Cell Death and Inflammation: Focusing on Mitochondrial Quality Control in Ischemic Stroke and Reperfusion. *Biomedicines* 9(2): 169. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020169>
53. *Chen Y, Zhou Z, Min W* (2018) Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Front Physiol* 9: 1487. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01487>
54. *Meyers AK, Zhu X* (2020) The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells* 9(8): 1808. <https://doi.org/10.3390/cells9081808>
55. *Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN* (2013) The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153: 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.054>
56. *Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S* (2013) Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 14: 454–460. <https://doi.org/10.1038/ni.2550>

57. Elliott EI, Miller AN, Banoth B, Iyer SS, Stotland A, Weiss JP, Gottlieb RA, Sutterwala FS, Casse SL (2018) Cutting Edge: Mitochondrial Assembly of the NLRP3 Inflammasome Complex Is Initiated at Priming. *J Immunol Baltim Md* 200(9): 3047–3052.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701723>
58. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS (2013) Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39: 311–323.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>
59. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335–344.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
60. Kahles T, Kohnen A, Heumueller S, Rappert A, Bechmann I, Liebner S, Wittko IM, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Schroeder K, Brandes RP (2010) NADPH oxidase Nox1 contributes to ischemic injury in experimental stroke in mice. *Neurobiol Dis* 40: 185–192.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.023>
61. Heeba GH, El-Hanafy AA (2012) Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci* 90: 388–395.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.001>
62. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27: 1129–1138.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007>
63. Ochoa CD, Wu RF, Terada LS (2018) ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 63: 18–29.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.002>
64. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358–362.
<https://doi.org/10.1126/science.1207385>
65. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V (2011) Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol Baltim Md* 1950187: 613–617.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100613>
66. Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C, Jo E-K (2021) An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 18: 1141–1160.
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
67. Ren J-D, Wu X-B, Jiang R, Hao D-P, Liu Y (2016) Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide-triggered NLRP3 inflammasome activation in macrophages by targeting the mitochondrial reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1863: 50–55.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2015.10.012>
68. Wang Y, Shi P, Chen Q, Huang Z, Zou D, Zhang J, Gao X, Lin Z (2019) Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *J Mol Cell Biol* 11: 1069–1082.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz020>
69. Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD (2013) Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol Baltim Md* 1950191: 5230–5238.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301490>
70. Du Y, Chen L, Qiao H, Zhang L, Yang L, Zhang P, Wang J, Zhang C, Jiang W, Xu R, Zhang X (2023) Hydrogen-Rich Saline-A Novel Neuroprotective Agent in a Mouse Model of Experimental Cerebral Ischemia via the ROS-NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway In Vivo and In Vitro. *Brain Sci* 13(6): 939.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13060939>
71. Liu X, Zhang X, Ding Y, Zhou W, Tao L, Lu P, Wang Y, Hu R (2017) Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal* 26: 28–43.
<https://doi.org/10.1089/ars.2015.6615>
72. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 287: 36617–36622.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>
73. Peng J, Wang H, Gong Z, Li X, He L, Shen Q, Pan J, Peng Y (2020) Idebenone attenuates cerebral inflammatory injury in ischemia and reperfusion via dampening NLRP3 inflammasome activity. *Mol Immunol* 123: 74–87.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.04.013>

74. Luo T, Zhou X, Qin M, Lin Y, Lin J, Chen G, Liu A, Ouyang D, Chen D, Pan H (2022) Corilagin Restrains NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptosis through the ROS/TXNIP/NLRP3 Pathway to Prevent Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2022: 1652244.
<https://doi.org/10.1155/2022/1652244>
75. Chen D, Dixon BJ, Doycheva DM, Li B, Zhang Y, Hu Q, He Y, Guo Z, Nowrangi D, Flores J, Filippov V, Zhang JH, Tang J (2018) IRE1 α inhibition decreased TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through miR-17-5p after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Neuroinflammat* 15: 32.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1077-9>
76. Yao Y, Hu S, Zhang C, Zhou Q, Wang H, Yang Y, Liu C, Ding H (2022) Ginsenoside Rd attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by exerting an anti-pyroptotic effect via the miR-139-5p/FoxO1/Keap1/Nrf2 axis. *Int Immunopharmacol* 105: 108582.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108582>
77. Cao G, Jiang N, Hu Y, Zhang Y, Wang G, Yin M, Ma X, Zhou K, Qi J, Yu B, Kou J (2016) Ruscogenin Attenuates Cerebral Ischemia-Induced Blood-Brain Barrier Dysfunction by Suppressing TXNIP/NLRP3 Inflammasome Activation and the MAPK Pathway. *Int J Mol Sci* 17.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091418>
78. Liu T, Wang W, Liu M, Ma Y, Mu F, Feng X, Zhang Y, Guo C, Ding Y, Wen A (2020) Z-Guggulsterone alleviated oxidative stress and inflammation through inhibiting the TXNIP/NLRP3 axis in ischemic stroke. *Int Immunopharmacol* 89: 107094.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107094>
79. Arias-Cartin R, Grimaldi S, Arnoux P, Guigliarelli B, Magalon A (2012) Cardiolipin binding in bacterial respiratory complexes: structural and functional implications. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1937–1949.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.005>
80. Ji J, Baart S, Vikulina AS, Clark RS, Anthonymuthu TS, Tyurin VA, Du L, St Croix CM, Tyurina YY, Lewis J, Skoda EM, Kline AE, Kochanek PM, Wipf P, Kagan VE, Bayur H (2015) Deciphering of mitochondrial cardiolipin oxidative signaling in cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 35: 319–328.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.204>
81. Szeto HH, Liu S, Soong Y, Seshan SV, Cohen-Gould L, Manichev V, Feldman LC, Gustafsson T (2017) Mitochondria Protection after Acute Ischemia Prevents Prolonged Upregulation of IL-1 β and IL-18 and Arrests CKD. *J Am Soc Nephrol JASN* 28: 1437–1449.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2016070761>
82. Yabal M, Calleja DJ, Simpson DS, Lawlor KE (2019) Stressing out the mitochondria: Mechanistic insights into NLRP3 inflammasome activation. *J Leukoc Biol* 105: 377–399.
<https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-124R>
83. Gómez-Suaga P, Bravo-San Pedro JM, González-Polo RA, Fuentes JM, Niso-Santano M (2018) ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 9: 337.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0079-3>
84. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, Iglewski M, Chiong M, Simmen T, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Szabadkai G, Lavadero S (2011) Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci* 124: 2143–2152.
<https://doi.org/10.1242/jcs.080762>
85. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221–225.
<https://doi.org/10.1038/nature09663>
86. Spescha RD, Klohs J, Semerano A, Giacalone G, Derungs RS, Reiner MF, Rodriguez Gutierrez D, Mendez-Carmona N, Glanzmann M, Savarese G, Kränkel N, Akhmedov A, Keller S, Mocharla P, Kaufmann MR, Wenger RH, Vogel J, Kulic L, Nitsch RM, Beer JH, Peruzzotti-Jametti L, Sessa M, Lüschner TF, Camici GG (2015) Post-ischaemic silencing of p66Shc reduces ischaemia/reperfusion brain injury and its expression correlates to clinical outcome in stroke. *Eur Heart J* 36: 1590–1600.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv140>
87. Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, Shen Y, Wang R-R, Wang X, Hu W-W, Wang G, Chen Z (2013) Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 9: 1321–1333.
<https://doi.org/10.4161/auto.25132>
88. He Q, Li Z, Meng C, Wu J, Zhao Y, Zhao J (2019) Parkin-Dependent Mitophagy Is Required for the Inhibition of ATF4 on NLRP3 Inflammasome Activation in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Cells* 8(8): 897.
<https://doi.org/10.3390/cells8080897>

89. *Su S-H, Wu Y-F, Lin Q, Wang D-P, Hai J* (2019) URB597 protects against NLRP3 inflammasome activation by inhibiting autophagy dysfunction in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Neuroinflammation* 16: 260.
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1668-0>
90. *Zou X, Xie L, Wang W, Zhao G, Tian X, Chen M* (2020) FK866 alleviates cerebral pyroptosis and inflammation mediated by Drp1 in a rat cardiopulmonary resuscitation model. *Int Immunopharmacol* 89: 107032.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107032>
91. *Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y* (2013) Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(44): 17963–17968.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1312571110>
92. *Nguyen T, Nioi P, Pickett CB* (2009) The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J Biol Chem* 284: 13291.
<https://doi.org/10.1074/JBC.R900010200>
93. *Anandhan A, Nguyen N, Syal A, Dreher LA, Dodson M, Zhang DD, Madhavan L* (2021) NRF2 Loss Accentuates Parkinsonian Pathology and Behavioral Dysfunction in Human α -Synuclein Overexpressing Mice. *Aging Dis* 12: 964–982.
<https://doi.org/10.14336/AD.2021.0511>
94. *Xu X, Zhang L, Ye X, Hao Q, Zhang T, Cui G, Yu M* (2018) Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion. *Inflamm Res* 67: 57–65.
<https://doi.org/10.1007/s00011-017-1095-6>
95. *Yu J, Wang W-N, Matei N, Li X, Pang J-W, Mo J, Chen S-P, Tang J-P, Yan M, Zhang JH* (2020) Ezetimibe Attenuates Oxidative Stress and Neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP Pathway after MCAO in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 4717258.
<https://doi.org/10.1155/2020/4717258>
96. *Hou Y, Wang Y, He Q, Li L, Xie H, Zhao Y, Zhao J* (2018) Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury. *Behav Brain Res* 336: 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.027>
97. *Aoki Y, Huang Z, Thomas SS, Bhide PG, Huang I, Moskowitz MA, Reeves SA* (2000) Increased susceptibility to ischemia-induced brain damage in transgenic mice overexpressing a dominant negative form of SHP2. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 14: 1965–1973.
<https://doi.org/10.1096/fj.00-0105com>
98. *Guo W, Liu W, Chen Z, Gu Y, Peng S, Shen L, Shen Y, Wang X, Feng G-S, Sun Y, Xu Q* (2017) Tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation via ANTI1-dependent mitochondrial homeostasis. *Nat Commun* 8: 2168.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02351-0>
99. *Schäfer MKE, Pfeiffer A, Jaeckel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A* (2014) Regulators of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in cerebral ischemia. *Cell Tissue Res* 357: 395–405.
<https://doi.org/10.1007/s00441-014-1807-y>
100. *Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu S-Y, Dejean LM* (2011) Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta* 1813: 616–622.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.013>
101. *Missirotti S, Patergnani S, Caroccia N, Pedriali G, Perrone M, Prevati M, Wieckowski MR, Giorgi C* (2018) Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis* 9: 329.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0027-2>
102. *Korff S, Riechert N, Schoensiegel F, Weichenhan D, Autschbach F, Katus HA, Ivandic BT* (2006) Calcification of myocardial necrosis is common in mice. *Virchows Arch Int J Pathol* 448: 630–638.
<https://doi.org/10.1007/s00428-005-0071-7>
103. *Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, Schubert K, Schöneberg T, Schaefer M, Krügel U, Smajilovic S, Bräuner-Osborne H, Baerwald C, Wagner U* (2012) Extracellular Ca^{2+} is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun* 3: 1329.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2339>
104. *Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, Germain RN, Kastner DL, Chae JJ* (2012) The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature* 492: 123–127.
<https://doi.org/10.1038/nature11588>

105. Wang C, Jia Q, Sun C, Jing C (2020) Calcium sensing receptor contribute to early brain injury through the CaMKII/NLRP3 pathway after subarachnoid hemorrhage in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 530: 651–657.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.081>
106. Pan T, Zhu Q-J, Xu L-X, Ding X, Li J-Q, Sun B, Hua J, Feng X (2020) Knocking down TRPM2 expression reduces cell injury and NLRP3 inflammasome activation in PC12 cells subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neural Regen Res* 15: 2154–2161.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.282271>
107. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP (2013) The complement membrane attacks complex triggers intracellular Ca^{2+} fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci* 126: 2903–2913.
<https://doi.org/10.1242/jcs.124388>
108. Chang Y-Y, Jean W-H, Lu C-W, Shieh J-S, Chen M-L, Lin T-Y (2020) Nicardipine Inhibits Priming of the NLRP3 Inflammasome via Suppressing LPS-Induced TLR4 Expression. *Inflammation* 43: 1375–1386.
<https://doi.org/10.1007/s10753-020-01215-y>
109. Ismael S, Patrick D, Salman Mohd, Parveen A, Stanfill AG, Ishrat T (2022) Verapamil inhibits TXNIP-NLRP3 inflammasome activation and preserves functional recovery after intracerebral hemorrhage in mice. *Neurochem Int* 161: 105423.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105423>
110. Yu SP (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol* 70: 363–386.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00090-x)
111. Song M, Yu SP (2014) Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 5: 17–27.
<https://doi.org/10.1007/s12975-013-0314-x>
112. Tapia-Abellán A, Angosto-Bazarra D, Alarcón-Vila C, Baños MC, Hafner-Bratkovič I, Oliva B, Pelegrín P (2021) Sensing low intracellular potassium by NLRP3 results in a stable open structure that promotes inflammasome activation. *Sci Adv* 7: eabf4468.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abf4468>
113. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14: 1583–1589.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>
114. Silverman WR, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 284: 18143–18151.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.004804>
115. Purohit R, Bera AK (2021) Pannexin 1 plays a pro-survival role by attenuating P2X7 receptor-mediated Ca^{2+} influx. *Cell Calcium* 99: 102458.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102458>
116. Gulbransen BD, Bashashati M, Hirota SA, Gui X, Roberts JA, MacDonald JA, Muruve DA, McKay DM, Beck PL, Mawe GM, Thompson RJ, Sharkey KA (2012) Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nat Med* 18: 600–604.
<https://doi.org/10.1038/nm.2679>
117. Bhattacharya A, Jones DNC (2018) Emerging role of the P2X7-NLRP3-IL1 β pathway in mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 98: 95–100.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.08.015>
118. Butt AM (2011) ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. *Semin Cell Dev Biol* 22: 205–213.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.02.023>
119. Illes P, Verkhratsky A, Burnstock G, Franke H (2012) P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 18: 422–438.
<https://doi.org/10.1177/1073858411418524>
120. Schädlich IS, Winzer R, Stabernack J, Tolosa E, Magnus T, Rissiek B (2023) The role of the ATP-adenosine axis in ischemic stroke. *Semin Immunopathol* 45: 347–365.
<https://doi.org/10.1007/s00281-023-00987-3>
121. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S (2017) The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47: 15–31.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>

122. Ye X, Shen T, Hu J, Zhang L, Zhang Y, Bao L, Cui C, Jin G, Zan K, Zhang Z, Yang X, Shi H, Zu J, Yu M, Song C, Wang Y, Qi S, Cui G (2017) Purinergic 2X7 receptor/NLRP3 pathway triggers neuronal apoptosis after ischemic stroke in the mouse. *Exp Neurol* 292: 46–55.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.002>
123. Liang J, Han R, Zhou B (2021) Metabolic Reprogramming: Strategy for Ischemic Stroke Treatment by Ischemic Preconditioning. *Biology* 10(5): 424.
<https://doi.org/10.3390/biology10050424>
124. Hu H-J, Song M (2017) Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* 26: 2706–2719.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.011>
125. Edye ME, Lopez-Castejon G, Allan SM, Brough D (2013) Acidosis drives damage-associated molecular pattern (DAMP)-induced interleukin-1 secretion via a caspase-1-independent pathway. *J Biol Chem* 288: 30485–30494.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478941>
126. Rajamäki K, Nordström T, Nurmi K, Åkerman KEO, Kovanen PT, Öörni K, Eklund KK (2013) Extracellular Acidosis Is a Novel Danger Signal Alerting Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem* 288: 13410–13419.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426254>
127. Xiong Z-G, Zhu X-M, Chu X-P, Minami M, Hey J, Wei W-L, MacDonald JF, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ, Simon RP (2004) Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118: 687–698.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.026>
128. Alvarez de la Rosa D, Krueger SR, Kolar A, Shao D, Fitzsimonds RM, Canessa CM (2003) Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 546: 77–87.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.030692>
129. Pignataro G, Simon RP, Xiong Z-G (2007) Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain J Neurol* 130: 151–158.
<https://doi.org/10.1093/brain/awl325>
130. Li M, Inoue K, Branigan D, Kratzer E, Hansen JC, Chen JW, Simon RP, Xiong Z-G (2010) Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 30: 1247–1260.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.30>
131. De Rivero Vaccari JP, Cyr B (2023) Chapter 18 – The inflammasome in stroke. *Inflammasome Biology*. Academ Press. 275–290.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91802-2.00030-X>
132. Lv J, Jiang X, Zhang J, Peng X, Lin H (2020) Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NLRP3 and CARD8 confer risk of ischemic stroke in men. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 29: 104874.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104874>
133. Kerr N, García-Contreras M, Abbassi S, Mejias NH, Desousa BR, Ricordi C, Dietrich WD, Keane RW, de Rivero Vaccari JP (2018) Inflammasome Proteins in Serum and Serum-Derived Extracellular Vesicles as Biomarkers of Stroke. *Front Mol Neurosci* 11: 309.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00309>
134. Lu D, Hu M, Zhang B, Lin Y, Zhu Q, Men X, Lu Z, Cai W (2021) Temporal and Spatial Dynamics of Inflammasome Activation After Ischemic Stroke. *Front Neurol* 12: 621555.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.621555>
135. Chen SH, Scott XO, Ferrer Marcelo Y, Almeida VW, Blackwelder PL, Yavagal DR, Peterson EC, Starke RM, Dietrich WD, Keane RW, de Rivero Vaccari JP (2021) Netosis and Inflammasomes in Large Vessel Occlusion Thrombi. *Front Pharmacol* 11: 607287.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.607287>

The Role of NLRP3 Inflammasome in the Pathogenesis of Ischemic Stroke

S. D. Kazakov^{a,*}, E. M. Kamenskih^a, and E. V. Udut^a

^aSiberian State Medical University, Tomsk, Russia

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

Ischemic stroke (IS) is a prevalent condition with high mortality and disability risks worldwide. As of now, the issue of pathogenetic therapy remains unresolved due to the limited effectiveness and safety of reperfusion measures. Recent research has elucidated that neuroinflammation plays a pivotal role in IS development and may serve as a therapeutic target. The NLRP3 inflammasome emerges as a key mediator orchestrating post-ischemic inflammatory reactions through the activation of caspase-1, which cleaves pro-interleukin-1 beta and -18 precursors into active proinflammatory cytokines released into the extracellular milieu. This review presents insights into the structure and activation process of the NLRP3 inflammasome in IS. Factors and mechanisms contributing to both its activation and inhibition are delineated.

Keywords: stroke, ischemia, neuroinflammation, immunity, inflammasome

ОБЗОРЫ

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В МОДЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦНС
НА ПРИМЕРЕ РЫБ ЗЕБРАДАНИО

© 2024 г. Л. В. Юшко^{1, 2, 3}, А. Д. Шевляков^{1, 4}, М. А. Ромазева⁴, К. В. Апухтин⁴,
А. Д. Волгин⁴, Д. А. Абрамов⁴, М. М. Котова⁴, А. В. Калуев^{1, 2, 3, 4, 5, *}

¹ Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины»,
Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-
Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-
технологический университет «Сирius», Федеральная территория Сирius, Россия

⁵ НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

* E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 21.01.2024 г.

После доработки 07.04.2024 г.

Принята к публикации 12.04.2024 г.

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции экспрессии генов. Нарушения этого процесса в мозге вызывают различные заболевания, включая аутизм, шизофрению и депрессию. Являясь перспективным модельным организмом в биомедицине, рыбы зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish) обладают генетической и отчасти физиологической гомологией с человеком, и поэтому изучение нарушений метилирования ДНК в их геноме может прояснить патогенез ряда неврологических заболеваний человека и, возможно, разработать новые подходы к их терапии. В статье обсуждаются механизмы метилирования ДНК в мозге, заболевания, связанные с его нарушениями, а также генетические и фармакологические модели на примере зебраданио. В работе рассмотрены ограничения применения этого вида рыб и новые направления дальнейших исследований в данной области. Приведенные сведения указывают на ценность зебраданио как эффективной модели для изучения молекулярных процессов, лежащих в основе патогенеза заболеваний мозга, связанных с нарушениями метилирования ДНК.

Ключевые слова: эпигенетическая регуляция, метилирование ДНК, мозг, зебраданио

DOI: 10.31857/S0869813924050022, **EDN:** BLRINU

ВВЕДЕНИЕ

Эпигенетическая регуляция, в том числе метилирование ДНК, является важнейшим процессом для нормальной жизнедеятельности организма [1]. Метилирование ДНК непосредственно влияет на экспрессию генов, функцию регуляторных элементов и стабильность хроматина и играет важную роль в дифференцировке клеток и специ-

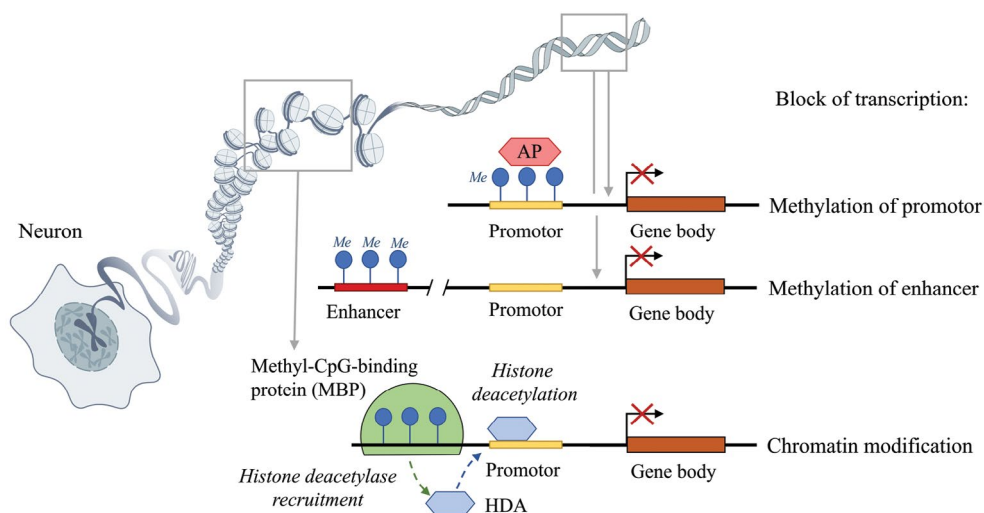


Рис. 1. Основные механизмы контроля транскрипции генов путем метилирования ДНК.

На двух верхних примерах показано ингибирование транскрипции за счет препятствия взаимодействию факторов транскрипции с промотерной и энхансерной областями гена соответственно. При метилировании промотера происходит привлечение активирующего белка (AP), который не позволяет факторам транскрипции связываться с последовательностью промотера. Пример снизу отражает взаимодействие метил-CpG-связывающего белка (MBP) с областью, обогащенной метилированными CpG сайтами. После связывания MBP с последовательностью ДНК происходит привлечение деацетилаз гистонов (HDA), которые осуществляют деацетилирование гистонов, приводя к конденсации хроматина на данном участке и закрытию промотеров для связывания транскрипционных факторов, что, в свою очередь, выключает экспрессию гена.

ализации тканей в эмбриогенезе, в том числе в центральной нервной системе (ЦНС), (рис. 1). Метилирование ДНК эукариот осуществляется путем присоединения метильной группы к цитозину (C) в 5-й позиции в тех участках ДНК, где за ним следует гуанин (G) – так называемых CpG-сайтах, которые с высокой частотой встречаются в геномных областях (CpG-островках), локализованных в районе промотеров генов [1]. Нарушения метилирования ДНК – как его гипер-, так и гипометилирование, связаны с различными заболеваниями ЦНС, включая аутизм, шизофрению, биполярное расстройство и депрессию [1] (табл. 1). Однако молекулярные механизмы метилирования ДНК и его роль в их патогенезе по-прежнему остаются малоизученными. Экспериментальные животные модели являются важным инструментом для изучения патологических процессов на разных системных уровнях, в частности, с использованием высокотрансляционных модельных организмов, прежде всего грызунов и приматов.

Наряду с лабораторными млекопитающими в последние годы большую популярность в качестве эффективной трансляционной модельной системы приобрела пресноводная костистая рыба зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish) [2]. Широкое применение зебраданио в нейробиологических исследованиях продиктовано рядом их биологических особенностей, включая достаточно сходную с человеком физиологию ЦНС [2], быстрое развитие, высокую плодовитость, развитие вне материнского организма, прозрачность эмбриона, сходные с млекопитающими ответы на лекарственные препараты

и легкость их введения рыбам путем иммерсии [3, 4]. Зебраданию легко подвергаются генетическим манипуляциям, и на их основе созданы мутации, вызывающие дефекты различных систем органов, сходные с патологиями человека [5]. К настоящему моменту геном зебраданию полностью картирован и секвенирован [6], обнаруживая довольно высокую генетическую гомологию с человеком (порядка 70%) [7]. Более 80% генов человека, связанных с заболеваниями, имеют по крайней мере один ортолог у рыб зебраданию, 69% из которых составляют линейно гомологичные гены [8], а среди ортологичных генов 47% имеют однозначную связь с ортологом зебраданию [5]. Наличие ортологов, связанных с заболеваниями человека, обеспечивает возможность исследования ключевых путей экспрессии этих генов и их нижестоящих мишеней [9]. Совокупность этих и других полезных характеристик позволяет использовать зебраданию как эффективную модель для изучения роли метилирования ДНК в функционировании ЦНС.

Таблица 1. Примеры заболеваний мозга человека, ассоциированных с нарушениями метилирования ДНК

Болезнь	Нарушение МГ	Основные клинические симптомы
Аутизм	Гиперметилирование генов метил-СpG-связывающего белка 3 (<i>MECP2</i>) и убиквитин-протеин-лигазы E3A (<i>UBE3A</i>)	Социальный дефицит, стереотипии, когнитивные дисфункции
Шизофрения	Гипометилирование промотора гена глутамат-декарбоксилазы (<i>GAD1</i>), гиперметилирование промоторов генов катехол-О-метилтрансферазы (<i>COMT</i>) и нейротрофического фактора мозга (<i>BDNF</i>), гиперметилирование гена Sry-Box транскрипционного фактора 10 (<i>SOX10</i>)	Гипо- и гиперактивность, притупление эмоций, замкнутость, агрессивность
Депрессия	Гипометилирование гена синапсина II (<i>SYN2</i>), гиперметилирование промотора BDNF	Апатия, подавленность настроения, ангедония, пессимизм, усталость, нарушение сна
Биполярное расстройство	Гиперметилирование генов рецептора аутокринного фактора подвижности (<i>AMFR</i>), рецептора BDNF TrkB (<i>NTRK2</i>) и субъединицы 1 глутаматного ионотропного рецептора NMDA (<i>GRIN1</i>), гипометилирование генов члена семейства кинезинов 18A (<i>KIF18A</i>), StAR-связанного белка-переносчика липидов 9 (<i>STARD9</i>), легкой цепи кинезина 3 (<i>KLC3</i>) и тяжелой цепи 17 аксонемного динеина (<i>DNAH17</i>)	Циклические изменения настроения, гипо- и гиперактивность, возбужденность

Проведение генетических исследований на рыбах несколько осложняется тем, что предки современных зебрании подверглись дополнительному циклу дупликации всего генома, характерного для костных рыб [5]. В результате этого зебрании обладают 26206 кодирующими генами, что больше, чем у любого другого ранее секвенированного позвоночного. В геноме зебрании больше видоспецифичных генов, чем у человека и мыши, что также является следствием дупликации [10], а дублированные гены кодируют потенциально более разнообразные и специфические для зебрании белки [11]. С другой стороны, проведение генетических модификаций у данных рыб является гораздо более простым и доступным по сравнению с грызунами [12].

На данном этапе развития генетики уже существуют ключевые инструменты для редактирования генома зебрании, среди которых особый интерес представляют нуклеазы цинкового пальца (ZFNs), TAL-эффекторнe нуклеазы (TALENs) и кластеризованные регуляторные короткие палиндромные повторы (CRISP/Cas9), позволяющие индуцировать таргетные мутации генома [13]. В настоящее время применение таких технологий позволило создать генетические модели зебрании с мутациями, характерными для различных заболеваний ЧНС. К их числу относятся модели болезни Паркинсона, созданные путем нокаута гена *PINK1*, периферической невропатии и доминантной атрофии зрительного нерва, эти модели создавались путем нокаута генов *MFN2* и *KIF5A*, синдрома Ли с мутацией в гене *COA6*, синдрома Драве с мутацией *SCN1A*, синдрома Костеффа с мутацией в гене *OPA3*, а также врожденного миостенического синдрома или тяжелой комбинированной D-2- и L-2-гидроксиглутаровой ацидурии с мутацией в гене *SLC25A1* [14]. Таким образом, на основе рыб зебрании созданы генетические модели, которые успешно используются для исследования молекулярных механизмов патогенеза различных заболеваний мозга человека, разработки новых терапевтических подходов и проведения доклинических испытаний.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КАК МЕХАНИЗМ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОМА

Роль эпигенетических механизмов в многоклеточных организмах сводится к модуляции профилей экспрессии генов в клетках и тканях [15]. К основным эпигенетическим процессам относятся метилирование и деметилирование ДНК, ацетилирование и деацетилирование гистонов, а также фосфорилирование и дефосфорилирование транскрипционных факторов [16]. В отличие от ацетилирования (облегчающего процесс транскрипции), метилирование ДНК может как индуцировать, так и ингибировать транскрипцию генов в зависимости от количества присоединяемых метильных групп (рис. 1, 2). Так, присоединение одной группы приводит к ослаблению притяжения между генетической последовательностью ДНК и гистонами и увеличению транскрипции, тогда как присоединение 2–3 метильных групп влечет за собой блокировку участка ДНК и репрессию генов [17].

Специфические ферменты, которые катализируют, распознают и удаляют метилирование ДНК, подразделяются на несколько групп (табл. 2). Записывающие ферменты катализируют добавление метильных групп к остаткам цитозина, стирающие – модифицируют или удаляют метильную группу, а считывающие – распознают метильные группы и связываются с ними, оказывая влияние на экспрессию генов [18]. Метилирование ДНК эукариот катализируется семейством ДНК-метилтрансфераз (Dnmts), которые представляют собой записывающие ферменты. Три таких фермента (Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b) активны в процессе эмбриогенеза [17]. Dnmt3a и Dnmt3b, известные как *de novo* Dnmt, могут устанавливать новый паттерн метилирования немодифицированной ДНК. В экспериментах *in vivo* показана решающая роль Dnmt3b на ранних стадиях развития, а Dnmt3a – для нормальной клеточной дифференциации [17] (рис. 1 и 2).

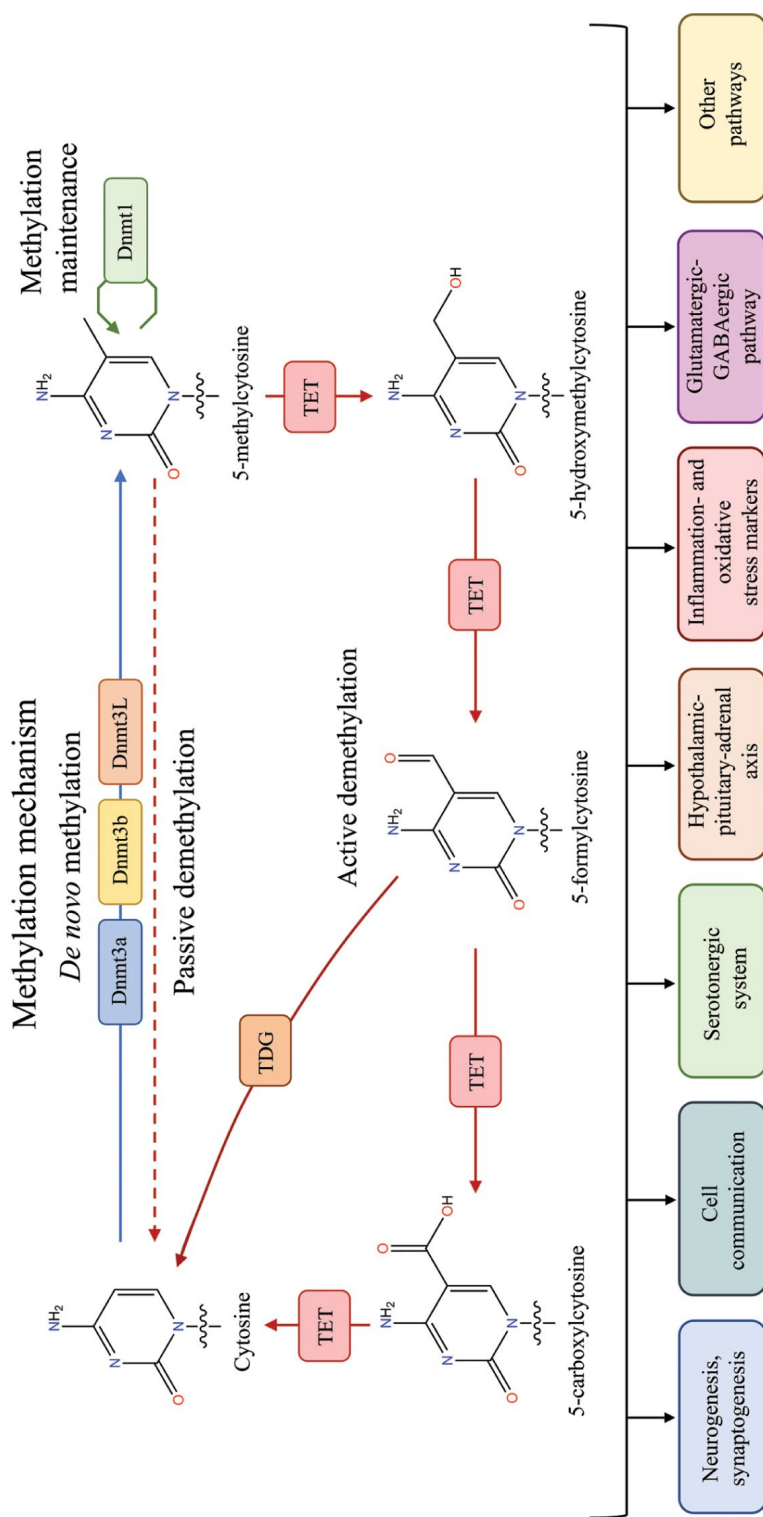


Рис. 2. Роль метилирования и деметилирования ДНК в процессах регуляции функций нервной ткани.

Нативный цитозин подвергается метилированию за счет действия трех основных метилтрансфераз: Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L. При этом непрерывный процесс метилирования поддерживается Dnmt1. Пассивный процесс деметилирования осуществляется путем воздействия внешних факторов. Процесс активного деметилирования производят TET-метилцитозин-диоксигеназы (TET) и тимин-ДНК-глицозилаза (TDC), (см. также табл. 2).

Таблица 2. Ферменты метилирования и деметилирования ДНК у грызунов и зебраданио (см. также рис. 1, 2)

Фермент	Основная биологическая роль
DNMTs (ДНК-метилтрансферазы)	Катализ передачи метильной группы на цитозиновые основания ДНК, образуя 5-метилцитозин. У грызунов и зебраданио имеются несколько видов ДНК-метилтрансфераз, включая DNMT1, DNMT3A и DNMT3B
TET (Тет-метилцитозин-диоксигеназы)	Деметилирование ДНК путем окисления 5-метилцитозина, преобразуя его последовательно в гидроксиметилцитозин, формильцитозин и карбоксилцитозин
Другие ферменты – деметилазы	Активное (независимое от репликации) деметилирование ДНК при действии тимин-ДНК-гликозилазы (TDG), которая запускает репарацию и по ее результатам деметилирование ДНК
Methyl-binding proteins, MBP (methyl-CpG- binding domain proteins, MBD, метил-связывающие белки)	Связывание с метилированными CpG-островами на ДНК и подавление транскрипции генов (белки MBD1, MBD2 и MBD4)
Gadd45 (growth arrest and DNA damage-inducible 45, индуцируемый ДНК-повреждением белок задержки роста 45)	Белки, активируемые стресс-сигналами и участвующие в деметилировании ДНК. Могут взаимодействовать с TET-ферментами и способствовать деметилированию 5-метилцитозина

Dnmt1 является одним из наиболее изученных ферментов данного семейства. Он копирует паттерн метилирования ДНК из родительской нити ДНК на вновь синтезируемую дочернюю нить, таким образом участвуя в репликации ДНК, а при эмбриональном развитии контролирует дифференцировку и деление клеток [19]. Dnmt3L экспрессируется на ранних этапах развития и не выполняет каталитическую функцию самостоятельно, а связывается с Dnmt3a и Dnmt3b, стимулируя их метилтрансферазную активность и изменяя глобальную экспрессию РНК генов, участвующих в дифференцировке нейронов [20, 21]. Синтез Dnmt3L подавляется во время последней и в постнатальном мозге человека не наблюдается [22]. Экспрессия Dnmt снижается к моменту терминальной дифференцировки большинства клеток в эмбриогенезе, однако нейроны в мозге взрослых млекопитающих продолжают экспрессировать Dnmts, указывая на важность метилирования ДНК для работы мозга в течение всего онтогенеза [23].

К классу считывающих ферментов относятся MBD (табл. 1), убиквитин-подобные белки UHRF (см. далее) и белки, содержащие мотив цинковых пальцев Cys2His2 (C2H2). Все они обладают высоким сродством к 5-метилцитозину и ингибируют связывание факторов транскрипции [24]. Белки семейства MBD содержат консервативный метил-СрG-связывающий домен, который обеспечивает высокое сродство с единичными метилированными СрG-сайтами. Белки этого семейства экспрессируются в головном мозге млекопитающих больше, чем в любой другой ткани, и важны для нормального развития и функционирования нейронов. В данное семейство входят MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4. Кроме основной роли в репрессии транскрипции, они также участвуют в поддержании метилирования ДНК [24]. Убиквитин-подобные белки представлены UHRF1 и UHRF2 – мультидоменными белками, которые связываются с полуметилированной ДНК во время S-фазы и рекрутируют ДНК-метилтрансферазу DNMT1 для регуляции структуры хроматина и экспрессии генов [25]. В процессе эмбрионального развития структура метилирования ДНК в геноме динамически изменяется в результате как ее метилирования *de novo*, так и деметилирования.

Дифференцированные клетки вырабатывают стабильный и уникальный паттерн метилирования ДНК, который регулирует тканеспецифичную транскрипцию генов. При этом активность нейронов может модулировать паттерн метилирования ДНК в ответ на физиологические стимулы и воздействие окружающей среды и передаваться по наследству [26]. Так, описаны различия в паттернах метилирования ДНК у народов, исконно ведущих кочевой образ жизни, для которых характерно гипометилирование промоторных частей гена *PM20D1*, кодирующего белок деления митохондрий и участвующего в клеточной защите от активных форм кислорода и терморегуляции [27].

Накапливаются данные и о важной роли метилирования ДНК в реализации функций мозга. Например, у пациентов с болезнью Паркинсона отмечается изменение метилирования ДНК нейронов черной субстанции в ходе развития депрессивных симптомов [28]. С другой стороны, показана корреляция улучшения ряда когнитивных навыков человека при медитации и метилировании ДНК. В частности, отмечено изменение метилирования генов *SLC1A2* (переносчика возбуждающих аминокислот ЕААТ2, основного транспортера глутамата), *FBXO38* (регулятора убиквитинирования и противоопухолевой активности), *HMP19* (супрессора рака поджелудочной железы), *PPP1R9A* (белка NRB1, который играет ключевую роль в формировании синапсов) и ряда других генов, кодирующих различные по функциям белки в мозге [29].

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ГЕНОМЕ ЗЕБРАДАНИО ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНЕЙ МОЗГА

Зебраданию являются логичной моделью для изучения метилирования ДНК, поскольку основные эпигенетические механизмы эволюционно консервативны у всех позвоночных [30] (рис. 3). На данный момент существуют данные о влиянии метилирования ДНК на развитие нервной системы зебраданию, миелинизацию олигодендроцитов и дифференцировку нервных клеток при развитии нервной трубки (снижение метилирования ДНК и гиперацетилирование *H3K27* под воздействием морфина) [31]. Также показана зависимость метилирования ДНК и нейропротекции, нейропластичности (снижение выработки нейротрофина BDNF под воздействием морфина), пролиферации нейронных предшественников (в результате дисфункции лизин(К)-метилтрансферазы 2A, KMT2A, поддерживающей экспрессию различных генов), а также опухолеобразования в ЦНС зебраданию (в связи с нарушением экспрессии генов *MYCN* и *ALK*, кодирующих протоонкогенный белок N-тус и рецепторную тирозинкиназу соответственно) [31].

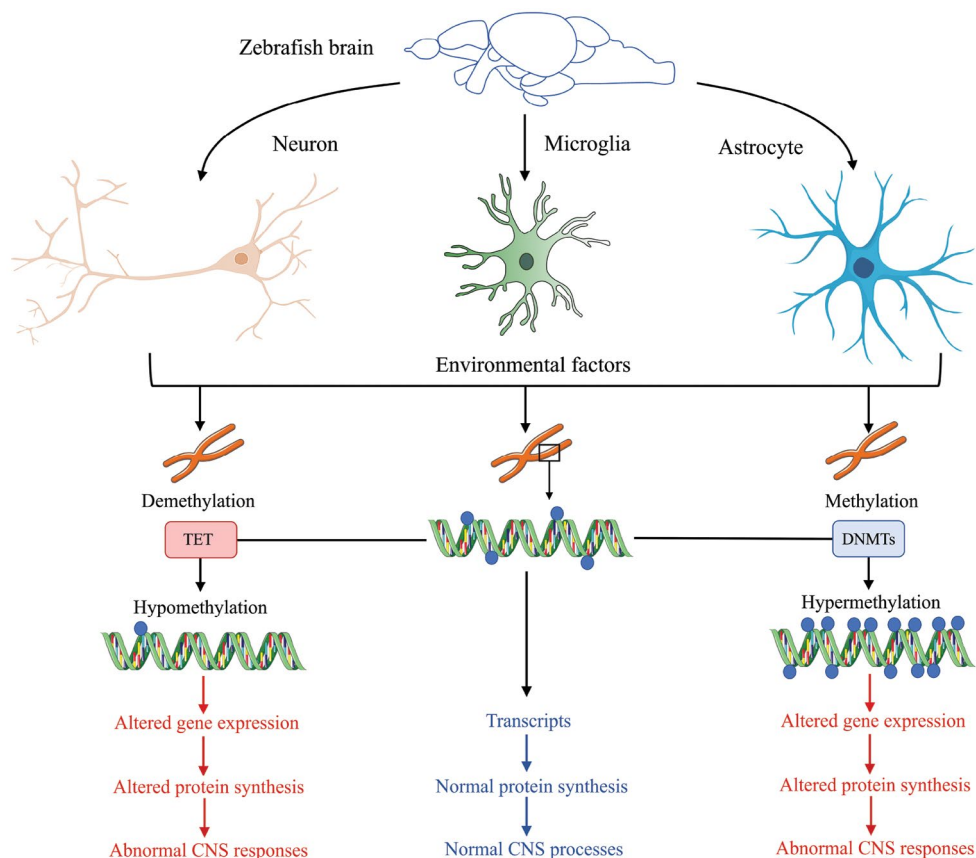


Рис. 3. Воздействие факторов среды на изменение экспрессии генов при метилировании ДНК в основных клеточных типах мозга зебраданио.

TET – Tet-метилцитозин-диоксигеназы, ферменты деметилирования генома; DNMTs – ДНК-метилтрансферазы, ферменты метилирования генома (см. также рис. 1 и 2).

С использованием зебраданио также изучаются нарушения эпигенетических механизмов у потомства, подвергнувшегося, например, воздействию этанола в эмбриогенезе [32], и моделируется тревожно-подобное поведение у рыб с применением полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) [33]. Также на зебраданио был успешно смоделирован фетальный вальпроатный синдром – нарушение развития нервной системы плода под действием ингибитора деацетилаз гистонов вальпроата натрия, симптомы которого напоминают аутизм, а патофизиологические механизмы мало изучены. В частности, был исследован серотонергический дефицит, характерный для данного синдрома и установлена его связь с нарушением пронеурального гена *Ascl1* [34].

Зебраданио активно применяются для изучения роли метилирования ДНК в патогенезе сложных полигенных психических расстройств (см. примеры на рис. 4). Поскольку шизофрения у человека связана с однонуклеотидными полиморфизмами в гене $\beta 2$ субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) типа A (*GABRB2*), проявление шизофренических симптомов (социальная изоляция и нарушение когни-

тивной функции) у зебраданио моделируется введением I-метионина (MET). При этом значительно повышается уровень метилирования ДНК в целом и промотора *gabbrb2* в частности, что повторяет патологическую картину, наблюдаемую *post mortem* в ткани головного мозга пациентов с шизофренией [35]. Также созданы модели нейродегенеративных заболеваний зебраданио, например, фармакологические модели паркинсонизма с применением 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP+) [36], которые показали нарушение эпигенетических механизмов и терапевтическую эффективность транс-2-фенилциклопропиламина, ингибитора ферментов деметилирования гистонов [37].

Группа цитидиндезаминаз AID/APOBEC представляет собой семейство белков, которые способны вносить мутации в ДНК и РНК [38]. AID/APOBEC обеспечивают дезаминирование амина до карбонильной группы и превращение 5-метилцитозина в тимин, что является одним из механизмов активного деметилирования. Моделирование механизма действия комплекса AID/APOBEC на зебраданио продемонстрировало, что избыточная экспрессия AID/APOBEC способствует деметилированию ДНК у рыб, тогда как нокдаун или нокаут ингибирует деметилирование ДНК различных генов, необходимых для клеточного перепрограммирования и развития [39, 40].

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Следует подчеркнуть, что клетки нервной системы, в отличие от других тканей организма, способны изменять паттерн метилирования в ходе развития, что важно для обеспечения процессов обучения и памяти. Поэтому нарушения механизмов метилирования ДНК приводят к нарушениям когнитивной деятельности мозга. Среди заболеваний ЦНС, ассоциированных с нарушением метилирования ДНК (табл. 1), также отмечают синдром Ретта (вызывается мутацией в метил-связывающем белке MeCP2 [41]) и наследственную сенсорную и автономную нейропатию типа 1, которая во взрослом возрасте развивается в деменцию и потерю слуха (результат аутосомно-доминантной мутации в N-концевом регуляторном домене Dnmt1 [42]). Также с нарушениями метилирования ДНК связаны синдром Мартина – Белл или синдром ломкой X-хромосомы (результат аномального метилирования тринуклеотидного повтора в гене *FMR1* на хромосоме X, который является распространенной формой умственной отсталости [43]), а также синдромы Прадера – Вилли и Ангельмана, которые возникают в результате неправильного метилирования импринтированного аллеля и проявляются в виде значительных психических нарушений [44]. Поскольку неправильная экспрессия или дисфункция даже одного гена влекут за собой значительные нарушения в деятельности мозга, важность понимания механизмов влияния метилирования ДНК на экспрессию генов ЦНС сложно переоценить.

Как уже отмечалось, факторы окружающей среды существенно влияют на эпигенетические механизмы, в том числе метилирования ДНК. Например, модулирующим метилирование ДНК эффектом обладает воздействие наркотических веществ [45, 46], этанола [47], а также ряда лекарственных препаратов [48]. Другим таким средовым фактором является стресс. Например, повышение метилирования промотора глюкокортикоидного рецептора при неонатальном стрессе у мышей, приводящее к снижению его экспрессии, напоминает сходные изменения и у детей, подвергавшихся жестокому обращению [49], а также у пациентов с шизофренией, депрессией и биполярным расстройством [50]. В связи с этим изучение фармакогенной и стресс-индуцированной модуляции метилирования ДНК в мозге зебраданио представляется крайне интересной и перспективной темой.

В целом зебраданио являются ценным трансляционным объектом для моделирования генетических нарушений человека и при этом практически не уступают грызунам в потенциале воспроизведения психических расстройств [51, 52]. Хотя эпигенетические процессы у зебраданио пока еще слабо изучены, применение этих модельных

объектов для исследований эпигенома и его влияния на долгосрочную жизнедеятельность организма имеет значительный потенциал. В первую очередь необходимы исследования эпигенетических механизмов развития нормального мозга зебранию, а именно процессов формирования эпигенома и его влияния на развитие различных типов нейронов, формирование нейронных сетей и функцию мозга в целом в различные периоды жизни организма. Одним из дальнейших направлений является развитие технологий, чувствительных ко всем формам цитозина – как к 5-метилцитозину, так и к 5-гидроксиметилцитозину [53], и анализ изменений в клеточных процессах, вызванных их накоплением.

Отдельным направлением исследований роли метилирования ДНК в ЦНС зебранию является уточнение влияния эпигенетических факторов на формирование организма. Известно, что перинатальный период является критическим для нормального развития мозга [54], поэтому исследования метилирования ДНК и других эпигенетических изменений во время этого периода и их связи с последующим развитием заболеваний мозга особенно важны. Хотя канонические функции метилирования ДНК в значительной степени консервативны, наблюдается широкий спектр уровней и паттернов метилирования ДНК у различных видов. В связи с этим перспективным является сравнительный анализ паттернов метилирования ДНК у позвоночных, в частности у грызунов и зебранию, поскольку понимание этих межтаксонных различий может привести к выявлению новых эволюционных аспектов регуляции генов ЦНС.

Важнейшим аспектом изучения регуляции экспрессии генов является размер генома. Зебранию и грызуны имеют существенные различия в объеме генетической информации, которые могут влиять на разнообразие генов, их расположение и функциональные характеристики. Большой размер генома может предоставить дополнительные возможности для эволюции и разнообразия, в то время как меньший размер генома может подразумевать более эффективную организацию генетической информации. Организация геномных участков также играет решающую роль в функционировании клеток.

У зебранию и грызунов имеются различия в структуре хромосом, расположении генов и других функциональных элементов. Зебранию и грызуны также проявляют различия в паттернах метилирования ДНК, что может сказываться на фенотипе и специфических биологических процессах. Так, сравнительный анализ профилей метилирования ДНК клеток мозга мышей и зебранию показал, что в среднем в мозге мыши метилированы 24% CpG, в то время как у зебранию 70% [55]. Эти данные подтверждают, что метилирование ДНК является видоспецифичным. Кроме того, до недавнего времени многие исследования метилирования ДНК фокусировались на таких областях, как острова CpG (CGI) и сайты начала транскрипции (TSS), и лишь немногие недавние исследования занимались изучением метилирования ДНК в других геномных элементах, таких как интергенные регионы и энхансеры (рис. 4). Тем не менее на зебранию показана положительная корреляция между деметилированием ДНК в энхансерах и уровнем экспрессии близлежащих генов [56].

Именно за счет высокого распространения интергенных регионов у зебранию также значительно выше общий уровень метилирования ДНК, чем у мышей [55], что соответствует наличию большего количества транспозонов в интергенных регионах генома зебранию по сравнению с геномом мыши. Так, учитывая размер генома и долю повторяющихся последовательностей, транспозоны могут составлять до 52% генома зебранию и 45% генома мыши [57]. Понимание различий в регуляции генов между зебранию и грызунами, в том числе на уровне метилирования ДНК, может пролить свет на молекулярные основы их биологических отличий, включая ЦНС, а дальнейшие исследования в этой области могут открыть новые перспективы для разработки методов лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушением экспрессии генов ЦНС.

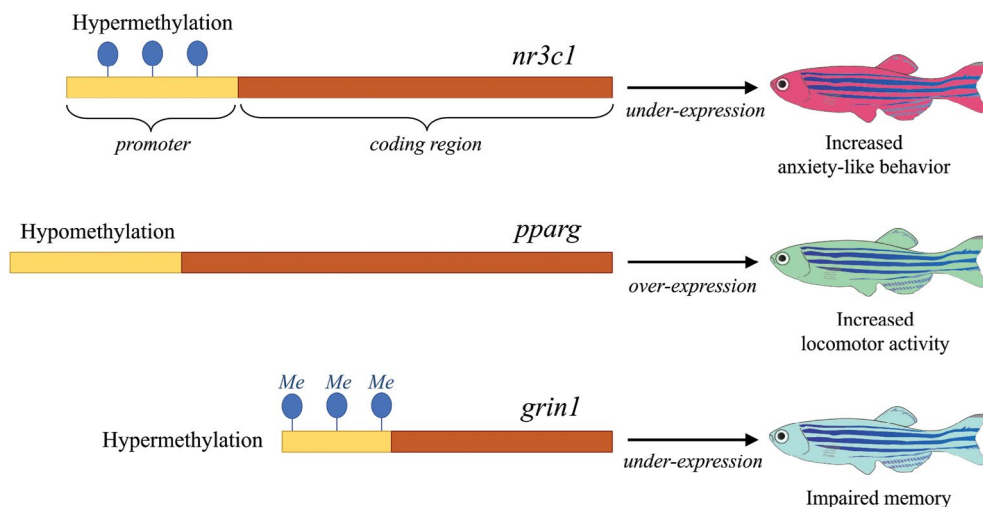


Рис. 4. Влияние метилирования промоторов маркерных генов на развитие фенотипов ЦНС зебранию.

Гиперметилование промотора гена глюкокортикоидного рецептора *nr3c1* изменяет его экспрессию и, как следствие, нормальное функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, усиливая тревожно-подобное поведение рыб [58]. Недостаток метилирования промотора гена гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (*pparg*), ключевого транскрипционного фактора, который контролирует экспрессию многих нижестоящих генов, участвующих в процессах липидного транспорта, биогенеза и липолиза, приводит к увеличению экспрессии *pparg*. В свою очередь, это вызывает быстрое накопление АТФ и аномальное повышение локомоторной активности мальков зебранию [59]. В механизме патогенеза нарушения памяти важную роль играет глутаматный ионотропный рецептор и его субъединица 1 (*grin1*), промотор гена которой под воздействием никотина гиперметируется у рыб (и у крыс), что приводит к подавлению экспрессии контролируемого им гена и ухудшению памяти зебранию [60].

Анализ половых различий ЦНС зебранию [61] является еще одним важным направлением исследований с точки зрения растущего признания роли половых различий как в функционировании нормального мозга человека, так и при его патологии [62], а также данных о половых различиях в метилировании ДНК в мозге человека [63] и зебранию [64]. Еще одним важным направлением исследований метилирования ДНК в ЦНС зебранию является изучение эффектов различных нейротропных препаратов и токсинов на экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз и деметилаз в мозге рыб, синтез самих белков данных ферментов, а также оценка их энзиматической активности. Например, ареколин – природный психоактивный алкалоид с частичным агонизмом к никотиновым и мускариновым ацетилхолиновым рецепторам – при хроническом введении вызывает анксиолитическое действие на поведение рыб на фоне повышения экспрессии генов в мозге. Это указывает на вовлечение эпигенетической регуляции посредством метилирования ДНК в долговременные эффекты ареколина [65]. Таким образом, можно выделить как минимум несколько различных механизмов, связанных с метилированием ДНК, благодаря которым тот или иной нейротропный препарат может оказать влияние на ЦНС (табл. 3). С учетом высокой пропускной способности зебранию в качестве скрининговой модели, тестирование данных препаратов на зебранию может привести к выявлению новых классов фармакологических препаратов, подавляющих или, наоборот, усиливающих метилирование ДНК в ЦНС.

Таблица 3. Некоторые возможные механизмы действия нейротропных препаратов на процессы метилирования ДНК в ЦНС

Возможный механизм действия
Прямое ингибирование или активация ДНК-метилтрансфераз
Активация или подавление экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз
Активация или подавление синтеза ДНК-метилтрансфераз
Прямое ингибирование или активация деметилаз
Активация или подавление экспрессии генов деметилаз
Активация или подавление синтеза деметилаз
Прямое ингибирование или активация CpG-связывающих белков
Активация или подавление экспрессии генов CpG-связывающих белков
Активация или подавление синтеза CpG-связывающих белков
Прямое ингибирование или активация ацетил- и деацетилтрансфераз*
Активация или подавление экспрессии ацетил- и деацетилтрансфераз*
Активация или подавление синтеза ацетил- и деацетилтрансфераз*
Модуляция других эпигенетических процессов, косвенно влияющих на метилирование ДНК

Примечание. *Данные механизмы влияют на ацетилирование и деацетилирование гистонов, но связаны с метилированием ДНК косвенно, поскольку обусловленная им модификация гистонов влияет на уровень экспрессии генов (см. рис. 1).

Традиционно считается, что увеличение метилирования CpG-островков в промоторных участках генов приводит к подавлению их экспрессии, а уменьшение метилирования, напротив, к ее усилению. Например, увеличение метилирования CpG в промоторной области гена мозгового нейротрофина (*BDNF*) коррелирует с пониженным синтезом *BDNF* в нейронах мышей [66]. При этом для других геномных областей нет определенной связи с уровнем метилирования ДНК и направлением изменения экспрессии генов [67]. Так, различные ассоциации метилирования ДНК и тяжелых депрессивных расстройств человека встречаются в регионах вне промотора (например, общее гипометилирование гена синапсина (*SYN2*) при депрессии [68, 69]). Исследования расстройств аутистического спектра (РАС) с помощью полногеномного секвенирования с бисульфидной конверсией плаценты матерей, у чьих детей впоследствии развилось РАС, выявили изменение метилирования ранее неохарактеризованной некодирующей области *NHIF* (РНК-гена, «индуцируемого нейрональной гипоксией, ассоциированного с плацентой») [70]. Эти данные показывают, что связь между метилированием ДНК и нарушениями развития ЦНС разнообразна и затрагивает регионы по всему геному, а не только кодирующие участки. Помимо блокировки факторов транскрипции при метилировании ДНК (рис. 1), еще один механизм эпигенетической регуляции основан на гидроксилировании 5-метилцитозина под действием ферментов – деметилаз ТЕТ (рис. 2) [70, 71]. В настоящее время обычно не делают акцент на различиях между метилированием и гидроксиметилированием ДНК, измеряя обе модификации без разбора. Поэтому в дальнейших исследованиях метилирования ДНК [72] в мозге зебранию важно отдельно изучать эти два процесса и их индивидуальный вклад в модуляцию ЦНС.

Наконец, метилирование ДНК вне CpG областей наиболее часто встречается в нейронах и глиальных клетках млекопитающих (в частности, у мышей и человека), представляя собой редкое явление в лобной коре у плода человека, но значительно усиливающееся на более поздних стадиях жизни на фоне развития синапсов и увеличения синаптической плотности [73]. Метилирование ДНК не-CpG островков может играть

важную роль в регулировании генной активности и продолжаться во взрослом мозге, действуя подобно метилированию CpG в подавлении транскрипции [74]. Например, связывание классического MBP MeCP2 с неметилированными последовательностями ДНК имеет решающее значение для экспрессии BDNF, как показано в модели синдрома Ретта у мышей [75]. В связи с этим исследование данного вопроса с использованием моделей на зебрадании может быть актуальным и важным.

Анализ метилирования ДНК в ЦНС зебрадании также имеет значение при исследовании роли гормональной (например, стероидной) регуляции, а также действия различных эндокринных дизрапторов (ЭД). В частности, метилирование фланкирующего фрагмента гена вителлогенина 1 в мозге зебрадании оказывается чувствительным к хроническому действию эстрогена [76]. Промотор гена гонадолиберина 3 (*GnRH3*) в телянцефалоне и обонятельной луковице зебрадании обнаруживает паттерн гиперметилирования при действии дексаметазона [77]. Действие органофосфата TDCIPP на личинок зебрадании приводит к повышенному тревожно-подобному поведению у рыб во взрослом возрасте на фоне усиления экспрессии генов трех ДНК-метилтрансфераз, а также гиперметилированию промоторов генов BDNF и дофаминового рецептора D4b в мозге самок (но не самцов) рыб [78], тем самым демонстрируя зависимость от пола токсичные эффекты на ЦНС. Эпигенетическая регуляция у зебрадании при действии ряда таких веществ может также носить трансгенерационный характер. Например, ЭД микроцистин-лейцин-аргинин усиливает метилирование промоторов (и соответственно, снижает экспрессию) генов *нейротрофического фактора мозга* BDNF и глутамат-карбоксилазы 1 в мозге у F1 поколения при введении препарата особям F0 поколения [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метилирование ДНК в мозге может изменять экспрессию генов ключевых сигнальных молекул, рецепторов и факторов роста, влияя на структурные изменения в нейронах и формирование новых синапсов, что напрямую связано с пластическими свойствами мозга (рис. 2). Кроме того, метилирование ДНК играет ведущую роль в развитии мозга с самых ранних его этапов. Создан ряд генетических и фармакологических моделей различных заболеваний, вызванных нарушениями метилирования ДНК у зебрадании (рис. 3), в том числе при действии этанола, наркотических веществ и стресса. Зебраданию также широко применяются для моделирования психических (шизофрения, аутизм) и нейродегенеративных (паркинсонизм, деменция) заболеваний, связанных с нарушениями метилирования ДНК у человека. В целом моделирование нарушений метилирования ДНК на зебрадании является перспективным инструментом для изучения и понимания молекулярных механизмов эпигенетических нарушений в патогенезе ряда заболеваний, также предоставляя возможность разработки новых подходов к их диагностике и лечению. Накопленные знания о роли метилирования ДНК в ЦНС зебрадании создают основу для дальнейших трансляционных исследований в этой области с целью поиска эффективных терапевтических стратегий.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К.), подготовка черновика статьи (Л.В.Ю., А.Д.Ш., М.А.Р., К.В.А., М.М.К., А.Д.В., А.Д.А., А.В.К.), обсуждение и подготовка итоговой версии рукописи (А.В.К., Л.В.Ю., М.А.Р., А.Д.В., Д.А.А., К.В.А., М.М.К.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Научно-технологического университета «Сириус». Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mattei AL, Bailly N, Meissner A (2022) DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet* 38: 676–707.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.010>
2. Bashirzade AA, Zabegalov KN, Volgin AD, Belova AS, Demin KA, de Abreu MS, Babchenko VY, Bashirzade KA, Yenkovyan KB, Tikhonova MA, Amstislavskaya TG, Kalueff AV (2022) Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish. *Neurosci Biobehav Rev* 138: 104679.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104679>
3. Dang M, Henderson RE, Garraway LA, Zon LI (2016) Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *Dis Mod Mech* 9: 811–820.
<https://doi.org/10.1242/dmm.024166>
4. Wang J, Cao H (2021) Zebrafish and Medaka: important animal models for human neurodegenerative diseases. *Intl J Mol Sci* 22: 10766.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910766>
5. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambbridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthavadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
6. Shin JT, Priest JR, Ovcharenko I (2005) Human-zebrafish non-coding conserved elements act in vivo to regulate transcription. *Nucl Acid Res* 33: 5437–5445.
<https://doi.org/10.1093/nar/gki853>
7. Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A, Heng L, Durbin R, Birney E (2009) EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res* 19: 327–335.
<https://doi.org/10.1101/gr.073585.107>
8. Kim DS, Huh JW, Kim YH, Park SJ, Kim HS, Chang KT (2010) Bioinformatic analysis of TE-spliced new exons within human, mouse and zebrafish genomes. *Genomics* 96: 266–271.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.08.004>
9. Berma J, Payne E, Hall C (2012) The zebrafish as a tool to study hematopoiesis, human blood diseases, and immune function. *Adv Hematol* 2012: 425345.
<https://doi.org/10.1155/2012/425345>
10. Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y (2003) Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* 13: 382–390.

- https://doi.org/10.1101/gr.640303
11. *Mihaljevic I, Popovic M, Zaja R, Smital T* (2016) Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of *slc22* genes in zebrafish (*Danio rerio*). BMC Genom 17: 626.
https://doi.org/10.1186/s12864-016-2981-y
12. *McCammon JM, Sive H* (2015) Challenges in understanding psychiatric disorders and developing therapeutics: a role for zebrafish. Dis Mod Mech 8: 647–656.
https://doi.org/10.1242/dmm.019620
13. *Varshney GK, Sood R, Burgess SM* (2015) Understanding and editing the zebrafish genome. Adv Gen 92: 1–52.
https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.09.002
14. *Yushko LV, Kalueff AV, Kotova MM* (2023) Experimental models of mitochondrial dysfunction disorders in the pathogenesis of CNS diseases on zebrafish. J Evol Biochem Physiol 59: 2114–2128.
15. *Zhang L, Lu Q, Chang C* (2020) Epigenetics in health and disease. Adv Exper Med Biol 1253: 3–55.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1
16. *Gayon J* (2016) From Mendel to epigenetics: history of genetics. Comptes Rendus Biol 339: 225–230.
https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.05.009
17. *Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH* (2017) DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenet Chromatin 10: 23.
https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8
18. *Hamidi T, Singh AK, Chen T* (2015) Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. Epigenomics 7: 247–265.
https://doi.org/10.2217/epi.14.80
19. *Ren Y* (2022) Regulatory mechanism and biological function of UHRF1-DNMT1-mediated DNA methylation. Funct Integr Genom 22: 1113–1126.
https://doi.org/10.1007/s10142-022-00918-9
20. *Qin L, Qiao C, Sheen V, Wang Y, Lu J* (2021) DNMT3L promotes neural differentiation by enhancing STAT1 and STAT3 phosphorylation independent of DNA methylation. Prog Neurobiol 201: 102028.
https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102028
21. *Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G* (2019) The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. Genes 10: 172.
https://doi.org/10.3390/genes10020172
22. *Younesian S, Yousefi AM, Momeny M, Ghaffari SH, Bashash D* (2022) The DNA methylation in neurological diseases. Cells 11: 3439.
https://doi.org/10.3390/cells11213439
23. *Pensold D, Reichard J, Van Loo KMJ, Ciganok N, Hahn A, Bayer C, Liebmann L, Groß J, Tittelmeier J, Lingner T, Salinas-Riester G, Symmank J, Halfmann C, González-Bermúdez L, Urbach A, Gehrmann J, Costa I, Pieler T, Hübner CA, Vatter H, Kampa B, Becker AG, Zimmer-Bensch G* (2020) DNA methylation-mediated modulation of endocytosis as potential mechanism for synaptic function regulation in murine inhibitory cortical interneurons. Cereb Cortex 30: 3921–3937.
https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa009
24. *Sergeeva A, Davydova K, Perenkov A, Vedunova M* (2023) Mechanisms of human DNA methylation, alteration of methylation patterns in physiological processes and oncology. Gene 875: 147487.
https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147487
25. *Hanaki S, Habara M, Shimada M* (2021) UV-induced activation of ATR is mediated by UHRF2. Gen Cells 26: 447–454.
https://doi.org/10.1111/gtc.12851
26. *Xavier MJ, Roman SD, Aitken RJ, Nixon B* (2019) Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. Hum Repr Update 25: 518–540.
https://doi.org/10.1093/humupd/dmz017
27. *Inaba Y, Iwamoto S, Nakayama K* (2022) Genome-wide DNA methylation status of Mongolians exhibits signs of cellular stress response related to their nomadic lifestyle. J Phys Anthropol 41: 30.
https://doi.org/10.1186/s40101-022-00305-0
28. *Lunnon K, Harvey J, Smith A, Weymouth L, Smith R, Castanho I, Hubbard L, Creese B, Bresner K, Williams N, Pishva E* (2023) Epigenetic insights into neuropsychiatric and cognitive symptoms in Parkinson's disease: A DNA co-methylation network analysis. Res Square rs.3.rs-3185734.
https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3185734/v1

29. Abomoelak B, Prather R, Pragya SU, Pragya SC, Mehta ND, Uddin P, Veeramachaneni P, Mehta N, Young A, Kapoor S, Mehta D (2023) Cognitive skills and DNA methylation are correlating in healthy and novice college students practicing Preksha Dhyāna meditation. *Brain Sci* 13: 1214. <https://doi.org/10.3390/brainsci13081214>
30. Cavalieri V, Spinelli G (2017) Environmental epigenetics in zebrafish. *Epigen. Chromat* 10: 46. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0154-0>
31. Lakstygai AM, de Abreu MS, Kalueff AV (2018) Zebrafish models of epigenetic regulation of CNS functions. *Brain Res Bull* 142: 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.08.022>
32. Swartz ME, Wells MB, Griffin M, McCarthy N, Lovely CB, McGurk P, Rozacky J, Eberhart JK (2014) A screen of zebrafish mutants identifies ethanol-sensitive genetic loci. *Alcohol Clin Exp Res* 38: 694–703. <https://doi.org/10.1111/acer.12286>
33. Knecht AL, Truong L, Marvel SW, Reif DM, Garcia A, Lu C, Simonich MT, Teeguarden JG, Tanguy RL (2017) Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 329: 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.033>
34. Jacob J, Ribes V, Moore S, Constable SC, Sasai N, Gerety SS, Martin DJ, Sergeant CP, Wilkinson DG, Briscoe J (2014) Valproic acid silencing of *ascl1b/Ascl1* results in the failure of serotonergic differentiation in a zebrafish model of fetal valproate syndrome. *Dis Mod Mech* 7: 107–117. <https://doi.org/10.1242/dmm.013219>
35. Wang L, Jiang W, Lin Q, Zhang Y, Zhao C (2016) DNA methylation regulates *gabrb2* mRNA expression: developmental variations and disruptions in l-methionine-induced zebrafish with schizophrenia-like symptoms. *Genes Brain Behav* 15: 702–710. <https://doi.org/10.1111/gbb.12315>
36. Razali K, Othman N, Mohd Nasir MH, Doolaanea AA, Kumar J, Ibrahim WN, Mohamed Ibrahim N, Mohamed WMY (2021) The promise of the zebrafish model for Parkinson's disease: today's science and tomorrow's treatment. *Front Genet* 12: 655550. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.655550>
37. Zheng YC, Ma J, Wang Z, Li J, Jiang B, Zhou W, Shi X, Wang X, Zhao W, Liu HM (2015) A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Medicin Res Rev* 35: 1032–1071. <https://doi.org/10.1002/med.21350>
38. Meshcheryakova A, Pietschmann P, Zimmermann P, Rogozin IB, Mechtcheriakova D (2021) AID and APOBECs as multifaceted intrinsic virus-restricting factors: emerging concepts in the light of COVID-19. *Front Immunol* 12: 690416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690416>
39. Rai K, Huggins JJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and *gadd45*. *Cell* 135: 1201–1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.042>
40. Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463: 1101–1105. <https://doi.org/10.1038/nature08829>
41. Sandweiss AJ, Brandt VL, Zoghbi HY (2020) Advances in understanding of Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome: prospects for future therapies. *Lancet Neurol* 19: 689–698. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30217-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30217-9)
42. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, Hojo K, Yamanishi H, Karpf AR, Wallace DC, Simon M, Lander C, Boardman LA, Cunningham JM, Smith GE, Litchy WJ, Boes B, Atkinson EJ, Middha S, B Dyck PJ, Parisi JE, Mer G, Smith DI, Dyck PJ (2011) Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet* 43: 595–600. <https://doi.org/10.1038/ng.830>
43. Protic DD, Aishworiya R, Salcedo-Arellano MJ, Tang SJ, Milisavljevic J, Mitrovic F, Hagerman RJ, Budimirovic DB (2022) Fragile X Syndrome: from molecular aspect to clinical treatment. *Intl J Mol Sci* 23: 1935. <https://doi.org/10.3390/ijms23041935>
44. Yamada M, Okuno H, Okamoto N, Suzuki H, Miya F, Takenouchi T, Kosaki K (2023) Diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome by targeted nanopore long-read sequencing. *Eur J Med Genet* 66: 104690. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104690>
45. Sheikhpour M, Maleki M, Ebrahimi Vargoorani M, Amiri V (2021) A review of epigenetic changes in asthma: methylation and acetylation. *Clin Epigenet* 13: 65. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01049-x>

46. Browne CJ, Godino A, Sallery M, Nestler EJ (2020) Epigenetic mechanisms of opioid addiction. *Biol Psychiatry* 87: 22–33.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.06.027>
47. Vrettou M, Yan L, Nilsson KW, Wallén-Mackenzie Å, Nylander I, Comasco E (2021) DNA methylation of Vesicular Glutamate Transporters in the mesocorticolimbic brain following early-life stress and adult ethanol exposure-an explorative study. *Sci Reports* 11: 15322.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-94739-8>
48. Demidenko O, Barardo D, Budovskii V, Finnemore R, Palmer FR, Kennedy BK, Budovskaya YV (2021) Rejuvant®, a potential life-extending compound formulation with alpha-ketoglutarate and vitamins, conferred an average 8-year reduction in biological aging, after an average of 7 months of use, in the TruAge DNA methylation test. *Aging* 13: 24485–24499.
<https://doi.org/10.18632/aging.203736>
49. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12: 342–348.
<https://doi.org/10.1038/nn.2270>
50. Xiu J, Li J, Liu Z, Wei H, Zhu C, Han R, Liu Z, Zhu W, Shen Y, Xu Q (2022) Elevated BICD2 DNA methylation in blood of major depressive disorder patients and reduction of depressive-like behaviors in hippocampal Bicd2-knockdown mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119: e2201967119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2201967119>
51. Nguyen M, Stewart AM, Kalueff AV (2014) Aquatic blues: modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 55: 26–39.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.003>
52. Babin PJ, Goizet C, Raldúa D (2014) Zebrafish models of human motor neuron diseases: advantages and limitations. *Prog Neurobiol* 118: 36–58.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.03.001>
53. Liu Y, Stejka-Zielińska P, Velikova G, Bi Y, Yuan F, Tomkova M, Bai C, Chen L, Schuster-Böckler B, Song CX (2019) Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nat Biotechnol* 37: 424–429.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0041-2>
54. Wu Y, Yasung L, Calixto C, Gholipour A, Karimi D (2023) Characterizing normal perinatal development of the human brain structural connectivity. *ArXiv*, arXiv: 2308.11836v1.
55. Zhang C, Hoshida Y, Sadler KC (2016) Comparative epigenomic profiling of the DNA methylome in mouse and zebrafish uncovers high interspecies divergence. *Front Genet* 7: 110.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00110>
56. Lee HJ, Lowdon RF, Maricque B, Zhang B, Stevens M, Li D, Johnson SL, Wang T (2015) Developmental enhancers revealed by extensive DNA methylome maps of zebrafish early embryos. *Nat Commun* 6: 6315.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7315>
57. Kapusta A, Kronenberg Z, Lynch VJ, Zhuo X, Ramsay L, Bourque G, Yandell M, Feschotte C (2013) Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 9: e1003470.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>
58. Xin N, Wang DT, Zhang L, Zhou Y, Cheng Y (2022) Early developmental stage glucocorticoid exposure causes DNA methylation and behavioral defects in adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol Pt C: Toxicol Pharmacol* 256: 109301.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109301>
59. Guo W, Han J, Wu S, Shi X, Wang Q, Zhou B (2019) Bis (2-ethylhexyl)-2, 3, 4, 5-tetrabromophthalate affects lipid metabolism in zebrafish larvae via DNA methylation modification. *Env Sci Technol* 54: 355–363.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05796>
60. Benvenuti R, Gallas-Lopes M, Marcon M, Reschke CR, Herrmann AP, Piato A (2022) Glutamate NMDA receptor antagonists with relevance to schizophrenia: a review of zebrafish behavioral studies. *Curr Neuropharmacol* 20: 494.
<https://doi.org/10.2174/1570159X19666210215121428>
61. Zhai G, Jia J, Bereketoglu C, Yin Z, Pradhan A (2022) Sex-specific differences in zebrafish brains. *Biol Sex Differ* 13: 31.
<https://doi.org/10.1186/s13293-022-00442-2>
62. McEwen BS, Milner TA (2017) Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *J Neurosci Res* 95: 24–39.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23809>
63. Young LJ, Pfaff DW (2014) Sex differences in neurological and psychiatric disorders. *Front Neuroendocrinol* 35: 253–254.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.005>

64. Chatterjee A, Lagisz M, Rodger EJ, Zhen L, Stockwell PA, Duncan EJ, Horsfield JA, Jeyakani J, Mathavan S, Ozaki Y, Nakagawa S (2016) Sex differences in DNA methylation and expression in zebrafish brain: a test of an extended 'male sex drive' hypothesis. *Gene* 590: 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.042>
65. Serikuly N, Alpyshev ET, Wang D, Wang J, Yang L, Hu G, Yan D, Demin KA, Kolesnikova TO, Galstyan D, Amstislavskaya TG, Babashev AM, Mor MS, Efimova EV, Gainetdinov RR, Strekalova T, de Abreu MS, Song C, Kalueff AV (2021) Effects of acute and chronic arecoline in adult zebrafish: Anxiolytic-like activity, elevated brain monoamines and the potential role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 104: 109977. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109977>
66. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302: 890–893. <https://doi.org/10.1126/science.1090842>
67. Xie J, Xie L, Wei H, Li XJ, Lin L (2023) Dynamic regulation of DNA methylation and brain functions. *Biology* 12: 152. <https://doi.org/10.3390/biology12020152>
68. Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE (2010) Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329: 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.1190485>
69. Cruceanu C, Kutsarova E, Chen ES, Checknita DR, Nagy C, Lopez JP, Turecki G (2016) DNA hypomethylation of Synapsin II CpG islands associates with increased gene expression in bipolar disorder and major depression. *BMC Psychiatry* 16: 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-0989-0>
70. Zhu Y, Gomez JA, Laufer BI, Mordaunt CE, Mouat JS, Soto DC, LaSalle JM (2022) Placental methylome reveals a 22q13. 33 brain regulatory gene locus associated with autism. *Genome Biol* 23: 1–32. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02613-1>
71. Kohli RM, Zhang Y (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502: 472–479. <https://doi.org/10.1038/nature12750>
72. Kamstra JH, Løken M, Aleström P, Legler J (2015) Dynamics of DNA hydroxymethylation in zebrafish. *Zebrafish* 12: 230–237. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1033>
73. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghighi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341: 1237905. <https://doi.org/10.1126/science.1237905>
74. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT (2017) CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. *Genes* 8: 148. <https://doi.org/10.3390/genes8060148>
75. Chen L, Chen K, Lavery LA, Baker SA, Shaw CA, Li W, Zoghbi HY (2015) MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sciences U S A* 112: 5509–5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505909112>
76. Strömqvist M, Tooke N, Brunström B (2010) DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) – sex and tissue differences and effects of 17alpha-ethinylestradiol exposure. *Aquat Toxicol* 98: 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.023>
77. Khor YM, Soga T, Parhar IS (2016) Early-life stress changes expression of GnRH and kisspeptin genes and DNA methylation of GnRH3 promoter in the adult zebrafish brain. *Gen Comp Endocrinol* 227: 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.004>
78. Li R, Yang L, Han J, Zou Y, Wang Y, Feng C, Zhou B (2021) Early-life exposure to tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate caused multigenerational neurodevelopmental toxicity in zebrafish via altering maternal thyroid hormones transfer and epigenetic modifications. *Environ Pollut* 285: 117471. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117471>
79. Xu J, Zhang W, Zhong S, Xie X, Che H, Si W, Tuo X, Xu D, Zhao S (2023) Microcystin-leucine-arginine affects brain gene expression programs and behaviors of offspring through paternal epigenetic information. *Sci Total Environ* 857: 159032. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159032>

The Role of DNA Methylation in Zebrafish Models of CNS Diseases

**L. V. Yushko^{a, b, c}, A. D. Shevlyakov^{a, d}, M. A. Romazeva^d, K. V. Apukhtin^d, A. D. Volgin^d,
D. A. Abramov^d, M. M. Kotova^a, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}**

^a*World-class scientific center “Center for Personalized Medicine”, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russia*

^b*Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russia*

^c*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^d*Neurobiology Program, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russia*

^e*Research Institute of Neuroscience and Medicine, Novosibirsk, Russia*

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

DNA methylation plays an important role in the regulation of gene expression. Disturbances in this process in the brain cause various neurological diseases, including autism, schizophrenia and mood disorders. Zebrafish (*Danio rerio*) are a promising model organism in biomedicine. Given high genetic and physiological homology with humans, studying genome methylation deficits in zebrafish can help to clarify the molecular processes underlying etiology and pathogenesis of various neurological diseases, as well as to develop novel therapies. Here, we discuss the mechanisms of DNA methylation in the brain and the diseases associated with its dysregulation in humans, as well as their genetic and pharmacological models in zebrafish. We also evaluate the limitations of zebrafish models and possible directions for further research in this field. Mounting evidence summarized here supports zebrafish as an effective model for elucidating the molecular mechanisms of brain pathologies associated with impaired DNA methylation.

Keywords: epigenetic regulation, genome methylation, brain, epigenetics, CNS, zebrafish

ОБЗОРЫ

ОБОНЯТЕЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

© 2024 г. Е. В. Бигдай^{1, *}, А. А. Зуйкова¹, А. В. Поздняков¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: bigday50@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 27.04.2024 г.

В статье анализируются данные литературы, посвященные тесной взаимосвязи энергетического баланса и обоняния. Обоняние представляет собой одну из основных модальностей гедонической оценки пищи. Запах является одним из наиболее важных сенсорных сигналов, предсказывающих качество пищевых продуктов, и играет ключевую роль в их выборе и потреблении. Аппетит может возбуждаться различными стимулами, но ведущая роль принадлежит обонятельным сигналам (вкусные запахи) и уровням гормонов, которые сигнализируют о голоде и сытости. Обонятельное восприятие подвергается гормональной модуляции. В связи с этим особое внимание в статье уделено модулирующей функции инсулина. Инсулин – один из основных метаболических гормонов, который контролирует потребление пищи, оказывая анорексигенный эффект не только на уровне гипоталамуса, но и на уровне обонятельного пути, особенно сильное в обонятельной луковице. Именно в ней скорость транспорта инсулина в два – восемь раз выше, чем в других отделах мозга, и в ней сосредотачивается самая высокая концентрация инсулина и самая высокая плотность инсулиновой рецепторной киназы. Таким образом, инсулин не только способен проникать к месту обработки обонятельной информации, но делать это быстро. Вместе с тем инсулин и его рецепторы локализируются в обонятельном эпителии, а именно в зрелых обонятельных сенсорных нейронах. Поэтому инсулин влияет на первичный этап восприятия пахучей молекулы – обнаружение запаха, осуществляющийся на уровне обонятельного эпителия. Обоняние нарушается вплоть до полной его потери при ожирении и диабете 2-го типа, ухудшая качество жизни таких пациентов. В работе рассматривается эффективность интраназального введения инсулина для восстановления обонятельной функции при метаболических расстройствах и других заболеваниях.

Ключевые слова: обонятельная дисфункция, ожирение, сахарный диабет 2-го типа, обонятельный эпителий, обонятельная луковица, интраназальный инсулин

DOI: 10.31857/S0869813924050033, **EDN:** BLLXGJ

ВВЕДЕНИЕ

По оценкам World Obesity Federation (Всемирная федерация по борьбе с ожирением) 800 миллионов человек в настоящее время страдают ожирением. Из них 39 миллионов – дети в возрасте до 5 лет (2020 г.) и 340 миллионов – дети и подростки в возрасте

от 5 до 19 лет. Более того, еще почти 1 миллиарду человек грозит риск ожирения или избыточного веса. Повышенный вес оказывает сильное влияние на психическое и физическое здоровье, сопровождаемое низкой самооценкой на протяжении всей жизни [1]. В зависимости от тяжести и продолжительности ожирения человек подвергается многим хроническим заболеваниям, включая обонятельную дисфункцию, требующим лечения [2]. Тревожными темпами растет распространенность и сахарного диабета 2-го типа (СД2), который диагностируется у пожилых пациентов, но все чаще встречается у детей, подростков и молодых людей. Число людей с диабетом выросло со 108 миллионов в 1980 г. до 422 миллионов в 2014 г. По сравнению со взрослыми молодые люди страдают относительно более высокой агрессивностью заболевания с более ранним возникновением осложнений, включающих обонятельную дисфункцию вплоть до потери обоняния [3, 4]. Состояние центральной инсулиновой резистентности назвали диабетом 3-го типа (СД3), при котором развиваются когнитивные нарушения и нейродегенерация [5, 6]. Приведенные выше данные свидетельствуют о широком распространении среди населения таких заболеваний эндокринной системы, как ожирение и сахарный диабет типа 2, при которых страдает обонятельная функция. Поэтому целью данного обзора явился анализ связи между этими эндокринными нарушениями и обонятельной функцией и возможности терапевтической помощи пациентам с обонятельной дисфункцией.

1. ОБОНЯНИЕ – ОДНА ИЗ ОСНОВНЫХ СЕНСОРНЫХ МОДАЛЬНОСТЕЙ ГЕДОНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПИЩИ

Эндокринная система тесно связана с обонятельной. Энергетический гомеостазис достигается благодаря скоординированной регуляции между периферическими органами и мозгом. Центральные структуры, в частности гипоталамус, выделяют пептиды для стимуляции нейронных путей, которые изменяют потребление пищи в соответствии с потребностями организма в питании [7–9]. В своих фундаментальных исследованиях И. П. Павлов показал, что во время кормления и ложного кормления попаданию пищи в рот предшествует активация секреции слюны, желудка и поджелудочной железы. Павлов называл это «психической» фазой пищеварения. Однако, по мнению Fine с соавт., он не выделял какую-либо сенсорную систему в качестве основной движущей силы этого явления, поэтому основополагающие открытия И. П. Павлова они интерпретируют в свете науки об обонянии. Авторы выдвигают гипотезу, согласно которой обоняние является путем, наиболее вероятно определяющим пищевое поведение млекопитающих. Удовольствие, связанное с пищей или ее вкусовыми качествами, для которого важно обоняние, является важнейшим аспектом выбора и приема пищи, а также определяет размер порции [10]. Следовательно, обоняние – одна из основных сенсорных модальностей, которая способствует гедонистической оценке пищи, что приводит к ее выбору и потреблению. Пахучие молекулы вдыхаются через нос и связываются с обонятельными белковыми рецепторами, расположенными в мембране обонятельных жгутиков (ОЖ) обонятельных сенсорных нейронов (ОСН) в обонятельном эпителии (ОЭ). Как известно, каждый ОСН экспрессирует только один тип обонятельных рецепторов [11]. Все ОСН, экспрессирующие один и тот же одорантный рецептор, проецируют свои аксоны на специфическую гломерулу обонятельной луковицы (ОЛ), где аксоны рецепторных нейронов образуют синапсы с дендритами митральных клеток – обонятельными нейронами второго порядка. Прямые проекции из ОЛ направляются в нейронные сети грушевидной коры (ГК), представляющей собой самую крупную из обонятельных областей коры. Она через латеральный обонятельный тракт получает прямой синаптический сигнал от митральных и тафтинговых клеток обонятельной луковицы и играет важную роль в идентификации запаха [11]. Таким образом, обоняние

информирует центральную нервную систему в режиме реального времени о химическом составе внешней среды до получения какой-либо визуальной или тактильной информации. Эта способность обонятельной сенсорной системы позволяет животному предвидеть и быстро адаптировать свое поведение при поиске пищи, обеспечивая гедоническую оценку питания. Ароматы еды являются мощными сигналами, вызывающими желание потребления еще до того, как ее увидят. Запахи пищи, возникающие на этапе ожидания еды, повышают аппетит по сравнению с продуктами без запаха [12]. Причем у людей еда, состоящая из продуктов питания, обладающих разнообразными ароматами, вызывает переедание и приводит на 60% к более высокому потреблению калорий, чем при однообразном питании [13].

Таким образом, можно сказать, что обонятельная система, гипоталамус и мезокортиколимбические цепи образуют интегративную сеть регуляции энергетического обмена и потребления пищи (рис. 1).

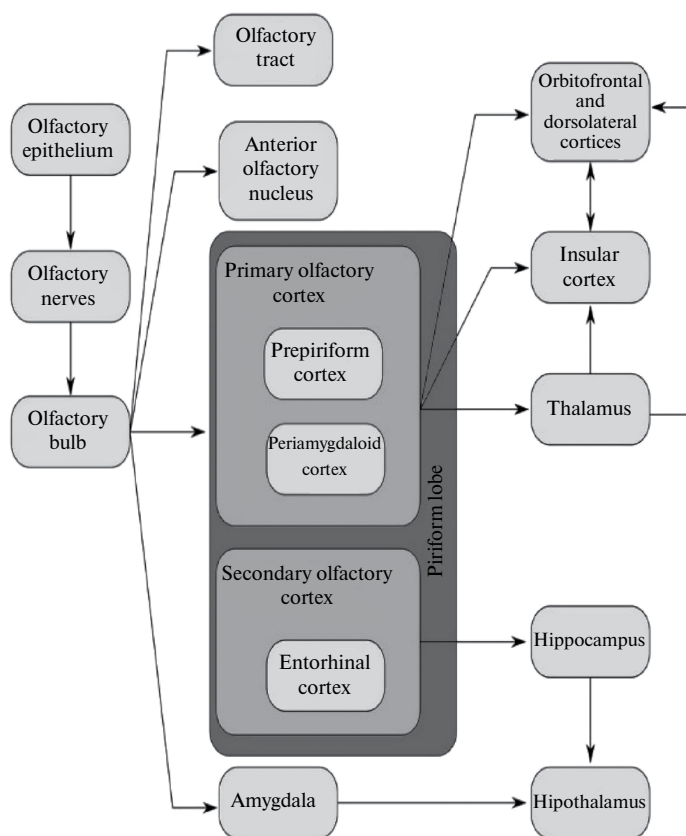


Рис. 1. Центральные пути обонятельной сенсорной системы.

Olfactory epithelium – обонятельный эпителий; olfactory nerves – обонятельные нервы; olfactory bulb – обонятельная луковица; прямые проекции от обонятельной луковицы: olfactory tract – обонятельный тракт; anterior olfactory nucleus – переднее обонятельное ядро; piriform lobe – грушевидная доля; primary olfactory cortex – первичная обонятельная кора (prepiriform cortex – прегрушевидная кора; periamygdaloid cortex – периамигдаллярная кора) и secondary olfactory cortex – вторичная обонятельная кора (entorhinal cortex – энторинальная кора); amygdala – миндалевидное тело; orbitofrontal and dorsolateral cortices – орбитофронтальная и дорсолатеральная кора; insular cortex – островковая кора; thalamus – таламус; hippocampus – гиппокамп; hypothalamus – гипоталамус.

Вместе с тем поиск источников пищи является обязательным условием срочного ее приема, и он связан с чувствительностью обонятельного анализатора к пищевому аромату. Человеческое обоняние гораздо более острое, чем считалось, и оно играет важную регулирующую роль в широком спектре человеческого поведения, включая пищевое, тесно связанное с пищевым статусом животных и человека. И от него зависит острота обоняния, поскольку степень насыщения влияет на обонятельную чувствительность [7, 10, 12, 14]. Следовательно, острота обоняния оказывает влияние на последующее количество и качество поедаемых продуктов, смещая акценты в обонятельной чувствительности в сторону обогащенной калориями пищи.

2. ГОРМОНАЛЬНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ВОСПРИЯТИЯ

В настоящее время большой интерес вызывает проблема гормональной модуляции обонятельного восприятия и влияния нарушения гормональной сигнализации в обонятельной системе на энергетический гомеостазис. На потребление пищи и расход энергии в краткосрочной перспективе влияют различные физиологические сигналы, эмоциональные факторы, а также вкусовые качества и содержание питательных веществ в доступной пище [15]. Активность нейронов центральных эффекторных путей, которые служат контролерами энергетического баланса, связывающими метаболическое состояние и гедоническую ценность пищи, регулируется нейромодуляторами, связанными с питанием [7, 13]. Это означает, что пищевое поведение регулируется метаболическим статусом. Обонятельная система действует как граница между внешним представлением о пищевых объектах и внутренней информацией о метаболическом состоянии, гедонистической ценности и опыте, формирующим правильное пищевое поведение. Таким образом, обонятельная система посредством поиска пищи способствует поддержанию метаболического гомеостазиса [8]. Поэтому обонятельную систему характеризуют как метаболический сенсор, подобный гипоталамусу.

Гормональная модуляция ольфакторной функции обеспечивается нейромодулирующими молекулами, связанными с питанием, и их рецепторы экспрессируются в обонятельном эпителии (рис. 2) и центральных обонятельных областях [7].

Многие из них имеют высокие уровни экспрессии в обонятельном бугорке (ОБ), который считается ключевой структурой, участвующей в мотивированном поведении под влиянием запахов. Полагают, что нейромодуляторные сигналы регулируют пищевое поведение, воздействуя на ОБ [13]. Пептиды, вовлекаемые в контроль гомеостазиса приема пищи и веса тела, изменяют восприятие запаха [16], способствуя таким образом адаптивной регуляции пищевого поведения. Взаимодействие между потреблением пищи и обонянием опосредовано пептидными гормонами, вырабатываемыми в зависимости от состояния сытости. Воздействуя на свои рецепторы на разных уровнях обонятельной сенсорной системы, метаболические гормоны модулируют электрическую активность обонятельных сетей, изменяя обонятельное восприятие под их действием [13].

Инсулин, участвующий в модуляции обонятельной функции, и его локализация в обонятельной сенсорной системе

В 2021 г. отмечалось столетие открытия инсулина. Инсулин оказывает модулирующие функции в различных участках ЦНС, особенно в гипоталамусе, где он регулирует такие ключевые процессы, как энергетический гомеостазис и выживание нейронов. Все больше данных свидетельствует о связи между такими метаболическими нарушениями, как диабет и ожирение, и нейродегенеративными и психическими заболеваниями [5, 17–19]. Инсулин – один из основных метаболических гормонов,

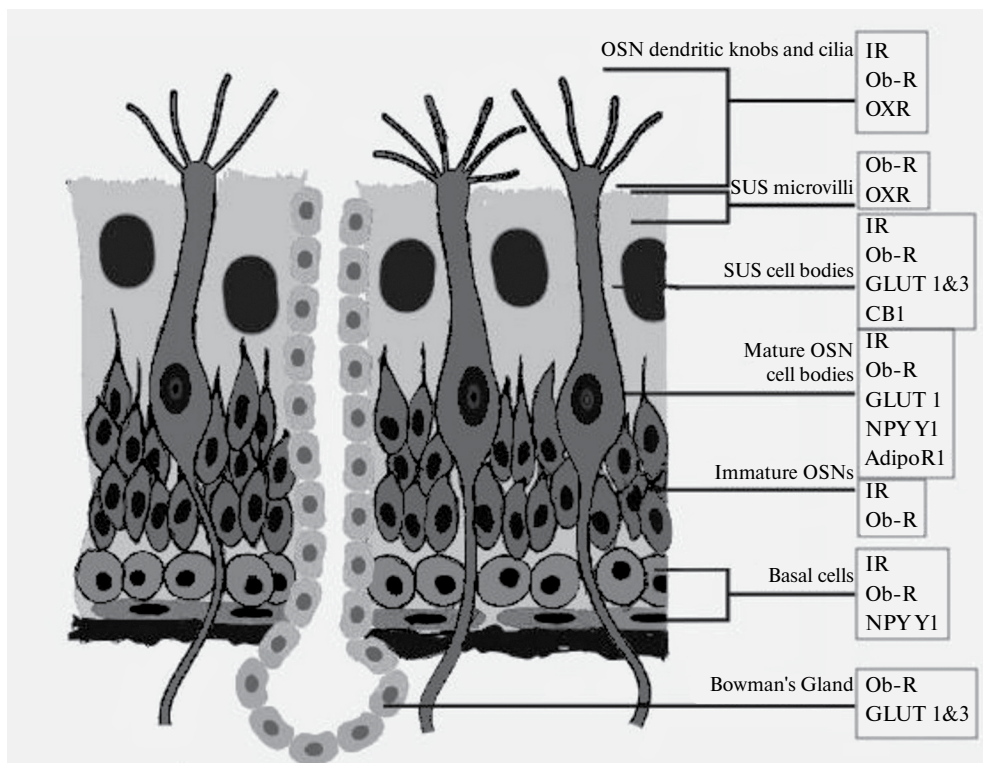


Рис. 2. Схематическое изображение распределения рецепторов к основным метаболическим факторам в обонятельной слизистой. OSN – обонятельный сенсорный нейрон, IR – киназа инсулинового рецептора, Ob-R – лептиновый рецептор, OXR – орексиновый рецептор, GLUT – переносчик глюкозы, CB1 – каннабиноидный рецептор 1-го типа, SUS – опорные клетки, NPY Y1 – рецептор Y1 для нейропептида Y, AdipoR 1 – адипонектиновый рецептор 1-го типа.

который контролирует потребление пищи, оказывая анорексигенный эффект не только на уровне гипоталамуса, но и на уровне других областей, включая обонятельный путь [7, 20–23].

Обнаружили, что концентрация инсулина в экстрактах всего мозга в среднем примерно в 25, а в отдельных его областях, включая ОЛ, в 10–100 раз превышает концентрацию в плазме [22]. Одним из механизмов такого превосходства в уровне инсулина в тканях головного мозга считают проникновением инсулина в ЦНС через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) по механизму рецептор-опосредованного транспорта, эффективность которого может снижаться при ожирении. Следует отметить, что среди всех областей ЦНС обонятельная луковица обладает самым высокопроницаемым ГЭБ [7]. Поэтому метаболические сигналы, передаваемые через кровь, могут проникать в нее легче, чем в другие области мозга. Кроме того, среди сенсорных областей головного мозга в бульбарных гломерулах обнаружено самое высокое значение капиллярной плотности. В результате скорость транспорта инсулина в ОЛ в два – восемь раз выше, чем в другие отделы мозга, и в ней сосредоточивается самая высокая концентрация инсулина и самая высокая плотность инсулиновых рецепторов [20]. Таким образом, инсулин не только способен проникать к месту обработки обонятельной информации, но и делать это быстро [5, 20, 21, 24, 25]. Высокая проницаемость ЦНС для инсулина

обеспечивается также участием семейства SLC (белков-переносчиков растворенных веществ), и их мутации связаны с СД2 и другими тяжелыми заболеваниями [26]. Такая повышенная проницаемость позволяет адаптировать обонятельное восприятие к физиологическому состоянию: высокочувствительное, когда животное голодно и ему необходимо найти пищу, и слабочувствительное, когда животное сыто.

Рецепторы к инсулину, как и инсулин, распространены по всей ЦНС, включая области мозга, связанные с обонятельной функцией. В мозге крыс, являющихся представителями макросматиков, наибольшая плотность инсулиновых рецепторов обнаружена в ОЛ, тогда как у человека (микросматиков) высокий уровень экспрессии выявлен в областях прямой проекции из ОЛ, выполняющих когнитивные функции, связанные с памятью, обучением и эмоциями [22, 27].

Повышение концентрации инсулина в ЦНС связывают с его способностью синтезироваться *de novo* в нейронах ЦНС, включая ОЛ [5, 17, 20, 21, 25]. Полагают, что ОЛ служит в качестве внутреннего датчика метаболизма путем индуцированной инсулином модуляции Kv1.3 (потенциал-зависимый K-канал) [7].

Экспрессия инсулиновых рецепторов зависит от статуса питания. У голодающих животных их содержание и концентрация инсулина в ОЛ увеличиваются. Это имеет важное значение, поскольку активный поиск пищи активирует бульбарные нейроны, требуя необходимого энергетического обеспечения. Известно, что даже в покое нейроны потребляют 350 или 400 мкл O_2 /(г/мин) [28]. Еще более высокие энергетические затраты для мозга требуются при выполнении сложных поведенческих функций, приема решений и т.д. Во время синаптической передачи и регуляции притока ионов один покоящийся нейрон использует около $4.7 \cdot 10^9$ молекул АТФ в секунду, что указывает на ошеломляющее количество энергии, используемой нейронами для этих процессов [6]. Инсулин поддерживает необходимый уровень глюкозы для снабжения нейронов энергией.

ОЛ, содержащая специализированные клетки, чувствительные к глюкозе, реагирует на локальные колебания внеклеточного уровня этого моносахарида. Полагают, что правильное функционирование нейронов, чувствительных к глюкозе, может быть важным для предотвращения таких метаболических нарушений, как ожирение и СД2. Считают, что бульбарные нейроны, чувствительные к глюкозе, являются ключевыми регуляторами метаболически-зависимых процессов, а нарушение их функции в ОЛ может изменить обонятельные пути, имеющие решающее значение для регуляции потребления пищи [5, 8]. В нейроны глюкоза доставляется переносчиками глюкозы, содержание которых особенно высоко в обонятельных областях мозга. В них переносчики глюкозы GLUT1, GLUT3 и GLUT4 колокализуются с инсулиновыми рецепторами и особенно высоко представлены в митральном клеточном слое, отличающимся, как и нейроны ЦНС, высокой чувствительностью к изменениям концентрации глюкозы [25].

ОЛ – место непрерывного нейрогенеза. Инсулин участвует в его регуляции. Он поддерживает выживаемость нейронов посредством активации протеинкиназы B, способствуя фосфорилированию антиапоптотического белка Bcl-2 для ингибирования апоптоза [17]. Следовательно, инсулин действует на бульбарную нейронную сеть, модулируя обработку обонятельной информации, подвергая обонятельную функцию контролю со стороны сигналов, участвующих в регуляции энергетического гомеостаза и пищевого поведения [29]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что инсулин играет важную роль в обработке обонятельной информации в ОЛ, которая изменяется статусом питания и указывает на важность инсулина для физиологических и жизненно важных функций мозга, включая поддержание энергии, настроения и формирование памяти и обоняния.

Вместе с тем инсулин и его рецепторы локализируются в обонятельном эпителии, а именно в зрелых обонятельных сенсорных нейронах [7]. Следовательно, в ОЭ модулирующее действие инсулина направлено главным образом на рецепторные клетки,

участвующие в обнаружении специфических запахов, поскольку, как известно, только зрелые ОСН экспрессируют все компоненты внутриклеточной сигнализации. Инсулиновые рецепторы обнаруживаются также в микровиллах опорных клеток, секретирующих обонятельную слизь для создания оптимальных условий жизнедеятельности и модуляции чувствительности обонятельных клеток [7]. Таким образом, инсулин влияет на первичный этап восприятия пахучей молекулы – обнаружение запаха, происходящее на уровне обонятельного нейроэпителия. Подтверждением сказанному служат электрофизиологические данные, согласно которым под воздействием инсулина на ОЭ быстро и обратимо снижается реакция ЭОГ на запахи [20]. Поскольку ЭОГ является показателем активности рецепторных клеток, то ее ослабление свидетельствует о снижении обонятельной чувствительности. Следовательно, повышенный уровень инсулина в апикальной области обонятельного эпителия ослабляет обоняние, что потенциально снижает удовольствие от еды [6, 30].

Можно предположить, что инсулин-рецепторный комплекс активирует мембраносвязанные фосфолипазы группы С с образованием диацилглицерина (DAG) и растворимого внутриклеточного посредника инозитол-(1,4,5)-трифосфата (IP₃) из PIP₂ [31]. Связывание IP₃ с Ca²⁺-каналами в плазматической мембране запускает вход ионов кальция в ОСН. Повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ активирует кальмодулин-киназу II (CaMKII), которая ингибирует аденилатциклазу III типа (ACIII), уменьшая содержание cAMP. В результате ослабевает активность CNG-каналов, с чем, вероятно, связано снижение обонятельной чувствительности (рис. 3).

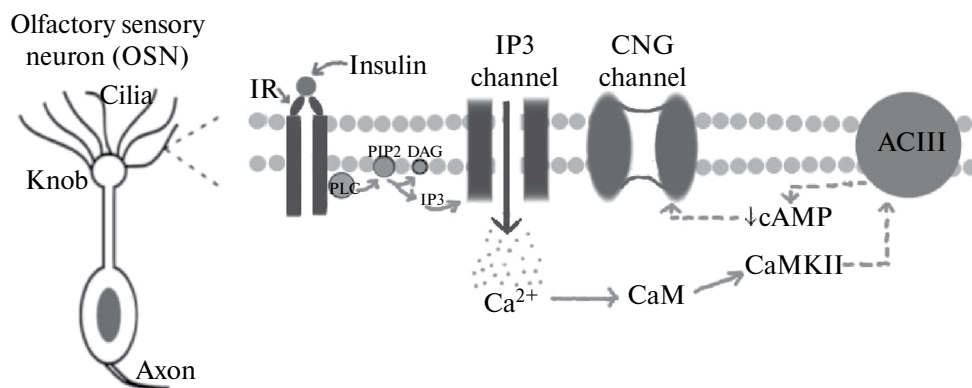


Рис. 3. Предполагаемый механизм ослабления обонятельной чувствительности под действием инсулина. Действие инсулина на инсулиновый рецептор активирует фосфолипазу С с образованием диацилглицерина (DAG) и инозитол-(1,4,5)-трифосфата (IP₃) из PIP₂. IP₃ открывает IP₃-зависимый канал в плазмолемме ОСН для входа ионов кальция, повышая его концентрацию в цитозоле. Повышение концентрации Ca²⁺ под действием инсулина приводит к активации кальмодулина, который стимулирует CaMKII, ингибирующую ACIII. Снижение cAMP уменьшает активность CNG-каналов, приводя к обонятельной дисфункции. IR – инсулиновый рецептор; PIP₂ – фосфатидилинозитол -(4,5)-дифосфат; IP₃ – инозитол- (1,4,5)-трифосфат; IP₃ channel – IP₃-зависимый канал; CNG channel – ионный канал, зависимый от циклических нуклеотидов; CaM – кальмодулин; CaMKII – Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II; ACIII – аденилатциклаза III типа; cAMP – циклический 3',5'-аденозинмонофосфат. Сплошными стрелками обозначены процессы активации. Пунктирными стрелками обозначено ослабление активности.

ОЭ подвергается постоянному обновлению на протяжении всей жизни в результате нейрогенеза и апоптоза. Присущая инсулину нейропротекторная роль является важным фактором выживания клеток ОЭ [32]. Для столь важной его функции необходимо поддержание порогового уровня гормона в слизистой оболочке [20].

Что является источником инсулина в периферическом отделе обонятельной сенсорной системы? Транспорт его в слой обонятельного эпителия из крови маловероятен, так как кровеносные сосуды локализуются под собственной пластинкой и не проникают в толщу эпителия, он бессосудистый [33]. Кроме того, эндотелий сосудов имеет плотные контакты, которые частично изолируют обонятельный нейроэпителий от капилляров, а апикальная его часть, непосредственно контактирующая с внешней средой, отделена от интерстициальной жидкости барьером из плотных контактов [34]. Вместе с тем получены доказательства того, что инсулин секретируется местно в ОЭ. Подобно глиии в ЦНС опорные клетки являются источником нейротрофических и нейромодуляторных факторов и вырабатывают инсулин [7, 20]. Таким образом, инсулин влияет на физиологию обонятельной слизистой оболочки посредством аутокринной и паракринной регуляции со стороны ОЭ и может точно настроить первый этап обнаружения запаха на уровне обонятельной слизистой, тем самым связывая обоняние с пищевым статусом животного.

Наличие щелевых контактов (ЩК) между клетками ОЭ образует синцитий, благодаря которому осуществляется межклеточное взаимодействие. Ca^{2+} и внутриклеточные сигнальные молекулы, активируемые инсулином, быстро распространяются по всему эпителию. У пациентов гипергликемические состояния при диабете приводят к нарушению их функции. Уменьшается проницаемость ЩК для Ca^{2+} . В результате каналы, образованные ими, закрываются одновременно во всех клетках, и разобщается связь между всеми клеточными типами в ОЭ, вызывая обонятельную дисфункцию [6]. Поскольку ЩК распространены почти повсеместно в тканях, включая ЦНС, то они вносят значительный вклад в клинические осложнения диабета [35].

Таким образом, инсулин и его рецепторы идентифицированы в обонятельных сенсорных нейронах и других типах клеток в ольфакторном нейроэпителии. В экспериментах на моделях грызунов показано, что они влияют на периферические этапы восприятия запахов [36], а также могут стабилизировать эпителио-бульбарные связи за счет усиления спонтанной активности рецепторных нейронов в отсутствие пахучей стимуляции. Вместе с тем, действуя на ОСН, инсулин снижает обонятельную чувствительность при стимуляции одорантами, а это, в свою очередь, ослабляет удовольствие от еды при насыщении [6, 30, 37].

Как для процессов обонятельной трансдукции, так и для нейрогенеза необходима энергия, источником которой является глюкоза, чувствительность ОСН к которой до недавнего времени была под вопросом. Однако глюкоза в концентрации 1 мМ содержится в обонятельной слизи, а ее удаление и ингибирование гликолиза или окислительного фосфорилирования ослабляют реакцию на запах. Вместе с тем в железах Боумана, в опорных клетках и в ОСН экспрессируются переносчики глюкозы, что абсолютно удовлетворяет потребность ОЭ в глюкозе в качестве энергетического источника [22, 38, 39].

Участие IGF в модуляции обонятельной функции и их локализация в обонятельной сенсорной системе

Как уже упоминалось выше, ОЭ является основным местом нейрогенеза во взрослой нервной системе. Он имеет уникальную систему регенеративных стволовых клеток-предшественников в базальном слое. Дальнейшую дифференцировку и созревание незрелых ОСН индуцируют факторы роста [40]. Семейство инсулиноподобных факторов роста (IGF) включает факторы роста (IGF-I, IGF-II), их рецепторы

и связывающие белки (IGFBP 1–6). Экспрессия IGF и их рецепторов обнаруживается в ОСН. Они находятся также в опорных клетках и в собственной пластинке, а их связывающие белки сосредоточены в ОСН и в протоках и ацинусах Боуменовых желез, являясь компонентом обонятельной слизи, в составе которой уровни IGF более высокие по сравнению со слизистой оболочкой верхних дыхательных путей или со слезами [40].

Такое превосходство свидетельствует о важной роли IGF в функции ОЭ. Подтверждением сказанному служат данные, согласно которым снижение уровней IGF-I инициирует повреждение ОЭ и, как следствие, дисфункцию обоняния. Так, например, у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями ухудшение обонятельной способности коррелирует со значительно более низким уровнем IGF-I в обонятельной слизи по сравнению с нормой. Давно известно, что IGF-I регулируется питанием [41], и при его недостатке, свойственном, например, для анорексии, концентрация IGF-I снижается. Возникающее локальное нарушение системы IGF-I–IGFBPs в ОЭ, в самом богатом IGF-I и IGFBPs участке в носу, вызывающее обонятельную дисфункцию, обусловленное статусом питания, означает, что система IGF-I–IGFBPs может обладать регуляторной активностью в отношении самого эпителия [22, 42, 43]. Полагают, что IGF-I секретируется опорными клетками и, взаимодействуя с IGF-связывающими белками в ОСН, участвует в их нейропротекции, выполняя функцию аутокринного или паракринного регулятора, играющего плейотропную роль в нейрогенезе во взрослом обонятельном эпителии. IGF-I индуцирует дифференцировку предшественников нейронов в сенсорные нейроны [42] в зависимости от статуса питания.

Бульбарные IGF-I и IGFBP-6 влияют на клетки развивающейся обонятельной луковицы и индуцируют дифференцировку молодых нейронов. Причем в ней развилась исключительная зависимость от IGF-I, начиная с раннего нейрогенеза. Показано, что в ОЛ эмбрионов мышей имеются стволовые клетки со специфическими потребностями в IGF для пролиферации или дифференцировки. В их ОЛ IGF-I является эндогенным фактором, регулирующим бульбарный нейрогенез из ее стволовых клеток. Оказалось, что ОЛ уникальна среди структур мозга по уровню экспрессии IGF-I на протяжении всей жизни, особенно среди митральных нейронов, которые образуют первый синапс с ОСН [44]. Таким путем поддерживается бульбарная целостность, которая, в свою очередь, обеспечивает выживание и митотическую регуляцию ОСН. В результате в мозге активируются соответствующие нейронные сети для модуляции гомеостазиса клеточной энергии и системной метаболической функции [45], которые могут сформироваться неправильно в зависимости от потребления пищи, снижающей содержание IGF-I и IGFBP-6 в ОЛ.

Из всего вышесказанного следует, что инсулин, IGF и их рецепторы экспрессируются в ОЭ, модулируют активность ОСН в зависимости от статуса питания и обеспечивают эндокринный механизм для изменения периферической чувствительности к запахам. Гормональная модуляция ольфакторной функции и ольфакторного поведения обуславливается тем, что гормоны, эндогенные модуляторы и их рецепторы присутствуют во всех отделах мозга, связанных с обработкой обонятельной информации.

Экспрессия метаболических факторов и их рецепторов в обонятельной сенсорной системе регулируется метаболическим статусом

Экспрессия метаболических факторов и их рецепторов в обонятельной слизистой оболочке и ОЛ регулируется питанием. Например, у крыс уровни транскрипции ИР в обонятельной слизистой повышаются в течение 48 ч голодания, что приводит к увеличению количества ИР. Удлинение голодания до 72 ч в 15 раз увеличивает уровни бульбарного инсулина по сравнению с таковым в плазме, тогда как предотвращение

сенсорного восприятия при односторонней окклюзии ноздри на 90% уменьшает число ИР-иммунореактивных ОСН [46].

Лептин представляет собой один из основных анорексических гормонов. Лептиновые рецепторы (Ob-R) в основном обнаруживаются в областях мозга, связанных с обонятельными путями, такими как ядро латерального обонятельного тракта, пириформная кора, обонятельная луковица и обонятельная слизистая оболочка. Он достигает их как из общего кровотока, так и синтезируясь местно в ОЭ и ОЛ. В обонятельной слизистой главным образом в опорных клетках, клетках протока железы Боумана, дендритных булавах и ОЖ зрелых ОСН экспрессируются Ob-Rb и Ob-Ra изоформы (рис. 1). В ОЛ локализуется изоформа Ob-Rb. Экспрессия лептина и его рецепторов в обонятельной слизистой оболочке и ОЛ регулируется питанием. Так, голодание вызывает значительное усиление транскрипции как лептина, так и Ob-R в них (47).

Совместная локализация этих рецепторов с обонятельными рецепторами, связывающимися с пахучими молекулами, дает основания для предположения, что лептин, действуя как эндокринный или паракринный фактор, может регулировать обонятельную функцию, влияя на процессы обонятельной трансдукции в ОЖ зрелых ОСН. Повышение уровней лептина и его рецепторов в периферическом отделе обонятельного анализатора во время голодания может изменять обонятельную чувствительность перед приемом пищи. Электрофизиологические исследования продемонстрировали, что лептин значительно снижает обонятельные реакции на запахи. В результате функция обоняния приводится в соответствие с состоянием сытости [37]. Экспрессия Ob-R в опорных клетках и клетках железы Боумана, секретирующих обонятельную слизь для создания благоприятных условий жизнедеятельности ОЭ, свидетельствует об участии лептина в поддержании гомеостазиса в этой ткани в зависимости от метаболического статуса.

NPY является одним из наиболее распространенных орексигенных пептидов в ЦНС. Среди многочисленных физиологических функций у многих видов животных NPY играет важную роль в контроле потребления пищи главным образом через гипоталамус. Однако показано присутствие NPY как в развивающейся, так и во взрослой обонятельной слизистой оболочке грызунов, где он экспрессируется в ОСН, опорных и обкладочных нейроэпителиальных клетках (рис. 2). NPY действует главным образом через рецепторы Y1, сопряженные с G-белком. Статус питания изменяет их экспрессию в обонятельной слизистой, которая чрезмерно увеличивается через 14 ч голодания. Было показано, что при действии NPY значительно увеличивалась амплитуда ЭОГ в ответ на пахучие стимулы у голодных крыс [36]. Поскольку ЭОГ характеризует реакции рецепторных клеток в ОЭ, то эти данные свидетельствуют о том, что NPY модулирует начальные этапы, связанные с обнаружением запахов, влияя на процессы обонятельной трансдукции. В результате при голодании обостряется обонятельная чувствительность, подтверждая сильную физиологическую связь между обонянием и процессами питания.

Таким образом, из приведенных выше примеров видно, что изменения в статусе питания изменяют экспрессию метаболических факторов и их рецепторов в обонятельной системе, влияя на механизмы обонятельной трансдукции и обонятельную чувствительность. У млекопитающих уровень сытости сигнализируется циркулирующими кровью пептидными гормонами, которые, в свою очередь, преобразуют активность обонятельных нейронов. Многие из этих молекул синтезируются и секретируются гипоталамическими нейронами, а затем высвобождаются на бульбарном уровне, другие метаболически важные гормоны имеют доступ к обонятельной слизистой, влияя непосредственно на реакции ОСН на одоранты, стимулируя или подавляя добычу корма [7]. Таким образом, обонятельная система действительно способствует корректировке регуляции потребления пищи в соответствии с физиологическими потребностями.

Возникает вопрос: могут ли изменения обонятельной чувствительности напрямую влиять на увеличение веса? Было показано, что гипосмические мыши с пониженной обонятельной чувствительностью более устойчивы к ожирению, вызванному диетой с высоким содержанием жиров. В противоположность им у гиперосмических мышей (с повышенной остротой обоняния) вес увеличивался при нормальном питании, что со временем приводило к резистентности к инсулину [10]. Эти результаты позволяют предположить, что обонятельные цепи взаимодействуют с центральными нейронами, регулируя энергетический баланс.

Острая потеря обоняния у здоровых людей является документально подтвержденной причиной потери веса, нервной анорексии и депрессии [48]. Однако прогрессирующая потеря обоняния связана с хроническим ожирением и воспалительными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, гипертония и естественное старение. Ощущение аномальных (паросмия), неприятных (какосмия) и фантомных запахов (фантосмия) представляет собой нарушения обоняния, сопровождающиеся потерей веса. Appetit как физиологический механизм, регулирующий поступление в организм пищевых веществ, интегрирует физиологию желудочно-кишечного тракта, нейробиологию, когнитивные и поведенческие функции. По мнению Fine и Riera, на первый план в гомеостатических и гедонистических аспектах питания явно вышла множественная роль обоняния [10].

Действительно, запахи пищи являются одними из основных факторов, определяющих выбор и потребление пищи. И наоборот, состояние питания людей влияет на способность обнаруживать запахи. Длительный пост повышает обонятельную чувствительность, которая уменьшается при насыщении, что указывает на обратную связь между приемом пищи и обонятельной чувствительностью. У пациентов с метаболическими нарушениями (ожирение, нервная анорексия, нервная булимия и болезненное ожирение) нарушаются все показатели обонятельной функции: увеличиваются пороги обнаружения запахов, ослабевает способность к их дискриминации и идентификации. Это означает, что существует тесная связь между обонянием и метаболическим статусом, и гормоны управляют обонятельным поведением [49].

Предлагают рассматривать обонятельную систему как новую мишень для изменения системного метаболизма у людей. Мозг, особенно гипоталамус, является главным регулятором энергетического гомеостаза всего тела. Роль обоняния выходит за рамки простого сенсорного восприятия и глубоко переплетается с функцией гипоталамуса. Запахи, воспринимаемые обонятельной системой, изменяют статус активации специфических нейронов гипоталамуса, тем самым модулируя цепи аппетита и насыщения. Более того, обонятельные сигналы влияют также на термогенез и периферический метаболизм, возможно, опосредованно ольфактомедином 2 (OLFM2), белком, который играет значительную роль в модуляции энергетического баланса. Интеграция обонятельных сигналов с регуляцией гипоталамуса подчеркивает сложный, но решающий аспект энергетического баланса, влияющий на пищевое поведение, термогенез и общий системный метаболизм [49].

3. СВЯЗЬ МЕЖДУ НАРУШЕНИЯМИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ОБОНЯНИЕМ

Запах является одним из наиболее важных сенсорных сигналов, предсказывающих качество пищевых продуктов, и играет ключевую роль в их выборе и потреблении. Appetit может возбуждаться различными стимулами, но ведущая роль принадлежит обонятельным сигналам (вкусные запахи) и уровням гормонов, которые сигнализируют о голоде и сытости [4, 12, 50]. Однако у 5% населения по различным причинам развивается обонятельная дисфункция [51]. Некоторые заболевания могут привести к частичному (гипосмия) или полному (аносмия) нарушению обоняния, вызывая серьезные изменения качества жизни.

Ожирение

Все больше данных свидетельствуют о том, что обонятельная функция изменяется при ожирении. Полагают, что увеличение индекса массы тела (ИМТ) может быть фактором риска аносмии и ограниченного контроля над потреблением пищи [49]. Ожирение рассматривают как воспалительное заболевание гипоталамуса, которое в конечном итоге приводит к увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера, повреждению таницитов и активации провоспалительных путей микроглии и астроцитов [6]. В зависимости от тяжести и продолжительности ожирения у человека наблюдаются многие хронические эндокринологические и физиологические изменения, включая резистентность к инсулину (СД2), требующие лечения. Потребление богатой энергией пищи приводит к метаболическим заболеваниям и связанной с этим обонятельной дисфункцией [4]. Имеющийся метаанализ показал, что с увеличением ИМТ изменяются обонятельные пороги, от которых зависит активность гипоталамических нейронов. Причем у людей с ожирением чувствительность повышается к запахам высокоэнергетической пищи, еще больше способствуя набору избыточного веса. В настоящее время обнаружена корреляция ИМТ и окружности талии с генами обонятельных рецепторов [49]. Это дает основание предположить, что под действием жира активируются гены, кодирующие ОР к запаху высококалорийной пищи. В целом эти результаты подчеркивают сложное взаимодействие между составом рациона и генетической регуляцией обонятельных сигнальных путей. В результате возникает порочный круг. Генетические вариации в генах обонятельных рецепторов могут влиять на обонятельную чувствительность, что, в свою очередь, может влиять на пищевые предпочтения, потенциально способствуя ожирению. Полагают, что именно обонятельная дисфункция способствует ожирению, а не наоборот, и проявляется в увеличении порогов обнаружения запахов, то есть снижением остроты обоняния к низкокалорийной пище. Тяжелое ожирение увеличивает риск аносмии. Показано, что частота увеличения веса самая высокая среди людей с аносмией, а различия в способности идентифицировать запахи с увеличением ожирения, пола и возраста могут быть связаны с более высокими когнитивными изменениями [7, 9]. Таким образом, изменения в работе обонятельной системы при ожирении могут спровоцировать неправильные решения по выбору пищи [52].

Заметное снижение обонятельной чувствительности при ожирении, о котором судили по снижению амплитуды электроolfактограммы в ответ на действие запаха, связывают с гибелью ОСН, вызванной воспалительными процессами в ОЭ, инициируемыми жиром. Они сопровождались увеличением количества провоспалительных клеток и степени гибели зрелых рецепторных нейронов вследствие апоптоза. Причем количество погибших клеток зависело от локализации ОСН в эпителии. Меньший процент потери рецепторных клеток связан, по-видимому, с большей сопротивляемостью к воспалению в определенных областях обонятельной слизистой, в частности в перегородке. В результате уменьшения их числа ослабляется связь между ОЭ и ОЛ, так как уменьшается количество аксональных проекций в специфические бульбарные гломерулы [4, 52].

Вместе с тем, согласно биохимическим данным, чрезмерное употребление жиров значительно снижает экспрессию гетеротримерного G_{olf} -белка, сопряженных с ним ОР, специфических для данного запаха, и число ОЖ, осуществляющих первичные процессы взаимодействия с пахучим стимулом и генерацию рецепторного потенциала [52]. Это означает, что жиры, приводящие к ожирению, уменьшают количество ОСН, изменяют их морфологию и нарушают механизмы обонятельной трансдукции, снижая обонятельную чувствительность.

С количеством и функционированием зрелых ОСН связано пищевое поведение, в частности, способность к обонятельной дискриминации и идентификации запахов. При ожирении эта способность ослабевает, а следовательно, ухудшается рабочая па-

мать и когнитивные функции, связанные с обучением. Как оказалось, физиологическое влияние высокожировой диеты на обонятельное обучение и распознавание может быть длительным и даже потенциально необратимым. Это связано с тем, что аксональные проекции ОСН в ОЛ, которые теряются при ожирении, не восстанавливаются после отмены диеты. Показано, что диета с высоким содержанием жиров, независимо от степени ожирения, может влиять на общую нейроархитектуру обонятельной системы [52]. Это можно объяснить потерей аксональных проекций из ОСН в ОЛ и нарушением топографической организации ее гломерул и образования нейронных цепей за счет уменьшения размера синаптической мишени.

С другой стороны, нейроархитектура обонятельной системы может нарушаться благодаря гибели нейронов в самой ОЛ из-за воспалительных процессов в ней, инициируемых жировой диетой. При ожирении хронический избыток калорий приводит к накоплению неподкожной эктопической жировой массы. Избыток жировой ткани благоприятствует воспалительным каскадам, связанным с секрецией провоспалительных адипокинов, что может иметь серьезные последствия для обоняния [4, 52].

Диабет

Ожирение резко увеличивает риск развития СД2, поскольку одним из основных последствий эктопического накопления триглицеридов является резистентность к инсулину и непереносимость глюкозы, которые могут привести к хронической гипергликемии при возникновении дисфункции β -клеток поджелудочной железы [4]. СД2, серьезная проблема общественного здравоохранения, коррелирует со снижением обонятельных способностей у людей. Из двух классических типов диабета наиболее широко изучена корреляция между СД2 и обонятельной дисфункцией. Наблюдения за пациентами с СД2 показали, что у них снижается способность к идентификации запахов [50], которая, как известно, характеризует когнитивные способности благодаря анатомической близости обонятельной сенсорной и лимбической систем. В этот отдел мозга направляются прямые проекции из ОЛ. Но, как показано на мышах с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, у них нарушается нейрогенез ОЛ и развивается обонятельная дисфункция. Более того, СД с дефицитом инсулина подавляет пролиферацию нервных стволовых клеток, а следовательно, нейрогенез в субвентрикулярной зоне, что приводит к снижению структурной пластичности ОЛ [9]. Поскольку обоняние представляет собой основной компонент пищевого поведения, его изменение может иметь серьезные последствия для распознавания химических характеристик потребляемой пищи, определяющих выбор продуктов питания, что, в свою очередь, может способствовать развитию хронических заболеваний, включая СД2.

Нарушение обоняния при СД2 сопровождается ослаблением функции периферического аппарата обонятельной сенсорной системы, в результате которого снижается острота обоняния. Ослабление обонятельной чувствительности связывают с нарушением динамики клеток ОЭ. Известно, что количество зрелых сенсорных нейронов должно строго регулироваться. Взрослый ОЭ находится в динамическом равновесии между рождением ОСН из базальных клеток, их дифференцировкой и апоптозом. Это равновесие, как полагают, регулируется аутокринными и паракринными сигналами, которые стимулируют или ингибируют пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток [53]. На крысах с диабетом, индуцированным диетой с высоким содержанием фруктозы, показано, что клеточная динамика в обонятельной слизистой изменяется в результате снижения уровня апоптоза и увеличения плотности стареющих сенсорных нейронов, имеющих более низкую чувствительность к запахам, чем зрелые ОСН, являясь причиной ослабления остроты обоняния при диабете [54].

Вместе с тем существует корреляция между СД, обонянием и дисфункцией ЦНС. Так, среди 151 японца старшего возраста, страдающих СД2 с изначальной обонятель-

ной дисфункцией, через 3 года чаще развивалась деменция по сравнению с теми, у кого не было нарушений обоняния. Кроме того, вероятность возникновения обонятельной дисфункции у пациентов с СД2 в 1.58 раза выше, чем у контрольной группы [9, 55]. Из этого следует, что обонятельная дисфункция при СД2 может предсказывать развитие деменции. У пациентов с СД2 снижается способность к идентификации запахов и увеличивается риск аносмии в результате развития резистентности к инсулину как в ОЭ, так и в ОЛ в большей степени, чем в других отделах ЦНС [56, 57].

На мышах с диабетом, вызванным диетой с высоким содержанием фруктозы, показано, что уже на ранней стадии быстро и серьезно нарушается обонятельное поведение: животные не способны различать два запаха, и им требуется больше времени при тестировании поиска пищи по запаху [54]. Дисфункция обоняния усугубляется с возрастом и, как полагают, связана с дегенеративными осложнениями СД2 [58].

Таким образом, из вышеизложенного следует, что при ожирении и СД2 развивается обонятельная дисфункция, которая затрагивает обонятельную сенсорную систему от ОЭ до центральных отделов. В результате снижается обонятельная чувствительность, ослабляется способность к дискриминации и идентификации запахов, то есть расстраивается пищевое поведение, усугубляющее тяжесть этих метаболических нарушений.

4. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАССТРОЙСТВ ОБОНЯНИЯ ПРИ НАРУШЕНИЯХ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Однако несмотря на снижение обонятельных способностей у людей с СД2, многие пациенты не осознают собственных обонятельных проблем. Поэтому для получения значимой информации о хемосенсорной функции у больных необходимо количественно оценивать обоняние. Эта процедура имеет клиническую значимость, поскольку знание о сниженной обонятельной чувствительности может помочь повысить безопасность пациентов, так как риск опасных событий увеличивается вдвое при обонятельной дисфункции. Кроме того, если не поставлен диагноз хемосенсорной недостаточности, затруднено консультирование пациентов [50, 56]. Было высказано предположение, что обонятельные нарушения являются осложнением диабета. Предложили рассматривать обонятельную дисфункцию как новое проявление центральной нейропатии, а для оценки поражения ЦНС при диабете использовать анализ обонятельных расстройств с помощью обонятельных тестов [9]. Это важно, так как расстройство обоняния при диабете снижает качество жизни. Так, пациенты с СД2, получавшие инсулин, страдали от ощущения фантомных запахов, которых в действительности в настоящее время не было. Обычно человек чувствует ложные ароматы из категории неприятных. Это доставляет существенный дискомфорт в повседневной жизни и может ограничивать активность индивидуума [9].

Было показано, что молекулярные ОР выполняют физиологические функции, отличные от обоняния. Так, одни ОР обеспечивают хемотаксис сперматозоидов, а другие участвуют в топографической организации обонятельной системы [59–61]. Подсемейство ОР, связанных с G-белком, присутствует во многих необонятельных тканях. Их экспрессия обнаружена в островках поджелудочной железы, в которой система ОР, по-видимому, регулирует стимулируемую глюкозой секрецию инсулина. Полагают, что ОР действуют как хемосенсоры веществ, полученных из пищи, способных управлять экспрессией рецепторов и активностью таким образом, чтобы модулировать метаболический гомеостазис клеточно-тканевым автономным образом [55]. К ним относится ОР Olfr109. Помимо ОЭ он присутствует в β -клетках поджелудочной железы и является островковым рецептором, воспринимающим эндогенный пептид поджелудочной железы insB:9–23 (пептид В-цепи инсулина). Значительные количества инсулиновых пептидов, полученных из устаревшего инсулина, тесно связаны с диабетом, и это обнаружение с помощью Olfr109 в β -клетках подавляет секрецию инсулина и способствует

воспалению при диабете и ожирении. Экспрессия этого рецептора повышена в различных моделях диабета или ожирения у мышей [62, 63]. Это подчеркивает огромный потенциал хемосенсорной передачи сигналов одорантных рецепторов при СД2.

Тяжелые гипогликемические явления при инсулиннезависимом диабете оказывают существенное негативное влияние на обоняние и качество жизни людей с диабетом. В физиологических условиях в регуляции секреции инсулина важную роль играет глутамат [64]. Но у пациентов с диабетом чрезвычайно увеличивается высвобождение β -клетками эндогенного глутамата. В этой ситуации возникает чрезмерная активация рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), обладающих высокой проницаемостью для Ca^{2+} , избыточно высокая внутриклеточная и внутримитохондриальная концентрация кальция, развивается дисфункция и гибель β -клеток, тем самым способствуя развитию диабета [5, 64, 65, 67–69].

Таким образом, на островковых β -клетках было продемонстрировано, что нейротоксичность эндогенного глутамата при СД2 связана с длительным воздействием на NMDAR [64, 66, 69, 70]. Показано, что они локализованы в ОЧН [71]. Одним из проявлений обонятельной дисфункции является ослабление обоняния вплоть до anosмии. Причиной этому может служить потеря рецепторных клеток в ОЧ, в которую вовлекаются NMDAR [52, 53]. Можно предположить следующий механизм NMDAR-опосредованной гибели ОЧН (рис. 4).

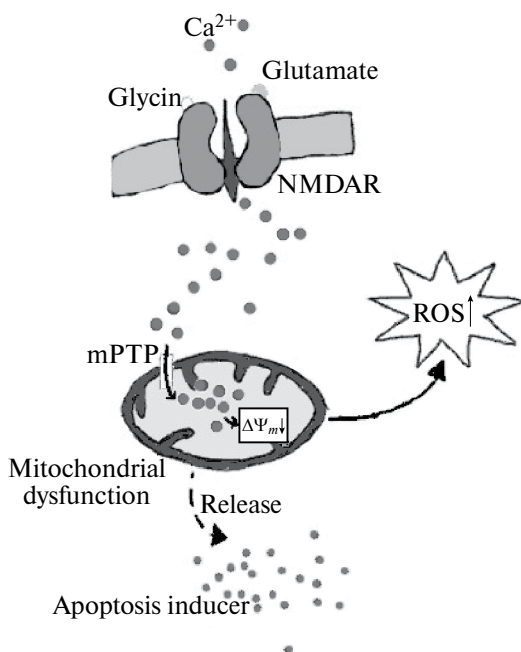


Рис. 4. Схема механизма эксайтотоксичности NMDAR в ОЧН. Повышенный уровень глутамата, возникающий при патологии, вызывает чрезмерную активацию ионотропного NMDAR, проявляющуюся в запуске значительного притока внеклеточного Ca^{2+} в ОЧН. Вследствие этого в цитозоле и митохондриях возникает перегрузка кальцием. Избыточное содержание Ca^{2+} влечет за собой дисфункцию митохондрий, сопровождающуюся деполяризацией митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), снижением выработки АТФ, накоплением активных форм кислорода (АФК) и высвобождением индуктора апоптоза цитохрома С.

NMDAR – ионотропный рецептор глутамата, связывающий N-метил-D-аспартат; mPTP – пора, изменяющая проницаемость мембраны митохондрии, $\Delta\Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал; ROS – реактивные формы кислорода.

При СД2 клетками ОЭ, аналогично β -клеткам поджелудочной железы, в обонятельную слизь высвобождается высокое содержание эндогенного глутамата. В этих обстоятельствах NMDAR слишком сильно активируются, что проявляется в большом притоке кальция в ОЧН и внутриклеточной и митохондриальной перегрузке их кальцием. Вследствие этого возникает митохондриальная дисфункция и дисбаланс окислительного стресса, что способствует накоплению активных форм кислорода (АФК) и инициирует впоследствии провоспалительные пути, порождая повреждение ОЭ и дисфункцию обоняния. При этом из-за дефицита АТФ снижается секреция инсулина в обонятельной слизи, который, как показано, обладает нейропротекторными свойствами [32, 72]. Таким образом, в патогенез обонятельной функции при СД2 вовлечена митохондриальная дисфункция, которую описывают как метаболический дефект, связанный с инсулинорезистентностью и СД2 [7, 63].

Из сказанного выше следует, что при СД2 выявляются обонятельные расстройства вплоть до потери обоняния, которые оказывают серьезные последствия для страдающих людей. Нарушение обоняния и его ликвидация – большая клиническая проблема. Более того, изменения в потреблении пищи и пищевом поведении вследствие потери обоняния и вкуса могут оказывать влияние на артериальное давление и метаболический контроль. Обонятельные и вкусовые ощущения являются важными факторами для больных СД как с точки зрения общего качества жизни, так и с точки зрения возможных опасностей, связанных с обонятельными и вкусовыми потерями в повседневной жизни [56]. Обонятельная дисфункция является симптомом, отражающим множественные процессы хронических заболеваний, затрагивающие различные системы органов и соматические процессы, включая эндокринные, метаболические, неврологические и нейродегенеративные процессы [74]. Хотя снижение обонятельной функции в основном рассматривается как результат нервно-психических заболеваний, потеря обонятельных сигналов может влиять на области мозга, которые тесно связаны с обработкой запахов и эмоциями. Поведенческие исследования показали, что у мышей с хронической аносмией, вызванной $ZnSO_4$, наблюдается усиление депрессивного поведения [51]. Около трети пациентов, обращающихся за профессиональной помощью, сообщают о значительном снижении качества жизни или депрессивных симптомах. Пациенты с приобретенной обонятельной дисфункцией часто сообщают об изменении пищевого поведения, а также об ангедонии по отношению к еде, чему сопутствует уменьшение удовольствия от еды [75].

Запахи служат предупреждающими сигналами, например, для обнаружения газа или проблем, связанных с гигиеной. В связи с этим запахи тела могут сигнализировать о состоянии заболевания и, таким образом, вызывать реакции избегания и чувство отвращения. Сигнальные функции запахов нарушаются при аносмии. Помимо фактической опасности таких ситуаций, основной проблемой пациентов с потерей обоняния является чувство незащищенности и беспокойства. Пациенты с потерей обоняния отмечают, что их беспокоят нарушения, связанные с гигиеной, что может привести к серьезным последствиям для психического здоровья, усугубляя развитие депрессивного состояния, симптомов тревоги, разочарования, печали или изоляции [4, 51, 75]. Вместе с тем следует отметить, что в экспериментах на мышах хронические последствия потери обоняния при СД2 наблюдаются у молодых животных. Эти результаты важны и для людей, поскольку молодое население более восприимчиво к изменениям обонятельной функции, чем пожилые, а мозг продолжает развиваться в детстве и подростковом возрасте, обонятельный дефицит может иметь большее влияние на более молодых пациентов.

Таким образом, необходимо раннее выявление и лечение нарушений обоняния до того, как возникнут неблагоприятные долгосрочные последствия. Полагают, что скрининг обонятельной дисфункции может служить ранним детектором наличия диабетических осложнений, что позволит быстро их распознать и лечить с последующей пользой для пациента [9, 55].

5. РОЛЬ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ

Важную роль в физиологии обонятельной слизистой оболочки может играть инсулин, который присутствует в слизи носа и играет важную роль в выживании и активности ОСН. Степень повреждения ОЭ сильно зависит от концентрации инсулина в нем. У мышей с диабетом наблюдали значительно более низкие концентрации инсулина в обонятельной слизи, чем в норме, что являлось причиной большой эпителиальной восприимчивости к повреждению, которая снижалась при увеличении содержания инсулина в обонятельной слизи [12, 32, 76]. Благодаря этому усиливалось восприятие запаха, связанное с понижением обонятельных порогов [49, 77]. Вероятно, защитный эффект можно объяснить тем, что инсулин способен увеличивать внутриклеточную и снижать внеклеточную концентрацию аденозина, противодействуя влиянию окислительного стресса в ОСН и подавляя их апоптоз. Полагают, что этот путь является ключевым механизмом, посредством которого инсулин защищает ОЭ от повреждения. Среда, обогащенная инсулином посредством назального его применения, способствует регенерации и созреванию обонятельных сенсорных нейронов при СД2. Поэтому интраназальное применение инсулина можно использовать в качестве клинического метода лечения, способствующего регенерации и созреванию ОСН после травмы [25, 76, 78].

Кроме того, инсулин может воздействовать на нейроны ОЛ. Это важно, так как она также может поражаться при хроническом воспалении носа и постинфекционных расстройствах обоняния [32]. Инсулин переносится аксонами ОСН в ОЛ. Молекулы, доставленные интраназально, демонстрируют самые высокие бульбарные концентрации, что обеспечивает возможность прямой доставки инсулина во все слои ОЛ. Более того, было показано, что интраназальное введение инсулина не имеет вредных побочных эффектов и не вызывает изменения концентрации глюкозы в крови [17, 79]. Показано, что инсулин может увеличивать плотность NMDAR на клеточной поверхности на постсинаптической мембране, тем самым модулируя возбудимость нейронов [80]. Учитывая, что инсулин, инсулиновые рецепторы и NMDAR экспрессируются в синапсах ОЛ, регуляция инсулином активности NMDAR-каналов обеспечивает важный способ модуляции возбуждающей синаптической передачи от ОСН к специфическим бульбарнымglomerулам. Таким образом, интраназальный инсулин может поддерживать формирование стабильных нейронных цепей в ОЛ.

Разработка интраназальной доставки инсулина стала потенциальным терапевтическим путем для уменьшения тяжести многих заболеваний, включая обонятельную дисфункцию [79]. Ингаляционный человеческий инсулин (ExuberaR (инсулин человеческий [происхождение рДНК])) недавно был одобрен в Европейском союзе и США для применения перед приемом пищи у взрослых пациентов с СД [81]. Интраназальный путь введения имеет значительные преимущества: абсорбция происходит главным образом посредством параклеточного транспорта и эндоцитоза. Это дает значительное превосходство, заключающееся в обходе гематоэнцефалического барьера и быстрого проникновения в ЦНС, где он обнаруживается в течение 1 ч после введения. Интраназальный путь доставки инсулина ощутимо улучшает обонятельную и зрительно-пространственную память без каких-либо побочных эффектов. В дополнение к показателям клинической эффективности функциональные исследования МРТ и ПЭТ представили убедительные доказательства, свидетельствующие о восстановлении вазореактивности и церебральной перфузии в сером и белом веществе, улучшении связности, замедлении церебрального гипометаболизма. Важно подчеркнуть, что эффекты не ограничивались только диабетиками или пациентами с болезнью Альцгеймера, инсультами. Здоровые взрослые получали аналогичную пользу, что указывает на общий положительный эффект интраназального введения инсулина на функции головного мозга [82, 83].

Хроническое лечение интраназальным инсулином у бодрствующих мышей вызвало изменения в биохимии ОЛ и связанном с ней поведении. Животные демонстрировали тенденцию к потере веса, а также значительные улучшения когнитивной функции, проявляющиеся в изменении рабочей памяти, уровня тревожности и способности к обонятельной дискриминации [79, 84]. Показано, что ежедневное интраназальное введение инсулина способствует развитию когнитивных функций у пациентов с ранней болезнью Альцгеймера или ее продромальным амнестическим когнитивным нарушением легкой степени тяжести [23, 85]. Инсулин также благоприятно регулирует энергетический гомеостазис головного мозга, оказывает мощный антиапоптотический эффект и способствует регенерации миелина и нейритов, нейротрансмиссии и функциональной связности мозга. Интраназальное введение инсулина оказывает прямое регуляторное воздействие на функции митохондрий, оказывая потенциальную терапевтическую пользу при состояниях резистентности мозга к инсулину [5, 67, 82].

В настоящее время большое внимание в лечении обонятельной дисфункции уделяется применению инсулиноподобного фактора роста (IGF-1). Показано, что IGF-1 контролирует гомеостазис тканей на протяжении всей жизни посредством регуляции пролиферации, выживания клеток. Интраназальное введение низких доз IGF-1 обладает нейропротекторными свойствами, увеличивая количество зрелых ОСН в ОЭ, повышая обонятельную чувствительность [40].

Из вышеизложенного следует, что энергетический баланс и обоняние тесно взаимосвязаны. Метаболические расстройства, нарушающие энергетический баланс, изменяют обонятельную способность за счет модуляции экспрессии протеинов в областях, связанных с обонянием. В них изменяются уровни циркулирующих молекул, которые модифицируют обонятельную способность в ответ на пищевой статус и изменяют паттерн активации мозга в ответ на пищевые запахи. Обонятельная слизистая оболочка и ОЛ экспрессируют множество рецепторов и пептидов, связанных с питанием, и поэтому хорошо приспособлены для обнаружения как изменений уровней периферических и центральных гормонов, так и глюкозы. Обонятельная система влияет на энергетический баланс путем модуляции потребления калорий и обмена веществ. Различные гормоны, связанные с питанием, которые способны изменять обонятельную физиологию и функцию, становятся разбалансированными при метаболических расстройствах и поэтому могут нарушить нормальную обонятельную деятельность. Применение современных подходов в лечении обонятельной дисфункции позволит улучшить качество жизни больных с ожирением и СД2.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (Е.В.Б.), написание статьи (Е.В.Б.), редактирование и подготовка финальной версии обзора (Е.В.Б., А.А.З., А.В.П.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета Министерства здравоохранения РФ. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Masood B, Moorthy M (2023) Causes of obesity: a review. *Clin Med (Lond)* 23(4): 284–291. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2023-0168>
2. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD, Tschöp MH (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14(3): 140–162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
3. Dallatana A, Cremonesi L, Trombetta M, Fracasso G, Nocini R, Giacomello L, Innamorati G (2023) G Protein-Coupled Receptors and the Rise of Type 2 Diabetes in Children. *Biomedicines* 11(6): 1576. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061576>
4. Faour M, Magnan C, Gurden H, Martin C (2022) Olfaction in the context of obesity and diabetes: Insights from animal models to humans. *Neuropharmacology* 15(206): 108923. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108923>
5. Galizzi G, Di Carlo M (2022) Insulin and Its Key Role for Mitochondrial Function/Dysfunction and Quality Control: A Shared Link between Dysmetabolism and Neurodegeneration. *Biology (Basel)* 11(6): 943. <https://doi.org/10.3390/biology11060943>
6. Al-Sayyar A, Hammad MM, Williams MR, Al-Onaizi M, Abubaker J, Alzaid F (2023) Neurotransmitters in Type 2 Diabetes and the Control of Systemic and Central Energy Balance. *Metabolites* 13(3): 384. <https://doi.org/10.3390/metabo13030384>
7. Palouzier-Paulignan B, Lacroix MC, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA (2012) Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses* 37(9): 769–797. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs059>
8. Julliard AK, Al Koborssy D, Fadool DA, Palouzier-Paulignan B (2017) Nutrient Sensing: Another Chemosensitivity of the Olfactory System. *Front Physiol* 12(8): 468. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00468>
9. Gouveri E, Papanas N (2021) Olfactory Dysfunction: A Complication of Diabetes or a Factor That Complicates Glucose Metabolism? A Narrative Review. *J Clin Med* 10: 5637. <https://doi.org/10.3390/jcm10235637>
10. Fine LG, Riera CE (2019) Sense of Smell as the Central Driver of Pavlovian Appetite Behavior in Mammals. *Front Physiol* 18(10): 1151. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01151>
11. Mombaerts P (1999) Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev* 9 (3): 315–320. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(99\)80047-1](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(99)80047-1)
12. Janet R, Fournel A, Fouillen M, Derrington E, Corgnet B, Bensafi M, Dreher JC (2021) Cognitive and hormonal regulation of appetite for food presented in the olfactory and visual modalities. *Neuroimage* 15(230): 117811. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117811>
13. Nogi Y, Ahasan MM, Murata Y, Taniguchi M, Sha MFR, Ijichi C, Yamaguchi M (2020) Expression of feeding-related neuromodulatory signalling molecules in the mouse central olfactory system. *Sci Rep* 10(1): 890. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57605-7>
14. Loch D, Breer H, Strotmann J (2015) Endocrine Modulation of Olfactory responsiveness: Effects of the Orexigenic Hormone Ghrelin. *Chem Senses* 40: 469–479. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv028>
15. Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC (1999) Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 69(4): 584–596. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.4.584>
16. Caillol M, Aïoun J, Baly C, Persuy MA, Salesse R (2003) Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 960(1–2): 48–61. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03755-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03755-1)
17. Plum L, Schubert M, Brüning JC (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 16(2): 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>
18. Zhuo C, Zhang Q, Wang L, Ma X, Li R, Ping J, Zhu J, Tian H, Jiang D (2023) Insulin Resistance, Diabetes and Schizophrenia: Potential Shared Genetic Factors and Implications for Better Management of Patients with Schizophrenia. *CNS Drugs* 38: 33–44. <https://doi.org/10.1007/s40263-023-01057-w>

19. *Suvisaari J, Keinänen J, Eskelinen S, Mantere O* (2016) Diabetes and Schizophrenia. *Curr Diab Rep* 16(2): 16.
<https://doi.org/10.1007/s11892-015-0704-4>
20. *Lacroix MC, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M* (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20(10): 1176–1190.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01777.x>
21. *Lars P van der H, Amer K, Alain A, Willem HG, Geert MJR* (2005) Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* 94: 1158–1166.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03269>
22. *Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB* (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24(8): 855–872.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>
23. *Dakic T, Jevdjovic T, Lakic I, Ruzicic A, Jasnica N, Djurasevic S, Djordjevic J, Vujovic P* (2023) The Expression of Insulin in the Central Nervous System: What Have We Learned So Far? *Int J Mol Sci* 24(7): 6586.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076586>
24. *Bigdaj EV, Bezgacheva EA, Samojlov VO, Korolyev YN* (2018) Influence of Hypoxic Hypoxia on Human Smell Identification Ability. *Biophysics* 63(5): 1014–1021.
<https://doi.org/10.1134/s0006350918050044>
25. *Duarte AI, Proença T, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC* (2006) Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes* 55(10): 2863–2870.
<https://doi.org/10.2337/db06-0030>
26. *Pizzagalli MD, Bensimon A, Superti-Furga G* (2021) A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *FEBS J* 288(9): 2784–2835.
<https://doi.org/10.1111/febs.15531>
27. *Zhang X, Zhu X, Bi X, Huang J, Zhou L* (2022) The Insulin Receptor: An Important Target for the Development of Novel Medicines and Pesticides. *Int J Mol Sci* 23(14): 7793.
<https://doi.org/10.3390/ijms23147793>
28. *Hand SC, Hardewig I* (1996) Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu Rev Physiol* 58: 539–563.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.0025438>
29. *Aimé P, Hegoburu C, Jaillard T, Degletagne C, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Lorsignol A, Duchamp C, Mouly AM, Julliard AK* (2012) A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats. *PLoS One* 7(12): e51227.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051227>
30. *Ketterer C, Heni M, Thamer C, Herzberg-Schäfer SA, Häring HU, Fritsche A* (2011) Acute, short-term hyperinsulinemia increases olfactory threshold in healthy subjects. *Int J Obes (Lond)* 35(8): 1135–1138.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2010.251>
31. *Tronko MD, Kozun OL, Pushkarev VM, Sokolova LK, Pushkarev VV* (2018) Reception and intracellular mechanisms of insulin action part 2. *ENDOKRYNOLOGIA* 23(4): 341–355
<https://doi.org/10.31793/1680-1466.2018.23-4.341>
32. *Kikuta S, Kuboki A, Yamasoba T* (2021) Protective Effect of Insulin in Mouse Nasal Mucus Against Olfactory Epithelium Injury. *Front Neural Circuits* 15: 803769.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2021.803769>
33. *Lucero MT* (2013) Peripheral Modulation of Smell: Fact or Fiction? *Semin Cell Dev Biol* 24(1): 58–70.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.09.001>
34. *Paysan J, Breer H* (2001) Molecular physiology of odor detection: current views. *Pflügers Arch* 441(5): 579–586.
<https://doi.org/10.1007/s004240000492>
35. *Wright JA, Richards T, Becker DL* (2012) Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract* 2012: 496904.
<https://doi.org/10.1155/2012/496904>
36. *Negróni J, Meunier N, Monnerie R, Salesse R, Baly C, Caillol M, Congar P* (2012) Neuropeptide Y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS One* 7 (9): e45266.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045266>
37. *Savignier A, Duchamp-Viret P, Grosmaître X, Chaput M, Garcia S, Ma M, Palouzier-Paulignan B* (2009) Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J Neurophysiol* 101(6): 2898–2906.
<https://doi.org/10.1152/jn.91169.2008>

38. Villar PS, Delgado R, Vergara C, Reyes JG, Bacigalupo J (2017) Energy Requirements of Odor Transduction in the Chemosensory Cilia of Olfactory Sensory Neurons Rely on Oxidative Phosphorylation and Glycolytic Processing of Extracellular Glucose. *J Neurosci* 37(23): 5736–5743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2640-16.2017>
39. Nunez-Parra A, Cortes-Campos C, Bacigalupo J, Garcia M de los A, Nualart F, Reyes JG (2011) Expression and Distribution of Facilitative Glucose (GLUTs) and Monocarboxylate/H⁺ (MCTs) Transporters in Rat Olfactory Epithelia. *Chem Senses* 36(9): 771–780. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr052>
40. Ueha R, Kondo K, Ueha S, Yamasoba T (2018) Dose-Dependent Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 in the Aged Olfactory Epithelium. *Front Aging Neurosci* 10: 385. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00385>
41. Livingstone C (2013) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clin Sci (Lond)* 125(6): 265–280. <https://doi.org/10.1042/CS20120663>
42. Federico G, Maremmanni C, Cinquanta L, Baroncelli GI, Fattori B, Saggese G (1999) Mucus of the human olfactory epithelium contains the insulin-like growth factor-I system which is altered in some neurodegenerative diseases. *Brain Res* 835(2): 306–314. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01614-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01614-5)
43. Suzuki Y, Takeda M (2002) Expression of insulin-like growth factor family in the rat olfactory epithelium. *Anat Embryol* 205: 401–405. <https://doi.org/10.1007/s00429-002-0266-5>
44. Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, de Pablo F (2003) Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23(3): 895–906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00895.2003>
45. McCurdy RD, Féron F, McGrath JJ, Mackay-Sim A (2005) Regulation of adult olfactory neurogenesis by insulin-like growth factor-I. *Eur J Neurosci* 22(7): 1581–1588. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04355.x>
46. Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA (2000) Brain Insulin Receptor Causes Activity-Dependent Current Suppression in the Olfactory Bulb Through Multiple Phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83(4): 2332–2348. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.4.2332>
47. Baly C, Kuczewski N, Badonnel K, Duchamp-Viret P (2022) The metabolic status and olfactory function. *Flavor: From Food to Behaviors*. 2022. hal-03828195. <https://www.researchgate.net/publication/365072685>
48. Daskalou D, Hsieh JW, Hugentobler M, Macario S, Sipione R, Voruz F, Coppin G, Rimmer J, Landis BN (2023) Predictive factors of involuntary weight loss in patients with smell and taste disorders. *Rhinology* Nov 9. <https://doi.org/10.4193/Rhin23.222>
49. Matiashova L, Hoogkamer AL, Timper K (2023) The Role of the Olfactory System in Obesity and Metabolism in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolites* 14(1): 16. <https://doi.org/10.3390/metabo14010016>
50. Catamo E, Tornese G, Concas MP, Gasparini P, Robino A (2021) Differences in taste and smell perception between type 2 diabetes mellitus patients and healthy controls. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 31(1): 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.08.025>
51. Ahn S, Shin HW, Mahmood U, Khalmuratova R, Jeon SY, Jin HR, Choi JS, Kim HS, Kim DW (2016) Chronic anosmia induces depressive behavior and reduced anxiety via dysregulation of glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing hormone in a mouse model. *Rhinology* 54(1): 80–87. <https://doi.org/10.4193/Rhino15.209>
52. Thiebaud N, Johnson MC, Butler JL, Bell GA, Ferguson KL, Fadool AR, Fadool JC, Gale AM, Gale DS, Fadool DA (2014) Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J Neurosci* 34(20): 6970–6984. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3366-13.2014>
53. Newman MP, Féron F, Mackay-Sim A (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 99(2): 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00194-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00194-9)
54. Rivière S, Soubeyre V, Jarriault D, Molinas A, Léger-Charnay E, Desmoulin L, Grebert D, Meunier N, Grosmaître X (2016) High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Sci Rep* 6: 34011. <https://doi.org/10.1038/srep34011>

55. *Mozzanica F, Ferrulli A, Vujosevic S, Montuori A, Cardella A, Preti A, Ambrogio F, Schindler A, Terruzzi I, Ottaviani F, Luzzi L* (2022) Olfactory dysfunction and diabetic complications in type 2 diabetic patients: a pilot study. *Endocrine* 75(3): 760–767.
<https://doi.org/10.1007/s12020-021-02897-6>
56. *Naka A, Riedl M, Luger A, Hummel T, Mueller CA* (2010) Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267(4): 547–550.
<https://doi.org/10.1007/s00405-009-1123-4>
57. *Jimenez A, Estudillo E, Guevara-Guzman R* (2020) Inflammation in the olfactory bulb: A new mechanism of olfactory dysfunction in T2D? *J Neurobiol Physiol* 2(1): 12–14.
<https://doi.org/10.46439/neurobiology.2.007>
58. *Le Floch JP, Le Lièvre G, Labrousse M, Paul M, Peynegre R, Perlemuter L* (1993) Smell dysfunction and related factors in diabetic patients. *Diabetes Care* 16(6): 934–937.
<https://doi.org/10.2337/diacare.16.6.934>
59. *Flegel C, Vogel F, Hofreuter A, Schreiner BS, Osthold S, Veitinger S, Becker C, Brockmeyer NH, Muschol M, Wennemuth G, Altmüller J, Hatt H, Gisselmann G* (2016) Characterization of the Olfactory Receptors Expressed in Human Spermatozoa. *Front Mol Biosci* 2: 73.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00073>
60. *Lodovichi C* (2020) Role of Axonal Odorant Receptors in Olfactory Topography. *Neurosci Insights* 15: 2633105520923411.
<https://doi.org/10.1177/2633105520923411>
61. *Francia S, Lodovichi C* (2021) The role of the odorant receptors in the formation of the sensory map. *BMC Biol* 19(1): 174.
<https://doi.org/10.1186/s12915-021-01116-y>
62. *Cheng J, Yang Z, Ge XY, Gao MX, Meng R, Xu X, Zhang YQ, Li RZ, Lin JY, Tian ZM, Wang J, Ning SL, Xu YF, Yang F, Gu JK, Sun JP, Yu X* (2022) Autonomous sensing of the insulin peptide by an olfactory G protein-coupled receptor modulates glucose metabolism. *Cell Metab* 34(2): 240–255.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.022>
63. *Wong W* (2022) The smell of insulin. *Sci Signal* 15 (722): eabo6724.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.abo6724>
64. *Huang XT, Li C, Peng XP, Guo J, Yue SJ, Liu W, Zhao FY, Han JZ, Huang YH, Yang-Li, Cheng QM, Zhou ZG, Chen C, Feng DD, Luo ZQ* (2017) An excessive increase in glutamate contributes to glucose-toxicity in β -cells via activation of pancreatic NMDA receptors in rodent diabetes. *Sci Rep* 7: 44120.
<https://doi.org/10.1038/srep44120>
65. *Pan X, Tao S, Tong N* (2022) Potential Therapeutic Targeting Neurotransmitter Receptors in Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 20(13): 884549.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.884549>
66. *Huang XT, Yue SJ, Li C, Huang YH, Cheng QM, Li XH, Hao CX, Wang LZ, Xu JP, Ji M, Chen C, Feng DD, Luo ZQ* (2017) A Sustained Activation of Pancreatic NMDARs Is a Novel Factor of β -Cell Apoptosis and Dysfunction. *Endocrinology* 158(11): 3900–3913.
<https://doi.org/10.1210/en.2017-00366>
67. *Rueggsegger GN, Manjunatha S, Summer P, Gopala S, Zabeilski P, Dasari S, Vanderboom PM, Lanza IR, Klaus KA, Nair KS* (2019) Insulin deficiency and intranasal insulin alter brain mitochondrial function: a potential factor for dementia in diabetes. *FASEB J* 33(3): 4458–4472.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802043R>
68. *Fisher-Wellman KH, Neuffer PD* (2012) Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab* 23(3): 142–153.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.12.008>
69. *Tianqi M, Qingmei C, Chen C, Ziqiang L, Dandan F* (2020) Excessive Activation of NMDA Receptors in the Pathogenesis of Multiple Peripheral Organs via Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation. *SN Compr Clin Med* 2(5): 551–569.
<https://doi.org/10.1007/s42399-020-00298-w>
70. *Marquard J, Otter S, Welters A, Stirban A, Fischer A, Eglinger J, Herebian D, Kletke O, Klemen MS, Stöžer A, Wnendt S, Piemonti L, Köhler M, Ferrer J, Thorens B, Schliess F, Rupnik MS, Heise T, Berggren PO, Klöcker N, Meissner T, Mayatepek E, Eberhard D, Kragl M, Lammert E* (2015) Characterization of pancreatic NMDA receptors as possible drug targets for diabetes treatment. *Nat Med* 21(4): 363–372.
<https://doi.org/10.1038/nm.3822>
71. *Бигдай ЕВ, Самойлов ВО* (2022) Влияние нейротрансмиттеров на функционирование обонятельных сенсорных нейронов. *Рос физиол журн им. ИМ Сеченова* 108(6): 699–711. [Bigdai EV, Samoilov VO (2022) Role of Neurotransmitters in the Functioning of Olfactory Sensory Neurons. *Russ Fiziol Zhurn im IM Sechenova* 108(6): 699–711. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813922060012>

72. Hall RA (2011) Autonomic modulation of olfactory signaling. *Sci Signal* 4(155): pe1.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001672>
73. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, Luscombe-Marsh N (2019) Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. *Front Physiol* 10: 532.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00532>
74. Henkin RI, Schmidt L, Velicu I (2013) Interleukin 6 in hyposmia. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 139(7): 728–734.
<https://doi.org/10.1001/jamaoto.2013.3392>
75. Schäfer L, Schriever VA, Croy I (2021) Human olfactory dysfunction: causes and consequences. *Cell Tissue Res* 383(1): 569–579.
<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03381-9>
76. Kuboki A, Kikuta S, Otori N, Kojima H, Matsumoto I, Reisert J, Yamasoba T (2021) Insulin-Dependent Maturation of Newly Generated Olfactory Sensory Neurons after Injury. *ENeuro* 8 (3): ENEURO.0168–21.2021.
<https://doi.org/10.1523/ENeuro.0168-21.2021>
77. Edwin Thanarajah S, Hoffstall V, Rigoux L, Hanssen R, Brüning JC, Tittgemeyer M (2019) The role of insulin sensitivity and intranasally applied insulin on olfactory perception. *Sci Rep* 9(1): 7222.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43693-7>
78. Brünner YF, Benedict C, Freiherr J (2013) Intranasal insulin reduces olfactory sensitivity in normosmic humans. *J Clin Endocrinol Metab* 98(10): E1626–E1630.
<https://doi.org/10.1210/jc.2013-2061>
79. Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA (2009) Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29(20): 6734–6751.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-09.2009>
80. Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV (2001) Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3561–3566.
<https://doi.org/10.1073/pnas.051634698>
81. Dunn C, Curran MP (2006) Inhaled human insulin (Exubera): a review of its use in adult patients with diabetes mellitus. *Drugs* 66(7): 1013–1032.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200666070-00019>
82. Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, Arbuckle M, Callaghan M, Tsai E, Plymate SR, Green PS, Leverenz J, Cross D, Gerton B (2012) Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol* 69(1): 29–38.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.233>
83. Lioutas VA, Novak V (2016) Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke. *Neural Regen Res* 11(3): 400–401.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.179040>
84. Brabazon F, Wilson CM, Jaiswal S, Reed J, Frey WH Nd, Byrnes KR (2017) Intranasal insulin treatment of an experimental model of moderate traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(9): 3203–3218.
<https://doi.org/10.1177/0271678X16685106>
85. Reger MA, Watson GS, Green PS, Wilkinson CW, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Breitner JC, DeGroodt W, Mehta P, Craft S (2008) Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70(6): 440–448.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000265401.62434.36>

Olfactory Dysfunction in Obesity and Type 2 Diabetes

E. V. Bigday^a, A. A. Zuykova^a, and A. V. Pozdnyakov^a

^aSt. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

**e-mail: bigday50@mail.ru*

The article analyzes literature data on the close relationship between energy balance and sense of smell. Olfaction is one of the main modalities of hedonic evaluation of food. Odor is one of the most important sensory signals predicting food quality and plays a key role in food selection and consumption. Appetite can be stimulated by various stimuli, but the leading role belongs to olfactory signals (tasty smells) and levels of hormones that signal hunger and satiety. Olfactory perception is subject to hormonal modulation. In this regard, special attention in the article is paid to the modulating function of insulin. Insulin, one of the main metabolic hormones that controls food intake, has an anorexigenic effect not only at the level of the hypothalamus, but also at the level of the olfactory pathway, especially strong in the olfactory bulb. It has a rate of insulin transport two to eight times higher than in other parts of the brain, and it contains the highest concentration of insulin and the highest density of insulin receptor kinase. Thus, insulin is not only able to penetrate to the site of olfactory information processing, but do so quickly. At the same time, insulin and its receptors are localized in the olfactory epithelium, namely in mature olfactory sensory neurons. Therefore, insulin affects the primary stage of perception of an odorous molecule – odor detection, which occurs at the level of the olfactory epithelium. The sense of smell is impaired up to its complete loss in obesity and type 2 diabetes, worsening the quality of life of such patients. The paper examines the effectiveness of intranasal insulin administration to restore olfactory function in metabolic disorders and other diseases.

Keywords: olfactory dysfunction, obesity, type 2 diabetes mellitus, olfactory epithelium, olfactory bulb, intranasal insulin

ОБЗОРЫ

**СИНЕРГИЧЕСКОЕ ТРИО МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ,
ПОДДЕРЖИВАЮЩИХ ПОРОЧНЫЙ КРУГ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ
РАССТРОЙСТВЕ**

© 2024 г. М. В. Кондашевская^{1, *}, К. А. Артемьева¹, Л. М. Михалева¹

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А. П. Авцына
Российского научного центра хирургии имени академика Б. В. Петровского, Москва, Россия

*E-mail: marivladiko@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 18.02.2024 г.

Принята к публикации 13.05.2024 г.

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) представляет собой дизадаптивную реакцию на воздействие стрессора чрезвычайной интенсивности. Как и при любой реакции на внешние вызовы, организм животных и человека реагирует на системном, организменном и клеточном уровнях. У чувствительных к стрессорам индивидов (особей) наблюдается расстройство коллективной работы стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем, а это, в свою очередь, обуславливает трансформацию поведения, когнитивных способностей и других функций ЦНС. В настоящее время доказано, что в патогенезе ПТСР важное место занимает изменение численности и состава кишечной микробиоты. В связи с этим обсуждаются методы оздоровления микрофлоры. Анализируя данные российских и иностранных исследователей, авторы пришли к выводу, что метаболическое, соматическое и психическое здоровье во многом зависит от слаженного функционирования основных взаимозависимых компонентов метаболизма: гепатобилиарной системы, кишечной микробиоты и, как считают авторы, от состояния тучных клеток. Пристальное изучение взаимодействия этих компонентов позволит определить новые терапевтические мишени и наиболее действенные методы лечения ПТСР.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, кишечная микрофлора, желчь, тучные клетки, центральная нервная система

DOI: 10.31857/S0869813924050044, **EDN:** BLLSQS

ВВЕДЕНИЕ

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) – психическое расстройство, развивающееся вследствие мощного психотравмирующего воздействия угрожающего или катастрофического характера, симптомы которого чаще всего проявляются через 6 месяцев. Реакция на стрессор настолько изменяет чувствительность и ответ всех участвующих систем уязвимых к стрессу индивидов (особей), что организм не может вернуться к исходному гомеостатическому состоянию, реакция прогрессирует и модифицируется в хроническую или повторяющуюся стрессовую форму [1]. Показано, что формирование заболевания обусловлено неадекватным изменением чувст-

вительности ответа гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГТА) оси, симпатической нервной и иммунной системы [2, 3]. Если о реакции оси ГТА и симпатической нервной системы известно достаточно много, то ответу иммунной системы уделяется недостаточно внимания [4–6].

Первая волна сигналов опасности состоит из высвобождения продуктов метаболизма, таких как АТФ и АДФ, промежуточных формаций цикла Кребса и активных форм кислорода (АФК), поддерживается пуринергической передачей сигналов [7]. При сбалансированной реакции на стрессор, после того как опасность устранена или нейтрализована, активируется согласованная последовательность восстановительных реакций в организме резистентных к стрессу индивидов (особей). В то время как стрессоры чрезвычайной интенсивности индуцируют нарушение метаболизма клеток всего организма уязвимых индивидов (особей), что детерминирует расстройство коллективной работы всех систем органов, а это, в свою очередь, обуславливает изменение поведения, когнитивных способностей и других функций ЦНС [1]. В организме млекопитающих основным регулятором метаболического гомеостаза является печень – важнейший элемент системы органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [8].

Еще со времен Г. Селье известно, что при стрессе изменяется морфофункциональное состояние иммунной системы и ЖКТ. В последнее время микробиота кишечника вызывает значительный интерес к обитающим разновидностям бактерий и их потенциальной роли в патогенезе и терапии ПТСП. Идея обеспечения устойчивости к стрессу посредством специфической модуляции кишечной микробиоты стала доминирующей. В экспериментах и в клинике уже получены обнадеживающие результаты лечения ПТСП [9, 10]. Тем не менее невозможно добиться устойчивых результатов терапии без изучения функциональной связи между кишечной микробиотой, гепатобилиарной и иммунной системами.

Резидентные клетки иммунной системы формируют трансмембранные и цитоплазматические белки – инфламасомы, которые функционируют как сенсоры «опасности». Система сенсоров включает в себя рецепторы распознавания паттернов (PRR), рецепторы компонента и Fc-рецепторы, расположенные на поверхности тучных клеток, В-лимфоцитов, дендритных клеток, макрофагов, служащие для специфического распознавания и связывания с фрагментом молекулы антитела. PRR реагируют на патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP) и на сигналы опасности, появляющиеся при повреждении тканей – эндогенные молекулярные структуры (DAMP). После активации PRR тучные клетки, тканевые макрофаги и стромальные клетки начинают секретировать провоспалительные медиаторы, включая липидные медиаторы и интерлейкины. Интерлейкины (IL) связываются со своими рецепторами на поверхности соседних клеток, что часто включает экспрессию еще большего количества цитокинов [11]. Установлено, что несколько генов, ассоциированных с иммунным воспалительным ответом, сцеплены с реакцией на стресс, приводящей к развитию ПТСП [12]. Существует уже достаточно много доказательств того, что при ПТСП формируется системное вялотекущее воспаление. При этом применение неоптимальных противовоспалительных средств не приводит к излечению от заболевания [1, 6].

О роли тучных клеток в патогенезе ПТСП известно очень мало, несмотря на то, что многие знают, что мастоциты первыми реагируют на любые изменения во внутренней и окружающей среде. В течение нескольких секунд – минут после стимуляции они секретируют как предварительно сформированные медиаторы, так и молекулы, синтезированные *de novo*, действующие как эффекторы во взаимоотношениях между иммунной, сосудистой и нервной системами, а также связях периферии и мозга [1, 13]. Таким образом, тучные клетки, являясь важными источниками различных медиаторов, способны оказывать влияние как на близлежащие клетки и органы, так и на гомеостаз всего организма. Благодаря этой особенности мастоциты играют решающую роль в регуляции различных физиологических и патологических процессов [13]. Следует

отметить, что роль мастоцитов в патогенезе ПТСР чаще всего упускается из виду [14]. Авторы статьи убеждены, что исследование функций тучных клеток раскроет новые патогенетические механизмы ПТСР и значительно расширит возможности оптимальной терапии этого заболевания.

В данном обзоре мы стремились представить малоизвестные сведения о желудочно-кишечных факторах, которые динамично участвуют в регуляции стрессорной реакции ЦНС, уделяя основное внимание гепатобилиарной системе, микрофлоре кишечника и тучным клеткам, синергическое трио которых, по нашей гипотезе, вовлечено в развитие и поддержание такого тяжелого заболевания, как посттравматическое стрессовое расстройство.

Липидный дистресс-синдром при посттравматическом стрессовом расстройстве

В наших работах и исследованиях других авторов было установлено нарушение липидного профиля и регуляции метаболизма липидов в организме животных при моделировании ПТСР, а также у людей с диагнозом ПТСР. В крови животных и людей были выявлены продукты перекисного окисления липидов [8, 15].

В 1998 г. российским академиком, хирургом В.С. Савельевым была сформулирована концепция липидного дистресс-синдрома как системной патологической реакции организма на основе нарушений липидного обмена в виде многочисленных патофизиологических, патофизиохимических и патоморфологических процессов, выходящих за рамки конкретного пораженного органа-мишени, способствующая прогрессированию имеющихся заболеваний или возникновению новых, коморбидных. Этим же автором был разработан принципиально новый подход к диагностике и лечению многих заболеваний, обусловленных нарушениями липидного метаболизма. Липидный дистресс-синдром был назван именем Савельева [16, 17]. Установленные при липидном дистресс-синдроме Савельева закономерности развития нарушений липидного метаболизма не зависят от нозологии и касаются общих для всех заболеваний патологических процессов, основу которых составляют дислипопроотеидемия, эндотоксинемия, эпителиальная и эндотелиальная дисфункция. Липидный дистресс-синдром всегда формируется на фоне нарушений липидного метаболизма – дислипопроотеидемии [18].

Наиболее важным липидом является холестерин – одноатомный жирорастворимый спирт, а по химической структуре холестерин относится к стероидам (рис. 1) [19]. Концентрация холестерина в сыворотке крови взрослого человека в норме равна ~ 200 мг/дл, что соответствует холестериновому равновесию, когда количество холестерина, поступающего в организм, равно количеству холестерина, выводимому из организма. Если концентрация холестерина в крови выше нормы, то это указывает на его задержку в организме, что является фактором риска развития атеросклероза. Холестерин присутствует во всех тканях и клетках организма человека и многих животных, синтезируется он в основном в печени (~ 50%), тонком кишечнике (~ 20%), коже, коре надпочечников, железах половой системы (рис. 1) [19, 20]. С пищей в организм поступает ~ 25–30% всего холестерина в организме. Вместе с фосфолипидами холестерин входит в состав клеточных мембран всех органов (рис. 1). Он необходим для выработки желчи и многих других важнейших биоактивных веществ, в частности, он требуется для биосинтеза стероидных гормонов надпочечниками (кортизола, альдостерона, половых гормонов, прогестерона и др.) (рис. 1) [19, 20].

Основой холестеринового гомеостаза является энтерогепатическая циркуляция желчных кислот. Первичные желчные кислоты синтезируются в гепатоцитах из холестерина и метаболизируются в желчь в составе конъюгата с глицином и таурином (рис. 2) [20]. Желчь участвует в метаболизме жирных кислот, она необходима для регуляции перистальтики кишечника, нормальной работы желез ЖКТ, в частности поджелудочной железы, а также для поддержания баланса микрофлоры. В тонкой кишке под воздействием многочисленных пищеварительных ферментов происходит деконъ-

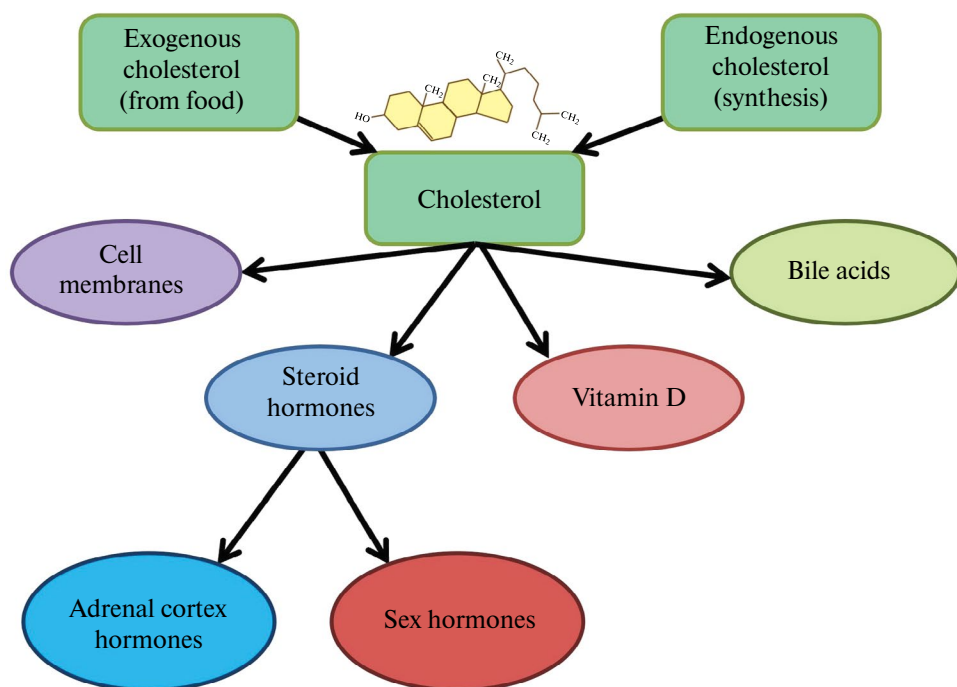


Рис. 1. Биологическая роль холестерина.

югация желчных кислот, в результате образуются соли желчных кислот, участвующие в формировании мицелл, необходимых для всасывания жиров. После всасывания жиров желчные кислоты остаются в полости тонкой кишки и по механизму обратной связи абсорбируются из подвздошной кишки в кровь (рис. 2) [20]. В кровоток поступают также триглицериды (ТГ), образующиеся в результате расщепления пищевых жиров. Холестерин и ТГ в кровотоке находятся в составе липопротеидов, выполняющих транспортную функцию. Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) осуществляют транспорт холестерина и триглицеридов в периферические клетки, липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) переносят холестерин в печень (рис. 2). Секреция липопротеидов печенью модулируется различными факторами кишечника, поджелудочной железы, жировой ткани и нервными импульсами ЦНС. В случае функциональных расстройств энтерогепатической циркуляции и/или внутрипеченочного холестаза вследствие снижения активности купферовских клеток ретикулоэндотелия формируется дислипидемия [20, 21].

Нарушение липидного метаболизма при ПТСТ обуславливает значительное увеличение маркеров перекисного окисления липидов (ПОЛ), таких как гидроперекиси липидов, конъюгированные диены, сопровождающееся заметным снижением активности ферментативных и неферментативных антиоксидантов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, восстановленный глутатион, витамины С и Е [21–23]. Продукты ПОЛ активируют инфламасомы – крупные мультибелковые комплексы, являющиеся внутриклеточными рецепторами распознавания патогенов или сигналов опасности, расположенных в тучных клетках, макрофагах, нейтрофилах, моноцитах, микроглии и др. Инфламасомы, в свою очередь, активиру-

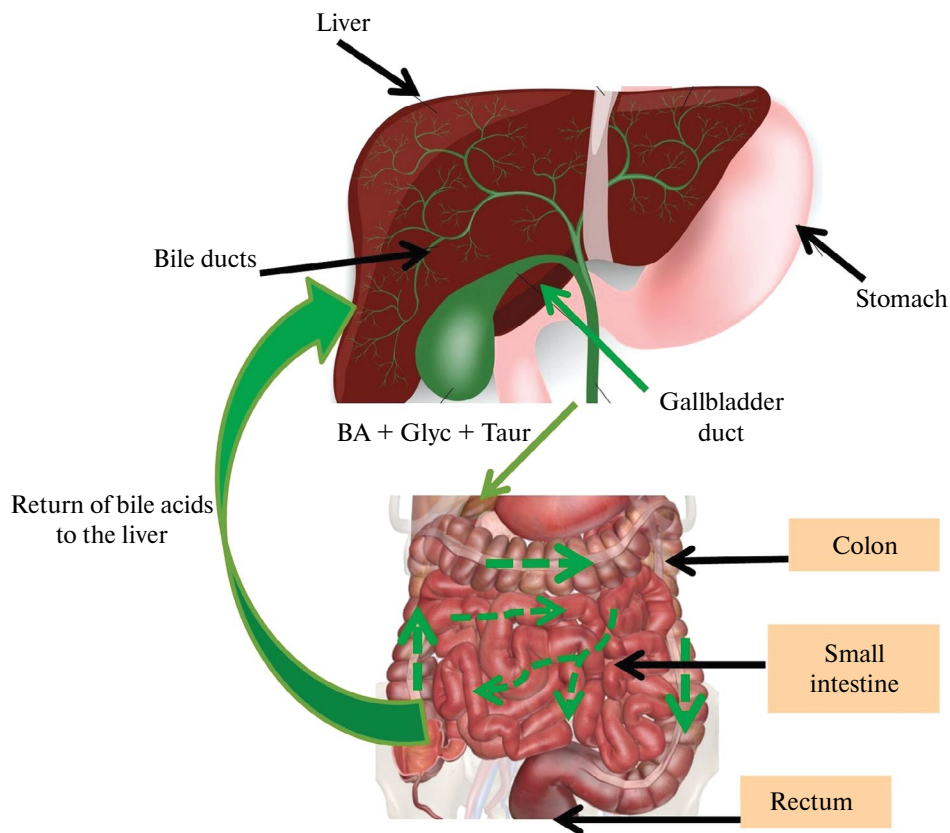


Рис. 2. Энтерогапатическая циркуляция желчи и микробная переработка желчных кислот.

Большая зеленая стрелка – пассивная абсорбция и активный транспорт желчи из кишечника в печень. Маленькие сплошные зеленые стрелки отражают направление потока желчи. Пунктирные стрелки отображают воздействие микробиоты. BA+Glyc+Taur – в состав желчи входят желчные кислоты, глицин и таурин.

ют врожденный иммунитет, в том числе и тучные клетки, что инициирует выработку провоспалительных интерлейкинов – IL1 β и IL18 [2].

Дислипидемия и ассоциированные метаболические заболевания включают в себя не только проблемы атеросклероза и его мультифокальных ишемических проявлений (ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные заболевания), но и алиментарно-конституциональное ожирение с метаболическими нарушениями в органах гепатобилиарной системы. Достаточно давно установлено, что при ПТСТ уровни параметров липидов плазмы изменены: общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП и очень низкой плотности (ЛПОНП) – значительно повышены, тогда как концентрация ЛПВП – заметно снижена [8]. В связи с этим фактор риска развития атеросклероза и ишемической болезни сердца повышается в 1.5–2 и более раз. При дислипидемии развитие жирового гепатоза происходит у 43–81%, а при ожирении – более чем у 75% пациентов, около половины из них имеют гистологические изменения, представленные воспалением или фиброзом, что является патоморфологическим субстратом для развития стеатогепатита [18, 21]. В работах иностранных авторов показана сильная корреляционная связь между заболеваниями печени (стеатоз, цирроз и др.) и распространенностью психиатрических диагнозов [22, 23]. В наших работах была установлена корреляци-

онная связь показателей морфофункциональной трансформации печени с показателями тревожного поведения крыс при моделировании ПТСР [8]. В работах других исследователей, проведенных на людях с печеночной энцефалопатией и неалкогольной жировой болезнью печени, доказана причинно-следственная связь между болезнями печени и изменениями объема кортикальных структур мозга. Последнее проявлялось в виде признаков нейропсихических расстройств, трансформации поведения и когнитивного дефицита – симптомов, характерных для ПТСР [22, 23]. В современной работе Bell с соавт. были выявлены общие гены, определяющие функционирование печени и мозга [24], в частности, ген, кодирующий пропротеинконвертазу субтилизин/кексин 9-го типа и его белковый продукт (PCSK9), участвующий в метаболизме холестерина и липидов [25–27]. Установлено, что PCSK9 увеличивает скорость метаболической деградации рецепторов ЛПНП, предотвращая диффузию ЛПНП из плазмы в клетки, способствуя повышению уровня связанного с липопротеинами холестерина в плазме. Церебральная экспрессия PCSK9 низкая, но значительно повышается во время болезненных состояний [28]. Известно, что PCSK9 среди прочего играет роль в нейрогенезе, дифференцировке нервных клеток, метаболизме центральных рецепторов ЛПНП, апоптозе нервных клеток, нейровоспалении, болезни Альцгеймера и других психоневрологических заболеваниях [25–27]. Показано, что мутации с усилением функции гена приводят к стойкой гиперхолестеринемии, сопровождающейся сердечно-сосудистыми и печеночными заболеваниями. В то же время мутации с потерей функции обычно обуславливают гипохолестеринемии, поэтому воздействие на этот ген может быть эффективным для защиты против указанных заболеваний, а возможно, и заболеваний ЦНС [25–27]. Работы по выявлению доказательств решающей роли PCSK9 в патогенных процессах, включая ЦНС, продолжаются. Однако каузальные связи между болезнями печени и изменениями в головном мозге до конца не выяснены [25–27].

Липидный состав крови в значительной степени зависит от состояния кишечной микробиоты и меняется на фоне стресса, сопровождающегося глубокими микроэкологическими нарушениями в кишечнике. Микроорганизмы ЖКТ активно участвуют в метаболизме холестерина, воздействуя на ферментные системы клеток хозяина, участвующие в синтезе эндогенного холестерина и рециркуляции желчных кислот [29]. Нарушение микробного ансамбля проявляется в виде повышенного количества анаэробов, гемолитических кишечных палочек, стафилококков, грибов с одновременным снижением числа лактобацилл (сем. *Lactobacillaceae*) и бифидобактерий (сем. *Bifidobacteriaceae*) [30]. Интенсивное размножение бактерий в тонкой кишке вследствие дисбиоза ЖКТ на фоне стресса (психоэмоционального, лекарственного, химического и т. д.) [30] приводит к усиленной деконъюгации связанных желчных кислот и образованию их токсичных эндогенных солей, нарушающих микроциркуляцию в стенке кишки, увеличивающих всасывание и возврат в печень до 100% выделенных в просвет тонкой кишки желчных кислот (рис. 3). По принципу «обратной связи» в гепатоцитах печени компенсаторно уменьшается синтез желчных кислот, вследствие чего повышается содержание холестерина в плазме крови. Таким образом, основой формирования дислипидемии и липидного дистресс-синдрома является нарушение главного природного механизма холестерина гомеостаза – энтерогепатической циркуляции желчных кислот (рис. 3) [30].

В современных работах показано, что печень взаимодействует с кишечником и компонентами кишечного барьера, в состав которого входит множество тучных клеток, через посредство желчных кислот, микробиоты кишечника и, конечно, нервной системы [8, 31, 32]. Снижение выработки желчных кислот печенью индуцирует дисбактериоз, в результате чего условно-патогенные бактерии и их липополисахариды (ЛПС) проникают в печень через воротную вену, вызывая активацию тучных клеток, секретирующих медиаторы воспаления. В то же время избыток желчных кислот обуславливает гибель гепатоцитов и приводит к тому же воспалительному эффекту [31, 32].

Нарушение процессов метаболизма холестерина и деструкции стерина до конечных продуктов индуцирует повышение концентрации холестерина, ТГ и других жиров [33], что обуславливает формирование стеатоза печени (рис. 3). Липиды, циркулирующие в крови, начинают откладываться в клетках органов, не приспособленных для их хранения: печени, миокарде, мышечных волокнах. В результате такие клетки гибнут путем апоптоза. Больные с хроническим стеатогепатозом представляют собой группу повышенного риска развития ПТСР [33], сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, артериальной гипертензии и т. д. (рис. 3). Диагностика стеатогепатоза при помо-

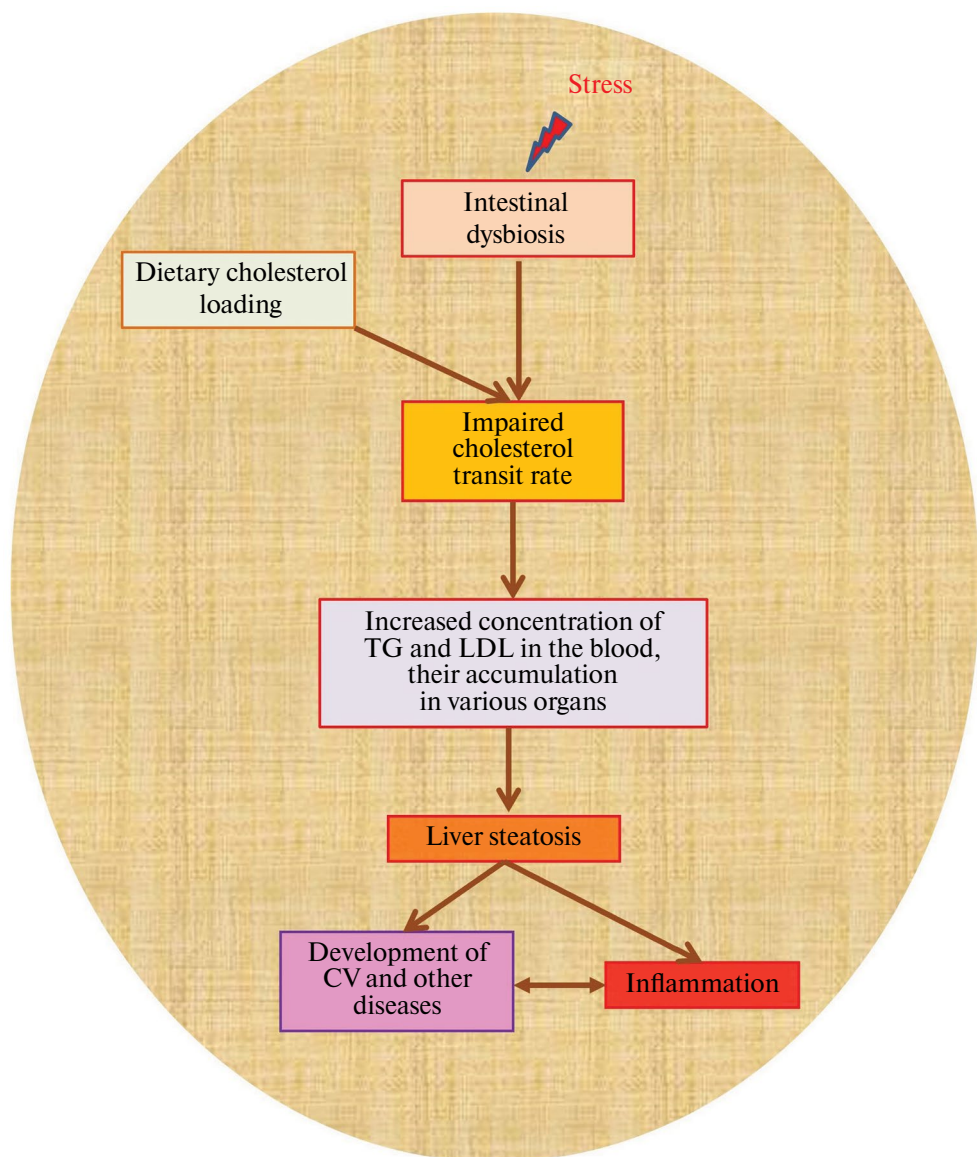


Рис. 3. Путь развития заболеваний печени и других заболеваний при гиперхолестеринемии.

TG – триглицериды, LDL – липопротеины низкой плотности, CV – сердечно-сосудистые заболевания.

щи УЗИ не представляет трудности, но верификация диагноза проводится с помощью биохимической диагностики и пункционной биопсии печени [18].

Разработанная академиком В. С. Савельевым тактика лечения липидного дистресс-синдрома основана на изменении в системе «хозяин↔микробиота» как важнейшем природном механизме холестерина гомеостаза, который до настоящего времени часто упускается из виду. Восстановление нормальной популяции микрофлоры ЖКТ должно представлять основную задачу различных консервативных и хирургических методов лечения нарушений липидного метаболизма. Это приоритетное условие, выдвинутое академиком В. С. Савельевым, обосновано тем, что резидентная и транзитная микрофлора хозяина, синтезируя, трансформируя или разрушая экзогенные и эндогенные стеринны, активно участвует в холестеринном метаболизме и является важнейшей метаболической и регуляторной системой, кооперирующей клетки и органы хозяина в поддержании гомеостаза [16–18].

Вовлеченность кишечной микробиоты в патогенез ПТСР

За последнее десятилетие было обнаружено, что посредством нейроиммунной модуляции микробиота кишечника способна вносить существенный вклад в этиопатогенез нейродегенеративных и психоневрологических расстройств, таких как депрессия, ПТСР и др. [34, 35]. Активное изучение микробного разнообразия кишечной микрофлоры позволило идентифицировать ряд микроорганизмов, включая бифидобактерии и лактобактерии в качестве потенциальных психотропных пробиотиков (рис. 4) [36].

Формирование и размножение кишечного микробиома начинается с рождения, а модификация его состава зависит в основном от генетических, эпигенетических, пищевых и некоторых других факторов. Изменение баланса кишечной микробиоты способно привести к ухудшению здоровья и развитию многих недугов, начиная с воспалительных заболеваний ЖКТ, метаболических, иммунологических и заканчивая психическими расстройствами (рис. 4) [36, 37]. Убедительные доказательства указывают на то, что кишечный микробиом человека – сложное сообщество микроорганизмов, обитающих в ЖКТ, играет решающую роль в развитии и функционировании нервной системы хозяина, сложном поведении и когнитивных процессах. Достаточно давно установлена корреляционная связь между числом и составом бактерий кишечника человека и психическими заболеваниями [38, 39]. Общегеномные ассоциативные исследования генома человека и микробиоты кишечника выявили важные взаимодействия между хозяином и микробиотой. Двусторонняя коммуникация микробиом кишечника↔мозг располагает также такими механизмами, как активация иммунной системы (в том числе активация тучных клеток) кишечника хозяина микробными метаболитами, оказывающими влияние на блуждающий нерв [35, 37]. Дисбактериоз кишечника наблюдается при различных психических расстройствах. Микробиом кишечника продуцирует многие нейротрансмиттеры, в связи с этим может способствовать развитию такого психического расстройства как ПТСР, влияя на стрессорные реакции путем изменения передачи сигналов [35, 37].

В совместной работе китайских и американских исследователей при проведении анализа генома человека и микробиома кишечника с двумя выборками между микробиологическими особенностями и психическими заболеваниями было обнаружено, что *Bacteroides eggerthii* и *Bacteroides thetaiotaomicron* положительно ассоциированы с ПТСР. Определено, что те гены, которые характерны для микробиоты, экспрессируются также и в тканях мозга человека [40].

В работе американских исследователей было установлено, что результаты терапии ПТСР неоптимальными лекарственными средствами часто приводят к развитию цирроза печени у ветеранов боевых действий [35]. Показано, что ПТСР часто индуцирует печеночную энцефалопатию, изменяя ось гепатобилиарная система↔микробиом↔мозг. В исследование были включены 93 ветерана мужского пола в возрасте 42–58 лет, уча-

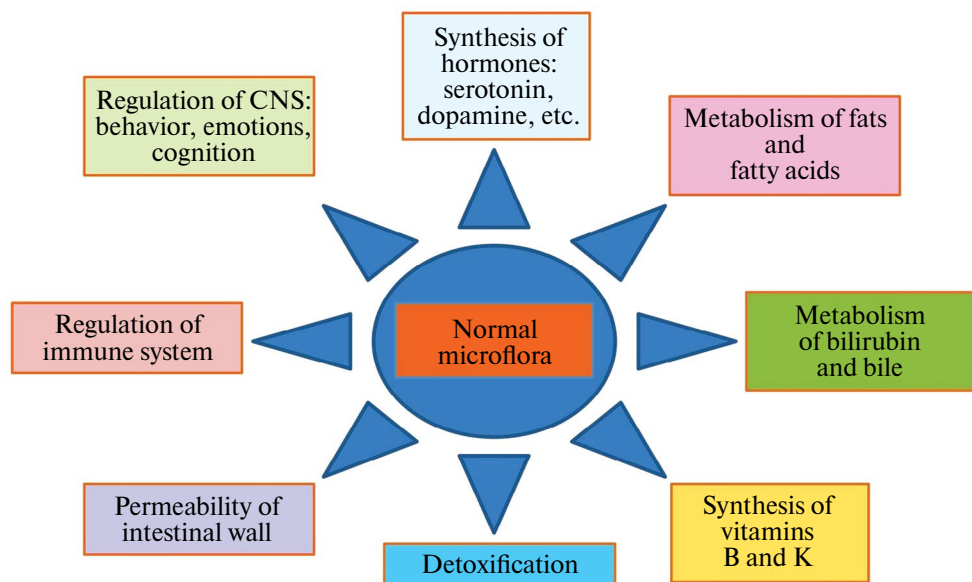


Рис. 4. Функции нормальной микрофлоры кишечника.

CNS – центральная нервная система.

ствовавших в боевых действиях. Установлено, что при ПТСР у мужчин-ветеранов с циррозом печени выявляется меньшее микробное разнообразие, большее количество транзитных патобионтов, сокращен состав аутохтонных таксонов. В отличие от группы сравнения у пациентов с ПТСР было выявлено гораздо большее количество патобионтов (*Enterococcus* и *Escherichia/Shigella*) и меньшее количество аутохтонных бактерий, принадлежащих к семействам *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*. Повышение численности бактерий из рода *Enterococcus*, а также изменение соотношения численности бактерий родов *Escherichia/Shigella* коррелировало с ухудшением когнитивных способностей [35, 41].

В работах китайских исследователей (Bajaj с соавт.) при изучении микробиоты ЖКТ ветеранов боевых действий с диагнозом ПТСР также выявлено значительно большее количество патобионтов *Enterococcus* и *Escherichia/Shigella* и меньшее число аутохтонных родов *Lachnospira* и *Ruminococcus*, семейств *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* [3].

Распространенность ПТСР и депрессии резко возросла во всем мире после пандемии COVID-19 (2019–2022 гг.). Для эффективного лечения этих состояний необходимо всестороннее понимание всех патофизиологических факторов. В работе испанских исследователей были проанализированы микробные сообщества из образцов кала 198 человек, у 8.8% которых зарегистрировано ПТСР. Выполнено секвенирование ампликона гена 16S рибосомальной РНК V3–4, проанализированы микробное разнообразие и структура сообщества, а также относительное таксономическое изобилие. Оказалось, что у лиц с коморбидным ПТСР + депрессия + состояние тревожности снижена численность бактерий вида *Fusicatenibacter saccharivorans*. При этом более высокие уровни бактерий рода *Turicibacter* положительно коррелировали с детской психической травмой, а у лиц, перенесших опасные для жизни физические травмы, были обнаружены более низкие уровни бактерий класса *Lentisphaerae* [41–43]. Учитывая неоптимальный ответ на современные методы лечения ПТСР и то, что когнитивные способности связаны с кишечной микробиотой [44, 45], которая представляет собой

новую терапевтическую мишень, воздействие на микробиоту кишечника может принести пользу оси кишечник – мозг.

В последнее время рассматриваются многие стратегии и тактики модулирования баланса кишечной экосистемы. Pearson-Leary с соавт. получили экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что можно передавать посредством переноса фекальной микробиоты поведенческий «тревожный» фенотип крыс между двумя популяциями – устойчивыми и неустойчивыми к стрессу социального поражения. Чувствительные к стрессу животные демонстрировали тревожное поведение и депрессию, что коррелировало с нейровоспалением в вентральном гиппокампе. Анализ фекальной микробиоты этих крыс выявил повышенную экспрессию бактерий рода *Clostridium*, обладающих иммуномодулирующими способностями. При переносе фекальной микробиоты от неустойчивых к стрессу крыс контрольным или устойчивым животным наблюдалось повышение плотности микроглии и экспрессия провоспалительного интерлейкина IL-1 β в вентральном гиппокампе, что сопровождалось депрессивноподобным поведением. В совокупности полученные результаты свидетельствовали о том, что с помощью трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) можно влиять на микробиом, ЦНС и поведение животных-реципиентов. В настоящее время ТФМ начали применять не только при воспалительных заболеваниях кишечника, но и при метаболическом синдроме, психических расстройствах, в частности, при ПТСР [46, 47].

В целом понимание механизмов, с помощью которых можно манипулировать микробиотой кишечника, является важным шагом в выяснении долгосрочной безопасности ТФМ и эффективности лечения ПТСР. Поскольку существующие фармакологические методы терапии ПТСР часто оказывают отрицательное влияние на микробиоту кишечника, они не всегда подходят для лечения этого заболевания [45]. Поэтому концепция обеспечения устойчивости к стрессу посредством специфической модуляции кишечной микробиоты может стать ключевым направлением для новых поисков методов терапии ПТСР. Предположительно, лечение будет направлено на нормализацию состава микробиома.

Вовлеченность тучных клеток в патогенез ПТСР

Слизистая оболочка является главным эшелонem защиты организма от вредного воздействия содержимого просвета кишечника, в том числе бактериальных токсинов. Поверхность слизистой оболочки кишечника выстлана эпителиальными клетками, которые физически отделяют просвет кишечника от внутренней среды, тем самым предотвращая проникновение потенциально вредных веществ, сохраняя при этом всасывание питательных веществ и электролитов. Барьерные функции кишечника в высокой степени регулируются иммунными и неиммунными механизмами, в которых тучные клетки (мастоциты) играют центральную роль. В частности, медиаторы, выделяемые мастоцитами, влияют на целостность и жизнеспособность эпителия кишечника, кровоток, коагуляцию и проницаемость сосудов, способствуют секреции ионов и воды, а также участвуют в нейроиммунных взаимодействиях, содействующих перистальтике (рис. 5) [11, 13].

В слизистой оболочке кишечника расположены специализированные иммунные структуры, такие как пейеровы бляшки, а также рециркулирующие клетки иммунной системы. В кишечнике как В1-, так и В2-клетки являются источником IgA, тогда как Т-лимфоциты могут быть вовлечены в процессы индукции и/или регуляции образования IgM в ответ на ТН2-антигены [48]. Среди всех этих клеток размещаются тучные клетки, имеющие, кроме множества других рецепторов, рецепторы к IgA. Мастоциты представляют собой ключевое звено, выполняющее несколько ролей в поддержании местного и общего гомеостаза [11, 13]. ЖКТ оснащен самой большой популяцией тучных клеток в организме. В кишечнике мастоциты составляют около 2–3% иммунно-клеточного пула собственной пластинки, кроме того, они расположе-

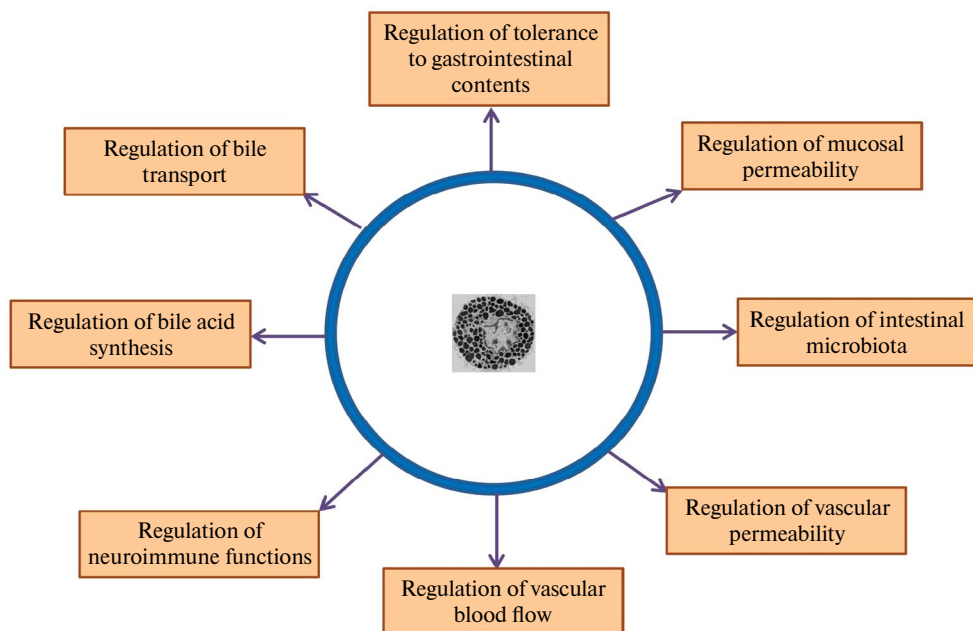


Рис. 5. Функции тучных клеток кишечника в норме.

ны в мышечном и серозном слоях (3000–25000 клеток/мм³), где они находятся в стратегической близости от кровеносных и лимфатических сосудов, а также нервных окончаний [11, 13].

Все элементы иммунной системы слизистой оболочки ЖКТ должны слаженно функционировать, чтобы генерировать иммунный ответ, который, с одной стороны, защищает хозяина от патогенов, а с другой – способствует выработке толерантности к пищевым антигенам и комменсальным бактериям. Иммунные клетки врожденного типа, включая мастоциты и дендритные клетки, обучают иммунные клетки адаптивного типа и эпителиальные клетки кишечника устанавливать симбиотические отношения с бактериями-комменсалами (рис. 5) [11, 49]. Тучные клетки вносят основной вклад в выработку иммунной толерантности слизистой оболочки, секретируя IL-9, который индуцирует выброс фермента – индоламиназную 2,3-диоксигеназу дендритными клетками. Установлено, что при дефиците IL-9 и Toll-подобных рецепторов 5 (TLR5, рецептор для бактериального компонента флагеллина), экспрессируемых мастоцитами, возникает воспалительный дисбиоз [49], что свидетельствует о регуляции тучными клетками микробного ансамбля (рис. 5). Имеются сведения, что модуляция мастоцитами состава и численности бактерий кишечника в нормальных физиологических условиях способствует нейропротекции ЦНС, сказывается на поведении и положительно влияет на нейродегенеративные процессы [11, 50]. Определено, что гепарин тучных клеток, в избытке присутствующий на поверхности слизистой оболочки кишечника, участвует в регуляции перемещений бактерий в просвете кишечника [51].

Кроме влияния на проницаемость кишечной стенки и кишечную микрофлору, мастоциты играют ключевую роль в регуляции транспорта желчи, изменяя протоковую реакцию путем воздействия на фактор роста фибробластов 15 (FGF15) и его рецеп-

торы. Этот же путь воздействия охарактеризован при исследовании участия тучных клеток в регуляции синтеза желчных кислот печенью (рис. 5) [52]. Таким образом, прослеживается как опосредованное, так и прямое влияние мастоцитов на метаболизм организма хозяина.

Острый и хронический стресс могут приводить к активации мастоцитов [11, 53, 54] и модулировать парацеллюлярную и трансклеточную проницаемость. Тучные клетки взаимодействуют с другими клетками иммунной и неиммунной систем [11, 53]. Это свойство позволяет им влиять на множество клеток, органов и систем. В частности, высвобождая такие биологически активные вещества, как гистамин, ацетилхолин, серотонин, норадреналин, кортикотропин-рилизинг гормон и др. и иммунные медиаторы (цитокины), мастоциты являются важнейшими компонентами взаимодействия между кишечной нервной системой и ЦНС (рис. 5) [11, 53]. Мастоциты играют решающую роль в физиологических и патологических реакциях, влияя через петли обратной связи на нейроиммunoэндокринную систему организма. Тучные клетки появились более 500 миллионов лет назад, когда у животных еще не сформировалась иммунная система. Существует предположение, что первоначально мастоциты служили прототипом нейроиммunoэндокринных клеток, а затем они эволюционировали в главный регулятор таких взаимодействий, тем более что большинство известных заболеваний связано с нейровоспалением, которое усиливается при стрессе [55].

Воздействие стрессора оказывает значительный эффект на функции кишечника и активацию тучных клеток как в ЖКТ, так и в ЦНС [56, 57]. Большая часть мастоцитов расположена на аблюминальной стороне кровеносных сосудов, где они взаимодействуют с нейронами, глией и эндотелиальными клетками. Стрессор за счет активации мастоцитов одновременно повышает проницаемость как гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), так и кишечного эпителиального барьера. В условиях стресса ЦНС может влиять на гепатобилиарную систему и кишечную микробиоту через основную систему стресса – ГГА ось, регулируя секрецию кортизола. Последний, в свою очередь, способен трансформировать проницаемость и барьерную функцию кишечника, изменять состояние гепатобилиарной системы. Мастоциты чувствительны к изменениям состояния ГГА оси, поскольку они обладают рецепторами к кортикотропин-рилизинг гормону, поэтому тучные клетки активируются при возбуждении ГГА оси. Высвобождаемые периферическими тучными клетками медиаторы проникают через ГЭБ и модулируют функции микроглии, астроцитов, нейронов [56, 57]. В ЦНС присутствует значительное количество мастоцитов. Глия и тучные клетки в головном мозге реактивируют друг друга посредством совместной стимуляции выработки широкого спектра биологически активных веществ. Паттерн высвобождения медиаторов мастоцитами является многофазным – готовые к применению медиаторы секретруются в окружающую среду в течение нескольких секунд, а вновь синтезируемые медиаторы – в течение следующих часов. Поэтому тучные клетки функционируют как катализаторы, усиливающие и продлевающие многие клеточные вазоактивные, нейроактивные, иммунореактивные и эндокринные реакции. В связи с этим тучные клетки являются важными эффекторами оси гепатобилиарная система ↔ кишечная микробиота ↔ мозг, которые преобразуют сигналы стресса в высвобождение широкого спектра нейротрансмиттеров и провоспалительных цитокинов. По этой причине роль мастоцитов в психических расстройствах, по мнению авторов статьи, должна рассматриваться как особо важная, поскольку эта гипотеза подтверждается многочисленными современными данными [11, 55–57].

Пандемия COVID-19 заставила исследователей по-новому взглянуть на роль тучных клеток при многих заболеваниях. Первостепенная загадка пандемии COVID-19 заключалась в том, что заставляло иммунную систему так катастрофически и внезапно реагировать лишь у некоторых пациентов, оставаясь достаточно регулируемой у большинства других заболевших. В результате проведения рандомизированных исследова-

ний возникла теория дисфункции мастоцитов. По этой гипотезе предполагается, что дисфункция мастоцитов – это, вероятнее всего, генетическая проблема, которая существует у ряда людей до заболевания COVID-19 или любого другого заболевания, проявляясь тяжелой формой воспалительной реакции. Возможно также, что воздействие сильного стрессора обуславливает постоянное увеличение численности тучных клеток, пораженных дисфункцией. Вероятно, из-за сложных взаимодействий между эпигенетическими аномалиями и индуцированным стрессором цитокиновым штормом осуществляется дополнительная мутация стволовых клеток, из которых произошли мастоциты с проявлениями дисфункции [58–60].

В настоящее время дисфункция тучных клеток считается хроническим мультисистемным воспалительным заболеванием, которое характеризуется периодическими обострениями. В связи с этим повторные симптомы инфекции COVID-19, наблюдающиеся у некоторых пациентов, объясняются тем, что они страдали от начального приступа инфекции, за которым через некоторое время следовало симптоматическое обострение вследствие активации мастоцитов с признаками дисфункции [61]. Кроме того, было показано, что психические расстройства, распространенные при COVID-19, связаны главным образом с воспалением и коагулопатией. В настоящее время считается, что эти расстройства возникают в большей степени из-за дисфункции мастоцитов. Это мнение поддерживается тем, что применение некоторых препаратов (фамотидин, аспирин), ингибирующих активацию тучных клеток и высвобождение ими медиаторов воспаления, принесло ощутимую пользу, несмотря на то что они не обладают противовирусным действием [60, 61].

Дисфункция мастоцитов остается пока что непризнанным заболеванием, несмотря на его большую распространенность, которая замаскирована крайней гетерогенностью клинических проявлений, обусловленной чрезвычайной мутационной гетерогенностью [61]. Дисфункция тучных клеток в большинстве случаев является идиопатическим заболеванием исключительно потому, что клональность не может быть продемонстрирована с помощью доступных клинических тестов. Обычно дисфункцию мастоцитов диагностируют в связи с каким-нибудь первичным заболеванием, несмотря на то, что дисфункция является первичным заболеванием. Исследования, проведенные путем секвенирования изолятов тучных клеток, полученных от пациентов с дисфункцией мастоцитов, показали, что почти у всех таких пациентов выявляется широкий спектр мутаций в *KIT* (только не в кодоне 816), а также в десятках других регуляторных генов мастоцитов. Еще одним тестом является метод проточной цитометрии для коэкспрессии CD117 на клеточной поверхности вместе с CD25 и/или CD2 [62]. Однако у некоторых пациентов дисфункция тучных клеток может быть чисто вторичной по отношению к другому процессу (например, аутоиммунному или раковому заболеванию). Следует подчеркнуть, что у диагностированных и пролеченных пациентов с дисфункцией мастоцитов при заболевании COVID-19 ни у кого из них не было тяжелого течения инфекции [63].

Потенциальные результаты предложенной гипотезы огромны как по отношению к ПТСР, так по отношению к другим воспалительным заболеваниям. Из гипотезы следует, что при наличии факта гиперактивации тучных клеток необязательно диагностическое тестирование на наличие синдрома дисфункции мастоцитов, но рекомендуется скорейшая корректировка начальной терапии, включая антагонисты рецепторов гистамина H1 и H2. Следует отметить, что большинство методов лечения, нацеленных на указанный синдром, достаточно безопасны. Использование стабилизаторов и блокирование медиаторов тучных клеток у пациентов с воспалительными заболеваниями способно помочь «успокоить» тучные клетки и исключить цитокиновые бури, что может привести к лучшим результатам, включая снижение показателей смертности. Кроме того, использование стабилизаторов мастоцитов, таких как антигистаминные препараты и кромолин, может помочь предотвратить значительный рост случаев хронизации

воспалительных заболеваний. С большой долей вероятности можно предположить, что применение стабилизаторов мастоцитов будет очень уместно при ПТСР, так как это расстройство характеризуется наличием системного субклинического воспаления с выраженным нейровоспалением [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПТСР представляет собой дизадаптивную реакцию, изменяющую чувствительность и ответ всех участвующих систем уязвимых к стрессу индивидов (особей) настолько, что организм не может вернуться к исходному гомеостазу, реакция прогрессирует и модифицируется в хроническую или повторяющуюся стрессовую реакцию. Симптомы заболевания характеризуются отсроченным периодом. У пострадавших от травматических событий впоследствии диагностируются тревожные, депрессивные и соматоформные расстройства, которые обуславливают профессиональную и социальную дизадаптацию с устойчивыми изменениями личностных черт. До настоящего времени отсутствуют надежные методы лечения ПТСР. При ПТСР, как и при многих других заболеваниях, сопровождающихся воспалением, основным ведущим или главным звеном в цепи возникающих в организме нарушений является системное вялотекущее воспаление, определяющее развитие остальных этапов болезни [1]. Возникшее в ходе формирования патологического процесса нарушение функций органов или систем обычно само становится фактором, вызывающим эти нарушения. Изменив метаболизм гепатобилиарной системы, состояние кишечной микрофлоры и активировав тучные клетки, основное звено патологического процесса трансформирует причинно-следственные отношения, и они меняются местами. Такое состояние в медицине называют «порочным кругом» – это замкнутый цикл патологических процессов. Гепатобилиарная система, кишечная микробиота и тучные клетки, находясь в синергических отношениях в качестве регуляторов метаболизма, образуют порочный круг, поддерживающий патологические процессы при ПТСР. Тактика влияния лекарственными средствами только на один компонент этого порочного круга может дать лишь временный положительный эффект. Авторы выдвигают гипотезу о необходимости лечебного воздействия на все компоненты охарактеризованного в статье метаболического порочного круга.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией: М.В.К. – разработка концепции и написание статьи; К.А.А. – оформление статьи; Л.М.М. – редактирование статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии им. академика Б.В. Петровского, № 122030200535–1. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lapshin MS, Kondashevskaya MV, Epishev VV, Patochkina NA* (2023) Pathogenesis of Post-Traumatic Stress Disorder and Therapeutic Targets. *Neurosci Behav Physiol* 53(6): 1072–1083. <https://doi.org/10.1007/s11055-023-01501-w>
2. *Speer KE, Semple S, McKune AJ* (2020) Acute Physiological Responses Following a Bout of Vigorous Exercise in Military Soldiers and First Responders with PTSD: An Exploratory Pilot Study. *Behav Sci (Basel)* 10(2): 59. <https://doi.org/10.3390/bs10020059>
3. *Liu B, Yuan ML, Hu Y, Ge FF, Wang JY, Zhang W* (2021) A Review of Research Progress in the Pathophysiological Mechanism of Stress-related Mental Disorders. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 52(1): 22–27. <https://doi.org/10.12182/20210160101>
4. *Sugama S, Kakinuma Y* (2020) Stress and brain immunity: Microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. *Brain Behav Immun Health* 7: 100111. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100111>
5. *Patas K, Baker DG, Chrousos GP, Agorastos A* (2024) Inflammation in Posttraumatic Stress Disorder: Dysregulation or Recalibration? *Curr Neuropharmacol* 22(4): 524–542. <https://doi.org/10.2174/1570159X21666230807152051>
6. *Speer K, Upton D, Semple S, McKune A* (2018) Systemic low-grade inflammation in post-traumatic stress disorder: a systematic review. *J Inflamm Res* 11: 111–121. <https://doi.org/10.2147/JIR.S155903>
7. *Naviaux RK* (2014) Metabolic features of the cell danger response. *Mitochondrion* 16: 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.08.006>
8. *Kondashevskaya MV, Mikhaleva LM, Artem'yeva KA, Aleksankina VV, Areshidze DA, Kozlova MA, Pashkov AA, Manukhina EB, Downey HF, Tselikman OB, Yegorov ON, Zhukov MS, Fedotova JO, Karpenko MN, Tselikman VE* (2023) Unveiling the Link: Exploring Mitochondrial Dysfunction as a Probable Mechanism of Hepatic Damage in Post-Traumatic Stress Syndrome. *Int J Mol Sci* 24: 13012. <https://doi.org/10.3390/ijms241613012>
9. *Sun J, Ince MN, Abraham C, Barrett T, Brenner LA, Cong Y, Dashti R, Dudeja PK, Elliott D, Griffith TS, Heeger PS, Hoisington A, Irani K, Kim TK, Kapur N, Leventhal J, Mohamadzadeh M, Mutlu E, Newberry R, Peled JU, Rubinstein I, Sengsayadeth S, Tan CS, Tan XD, Tkaczyk E, Wertheim J, Zhang ZJ* (2023) Modulating microbiome-immune axis in the deployment-related chronic diseases of Veterans: report of an expert meeting. *Gut Microbes* 15(2): 2267180. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2267180>
10. *Pearson-Leary J, Zhao C, Bittinger K, Eacret D, Luz S, Vigderman AS, Dayanim G, Bhatnagar S* (2020) The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats. *Mol Psychiatry* 25: 1068–1079. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0380-x>
11. *Кондашевская МВ* (2019) Экосистема тучных клеток – ключевой полифункциональный компонент организма животных и человека. Группа МДВ. Москва. [*Kondashevskaya MV* (2019) The mast cell ecosystem is a key multifunctional component of animals and humans. MDV Group. Moscow. (In Russ)].
12. *Zass LJ, Hart SA, Seedat S, Hemmings SM, Malan-Müller S* (2017) Neuroinflammatory genes associated with post-traumatic stress disorder: implications for comorbidity. *Psychiatr Genet* 27(1): 1–16. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000143>
13. *Traina G* (2021) The role of mast cells in the gut and brain. *J Integr Neurosci* 20: 185–196. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2021.01.313>
14. *Кондашевская МВ* (2023) Гепарин-адаптоген, секретируемый тучными клетками, горизонты гепаринотерапии. Группа МДВ. Москва. [*Kondashevskaya MV* (2023) Heparin-adaptogen secreted by mast cells, Horizons of heparin therapy. MDV Group. Moscow. (In Russ)].
15. *Perković MN, Milković L, Uzun S, Mimica N, Pivac N, Waeg G, Žarković N* (2021) Association of Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal with Post-Traumatic Stress Disorder. *Biomolecules* 11(9): 1365. <https://doi.org/10.3390/biom11091365>
16. *Петухов ВА* (2003) Липидный дистресс-синдром. М. ВЕДИ. [*Petukhov VA* (2003) Lipid distress syndrome. M. VEDI. (In Russ)].
17. *Петухов ВА, Магомедов МС* (2007) Липидный дистресс-синдром Савельева: 20 лет спустя. Поликлиника 2: 90–94. [*Petukhov VA, Magomedov MS* (2007) Saveliev's lipid distress syndrome: 20 years later. Poliklinika 2: 90–94. (In Russ)].

18. Савельев ВС, Петухов ВА, Каралкин АВ, Фомин ДК (2002) Внепеченочные билиарные дисфункции при липидном дистресс-синдроме: этиопатогенез, диагностика и принципы лечения. Русск мед журн 2: 62. [Savelyev VS, Petukhov VA, Karalkin AV, Fomin DK (2002) Extrahepatic biliary dysfunction in 10.1002/hep.32028 lipid distress syndrome: etiopathogenesis, diagnosis and principles of treatment. Russ Med J 2: 62. (In Russ)].
19. Du J, Zhu M, Bao H, Li B, Dong Y, Xiao C, Zhang GY, Henter I, Rudorfer M, Vitiello B (2016) The Role of Nutrients in Protecting Mitochondrial Function and Neurotransmitter Signaling: Implications for the Treatment of Depression, PTSD, and Suicidal Behaviors. Crit Rev Food Sci Nutr 56(15): 2560–2578.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.876960>
20. Wang Y, Yutuc E, Griffiths WJ (2021) Cholesterol metabolism pathways – are the intermediates more important than the products? FEBS J 288(12): 3727–3745.
<https://doi.org/10.1111/febs.15727>
21. Wang Y, Pandak WM, Hylemon PB, Min HK, Min J, Fuchs M, Sanyal AJ, Ren S (2023) Cholestenoic Acid as Endogenous Epigenetic Regulator Decreases Hepatocyte Lipid Accumulation in Vitro and in Vivo. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 326(2): G147–G162.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00184.2023>
22. Peng Z, Duggan MR, Dark HE, Daya GN, An Y, Davatzikos C, Erus G, Lewis A, Moghekar AR, Walker KA (2022) Association of liver disease with brain volume loss, cognitive decline, and plasma neurodegenerative disease biomarkers. Neurobiol Aging 120: 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2022.08.004>
23. Bharti V, Bhardwaj A, Elias DA, Metcalfe AWS, Kim JS (2022) A Systematic Review and Meta-Analysis of Lipid Signatures in Post-traumatic Stress Disorder. Front Psychiatry 13: 847310.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.847310>
24. Bell AS, Wagner J, Rosoff DB, Lohoff FW (2023) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in the central nervous system. Neurosci Biobehav Rev 149: 105155.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105155>
25. Barale C, Melchionda E, Morotti A, Russo I (2021) PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis. Int J Mol Sci 22(11): 5880.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115880>
26. Jaafar AK, Techer R, Chemello K, Lambert G, Bourane S (2023) PCSK9 and the nervous system: a no-brainer? J Lipid Res 64(9): 100426.
<https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100426>
27. Agnello F, Mauro MS, Rochira C, Landolina D, Finocchiaro S, Greco A, Ammirabile N, Raffo C, Mazzone PM, Spagnolo M, Occhipinti G, Imbesi A, Giacoppo D, Capodanno D (2023) PCSK9 inhibitors: current status and emerging frontiers in lipid control. Expert Rev Cardiovasc Ther 23: 1–18.
<https://doi.org/10.1080/14779072.2023.2288169>
28. Vilella A, Bodria M, Papotti B, Zanotti I, Zimetti F, Remaggi G, Elviri L, Potì F, Ferri N, Lupo MG, Panighel G, Daini E, Vandini E, Zoli M, Giuliani D, Bernini F (2023) PCSK9 ablation attenuates Aβ pathology, neuroinflammation and cognitive dysfunctions in 5XFAD mice. Brain Behav Immun 115: 517–534.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.11.008>
29. Cai J, Rimal B, Jiang C, Chiang JYL, Patterson AD (2022) Bile acid metabolism and signaling, the microbiota, and metabolic disease. Pharmacol Ther 237: 108238.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108238>
30. Kriaa A, Bourgin M, Potiron A, Mkaouer H, Jablaoui A, Gérard P, Maguin E, Rhimi M (2019) Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. J Lipid Res 60(2): 323–332.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R088989>
31. Simbrunner B, Trauner M, Reiberger T (2021) Review article: therapeutic aspects of bile acid signalling in the gut-liver axis. Aliment Pharmacol Ther 54(10): 1243–1262.
<https://doi.org/10.1111/apt.16602>
32. Teratani T, Mikami Y, Nakamoto N, Suzuki T, Harada Y, Okabayashi K, Hagihara Y, Taniki N, Kohno K, Shibata S, Miyamoto K, Ishigame H, Chu PS, Sujino T, Suda W, Hattori M, Matsui M, Okada T, Okano H, Inoue M, Yada T, Kitagawa Y, Yoshimura A, Tanida M, Tsuda M, Iwasaki Y, Kanai T (2020) The liver-brain-gut neural arc maintains the T_{reg} cell niche in the gut. Nature 585(7826): 591–596.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2425-3>
33. Lin H, Wang L, Liu Z, Long K, Kong M, Ye D, Chen X, Wang K, Wu KK, Fan M, Song E, Wang C, Hoo RL, Hui X, Hallenborg P, Piao H, Xu A, Cheng KK (2022) Hepatic MDM2 Causes Metabolic Associated Fatty Liver Disease by Blocking Triglyceride-VLDL Secretion via ApoB Degradation. Adv Sci (Weinh) 9(20): e2200742.
<https://doi.org/10.1002/advs.202200742>

34. Ke S, Hartmann J, Ressler KJ, Liu YY, Koenen KC (2023) The emerging role of the gut microbiome in posttraumatic stress disorder. *Brain Behav Immun* 114: 360–370.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.09.005>
35. Bajaj JS, Sikaroodi M, Fagan A, Heuman D, Gilles H, Gavis EA, Fuchs M, Gonzalez-Maeso J, Nizam S, Gillevet PM, Wade JB (2019) Posttraumatic stress disorder is associated with altered gut microbiota that modulates cognitive performance in veterans with cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 317: G661–G669.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00194.2019>
36. Bastiaanssen TFS, Cowan CSM, Claesson MJ, Dinan TG, Cryan JF (2019) Making Sense of the Microbiome in Psychiatry. *Int J Neuropsychopharmacol* 22(1): 37–52.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy067>
37. Xiao L, Liu S, Wu Y, Huang Y, Tao S, Liu Y, Tang Y, Xie M, Ma Q, Yin Y, Dai M, Zhang M, Llamocca E, Gui H, Wang Q (2023) The interactions between host genome and gut microbiome increase the risk of psychiatric disorders: Mendelian randomization and biological annotation. *Brain Behav Immun* 113: 389–400.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.08.003>
38. Montiel-Castro AJ, González-Cervantes RM, Bravo-Ruiseco G, Pacheco-López G (2013) The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front Integr Neurosci* 7: 70.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00070>
39. Douglas-Escobar M, Elliott E, Neu J (2013) Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain. *JAMA Pediatr* 167(4): 374–379.
<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.497>
40. Xiao L, Liu S, Wu Y, Huang Y, Tao S, Liu Y, Tang Y, Xie M, Ma Q, Yin Y, Dai M, Zhang M, Llamocca E, Gui H, Wang Q (2023) The interactions between host genome and gut microbiome increase the risk of psychiatric disorders: Mendelian randomization and biological annotation. *Brain Behav Immun* 113: 389–400.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.08.003>
41. Molina-Torres G, Rodríguez-Arrastia M, Roman P, Sanchez-Labraca N, Cardona D (2019) Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behav Pharmacol* 30 (2 and 3-Spec Issue): 187–200.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000478>
42. Gao F, Guo R, Ma Q, Li Y, Wang W, Fan Y, Ju Y, Zhao B, Gao Y, Qian L, Yang Z, He X, Jin X, Liu Y, Peng Y, Chen C, Chen Y, Gao C, Zhu F, Ma X (2022) Stressful events induce long-term gut microbiota dysbiosis and associated post-traumatic stress symptoms in healthcare workers fighting against COVID-19. *J Affect Disord* 303: 187–195.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.02.024>
43. Malan-Müller S, Valles-Colomer M, Palomo T, Leza JC (2023) The gut-microbiota-brain axis in a Spanish population in the aftermath of the COVID-19 pandemic: microbiota composition linked to anxiety, trauma, and depression profiles. *Gut Microbes* 15: 2162306.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2162306>
44. Pearson-Leary J, Zhao C, Bittinger K, Eacret D, Luz S, Vigderman AS, Dayanim G, Bhatnagar S (2020) The gut microbiome regulates the increases in depressive-type behaviors and in inflammatory processes in the ventral hippocampus of stress vulnerable rats. *Mol Psychiatry* 25: 1068–1079.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0380-x>
45. Клёсов РА, Каркищенко НН, Степанова ОИ, Матвеевко ЕЛ (2020) Лекарственное поражение желудочно-кишечной системы и пути ее коррекции (обзор). *Биомедицина* 16(3): 14–34. [Klesov RA, Karkischenko NN, Stepanova OI, Matveyenko EL (2020) Drug-Induced Injury of the Gastrointestinal System and Methods for Its Correction (A Review). *J Biomed* 16(3): 14–34. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-14-34>
46. Alagiakrishnan K, Halverson T (2021) Microbial Therapeutics in Neurocognitive and Psychiatric Disorders. *J Clin Med Res* 13: 439–459.
<https://doi.org/10.14740/jocmr4575>
47. Halverson T, Alagiakrishnan K (2020) Gut microbes in neurocognitive and mental health disorders. *Ann Med* 52(8): 423–443.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2020.1808239>
48. Снегирева НА, [Сидорова ЕВ], Дьяков ИИ, Гаврилова МВ, Чернышова ИИ, Пашков ЕП, Свитич ОА (2021) IgM- и IgA-ответ перитонеальных В1-клеток на Т-независимый антиген второго рода в присутствии γδТ-клеток *in vitro*. *Мед иммунол* 23(2): 245–256. [Snegireva NA, [Sidorova EV], Dyakov IN, Gavrilova MV, Chernishova IN, Pashkov EP, Svitich OA (2021) IgM- and IgA-response of peritoneal B1 cells to the TI-2 antigen with in vitro presence of γδTcells". *Med Immunol* 23(2): 245–256. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-IAI-2157>

49. Renga G, Moretti S, Oikonomou V, Borghi M, Zelante T, Paolicelli G, Costantini C, De Zuani M, Vilella VR, Raia V, Del Sordo R, Bartoli A, Baldoni M, Renauld JC, Sidoni A, Garaci E, Maiuri L, Pucillo C, Romani L (2018) IL-9 and Mast Cells Are Key Players of *Candida albicans* Commensalism and Pathogenesis in the Gut. *Cell Rep* 23: 1767–1778.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.034>
50. Girolamo F, Coppola C, Ribatti D (2017) Immunoregulatory effect of mast cells influenced by microbes in neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun* 65: 68–89.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.017>
51. Yang G, Yang L, Zhou X (2023) Inhibition of bacterial swimming by heparin binding of flagellin FliC from *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Arch Microbiol* 205(8): 286.
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03622-9>
52. Meadows V, Kennedy L, Ekser B, Kyritsi K, Kundu D, Zhou T, Chen L, Pham L, Wu N, Demieville J, Hargrove L, Glasner S, Alpini G, Francis H (2021) Mast Cells Regulate Ductular Reaction and Intestinal Inflammation in Cholestasis Through Farnesoid X Receptor Signaling. *Hepatology* 74(5): 2684–2698.
<https://doi.org/10.1002/hep.32028>
53. Theoharides TC (2020) The impact of psychological stress on mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol* 125(4): 388–392.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.07.007>
54. Woźniak E, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W (2021) Psychological Stress, Mast Cells, and Psoriasis-Is There Any Relationship? *Int J Mol Sci* 22: 13252.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413252>
55. Theoharides TC (2017) Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol* 26(9): 751–759.
<https://doi.org/10.1111/exd.13288>
56. Traina G, Cocchi M (2020) Mast cells, astrocytes, arachidonic acid: do they play a role in depression? *Appl Sci* 10: 3455.
<https://doi.org/10.3390/app10103455>
57. Jones MK, Nair A, Gupta M (2019) Mast cells in neurodegenerative disease. *Front Cell Neurosci* 13: 171.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00171>
58. Kempuraj D, Selvakumar GP, Ahmed ME, Raikwar SP, Thangavel R, Khan A, Zaheer SA, Iyer SS, Burton C, James D, Zaheer A (2020) COVID-19, Mast Cells, Cytokine Storm, Psychological Stress, and Neuroinflammation. *Neuroscientist* 26: 402–414.
<https://doi.org/10.1177/1073858420941476>
59. Afrin LB, Weinstock LB, Molderings GJ (2020) Covid-19 hyperinflammation and post-Covid-19 illness may be rooted in mast cell activation syndrome. *Int J Infect Dis* 100: 327–332.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.016>
60. Afrin LB, Self S, Menk J, Lazarchick J (2017) Characterization of mast cell activation syndrome. *Am J Med Sci* 353: 207–215.
<https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.12.013>
61. Altmüller J, Haenisch B, Kawalia A, Menzen M, Nöthen MM, Fier H, Molderings GJ (2017) Mutational profiling in the peripheral blood leukocytes of patients with systemic mast cell activation syndrome using next generation sequencing. *Immunogenetics* 69: 359–369.
<https://doi.org/10.1007/s00251-017-0981-y>
62. Afrin LB, Self S, Menk J, Lazarchick J (2017) Characterization of mast cell activation syndrome. *Am J Med Sci* 353: 207–215.
<https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.12.013>
63. Afrin LB, Weinstock LB, Molderings GJ (2020) Covid-19 hyperinflammation and post-Covid-19 illness may be rooted in mast cell activation syndrome. *Int J Infect Dis* 100: 327–332.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.016>

Synergic Trio of Metabolic Regulators Supporting the Vicious Circle of Pathological Processes in Post-Traumatic Stress Disorder

M. V. Kondashevskaya^{a, *}, K. A. Artemyeva^a, and L. M. Mikhaleva^a

*^aAvtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution
"Petrovsky National Research Centre of Surgery"*

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

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a maladaptive response to exposure of extreme intensity stressor. The body of animals and humans reacts at the systemic and cellular levels, as with any response to external challenges. Disorder of the collective work of stress-realizing and stress-limiting systems causes transformation of behavior, cognitive abilities and other functions of the central nervous system in stress-sensitive individuals. Currently, it has been proven that in the pathogenesis of PTSD, an important place is occupied by changes in the number and composition of the intestinal microbiota. In this regard, methods of improving the microflora are being considered. Analyzing data of Russian and foreign researchers, the authors came to the conclusion, that metabolic, somatic and mental health largely depends on the coordinated functioning of the main interdependent components of metabolism: hepatobiliary system, intestinal microbiota and, according to the authors, on the state of mast cells. A close study of the interaction of these components will allow us to identify new therapeutic targets and the most effective methods of treating PTSD.

Keywords: post-traumatic stress disorder, intestinal microflora, bile, mast cells. central nervous system

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КЛЮЧЕВЫЕ АНАБОЛИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В *M. SOLEUS* ЧЕЛОВЕКА
ПОСЛЕ 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ**

© 2024 г. С. П. Белова¹, С. А. Тыганов¹, К. А. Зарипова¹, Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: swetbell@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 21.03.2024 г.

Принята к публикации 24.03.2024 г.

Длительный постельный режим может оказать существенное негативное воздействие на скелетные мышцы, приводя к мышечной атрофии и снижению силы. Потеря мышечной массы и силы особенно выражена в первую неделю иммобилизации. Антиорто-статическая гипокинезия (АНОГ) – один из способов моделирования гравитационной разгрузки скелетных мышц, при котором человек пребывает на постельном режиме с углом наклона головного конца кровати на -6° . При АНОГ наблюдается развитие мышечной атрофии, являющейся результатом снижения синтеза белка и усиления его распада. Данная работа посвящена анализу ключевых анаболических маркеров камбаловидной мышцы (*m. soleus*) при 21-суточной АНОГ. Эксперимент с антиорто-статической гипокинезией был проведен на базе Института медико-биологических проблем РАН. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25–35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона головного конца кровати -6° . Игольчатая биопсия *m. soleus* проводилась по методу Бергстрема до гипокинезии и на 21-е сутки гипокинезии. Полученный в ходе биопсии материал немедленно замораживался в жидком азоте для дальнейших вестерн-блот и ПЦР анализов. Изучение субстратов mTORC1 показало достоверное снижение фосфорилирования p70 и 4EBP1 после АНОГ. Также наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования рибосомальной киназы p90RSK, достоверное увеличение фосфорилирования eEF2 и увеличение экспрессии мРНК eEF2K. Помимо этого, после АНОГ снижалось фосфорилирование AMPK и ее субстрата ACC. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что снижение синтеза белка вносит вклад в развитие атрофии *m. soleus* человека после 21-суточной АНОГ наряду с увеличением протеолиза.

Ключевые слова: постельный режим, гипокинезия, камбаловидная мышца, атрофия, синтез белка

DOI: 10.31857/S0869813924050055, **EDN:** BLEGYB

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы чрезвычайно пластичны. Снижение или полное прекращение сократительной активности приводит к их атрофии, что выражается в снижении мышечной массы, размера мышечных волокон, максимальной силы сокращения и снижении работоспособности [1, 2]. К атрофии мышц приводит иммобилизация конечностей, гравитационная разгрузка или постельный режим, которым сопровождаются различные патологические состояния [3]. Антиорто-статическая гипокинезия (АНОГ)

является, наряду с «сухой» иммерсией, моделью, с помощью которой воспроизводится механическая и функциональная разгрузка скелетных мышц человека. АНОГ – это состояние, при котором человек пребывает на постельном режиме с углом наклона головного конца кровати на -6° , имитируя условия микрогравитации. Это состояние изучалось на предмет его воздействия на организм человека и, в частности, на развитие атрофии и изменение функциональных свойств скелетных мышц. В экспериментах с АНОГ зафиксирована атрофия мышц с различным миозиновым фенотипом [3]. Гипокинезия в течение 60 суток приводила к уменьшению площади поперечного сечения (ППС) мышц поясницы, тогда как 120-суточная гипокинезия – к уменьшению ППС камбаловидной мышцы (*m. soleus*); в обоих случаях атрофия коррелировала с уменьшением силы сокращения этих мышц [4, 5]. Кратковременная длительность АНОГ (17–20 суток) также приводила к снижению ППС мышц голени на 10–12% [3, 6, 7]. Однако, как указывают работы Шенкмана и Козловской, атрофические изменения при гипокинезии развиваются медленнее, чем при «сухой» иммерсии, так как при АНОГ сохраняются, хоть и небольшое, опорное воздействие в результате перераспределения силы реакции опоры с подошв ног на заднюю поверхность тела человека [8–12]. Если АНОГ минимизирует силы, действующие на мышцы нижних конечностей человека в вертикальном или сидячем положении, то «сухая» иммерсия нейтрализует эти силы с помощью гидростатической подъемной силы [13]. При этом до сих пор совершенно неизученным остается вопрос о привязке кожных сенсорных полей глубокой механочувствительности различных участков тела к активности определенных мышц и мышечных групп. Поэтому вопрос о влиянии опорных реакций, приходящихся на поверхность спины и ягодиц, на активность камбаловидной мышцы по-прежнему остается неясным. Таким образом, при АНОГ наблюдается значительная зависящая от времени воздействия мышечная атрофия и снижение мышечной силы. Установлено, что снижение силы в два раза превышает снижение мышечной массы и размеров волокон [14]. Это может свидетельствовать о том, что при хронической разгрузке скелетные мышцы становятся слабее, и некоторая часть этой функциональной потери происходит в самой мышце, но также значительная часть наблюдающихся перемен, по-видимому, объясняется изменениями иннервации мышц, действующими на центральном и периферическом уровнях [14]. Понимание механизмов предотвращения уменьшения мышечной массы, вызванного функциональной разгрузкой скелетных мышц, по-прежнему является актуальной научной проблемой, решение которой имеет клиническое применение (иммобилизация, саркопения и кахексия) [15]. Будущие исследования должны обобщить воздействие АНОГ на людей и оценить, в какой степени эти эффекты можно смягчить с помощью различных контрмер [3]. Также должны быть изучены типы и продолжительность восстановления, необходимого для успешного поддержания двигательных функций.

Принято считать, что атрофия является результатом снижения синтеза белка и усиления его распада [16, 17]. Однако соотношение вклада этих процессов в развитие атрофии давно является предметом дискуссий. Phillips и McGlory в своей работе приходят к выводу, что у людей в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц наблюдается минимальное увеличение интенсивности протеолиза, а снижение синтеза белка является преобладающим механизмом, лежащим в основе снижения массы и площади поперечного сечения мышечных волокон [18]. Reid и соавт. высказывают другую точку зрения [19], указывая на то, что доминирующим механизмом, вызывающим мышечную атрофию, является протеолиз. В своем обзоре они ссылаются на работы, показывающие, что практически при всех атрофических состояниях увеличивается экспрессия мРНК ключевых мышечных E3-убиквитинлигаз MAFbx и MuRF-1. Увеличение экспрессии этих убиквитинлигаз было зарегистрировано в диафрагме людей [20–22] и грызунов [23], находящихся на искусственной вентиляции легких, в мышцах конечностей человека после постельного режима, иммобилизации нижних конечностей

тей [24–29], а также в мышцах грызунов после вывешивания задних конечностей, иммобилизации и при космическом полете [30–32]. Возникшие противоречия можно связать с тем, что в исследованиях на животных и человеке часто рассматриваются разные по функциям и миозиновому фенотипу мышцы [33, 34]. Кроме того, некоторые авторы показывают, что атрофия *m. vastus lateralis* происходит неравномерно – одни области атрофируются сильнее, чем другие [35]. При этом данные о молекулярных событиях в *m. soleus* у человека при разгрузке обрывочны, в то время как на модельных экспериментах с грызунами в *m. soleus* сигнальные процессы исследованы намного лучше, но они плохо соотносятся с имеющимися данными по *m. vastus lateralis* людей при гипокинезии и «сухой» иммерсии. В нашей недавней работе было показано, что 21-суточная АНОГ приводит к достоверному снижению площади поперечного сечения волокон как в *m. vastus lateralis*, так и в *m. soleus* [7]. При этом мы также наблюдали рост экспрессии мРНК MAFbx и MuRF-1, который был более выражен в *m. soleus* [7]. Также нами были зафиксированы изменения в экспрессии мРНК IL-6 и фосфорилировании протеинкиназы B (AKT) [7].

Синтез белка скелетных мышц регулируется сложной сетью молекулярных механизмов, которые можно разделить на mTORC1-зависимые и -независимые пути. Эти пути влияют на инициацию и элонгацию трансляции и биогенез рибосом, которые имеют решающее значение для синтеза белка в мышечных волокнах [36, 37]. Путь mTORC1, включающий путь АКТ/mTOR, является важнейшим регулятором гипертрофии скелетных мышц и может предотвращать мышечную атрофию. Этот путь активируется различными анаболическими стимулами и участвует в регуляции инициации рибосомальной трансляции, что является ключевым этапом синтеза белка [37, 38]. Рибосомальная протеинкиназа P70 (p70S6k) и 4E-связывающий белок 1 (4E-BP1) являются субстратами mTORC1 [39]. Для того чтобы составить полную картину изменений протеостаза при АНОГ, в данной работе мы провели анализ ключевых анаболических маркеров в *m. soleus* человека после 21-суточной антиортостатической гипокинезии с целью выяснения роли синтеза белка в развитии атрофии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антиортостатическая гипокинезия. Эксперимент с антиортостатической гипокинезией был проведен на базе Института медико-биологических проблем РАН. Шестеро здоровых мужчин добровольцев в возрасте 25–35 лет в течение 21 суток находились на строгом постельном режиме с углом наклона головного конца кровати -6° . Игольчатая биопсия *m. soleus* проводилась по методу Бергстрема [29] до гипокинезии (на рисунках данные обозначены как Pre) и на 21-е сутки гипокинезии (на рисунках данные обозначены как Post). В горизонтальном положении в помещении, предназначенном для хирургических манипуляций, проводили местную анестезию путем внутрикожной инъекции 2%-ного раствора лидокаина над поверхностью задней группы мышц голени. Затем выполняли кожный разрез с помощью хирургического лезвия и производили стерильный забор ткани с помощью биопсийной аспирационной иглы Бергстрема. После извлечения иглы рану обрабатывали гемостатической губкой и закрывали бактерицидным лейкопластырем. Образцы мышечной ткани были заморожены в жидком азоте и хранились в холодильнике при -85°C .

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты набора RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, США). Для проведения ПЦР в реальном времени исполь-

зовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ и мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (рН 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, Синтол, Россия). Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию housekeeping гена GAPDH. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Gene	Primers
<i>eEF2K</i>	F AGAAGCTGGTGACAGGCAGT R GGGTCTCTGTCCAGTCCAAA
<i>GAPDH</i>	F CCAGTATGATTCTACCCACGGC R CGGAGATGATGACCCTTTTGGC

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы. Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (Santa Cruz, США), 10 мкг/мл апротинина (SIGMA, США), 10 мкг/мл лейпептина (SIGMA, США), 10 мкг/мл пепстатина (SIGMA, США), 10 мкг/мл «complete Mini Protease Inhibitor Cocktail» (Roche, Швейцария), 20 мкг/мл фосфоингибиторного коктейля (Santa Cruz, США). Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере (5.4 мМ Tris-HCl (рН 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (Bio-Rad Laboratories) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В и температуре 4 °С в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (Bio-Rad Laboratories) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: p-p70S6k (Thr389) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, США, sc-11759), p-4E-BP1 (Thr37/46) (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #2855) и 4E-BP1 (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #9452), p-p90RSK (Ser380) (1:1000, Cell Signaling, США, #9341) и p90RSK (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #8408), p-eEF2 (Thr56) (1:1000, Cell Signaling, США, #2331) и eEF2 (1:2000, Cell Signaling Technology, США, #2332), p-AMPK (Thr172) (1:500, Cell Signaling, США, #2535) и AMPK (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #2532), p-ACC (Ser79) (1:1000, Cell Signaling, США, #3661) и ACC (1:1000, Cell Signaling Technology, США, #3676). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1:50000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4 °С, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Медиану оптического поглощения (ОП) полос вывешенной группы делили на медиану ОП полос соответствующей контрольной группы, отличия выражали в процентах. Медиану ОП полос контрольной группы принимали за 100%. Статистическая обработка данных вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

Статистическая обработка данных. Данные по содержанию белков представлены как средние ± SEM, данные о содержании мРНК представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). Средние значения всех групп показ-

ны в % от группы Pre. Для проверки достоверности различий между группами использовался непараметрический Т-критерий Уилкоксона. Значение $p < 0.05$ расценивали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в эксперименте с 24-суточным постельным режимом был проведен анализ фосфорилирования p70S6k в *m. vastus lateralis*, и авторы не обнаружили изменений по сравнению с контролем [40]. В нашем исследовании фосфорилирование p70S6k (Thr389) в *m. soleus* после 21 суток АНОГ снижалось на 48% ($p < 0.05$) (рис. 1a), а фосфорилирование 4E-BP1 (Thr37/46) на 18% ($p < 0.05$) (рис. 1b), что было ожидаемо, так как именно *m. soleus*, важнейшая познотоническая мышца, больше всего и страдает от безопорности. Субстраты mTORC1 ингибируются при многих состояниях, вызывающих атрофию, таких как сепсис, голодание, диабет и антиортостатическое вывешивание грызунов [41–43]. Но также известно, что в условиях иммобилизации и денервации активность mTORC1 увеличивается, а не снижается, по крайней мере, на ранних стадиях процесса атрофии, что, однако, не приводит к увеличению синтеза белка [42].

Сигнальный каскад ERK/p90RSK, который может участвовать в регуляции инициации трансляции независимо от mTORC1, также может изменяться в ответ на снижение сократительной активности скелетных мышц. 21-суточная гипокинезия привела к снижению фосфорилирования p90RSK (Thr359/Ser363) в *m. soleus* на 18% ($p < 0.05$) (рис. 1c). Наблюдаемое нами снижение фосфорилирования p70S6k, 4E-BP1 и p90RSK в *m. soleus* хорошо согласуется с результатами экспериментов с антиортостатическим вывешиванием грызунов в течение 7 суток [43, 44], причем в некоторых исследованиях показано снижение p90RSK *m. soleus* уже на третьи сутки вывешивания [45]. Таким образом, мы наблюдали снижение фосфорилирования и, соответственно, снижение активности рибосомальных киназ p70S6k и p90RSK после 21-суточной АНОГ, что должно приводить к снижению синтеза белка на рибосоме.

Фактор элонгации трансляции 2 (eEF2) играет ведущую роль в регуляции процесса наращивания полипептидной цепи, катализируя процесс транслокации (перемещение рибосомы по мРНК) [39]. Киназа eEF2 также является непосредственной мишенью mTORC1. Фосфорилирование eEF2 приводит к ингибированию ее активности, что снижает интенсивность элонгации трансляции [46, 47]. Несмотря на его важную роль в регуляции синтеза белка, активность eEF2 в мышцах человека при функциональной разгрузке ранее не исследовалась. В данной работе впервые показано увеличение в *m. soleus* после 21-суточной АНОГ содержания тотальной eEF2 на 165% ($p < 0.05$) и его фосфорилированной формы (Thr56), которая не способна связываться с рибосомой, на 275% ($p < 0.05$) (рис. 2a). Это ингибирующее фосфорилирование осуществляет киназа элонгационного фактора 2 (eEF2K) [48,49], экспрессия которой после АНОГ была увеличена на 45% ($p < 0.05$) (рис. 2b). Аналогичные изменения происходят в *m. soleus* крыс при вывешивании как на ранних (1-е – 3-и сутки), так и на более поздних (7- – 14-е сутки) этапах разгрузки [50]. Известно, что p70S6K и p90RSK могут фосфорилировать (по Ser366 и Ser359) и таким образом ингибировать eEF2K, что может приводить к увеличению синтеза белка [39, 51]. В нашем эксперименте ингибирование активности eEF2 наблюдается вместе со снижением фосфорилирования p70S6K и p90RSK, что замедляет процесс удлинения полипептидной цепи на рибосоме.

Хорошо известно, что АМФ-зависимая протеинкиназа (АМПК) может снижать анаболические процессы через фосфорилирование TSC2 и Raptor, ингибируя таким образом mTORC1 и синтез белка [52–55]. Помимо ингибирующего действия на mTORC1, АМПК также может регулировать синтез белка посредством ингибирования активности eEF2 через фосфорилирование eEF2K [56]. Мы проанализировали уровень фосфорилирования АМПК (Thr172) и ее субстрата ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в мыш-

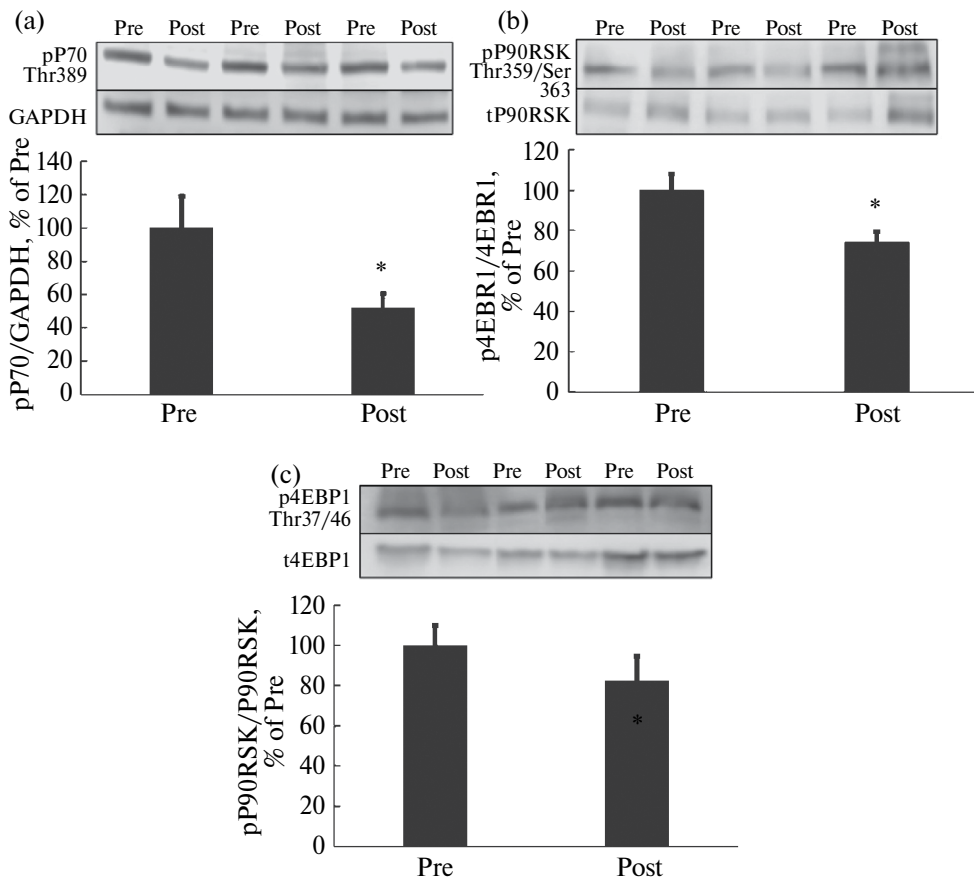


Рис. 1. Уровень фосфорилирования P70 (a), P90RSK (b) и 4EBP1 (c). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. * – достоверное отличие от Pre.

цах после 21-суточной гипокинезии. Фосфорилирование АМРК (Thr172) снижалось после гипокинезии в *m. soleus* на 21% ($p < 0.05$) (рис. 3а). При этом фосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) (Ser79) также достоверно снижалось в *m. soleus* на 19.5% ($p < 0.05$) (рис. 3б). В литературе нет данных об исследовании АМРК в *m. soleus* при гипокинезии, при этом в *m. vastus lateralis* при гипокинезии не наблюдалось каких либо изменений на 5- [57], 7- [58] и 14-й день гипокинезии [59]. При этом в *m. soleus* человека после 3 суток «сухой» иммерсии наблюдалось достоверное снижение фосфорилирования АМРК [60], а в экспериментах с вывешиванием на грызунах показано, что фосфорилирование АМРК в *m. soleus* снижалось только на начальных этапах функциональной разгрузки [61]. Учитывая тот факт, что при гипокинезии атрофические процессы развиваются медленнее, чем в условиях «сухой» иммерсии, поскольку при АНОГ сохраняется, хоть и небольшое, опорное воздействие [8], полученные нами данные хорошо согласуются с имеющимися сведениями из литературы по фосфорилированию АМРК в *m. soleus* и указывают на важную роль АМРК в сигнальных событиях при разгрузке именно в познотонических мышцах. Изначально мы предполагали,

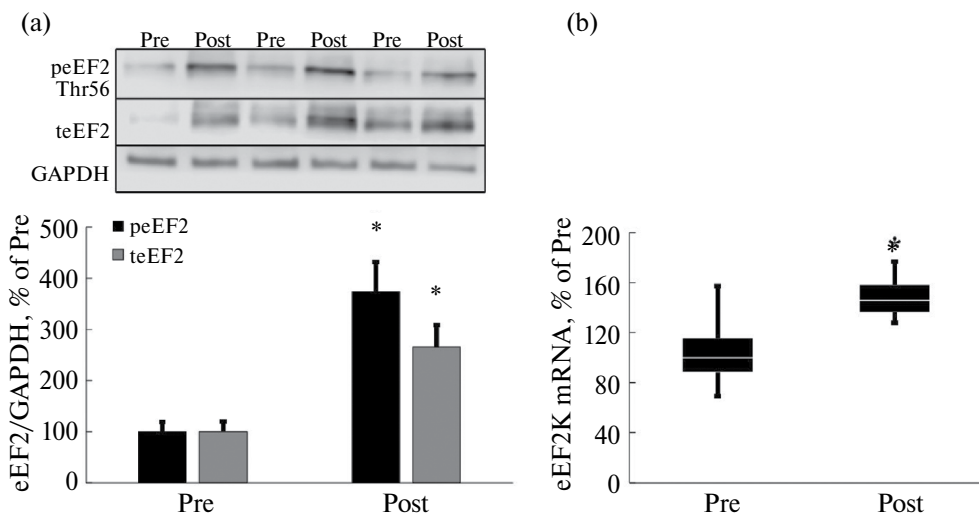


Рис. 2. Уровень фосфорилирования и содержания totalной формы eEF2 (a). Экспрессия мРНК eEF2K (b). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. * – достоверное отличие от Pre.

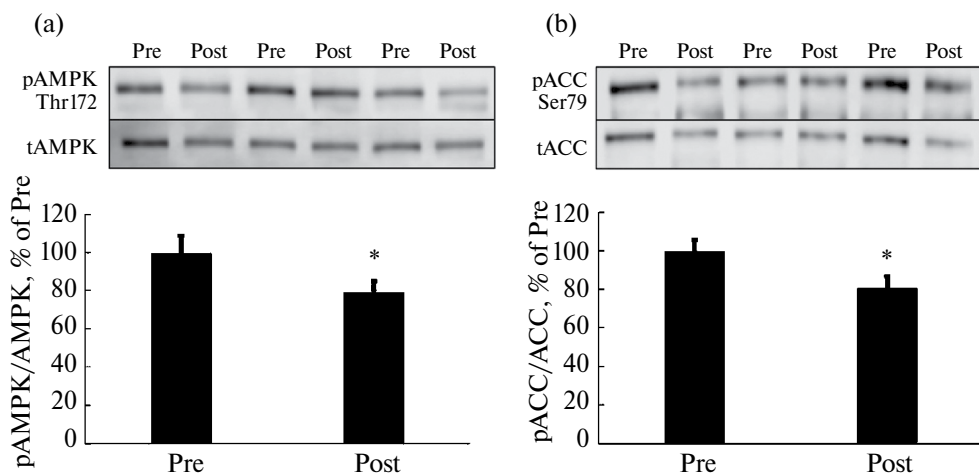


Рис. 3. Уровень фосфорилирования AMPK (a) и ACC (b). Pre – до АНОГ, Post – после АНОГ. * – достоверное отличие от Pre.

что снижение фосфорилирования p70S6K связано с ростом фосфорилирования AMPK. Полученные нами данные это предположение опровергли. Другим возможным активатором mTORC1 является протеинкиназа В (АКТ), которая фосфорилирует и инактивирует TSC2, блокирующий работу mTORC1 [39, 62]. Поскольку нами ранее было показано снижение фосфорилирования АКТ (Ser473) в условиях АНОГ [7], мы пред-

полагаем, что снижение активности p70S6k после 21-суточной АНОГ связано именно со снижением фосфорилирования АКТ.

Проведенное нами исследование показало, что атрофические изменения в *m. soleus* человека при 21-суточной АНОГ сопровождаются снижением активности ключевых анаболических маркеров p70S6k, p90RSK, 4EBP1, eEF2 и AMPK (рис. 4), что в большей степени соотносится с данными, полученными на *m. soleus* грызунов при моделировании функциональной разгрузки.

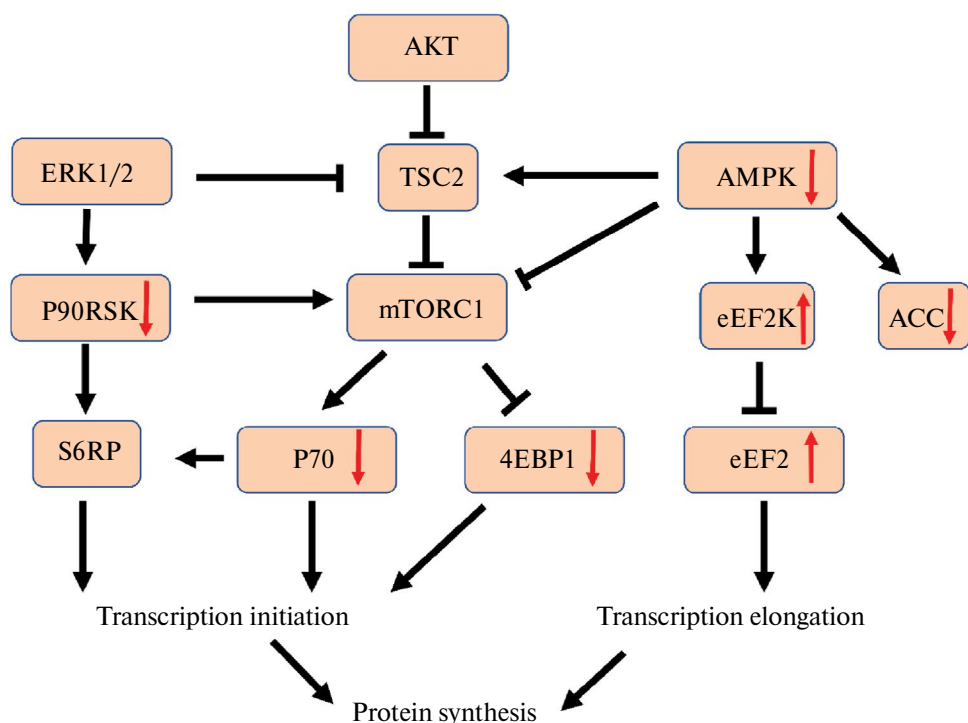


Рис. 4. Факторы регуляции инициации и элонгации трансляции (адаптировано из Mirzoev и соавт. [63]). АКТ – протеинкиназа В; AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа; eEF2K – киназа фактора элонгации эукариот 2; mTORC1 – мишень рапамицина у млекопитающих – комплекс 1; p70S6k – рибосомальная киназа p70; p90RSK – рибосомальная киназа p90; gpS6 – рибосомальный белок S6; TSC2 – комплекс туберозного склероза 2; 4EBP1 – белок, связывающий фактор инициации трансляции 4Е. Красными стрелками обозначены изменения фосфорилирования и содержания, изученные в данной статье.

Таким образом, наше исследование вносит вклад в понимание механизмов развития мышечной атрофии человека и применимости полученных на животных данных в поиске возможных фармакологических мишеней для ее предотвращения при космическом полете, клиническом постельном режиме и иммобилизации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы глубоко благодарим Е.С. Томиловскую, А.В. Шпакова, Д.В. Попова за организацию и проведение экспериментов и содействие в получении образцов мышечной ткани, а также Е.М. Леднева и Т.Ф. Вепхадзе за проведение игольчатой биопсии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Б.С.Ш. и С.П.Б., сбор данных – К.А.З., С.А.Т., С.П.Б., обработка данных – С.А.Т., С.П.Б., написание и редактирование манускрипта – С.А.Т., С.П.Б., Б.С.Ш.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств РНФ в рамках научного проекта № 22–75–00065. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН, протокол № 621 от 8 августа 2022 г.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81(11 Suppl): S40–51. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000029723.36419.0D>
2. Fluck M, Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity – from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:159–216. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0004-7>
3. Sharlo K, Tyganov SA, Tomilovskaya E, Popov DV, Saveko AA, Shenkman BS (2021) Effects of Various Muscle Disuse States and Countermeasures on Muscle Molecular Signaling. *Int J Mol Sci* 23(1): <https://doi.org/10.3390/ijms23010468>
4. Koryak YA (2014) Influence of simulated microgravity on mechanical properties in the human triceps surae muscle in vivo. I: effect of 120 days of bed-rest without physical training on human muscle musculo-tendinous stiffness and contractile properties in young women. *Eur J Appl Physiol* 114(5): 1025–1036. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2818-9>
5. Holt JA, Macias BR, Schneider SM, Watenpaugh DE, Lee SMC, Chang DG, Hargens AR (2016) WISE2005: Aerobic and resistive countermeasures prevent paraspinal muscle deconditioning during 60-day bed rest in women. *J Appl Physiol* 120(10): 1215–1222. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00532.2015>
6. Akima H, Kubo K, Imai M, Kanehisa H, Suzuki Y, Gunji A, Fukunaga T (2001) Inactivity and muscle: effect of resistance training during bed rest on muscle size in the lower limb. *Acta Physiol Scand* 172(4): 269–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00869.x>
7. Belova SP, Zaripova KA, Tyganov SA, Turtikova OV, Shenkman BS (2023) Expression of E3-ubiquitin ligases MuRF-1 and Mafbx in human postural and locomotor muscles during head-down hypokinesia. *Aviakosmi Ekol Medi* 57(3): 29–36. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-3-29-36>
8. Shenkman BS, Kozlovskaya IB (2019) Cellular Responses of Human Postural Muscle to Dry Immersion. *Front Physiol* 10: 187. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00187>

9. *Hikida RS, Gollnick PD, Dudley GA, Convertino VA, Buchanan P* (1989) Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity. *Aviat Space Environ Med* 60(7): 664–670.
<https://doi.org/>
10. *Bamman MM, Clarke MS, Feeback DL, Talmadge RJ, Stevens BR, Lieberman SA, Greenisen MC* (1998) Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution. *J Appl Physiol* (1985) 84(1): 157–163.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.1.157>
11. *Clarke MS, Bamman MM, Feeback DL* (1998) Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release. *J Appl Physiol* (1985) 85(2): 593–600.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.2.593>
12. *Shenkmann BS, Belozeroва IN, Matveeva OA, Mazin MG, Nemirovskaya TL, Kiseleva VN* (2003) Plasticity of cellular and tissue structures of human m. soleus under conditions of prolonged hypokinesia. *Biological Membranes* 20(1): 78–87.
<https://doi.org/>
13. *Watenpaugh DE* (2016) Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion. *J Appl Physiol* (1985) 120(8): 904–914.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00986.2015>
14. *Marusic U, Narici M, Simunic B, Pisot R, Ritzmann R* (2021) Nonuniform loss of muscle strength and atrophy during bed rest: a systematic review. *J Appl Physiol* (1985) 131(1): 194–206.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00363.2020>
15. *Demangel R, Treffel L, Py G, Brioché T, Pagano AF, Bareille MP, Beck A, Pessemesse L, Candau R, Gharib C, Chopard A, Millet C* (2017) Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 595(13): 4301–4315.
<https://doi.org/10.1113/JP273895>
16. *Jackman RW, Kandarian SC* (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4): C834–843.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>
17. *Bodine SC* (2013) Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2200–2208.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011>
18. *Phillips SM, McGlory C* (2014) CrossTalk proposal: The dominant mechanism causing disuse muscle atrophy is decreased protein synthesis. *J Physiol* 592(24): 5341–5343.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273615>
19. *Reid MB, Judge AR, Bodine SC* (2014) CrossTalk opposing view: The dominant mechanism causing disuse muscle atrophy is proteolysis. *J Physiol* 592(24): 5345–5347.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.279406>
20. *Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, Zhu J, Sachdeva R, Sonnad S, Kaiser LR, Rubinstein NA, Powers SK, Shrager JB* (2008) Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med* 358(13): 1327–1335.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa070447>
21. *Levine S, Biswas S, Dierov J, Barsotti R, Shrager JB, Nguyen T, Sonnad S, Kucharchuk JC, Kaiser LR, Singhal S, Budak MT* (2011) Increased proteolysis, myosin depletion, and atrophic AKT-FOXO signaling in human diaphragm disuse. *Am J Respir Crit Care Med* 183(4): 483–490.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1487OC>
22. *Hussain SN, Mofarrah M, Sigala I, Kim HC, Vassilakopoulos T, Maltais F, Bellenis I, Chaturvedi R, Gottfried SB, Metrakos P, Danialou G, Matecki S, Jaber S, Petrof BJ, Goldberg P* (2010) Mechanical ventilation-induced diaphragm disuse in humans triggers autophagy. *Am J Respir Crit Care Med* 182(11): 1377–1386.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0234OC>
23. *DeRuisseau KC, Kavazis AN, Deering MA, Falk DJ, Van Gammeren D, Yimlamai T, Ordway GA, Powers SK* (2005) Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. *J Appl Physiol* (1985) 98(4): 1314–1321.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00993.2004>
24. *Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL* (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18(9): 1025–1027.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-1228fje>
25. *De Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ* (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* 585(Pt 1): 241–251.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>

26. *Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, Raha S, Safdar A, Yasuda N, Kaczor JJ, Melov S, Hubbard A, Qu X, Phillips SM, Tarnopolsky M* (2009) Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One* 4(8): e6518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006518>
27. *Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, von Walden F, Trappe TA, Linnehan RM, Tesch PA* (2010) Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *J Appl Physiol* (1985) 109(3): 721–727. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00110.2009>
28. *Reich KA, Chen YW, Thompson PD, Hoffman EP, Clarkson PM* (2010) Forty-eight hours of unloading and 24 h of reloading lead to changes in global gene expression patterns related to ubiquitination and oxidative stress in humans. *J Appl Physiol* (1985) 109(5): 1404–1415. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00444.2010>
29. *Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, van Loon LJ* (2014) Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf)* 210(3): 600–611. <https://doi.org/10.1111/apha.12190>
30. *Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR* (2008) Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J* 22(11): 3836–3845. <https://doi.org/10.1096/fj.08-110163>
31. *Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogasawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K, Takeda S* (2004) Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J* 18(3): 522–524. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0419fje>
32. *Andrianjafinony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D* (2010) Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(2): C307–315. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2010>
33. *Phillips SM, McGlory C* (2014) Rebuttal from Stuart M. Phillips and Chris McGlory. *J Physiol* 592(24): 5349. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284406>
34. *Reid MB, Judge AR, Bodine SC* (2014) Rebuttal from Michael B. Reid, Andrew R. Judge and Sue C. Bodine. *J Physiol* 592(24): 5351. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284398>
35. *Miokovic T, Armbrecht G, Felsenberg D, Belavy DL* (2012) Heterogeneous atrophy occurs within individual lower limb muscles during 60 days of bed rest. *J Appl Physiol* (1985) 113(10): 1545–1559. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00611.2012>
36. *Goodman CA, Mabrey DM, Frey JW, Miu MH, Schmidt EK, Pierre P, Hornberger TA* (2011) Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new non-radioactive in vivo technique. *FASEB J* 25(3): 1028–1039. <https://doi.org/10.1096/fj.10-168799>
37. *Hodson N, West DWD, Philp A, Burd NA, Moore DR* (2019) Molecular regulation of human skeletal muscle protein synthesis in response to exercise and nutrients: a compass for overcoming age-related anabolic resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 317(6): C1061–C1078. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00209.2019>
38. *Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B* (2020) Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *J Neuromuscul Dis* 10.3233/JND-200568
39. *Mirzoev TM, Shenkman BS* (2018) Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 83(11): 1299–1317. <https://doi.org/10.1134/S0006297918110020>
40. *Brocca L, Cannavino J, Coletto L, Biolo G, Sandri M, Bottinelli R, Pellegrino MA* (2012) The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol* 590(20): 5211–5230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240267>
41. *Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR* (2013) Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2147–2157. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.039>
42. *Bodine SC* (2022) The role of mTORC1 in the regulation of skeletal muscle mass. *Fac Rev* 11:32. <https://doi.org/10.12703/r/11-32>
43. *Tyganov SA, Mochalova E, Belova S, Sharlo K, Rozhkov S, Kalashnikov V, Turtikova O, Mirzoev T, Shenkman B* (2021) Plantar mechanical stimulation attenuates protein synthesis decline in disused skeletal muscle via modulation of nitric oxide level. *Sci Rep* 11(1): Art 9806 <https://doi.org/10.1038/S41598-021-89362-6>

44. *Lysenko EA, Turtikova OV, Kachaeva EV, Ushakov IB, Shenkman BS* (2010) Time course of ribosomal kinase activity during hindlimb unloading. *Dokl Biochem Biophys* 434:223–226.
<https://doi.org/10.1134/S1607672910050017>
45. *Zaripova KA, Kalashnikova EP, Belova SP, Kostrominova TY, Shenkman BS, Nemirovskaya TL* (2021) Role of Pannexin 1 ATP-Permeable Channels in the Regulation of Signaling Pathways during Skeletal Muscle Unloading. *Int J Mol Sci* 22(19): 10.3390/ijms221910444
46. *Goodman CA* (2019) Role of mTORC1 in mechanically induced increases in translation and skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* (1985) 127(2): 581–590.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01011.2018>
47. *Browne GJ, Proud CG* (2004) A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Mol Cell Biol* 24(7): 2986–2997.
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.2986-2997.2004>
48. *Ryazanov AG, Davydova EK* (1989) Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation. *FEBS Lett* 251(1–2): 187–190.
<https://doi.org/>
49. *Ryazanov AG, Spirin AS* (1990) Phosphorylation of elongation factor 2: a key mechanism regulating gene expression in vertebrates. *New Biol* 2(10): 843–850.
<https://doi.org/>
50. *Vilchinskaya N, Lim WF, Belova S, Roberts TC, Wood MJA, Lomonosova Y* (2023) Investigating Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase/Eukaryotic Translation Elongation Factor 2 Pathway Regulation and Its Role in Protein Synthesis Impairment during Disuse-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Am J Pathol* 193(6): 813–828.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.02.009>
51. *Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG* (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20(16): 4370–4379.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4370>
52. *Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS* (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277(27): 23977–23980.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200171200>
53. *Mounier R, Lantier L, Leclerc J, Sotiropoulos A, Pende M, Daegelen D, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B* (2009) Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J* 23(7): 2264–2273.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-119057>
54. *Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Claflin DR, Brooks SV* (2014) Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol* (1985) 117(4): 363–369.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00256.2014>
55. *Moller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jorgensen JO, Moller N, Jessen N* (2015) Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 118(8): 971–979.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01116.2014>
56. *Thomson DM* (2018) The Role of AMPK in the Regulation of Skeletal Muscle Size, Hypertrophy, and Regeneration. *Int J Mol Sci* 19(10): 10.3390/ijms19103125
57. *Marshall RN, Smeuninx B, Seabright AP, Morgan PT, Atherton PJ, Philp A, Breen L* (2022) No effect of five days of bed rest or short-term resistance exercise prehabilitation on markers of skeletal muscle mitochondrial content and dynamics in older adults. *Physiol Rep* 10(13): e15345.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15345>
58. *Ringholm S, Bienso RS, Kuilerich K, Guadalupe-Grau A, Aachmann-Andersen NJ, Saltin B, Plomgaard P, Lundby C, Wojtaszewski JF, Calbet JA, Pilegaard H* (2011) Bed rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced mRNA responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(4): E649–658.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00230.2011>
59. *Buso A, Comelli M, Picco R, Isola M, Magnesa B, Pisot R, Rittweger J, Salvadego D, Simunic B, Grassi B, Mavelli I* (2019) Mitochondrial Adaptations in Elderly and Young Men Skeletal Muscle Following 2 Weeks of Bed Rest and Rehabilitation. *Front Physiol* 10: 474.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00474>
60. *Vilchinskaya NA, Mirzoev TM, Lomonosova YN, Kozlovskaya IB, Shenkman BS* (2015) Human muscle signaling responses to 3-day head-out dry immersion. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15(3): 286–293.
<https://doi.org/>

61. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading. *Cell Physiol Biochem* 39(3): 1011–1020.
<https://doi.org/10.1159/000447808>
62. *Glass DJ* (2010) PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 346:267–278.
https://doi.org/10.1007/82_2010_78
63. *Мирзоев ТМ, Тыганов СА, Ломоносова ЯН, Мусиенко ПЕ, Шенкман БС* (2015) Сигнальные пути, регулирующие синтез белка в камбаловидной мышце крысы на ранних сроках гравитационной разгрузки. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101(11): 1299–1308. [*Mirzoev TM, Tyganov SA, Lomonosova YN, Musienko PE, Shenkman BS* (2015) Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle during Early Stages of Hindlimb Unloading. *Russ J Physiol* 101(11): 1299–1308. (In Russ)].
<https://doi.org/0097-0549/17/4703-0359>

Key Anabolic Markers in Human *M. Soleus* after 21-Day Head-Down Tilt Bedrest

S. P. Belova^{a,*}, S. A. Tyganov^a, K. A. Zaripova^a, and B. S. Shenkman^a

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

^{*}*e-mail: swetbell@mail.ru*

Prolonged bed rest can have a significant negative effect on skeletal muscle, leading to muscle wasting and reduced strength. This process can occur in as little as 10 days in healthy individuals, with the loss of muscle mass and strength being particularly pronounced during the first week of immobilization. Head-down tilt bed rest (HDT) is a method used to simulate the physiological changes that occur in weightlessness during spaceflight. This technique involves lying in bed with the head tilted downward. This paper is dedicated to the analysis of key anabolic markers of the soleus muscle during 21 days of HDT BR. The HDT BR experiment was conducted at the Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences. Six healthy male volunteers, aged 25–35 years, were subjected to 21 days of strict bed rest with a tilt angle of -6° . A needle biopsy of the m. soleus was performed using the Bergström method before the start of HDT BR and on day 21 of HDT BR. The biopsy material was immediately frozen in liquid nitrogen for further Western blot and PCR analysis. Examination of mTORC1 substrates showed a significant decrease in p70 and 4EBP1 phosphorylation after HDT BR. We also observed a significant decrease in the phosphorylation of another ribosomal kinase, p90RSK, a significant increase in eEF2 phosphorylation and an increase in eEF2k mRNA expression. In addition, the phosphorylation of AMPK and its substrate ACC decreased after HDT BR. The data obtained in this work support the hypothesis that a decrease in protein synthesis, together with an increase in proteolysis, contributes to the development of human m. soleus atrophy after 21 days of HDT BR.

Keywords: bedrest, hypokinesia, m. soleus, atrophy, protein synthesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ГЛИБЕНКЛАМИД ПРЕДОТВРАЩАЕТ ВОСПАЛЕНИЕ, ВОЗДЕЙСТВУЯ
НА АКТИВАЦИЮ NLRP3 ИНФЛАММАСОМ *IN VITRO***

© 2024 г. Е. Д. Хилажева^{2,3}, Ю. А. Панина^{2,3}, А. И. Мосягина^{2,3}, О. С. Белозор^{2,3},
Ю. К. Комлева^{1,*}

¹Институт мозга, Научный центр неврологии, Москва, Россия

²Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, Россия

НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, Красноярский государственный медицинский
университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ,
Красноярск, Россия

*E-mail: yuliakomleva@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принята к публикации 13.04.2024 г.

Известно, что NLRP3 инфламмасы играют значительную роль в развитии нейродегенерации и физиологическом старении, а также в развитии метаболического воспаления, что вызывает значительный интерес научного сообщества к поиску эффективных ингибиторов инфламмасы NLRP3 и оценке их эффектов. Целью настоящей работы являлась оценка влияния фармакологической модуляции активности NLRP3 с использованием непрямого блокатора NLRP3 инфламмасом, глибенкламида, на экспрессию компонентов метафламмасом в клетках головного мозга *in vitro*, полученных от мышей средней возрастной группы. В ходе исследования было выявлено, что глибенкламид снижает экспрессию провоспалительных маркеров NLRP3 и IL18 в культуре клеток, что, в свою очередь, приводит к предотвращению фосфорилирования протеинкиназ метафламмасомного комплекса – PKR и IKK β . При этом мы не наблюдали изменения экспрессии патологически фосфорилированного IRS, а также числа сенесцентных клеток в культурах после воздействия глибенкламидом.

Ключевые слова: глибенкламид, астроциты, нейроны, метафламмасома, метавоспаление, NLRP3 инфламмасы, пожилой возраст, старение

DOI: 10.31857/S0869813924050067, **EDN:** BLEFSY

ВВЕДЕНИЕ

В связи с демографическими изменениями в обществе растет число людей средней возрастной группы и пожилого возраста, страдающих метаболическим синдромом, нейродегенеративными и другими возраст-ассоциированными заболеваниями. Воспаление играет решающую роль в развитии метаболических нарушений и когнитивных дефицитов при старении [1]. В соответствии с этой точкой зрения клинические исследования свидетельствуют о возможной ранней патогенетической роли системного воспаления как фактора когнитивного снижения в течение десятилетий, предшествующих

пожилому возрасту. При анализе когнитивных областей повышенный уровень маркеров воспаления в середине жизни наиболее устойчиво ассоциировался со снижением памяти [2].

Инфламмасомы, ключевые белковые комплексы, играют важнейшую роль в присутствии организма воспалительном процессе в ответ на молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (DAMP), высвобождающиеся при повреждении тканей [3]. Среди них каноническая инфламмасома – цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP, основной компонент одноименного типа инфламмасом (NLRP3 инфламмасом) – запускает активацию предшественника каспазы-1 (прокаспазы-1) с последующим активным протеолитическим расщеплением провоспалительного интерлейкина-1 β (IL-1 β) [4].

Ранее нами была показана роль NLRP3 в нейродегенерации и физиологическом старении, а именно влияние на память и нейрогенез. Мы подтвердили, что базальный уровень экспрессии NLRP3 необходим для процессов нейрогенеза, регулируя в основном ранние стадии – пролиферацию и дифференцировку клеток. Наши данные свидетельствуют о том, что экспрессия инфламмасом NLRP3 в нейрональных стволовых клетках и нейробластах может способствовать стимуляции нейрогенеза у взрослых в физиологических условиях [5]. В этой связи логичным является изучение влияния коррекции NLRP3 с помощью фармакологических модуляторов на процессы нейрогенеза.

Существует связь между воспалением и метаболическими нарушениями, которую описали термином «метавоспаление» [6, 7]. Данный термин был предложен для описания воспаления низкой степени, оркеструемого адипоцитами и гепатоцитами и индуцируемого стрессом эндоплазматического ретикула, липидным стрессом (например, ожирение, диабет 2-го типа, дислипидемия) или инфекционным стрессом. В качестве основных игроков, связывающих питательный стресс, воспаление и регуляцию метаболизма, была выделена группа белков, получившая название метафламмасомы [8]. Согласно результатам предыдущих исследований, белок PKR (дцРНК-зависимая протеинкиназа) является ключевым и играет важную роль в регуляции других компонентов метафламмасомы, включая JNK (c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-терминальные киназы), IRS1 (Insulin receptor substrate 1, субстрат инсулинового рецептора 1) и IKKbeta (IkB kinase beta, киназа ингибитора ядерного фактора NF-kB, субъединица бета) [9].

Связь инфламмасомы NLRP3 с множеством заболеваний, в том числе и нарушениями в метаболизме, вызывает значительный интерес научного сообщества к поиску эффективных ингибиторов инфламмасомы NLRP3. Используя преимущества сложного сигнального каскада инфламмасомы NLRP3, для ее ингибирования можно использовать разнообразные мишени. Например, ингибирование активации инфламмасомы NLRP3, подавление восходящих сигналов, блокада сборки инфламмасомы, ингибирование активации каспазы-1, блокада расщепления порообразующего белка гасдермина D (GSDMD), нейтрализация воспалительных цитокинов, продуцируемых инфламмасомой NLRP3, могут быть направлены на потенциальное ингибирование инфламмасомы NLRP3 [10].

Глибенкламид – наиболее широко используемый препарат сульфонилмочевины для лечения сахарного диабета 2-го типа. Недавние исследования показали, что глибенкламид снижает негативное нейровоспаление и улучшает поведенческие показатели после травмы центральной нервной системы (ЦНС). Глибенкламид может блокировать K_{АТР}-канал, канал Sur1-Trpm4, активацию NLRP3, снижать продукцию провоспалительных медиаторов (TNF- α , IL-1 β и реактивных форм кислорода) и подавлять накопление воспалительных клеток. Однако противовоспалительное действие глибенкламида требует дальнейшего изучения [11]. Кроме того, глибенкламид проявлял ингибирующую активность *in vitro* и *in vivo* в отношении активации NLRP3 инфламмасомы. Однако *in vivo* дозы глибенкламида для оказания ингибирующего действия достаточно высоки, что вызывает гипогликемию, поэтому его применение ограничено только сахарным

диабетом. Остается неясным, способствуют ли противовоспалительные эффекты глибенкламида изменению экспрессии компонентов метафламмасом [10].

Также следует отметить, что очень важно изучать долгосрочные последствия системного воспаления в середине жизни, поскольку считается, что именно в середине жизни начинаются многие патологические процессы, лежащие в основе возрастных когнитивных нарушений и деменции, и, возможно, именно этот период наиболее чувствителен к вмешательствам и потенциальной коррекции [2]. Целью настоящего исследования стало изучение влияния фармакологической модуляции активности NLRP3 с использованием непрямого блокатора NLRP3 инфламмасом – глибенкламида – на экспрессию компонентов метафламмасом в клетках головного мозга *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовались мыши линии C57BL/6 – самцы в возрасте 14–15 месяцев для включения в среднюю возрастную группу (соотносится с возрастом человека от 38 до 47 лет), поскольку, согласно данным литературы, мышам должно быть не менее 10 месяцев, а верхний возрастной предел составляет около 14–15 месяцев [12]. Масса животных составляла 25–30 г ($n = 6$). Грызунов содержали в индивидуально-вентилируемых клетках по 5–6 особей с соблюдением температуры в виварии 21–22 °C со свободным доступом к воде и гранулированному корму и с регулярным световым циклом 12 ч день/12 ч ночь. Все манипуляции выполнялись во время светлой фазы дня. В ходе эксперимента были предприняты все усилия для сведения к минимуму страданий животных и сокращения их числа согласно принципам работы с животными (Принцип 3 «R»).

Выделение и культивирование нейросфер

Животных декапитировали и производили забор головного мозга. Извлеченный мозг помещали в ледяной раствор 2%-ной глюкозы в PBS (ПанЭко, Россия), после чего выделяли гиппокамп и измельчали его скальпелем на кусочки размером около 1 мм³. Полученные кусочки ткани переносили пастеровской пипеткой в центрифужную пробирку, содержащую свежий раствор 2%-ной глюкозы в PBS, и оставляли на 1 мин. После осаждения кусочков ткани удаляли супернатант. В пробирку вносили 3 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США) и проводили механическую диссоциацию ткани стерильной серологической пипеткой до получения однородной суспензии клеток, после чего центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. После центрифугирования удаляли супернатант и добавляли 3 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Полученную клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы T-75 см² с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осуществлялось в условиях инкубатора при 5% CO₂ и 37 °C. Через 48 ч после выделения наблюдали образование нейросфер. Пассаж и смену среды осуществляли каждые 4–5 дней.

Дифференцировка нейросфер

На 3-м пассаже собирали из флакона среду, нейросферы осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Супернатант сливали, нейросферы ресуспендировали в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 20% FBS (HyClone, США), 0.58 мг/мл глутамина (ПанЭко, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки засевали в культуральные флаконы T-75 см². Через 5–7 дней наблюдали дифференцировку нейросфер в сокультуру астроцитов и нейронов. Через 10 дней дифференцированную культуру клеток пересаживали в 24-луночные или 96-луночные культуральные планшеты для дальнейшего изучения.

Фармакологическая модуляция инфламмасом

Фармакологическая модуляция инфламмасом осуществлялась путем добавления блокатора NLRP инфламмасом, глибенкламида, в конечной концентрации в среде 200 мкМ, инкубация продолжалась 1 ч в стандартных условиях. Эффективность дозы и длительность инкубации были показаны в исследованиях ранее [11].

Исследование сенесценции

Репликативное старение клеток или сенесценция – это необратимая остановка клеточного цикла и потеря способности к пролиферации соматических клеток вследствие накопления повреждений ДНК и истощения репаративных механизмов. Общепринятым и наиболее широко используемым биомаркером для определения старения клеток является β -галактозидаза, ассоциированная с клеточной сенесценцией (SA- β -gal), а точнее ее активность при pH 6.0 в стареющих клетках [13, 14]. SA- β -gal присутствует только в сенесцентных и не обнаруживается в предсенесцентных, покоящихся и иммортализованных клетках, а активность SA- β -gal обычно определяется путем иммуногистохимического окрашивания клеток и тканей с хромогенным субстратом X-gal. Для обнаружения клеточной сенесценции использовали набор Senescence Detection Kit (K320, BioVision, США) и работали согласно протоколу фирмы-изготовителя. Клетки фиксировали с помощью Fixative Solution в течение 15 мин, однократно промывали PBS, после чего добавляли к клеткам Staining Solution Mix и инкубировали при 37 °C в течение ночи. По завершении инкубации наблюдали появление голубой окраски клеток. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически, оценивали оптическую плотность при длине волны 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра Anthos (Biochrom, Великобритания). Предварительно в лунки 96-луночного планшета засевали клетки с одинаковой плотностью в количестве 3000 клеток на лунку. Репрезентативные микрофотографии клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Для регистрации целевых молекул-маркеров использовали метод двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител. Были использованы первичные антитела к GFAP (ab4648, Abcam, Великобритания), NeuN (ABN78, Merck Millipore, Германия), NLRP3 (ab2307396, Abcam, Великобритания), IL18 (Santa Cruz Biotechnology, США), pIKK β (Abcam, Великобритания), PKR (ab32506, Abcam, Великобритания), IR (ab137747, Abcam, Великобритания); IRS1 (phospho S312) (ab66154, Abcam, Великобритания), HMGB1 (ab77302, Abcam, Великобритания).

Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Время инкубации с первичными антителами составляло 18 ч при 4 °C. Вторичные антитела, меченые Alexa 555 (ab150078, Abcam, Великобритания) и Alexa 488 (ab150117, Abcam, Великобритания) использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 ч при 37 °C. Перед началом микроскопии ядра клеток окрашивали DAPI (D9542, Sigma Aldrich, США).

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Выполняли подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих антиген, а также интенсивность флуоресценции исследуемых маркеров с помощью программного обеспечения ImageJ. Относительное количество клеток определяли по соотношению количества иммунопозитивных клеток к общему количеству клеток в поле зрения. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью функции «Measure», предварительно выделив область интереса, после чего из полученных значений вычитали интенсивность флуоресценции фона. Для обчета использовали минимум 5 случайно выбранных полей зрения на лунку и по 2 лунки на экспериментальную группу.

Электрофизиологические исследования

В электрофизиологических экспериментах использовались коронарные живые срезы головного мозга. Для приготовления живых срезов мыши были глубоко анестезированы внутривенной инъекцией хлоралгидрата (400 мг/кг массы тела), декапитированы, вскрыта черепная коробка и забран головной мозг с последующим охлаждением в ледяном модифицированном растворе Рингера, содержащем (мМ) 234 сахаразы, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 10 MgSO_4 , 0.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 11 D-глюкозы, в течение 1 мин, с аэрацией смесью газов 95% O_2 и 5% CO_2 . Затем были выделены полушария мозга и использованы для приготовления срезов с помощью вибротома. Срезы толщиной 250 мкм инкубировались не менее 1 ч при комнатной температуре в иСМЖ, содержащей (мМ) 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 D-глюкозы, раствор перфузировался 95% O_2 и 5% CO_2 .

Регистрация пВПСП производилась с помощью Cl-Ag электрода в стеклянной боросиликатной пипетке, заполненной иСМЖ. Стимуляция пресинаптических волокон производилась с помощью платино-иридиевого электрода. Запись потенциалов и стимуляция производилась с CA1 зоны гиппокампа. Данные образования визуально определялись по характерным формам при увеличении объектива $\times 10$. Стимуляцию и регистрацию осуществляли с помощью программного обеспечения «Pachmaster» («НЕКА») и усилителя «pClamp10» («Molecular Devices»). Полученные записи анализировали в программе Clampfit 10.5 (Axon Instruments).

Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) вызывали импульсами с частотой стимуляции 0.33 Гц и с интенсивностью, которая могла вызвать 50% максимального ответа пВПСП. Наклон пВПСП рассчитывался как абсолютное значение максимального наклона нисходящей фазы между 5 и 95% отрицательного пика.

Для контроля записывали пВПСП в течение 10 мин. LTP индуцировали в области CA1 с помощью стимуляции тета-всплеска (TBS) из 5 серий, разделенных 10 с [15]. Каждая последовательность состояла из 25 повторов по 5 импульсов с частотой 100 Гц с интервалом 200 мс (5 Гц). После стимуляции продолжали запись 30 мин. Усредненные амплитуды последующих пВПСП за 5 мин нормализовали к среднему значению контрольных ответов, вызванных до индукции.

Для оценки влияния глибенкламида на синаптическую передачу добавляли глибенкламид в ванночку до начала записи в конечной концентрации в среде 200 мкМ. Записи с контрольной группы проводили без добавления глибенкламида.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, США). Критерий Колмогорова – Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. При несоблюдении условий нормальности распределения сравнение двух групп осуществляли с помощью непараметрического U критерия Манна – Уитни. Уровень значимости при проверке гипотез принимали при $p \leq 0.05$. Все результаты представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1, Q3 – нижний и верхний квартили, p – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ*Глибенкламид функционально изменяет экспрессию провоспалительных маркеров, но не сенесценцию*

Данные по свойству глибенкламида действовать до сборки инфламماسомы NLRP3 и блокировать нижестоящие пути активации инфламماسомы и образование провоспалительных маркеров в микроглии побудило нас продолжить изучение функционально-

го влияния глибенкламида в сокультуре астроцитов и нейронов (рис. 1). Во-первых, мы изучили эффекты глибенкламида на экспрессию NLRP3 инфламмасом, IL18 и HMGB1, а также развитие SASP фенотипа в клетках, полученных от животных средней возрастной группы. Экзогенно апплицируемый на клетки глибенкламид подавлял экспрессию NLRP3 инфламмасом, IL18, но не факторов SASP (включая HMGB1 и активность сенесценция-ассоциированной β -галактозидазы (SA- β -gal).

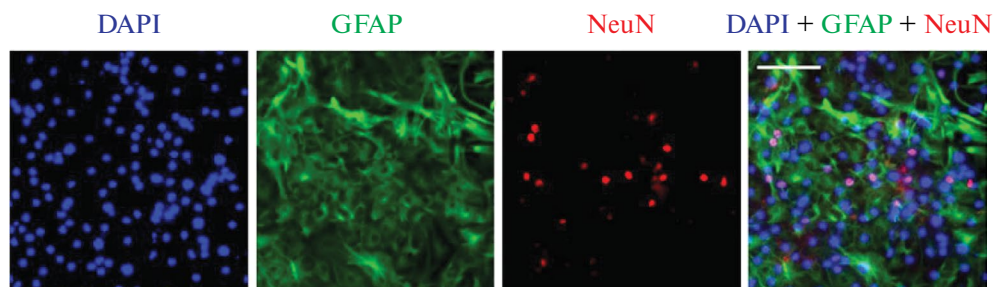


Рис. 1. Сокультура астроцитов и нейронов, полученных от мышей в возрасте 14 месяцев: ядра клеток окрашены DAPI (голубой), показана экспрессия маркера астроцитов GFAP (зеленый) и маркера нейронов NeuN (красный). Шкала – 50 мкм.

Иммуноцитохимический анализ показал, что инкубация сокультуры астроцитов и нейронов в присутствии глибенкламида приводит к статистически значимому снижению интенсивности флуоресценции NLRP3 с 15.15 (14.28; 16.63) у.е. в группе контроля до 8.65 (7.35; 9.58) у.е. в опытной группе ($p = 0.01$, критерий Манна – Уитни) (рис. 2).

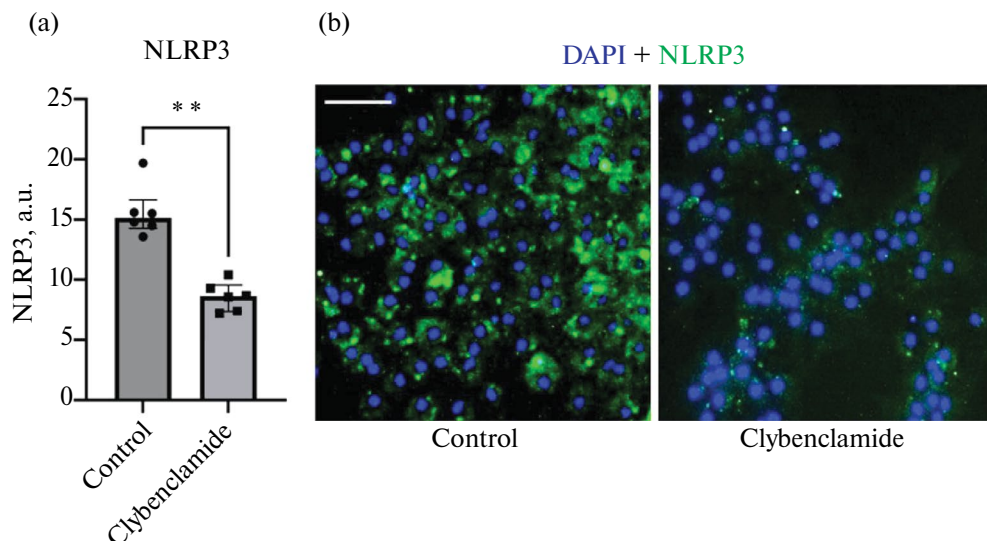


Рис. 2. (а) – количественный анализ экспрессии NLRP3 в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (б) – репрезентативные снимки экспрессии NLRP3 (зеленый) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала 50 – мкм. ** – уровень статистической значимости, $p < 0.01$.

Аналогичные данные получены при анализе экспрессии IL18 в экспериментальных группах – инкубация сокультуры астроцитов и нейронов приводила к снижению интенсивности флуоресценции IL18 с 9.65 (9.20; 10.40) у.е. в контрольной группе до 5.25 (4.20; 5.80) у.е. в группе клеток, инкубируемых с глибенкламидом ($p = 0.01$, критерий Манна – Уитни) (рис. 3). Таким образом, глибенкламид подавляет экспрессию маркеров воспаления у животных средней возрастной группы.

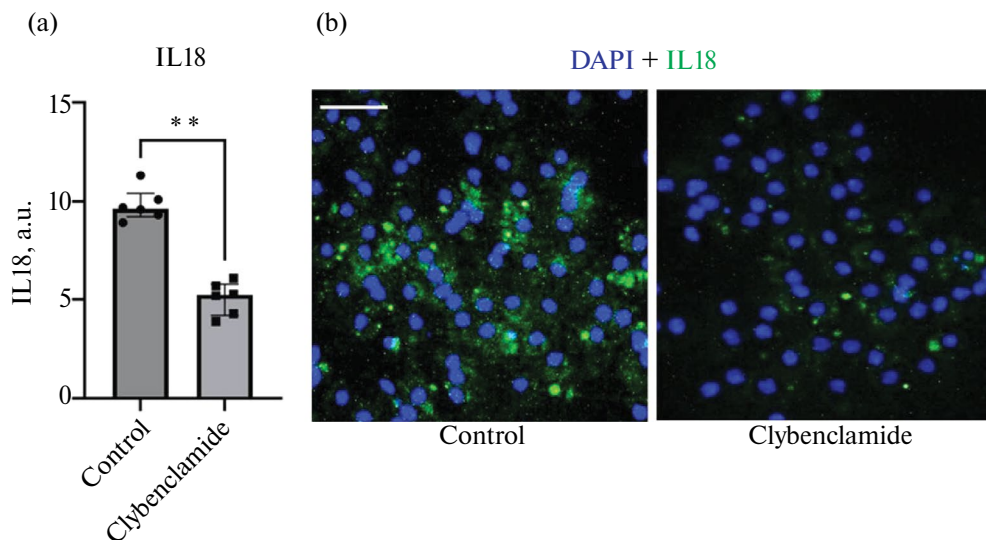


Рис. 3. (а) – количественный анализ экспрессии IL18 в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (б) – репрезентативные снимки экспрессии IL18 (зеленый) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала – 30 мкм. ** – уровень статистической значимости, $p < 0.01$.

Анализ активности β -галактозидазы в сокультуре нейронов и астроцитов (рис. 1), полученных от животных средней возрастной группы, проводили с использованием набора SA- β -gal. Полученные данные демонстрируют отсутствие статистически значимых различий между β -галактозидазной активностью клеток контрольной группы (0.084 (0.067; 0.089) у.е.) и клеток, инкубируемых в присутствии глибенкламида (0.065 (0.059; 0.079) у.е.) ($p = 0.1580$, критерий Манна – Уитни) (рис. 4).

Также нами была исследована экспрессия белка HMGB1 (high mobility group box 1), который преимущественно содержится в ядре клеток, где выполняет функции шаперона ДНК, однако наряду с этим является одним из наиболее изученных DAMPs [16]. Анализ полученных данных показал, что присутствие в среде культивирования глибенкламида не оказывает статистически значимого влияния на уровень экспрессии HMGB1. Так, в клетках контрольной группы средняя интенсивность флуоресценции HMGB1 была равна 6.25 (5.22; 7.40) у.е., а в клетках опытной группы 5.45 (4.48; 7.31) у.е. ($p = 0.4206$, критерий Манна – Уитни) (рис. 5).

Снижение экспрессии NLRP3 за счет действия глибенкламида может предотвращать фосфорилирование протеинкиназ метафламмасомного комплекса

В результате изучения экспрессии фосфорилированных форм протеинкиназ метафламмасомного комплекса было выявлено статистически значимое снижение экс-

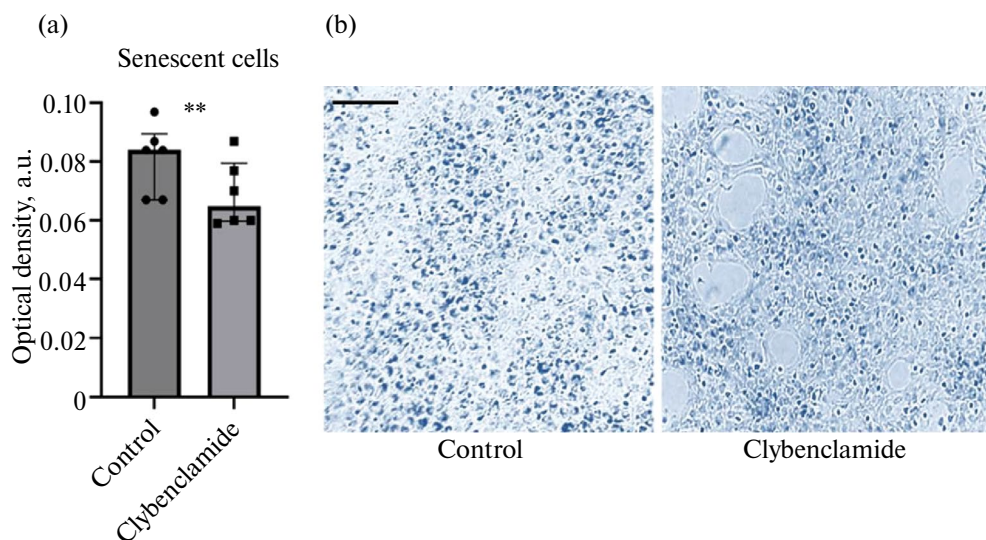


Рис. 4. (a) – количественный анализ SA-β-gal + клеток, представленный в виде оптической плотности в у.е. в сокультуре клеток. (b) – репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*. Шкала – 100 мкм.

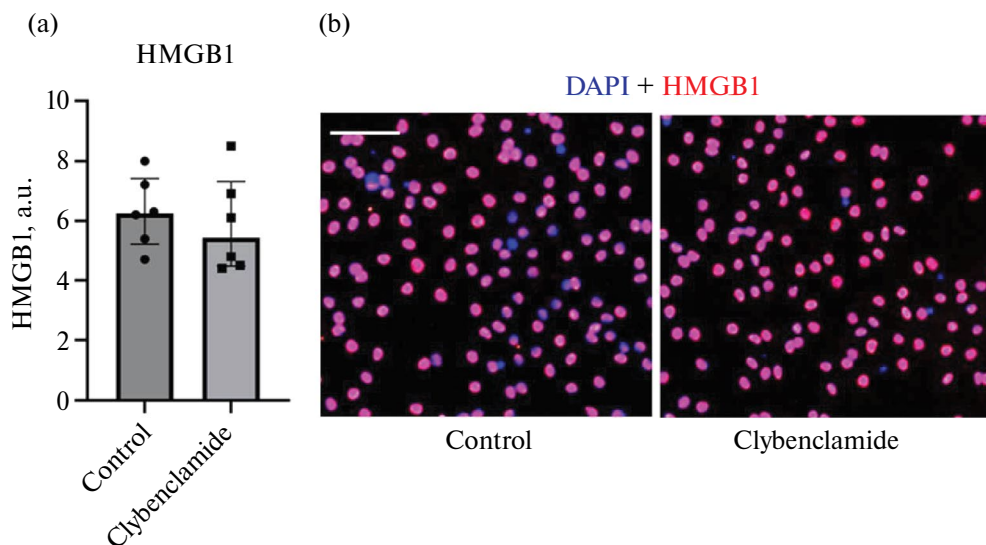


Рис. 5. (a) – количественный анализ экспрессии HMGB1 в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (b) – репрезентативные снимки экспрессии HMGB1 (красный) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала – 50 мкм.

прессии PKR и p-IKKbeta. Так, уровень флуоресценции PKR в сокультуре астроцитов и нейронов в контрольной группе составил 6.25 (6.03; 8.82) у.е., а в сокультуре клеток, инкубированных в присутствии глибенкламида, 5.30 (5.02; 5.85) у.е. ($p = 0.016$, критерий Манна – Уитни) (рис. 6).

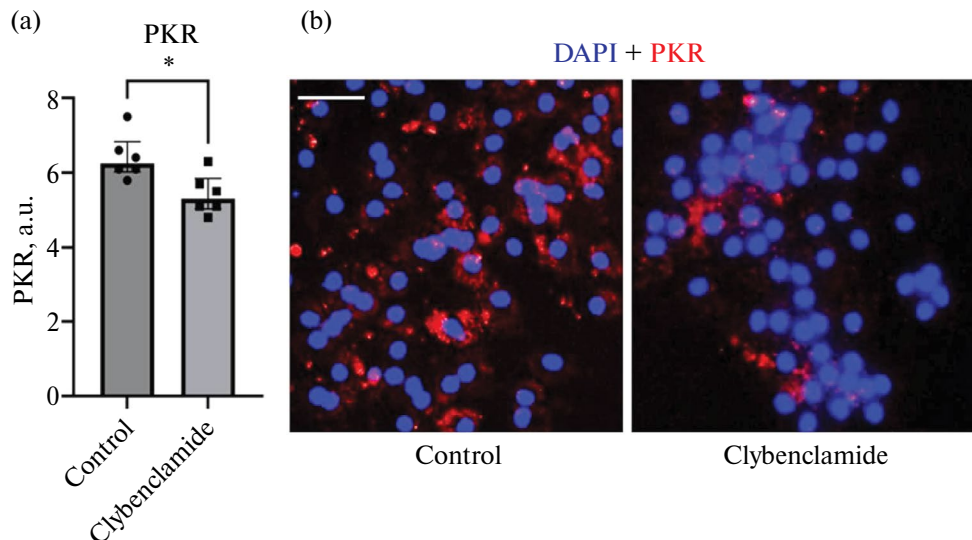


Рис. 6. (а) – количественный анализ экспрессии PKR в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (б) – репрезентативные снимки экспрессии PKR (красный) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала – 30 мкм. * – уровень статистической значимости, $p < 0.05$.

Интенсивность флуоресценции p-IKKbeta в клетках контрольной группы статистически значимо снизилась с 12.10 (11.00; 13.71) у.е. в контрольной группе до 9.41 (8.65; 10.30) у.е. в группе клеток, инкубируемых с глибенкламидом ($p = 0.008$, критерий Манна – Уитни) (рис. 7).

Статистически значимых различий в экспрессии pIRS-Ser выявлено не было: (10.86 (8.50; 12.79) у.е. в группе контроля и 10.25 (9.47; 11.38) у.е. в опытной группе) ($p = 0.84$, критерий Манна – Уитни) (рис. 8).

Воздействие глибенкламида изменяет значение времени нарастания полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов

В электрофизиологических исследованиях не было выявлено значимых различий в амплитуде и наклоне пВПСП в группах с добавлением и без добавления глибенкламида, однако время нарастания пВПСП в группе с добавлением глибенкламида оказалось статистически значимо ниже (1.05 ± 0.14 мс в группе без добавления глибенкламида и 0.74 ± 0.05 мс в группе с глибенкламидом, $p = 0.042$, критерий Манна – Уитни) (рис. 9), что может говорить о влиянии глибенкламида на синаптическую передачу у мышей.

Результаты LTP, индуцированной TBS, не показали значимых различий в контрольной группе и группе с добавлением глибенкламида, так как, вероятно, длительная стимуляция не может эффективно активировать синапсы у мышей средней возрастной группы (рис. 9).

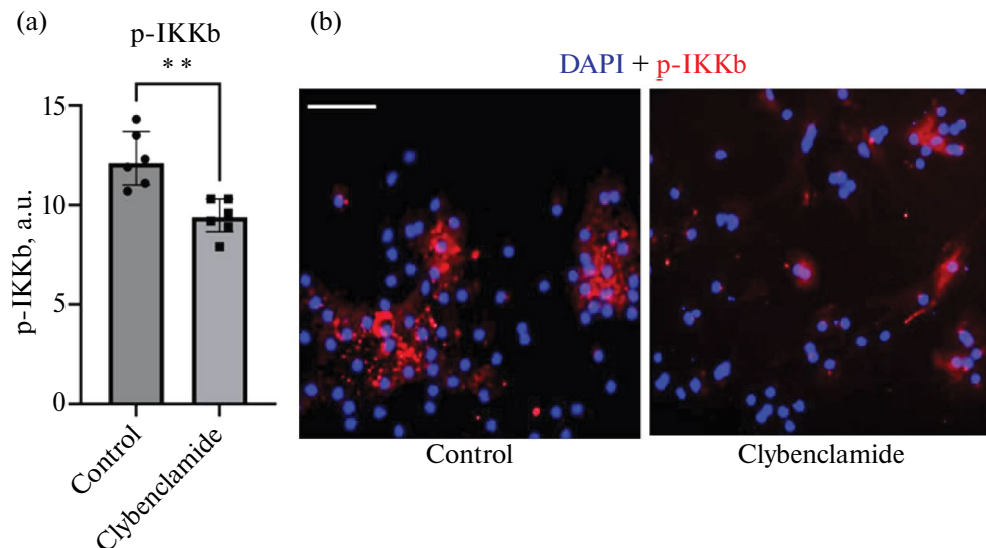


Рис. 7. (а) – количественный анализ экспрессии p-IKKbeta в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (б) – репрезентативные снимки экспрессии p-IKKbeta (красный) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала – 50 мкм. ** – уровень статистической значимости, $p < 0.01$.

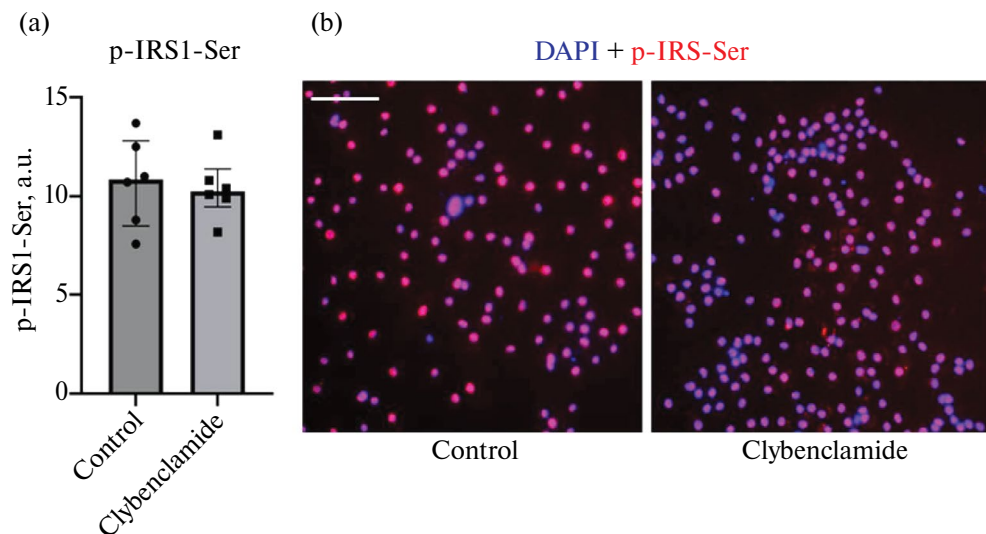


Рис. 8. (а) – количественный анализ экспрессии pIRS-Ser в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (б) – репрезентативные снимки экспрессии pIRS-Ser (красный) клетками. Ядра клеток окрашены DAPI (голубой). Шкала – 50 мкм.

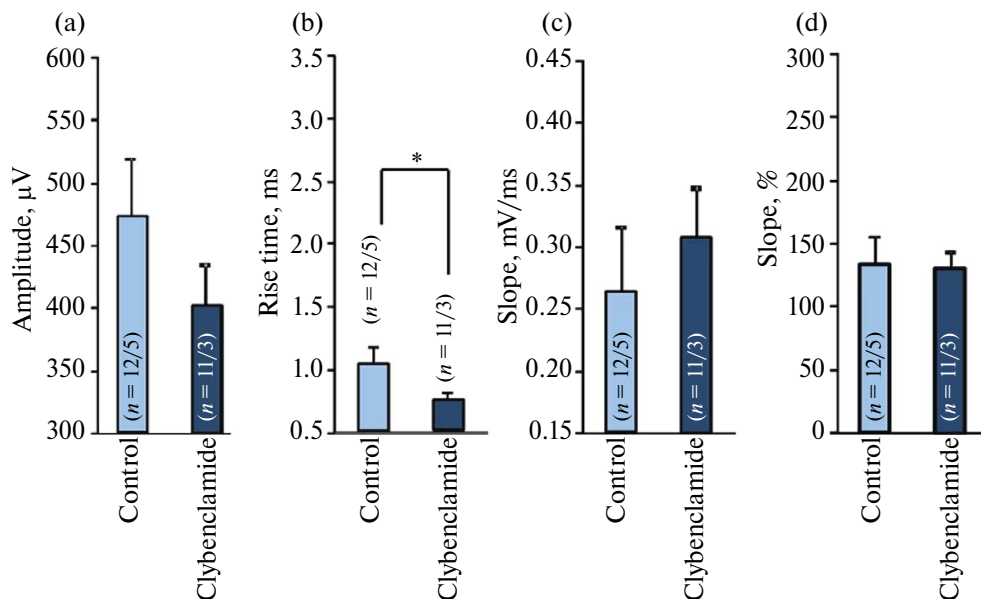


Рис. 9. (a) – сводная диаграмма амплитуд; (b) – сводная диаграмма значений времени нарастания; (c) – сводная диаграмма значений наклона пВПСП зоны CA1 гиппокампа; (d) – сводная диаграмма изменений наклона пВПСП после тетанус-стимуляции зоны CA1 гиппокампа. * – уровень статистической значимости, $p < 0.05$.

Синаптическая передача включает высвобождение нейротрансмиттеров из пресинаптических нейронов, которые затем связываются со специфическими постсинаптическими рецепторами. Амплитуда, наклон и время нарастания пВПСП указывают на силу возбуждающей синаптической передачи: насколько много пирамидных нейронов, вырабатывающих потенциалы действия, настолько быстро нейромедиатор высвобождается пресинапсом и связывается с рецептором на постсинапсе [17, 18].

Количество AMPA-рецепторов глутамата в синапсах является основным фактором, определяющим силу синапса, и варьируется от синапса к синапсу [19]. Также сила ответа пВПСП зависит от активации других глутаматных или ГАМК-ергических рецепторов. Кроме того, глутамат может высвобождаться не только нейронами, но также и астроцитами, и клетками микроглии, что наблюдается при воспалении [20, 21].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было показано, что старение сопровождается увеличением числа сенесцентных клеток и повышением экспрессии маркеров воспаления, увеличением экспрессии фосфорилированных протеиназ метафламмасом PKR и IKK β . При этом старение у мышей не приводило к изменению в экспрессии субстрата инсулиновых рецепторов 1 (IRS1phospho-S312) и инсулиновых рецепторов (IR), это позволяет предположить, что при физиологическом старении, без признаков нейродегенерации и реактивного астроглиоза, еще не наблюдается нарушений инсулиновой сигнализации, но уже наблюдаются проявления метаболического воспаления. Также нами было показано, что делеция гена *Nlrp3* предотвращала возрастные метаболические изменения у NLRP3 $^{-/-}$ нокаутных мышей, улучшая поведенческие и биохимические характеристики, связанные со старением, такие как сигнальная память (также известная как сен-

сорная память), относящаяся к способности мозга кратковременно сохранять поступающую из окружающей среды сенсорную информацию, тревожность, социальные функции, активность гликолиза, нейровоспаление, метавоспаление [22].

Имеются литературные данные, что глибенкламид оказывает нейропротекторное действие. Так, например, предполагается, что глибенкламид эффективно подавляет миграцию воспалительных клеток путем ингибирования сборки NLRP3 инфламмосомы, тем самым уменьшая инфильтрацию воспалительных клеток и предотвращая дальнейшее повреждение органов в ишемизированной ткани [23]. В одном из исследований было показано, что глибенкламид защищает целостность гематоэнцефалического барьера, что снижает индуцированную экстравазированным белком продукцию провоспалительных медиаторов и улучшает неврологические исходы после экспериментальной ишемии головного мозга [24, 25]. Поэтому мы проверили гипотезу о том, что глибенкламид ослабляет экспрессию PKR и последующую активацию фосфорилированных протеинкиназ путем ингибирования активации NLRP3 инфламмосомы.

Кроме того, было показано, что при обработке переживающих срезов глибенкламидом наблюдается уменьшение времени нарастания полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов. Такое уменьшение времени нарастания пВПСП говорит о более быстром выделении глутамата в синаптическую щель или о более быстром взаимодействии с рецепторами, что также может быть связано с изменением распределения рецепторов на постсинапсе. Глибенкламид блокирует АТФ-зависимые калиевые каналы (K^+ -АТФ-каналы). Прекращение выхода из клетки калия приводит к деполяризации мембраны и притоку ионов Ca^{2+} через потенциалзависимые кальциевые каналы. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} в клетке способствует выделению нейромедиаторов в синаптическую щель, что могло вызвать изменение времени нарастания пВПСП у зрелых мышей. Ранее было продемонстрировано, что глибенкламид менее специфичен к TRPM4-каналам и широко известен своей способностью антагонизировать SUR1-Kir6.2- (т. е. K^+ -АТФ) каналы. Было показано, что каналы SUR1-TRPM4 также объединяются в единые ансамбли и что эффективность глибенкламида в отношении каналов SUR1-TRPM4 в 100 раз выше, чем в отношении гомомерных каналов TRPM4. Интересно, что в условиях гипогликемии глибенкламид через K^+ -АТФ-каналы снижает возбуждающие постсинаптические потенциалы в нейроглиальных клетках коры головного мозга, но не в пирамидных нейронах. Поскольку TRPM4 активируется внутриклеточным кальцием и проводит моновалентные катионы, TRPM4 может способствовать и усиливать возбуждающую синаптическую передачу в пирамидальных нейронах CA1 гиппокампа [26].

Более того, ранее было продемонстрировано, что глибенкламид снижает АТФ-индуцированное повышение внутриклеточного кальциевого перехода через ингибирование реактивных форм кислорода и активности митохондрий в макрофагах [27]. Однако для выявления влияния глибенкламида на другие физиологические функции клеток гиппокампа через регуляцию гомеостаза $[Ca^{2+}]_i$ необходимо проведение дальнейших исследований.

В ходе текущего исследования было выявлено, что глибенкламид функционально изменяет экспрессию провоспалительных маркеров, но не сенесценцию в сокультуре астроцитов и нейронов. Также снижение экспрессии NLRP3 за счет действия глибенкламида приводит к предотвращению фосфорилирования протеинкиназ метафламмосомного комплекса.

Кроме того, было показано, что расположение PKR и IRS1 было ядерным, что согласуется с результатами предыдущих исследований, проведенных в мозге больных с болезнью Альцгеймера [28]. IKK β был обнаружен в цитоплазме нейронов, что также согласуется с результатами предыдущих исследований, показавших его цитоплазматическое расположение [29].

Мы предположили, что фармакологическая модуляция инфламмасом глибенкламидом приводит к снижению экспрессии PKR. Известно, что PKR – это проапоптотическая серин/треониновая киназа, активация которой путем фосфорилирования инициирует каскад нейродегенеративных клеточных событий, приводящих к апоптозу [8]. Было показано, что анализ PKR в цереброспинальной жидкости позволяет прогнозировать снижение когнитивных способностей [30], что подтверждает идею использования PKR в качестве биомаркера болезни Альцгеймера [29]. Интересно, что для других белков, участвующих в работе предполагаемой метафламмасомы, ранее было показано, что высокая экспрессия IRS1 и PKR связана с ухудшением познавательной деятельности, но не с наличием деменции [29]. Это, возможно, предполагает участие этих компонентов на ранних стадиях болезни Альцгеймера или при легких когнитивных расстройствах, которые могут развиваться в более раннем возрасте.

Наши результаты показали, что снижение PKR *in vitro*, индуцированное в мозге под действием глибенкламида, может предотвратить фосфорилирование IKK β . Воспаление запускается путем активации IKK β , который катализирует диссоциацию I κ B от ядерного фактора NF- κ B, что приводит к увеличению транслокации NF- κ B в ядро для запуска транскрипции генов, кодирующих воспалительные цитокины, такие как интерлейкин 1 β (IL-1 β) и IL-6 [31]. Таким образом, снижение IKK β снижает транслокацию NF- κ B в ядро. Кроме того, имеются исследования, демонстрирующие, что снижение воспалительной способности нейронов путем делеции или ингибирования промежуточных звеньев пути NF- κ B (например, IKK β) восстанавливает гипоталамический контроль энергетического баланса, что приводит к снижению восприимчивости к ожирению и толерантности глюкозы [32].

При этом мы не наблюдали изменения экспрессии патологически фосфорилированного IRS, а также числа сенесцентных клеток в культурах, полученных от животных средней возрастной группы, после воздействия глибенкламидом. Биологические эффекты передачи сигналов инсулина регулируются фосфорилированием субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS1) по остаткам серина. В головном мозге фосфорилирование IRS1 в специфических участках серина увеличивается при болезни Альцгеймера у пациентов и у животных с моделью болезни Альцгеймера. Также показано, что фосфорилирование IRS1 в специфических сайтах серина является потенциальным маркером несвязанных с A β дефицитов памяти, вызванных сахарным диабетом 2-го типа и старением; однако при ухудшении памяти, связанном с A β , модификации IRS1 могут быть маркером раннего выявления повышения A β 42 до начала ухудшения памяти при болезни Альцгеймера [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, глибенкламид снижает экспрессию провоспалительных маркеров NLRP3 и IL18 в культуре клеток головного мозга *in vitro*, что, в свою очередь, приводит к предотвращению фосфорилирования протеинкиназ метафламмасомного комплекса – PKR и IKK β . Блокирование NLRP3 инфламмасом глибенкламидом сопровождается снижением времени нарастания пВПС у зрелых мышей. При этом не наблюдается изменения экспрессии патологически фосфорилированного IRS, а также числа сенесцентных клеток в культурах после воздействия глибенкламидом при используемых в работе условиях инкубации.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена на приборной базе Центра коллективного пользования «Молекулярные и клеточные технологии», Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.К.К., Е.Д.Х.), проведение эксперимента (Ю.К.К., Е.Д.Х., О.С.Б., Ю.А.П., А.И.М.), обработка данных, подготовка графических материалов (Ю.К.К., Е.Д.Х., О.С.Б.), написание и редактирование манускрипта (Ю.К.К., Е.Д.Х.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук, МД-2368.2022.3, 2022–2023 гг. финансирования. Анализ данных выполнен при поддержке государственного задания «Фундаментальные аспекты нейропластичности в рамках модели трансляционной неврологии», фрагмент «Клеточно-молекулярные механизмы повреждения нейроваскулярной единицы головного мозга и гематоэнцефалического барьера при церебральной патологии» № 122041800164–3. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике при Красноярском медицинском университете им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, протокол № 2 от 01.11.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhao Q, Tan X, Su Z, Manzi HP, Su L, Tang Z, Zhang Y (2023) The Relationship between the Dietary Inflammatory Index (DII) and Metabolic Syndrome (MetS) in Middle-Aged and Elderly Individuals in the United States. *Nutrients* 15: 1857. <https://doi.org/10.3390/nu15081857>
2. Walker KA, Gottesman RF, Wu A, Knopman DS, Gross AL, Mosley TH, Selvin E, Windham BG (2019) Systemic inflammation during midlife and cognitive change over 20 years: The ARIC Study. *Neurology* 92: e1256–e1267. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007094>
3. Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13: 397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
4. Sharma BR, Kanneganti T-D (2021) NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol* 22: 550–559. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00886-5>
5. Komleva YK, Lopatina OL, Gorina YV, Chernykh AI, Trufanova LV, Vais EF, Kharitonova EV, Zhukov EL, Vahina LY, Medvedeva NN, Salmina AB (2022) Expression of NLRP3 Inflammasomes in Neurogenic Niche Contributes to the Effect of Spatial Learning in Physiological Conditions but Not in Alzheimer's Type Neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* 42: 1355–1371. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01021-y>
6. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
7. Романцова TP, Сыч ЮР (2019) Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении. Ожирение и метаболизм 16(4): 3–17. [Romantsova TR, Sych YuP (2019) Immunometabolism and metainflammation in obesity. *Obesity and metabolism* 16(4): 3–17. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/omet12218>

8. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS (2010) Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. *Cell* 140: 338–348.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.001>
9. Taga M, Minett T, Classey J, Matthews FE, Brayne C, Ince PG, Nicoll JA, Hugon J, Boche D, MRC CFAS (2017) Metaflammasome components in the human brain: a role in dementia with Alzheimer's pathology? *Brain Pathol* 27: 266–275.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12388>
10. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J (2019) Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol* 10: 2538.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538>
11. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM (2009) Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 187: 61–70.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200903124>
12. Fox JG (2007) The mouse in biomedical research. 2nd ed. Elsevier. AP. Amsterdam. Boston.
13. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5(2): 187–195.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
14. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363–9367.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.936>
15. Larson J, Munkácsy E (2015) Theta-burst LTP. *Brain Res.* 1621: 38–50.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.034>
16. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A (2008) HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med* 14: 476–484.
<https://doi.org/10.2119/2008-00034.Klune>
17. Muellerleile J, Blistein A, Rohlmann A, Scheiwe F, Missler M, Schwarzscher SW, Jedlicka P (2020) Enhanced LTP of population spikes in the dentate gyrus of mice haploinsufficient for neurobeachin. *Sci Rep* 10: 16058.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72925-4>
18. Heim LR, Shoob S, De Marcos L, Zarhin D, Slutsky I (2022) Measuring synaptic transmission and plasticity with fEPSP recordings in behaving mice. *STAR Protocols* 3: 101115.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101115>
19. Yamasaki M, Fukaya M, Yamazaki M, Azechi H, Natsume R, Abe M, Sakimura K, Watanabe M (2016) TARP γ -2 and γ -8 Differentially Control AMPAR Density Across Schaffer Collateral/Commissural Synapses in the Hippocampal CA1 Area. *J Neurosci* 36: 4296–4312.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-15.2016>
20. Lewerenz J, Maher P (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases – What is the Evidence? *Front Neurosci* 9: 469.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
21. Haroon E, Miller AH, Sanacora G (2017) Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 42: 193–215.
<https://doi.org/10.1038/npp.2016.199>
22. Khilazheva ED, Belozor OS, Panina YuA, Gorina YaV, Mosyagina AI, Vasiliev AV, Malinovskaya NA, Komleva YuK (2022) The Role of Metaflammation in the Development of Senescence-Associated Secretory Phenotype and Cognitive Dysfunction in Aging Mice. *J Evol Biochem Phys* 58: 1523–1539.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050222>
23. Gao L, Dong Q, Song Z, Shen F, Shi J, Li Y (2017) NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflamm Res* 66: 17–24.
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-0981-7>
24. Xu F, Shen G, Su Z, He Z, Yuan L (2019) Glibenclamide ameliorates the disrupted blood–brain barrier in experimental intracerebral hemorrhage by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. *Brain and Behav* 9: e01254.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1254>
25. Jiang B, Li L, Chen Q, Tao Y, Yang L, Zhang B, Zhang JH, Feng H, Chen Z, Tang J, Zhu G (2017) Role of Glibenclamide in Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage. *Transl Stroke Res* 8: 183–193.
<https://doi.org/10.1007/s12975-016-0506-2>

26. *Fearey BC, Binkle L, Mensching D, Schulze C, Lohr C, Friese MA, Oertner TG, Gee CE* (2022) A glibenclamide-sensitive TRPM4-mediated component of CA1 excitatory postsynaptic potentials appears in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep* 12: 6000.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-09875-6>
27. *Li D, Ma Z, Fu Z, Ling M, Yan C, Zhang Y* (2014) Glibenclamide Decreases ATP-Induced Intracellular Calcium Transient Elevation via Inhibiting Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Activity in Macrophages. *PLoS One* 9: e89083.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089083>
28. *Talbot K, Wang H-Y, Kazi H, Han L-Y, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE* (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* 122: 1316–1338.
<https://doi.org/10.1172/JCI59903>
29. *Taga M, Mouton-Liger F, Sadoune M, Gourmaud S, Norman J, Tible M, Thomasseau S, Paquet C, Nicoll JAR, Boche D, Hugon J* (2018) PKR modulates abnormal brain signaling in experimental obesity. *PLoS One* 13: e0196983.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196983>
30. *Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Lapalus P, Gray F, Laplanche J-L, Hugon J* (2012) Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Double-Stranded RNA-Dependant Protein Kinase in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 71: 829–835.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.031>
31. *Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Salleh N* (2017) *Phyllanthus niruri* leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 205: 123–137.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.002>
32. *Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP* (2017) Astrocyte IKK β /NF- κ B signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Mol Metabol* 6: 366–373.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.01.010>
33. *Wang W, Tanokashira D, Fukui Y, Maruyama M, Kuroiwa C, Saito T, Saido TC, Taguchi A* (2019) Serine Phosphorylation of IRS1 Correlates with A β -Unrelated Memory Deficits and Elevation in A β Level Prior to the Onset of Memory Decline in AD. *Nutrients* 11: 1942.
<https://doi.org/10.3390/nu11081942>

Glibenclamide Prevents Inflammation by Targeting NLRP3 Inflammasome Activation*In Vitro*

**E. D. Khilazheva^{b, c}, Yu. A. Panina^{b, c}, A. I. Mosiagina^{b, c}, O. S. Belozor^{b, c}, and
Yu. K. Komleva^{a, *}**

^a*Brain Institute, Scientific Center of Neurology, Moscow, Russia*

^a*Prof. V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of
the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russia*

^c*Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Educational Institution of Higher
Education «Prof. V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University» of the Ministry of
Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russia*

^{*}*e-mail: yuliakomleva@mail.ru*

The NLRP3 inflammasome is known to play a significant role in the development of neurodegeneration and physiological aging, as well as the development of metabolic inflammation, which has generated significant interest in the scientific community in finding effective inhibitors of the NLRP3 inflammasome and assessing their effects. The purpose of this study was to evaluate the effect of pharmacological modulation of NLRP3 activity using an indirect NLRP3 inflammasome inhibitor, glibenclamide, on the expression of metaflammasome components in *in vitro* brain cells obtained from middle-aged mice. The study revealed that glibenclamide reduces the expression of pro-inflammatory markers NLRP3 and IL18 in cell culture, which in turn leads to the prevention of phosphorylation of protein kinases of the metaflammasome complex – PKR and IKK β . However, we did not observe changes in the expression of pathologically phosphorylated IRS, as well as in the number of senescent cells in cultures after the exposure to glibenclamide.

Keywords: glibenclamide, astrocytes, neurons, metaflammasome, metainflammation, NLRP3 inflammasome, old age, aging

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЗНАЧЕНИЕ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МАЛЫХ ДОЗ L-ТИРОКСИНА

© 2024 г. Е. А. Гусакова¹*, И. В. Городецкая¹

¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь*

**E-mail: elena-gusakova83@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 09.04.2024 г.

Принята к публикации 13.04.2024 г.

Ранее была показана возможность повышения устойчивости организма к стрессу малыми дозами L-тироксина. Не установлено, связан ли этот эффект с действием самого L-тироксина или опосредуется активацией/потенцированием им эффектов других гормонов. Цель работы – изучить роль гормонов надпочечников в реализации защитного эффекта малых доз L-тироксина при стрессе. Работа выполнена на белых половозрелых беспородных крысах-самцах. Стресс моделировали ситуацией «дефицита времени». L-тироксин вводили в малых, близких к физиологическим дозах по следующей схеме: первая неделя 1.5 мкг/кг, вторая – 2.0 мкг/кг, третья – 2.5 мкг/кг, четвертая – 3.0 мкг/кг. Установлено, что стрессорное воздействие повышает концентрацию йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ) в крови на 23–44%, кортикостероидов на 40%, относительную массу надпочечников на 31%; снижает относительную массу тимуса и селезенки на 26 и 14%, уровень инсулина на 46%; вызывает повреждение слизистой оболочки желудка с индексом поражения 1.36; повышает физическую выносливость, двигательную активность и тревожность животных, снижая интенсивность исследовательских реакций. Двухсторонняя адреналэктомия препятствует активации тиреоидной функции и устраняет рост физической выносливости, изменяет структуру поведения, определяет более существенные повреждения (индекс поражения 2.7), повышение тревожности, угнетение исследовательского поведения в условиях стресса. Адреналэктомия ограничивает защитный эффект L-тироксина при стрессе, что проявляется более низкими значениями горизонтальной двигательной и исследовательской активности, более высокой тревожностью крыс и повреждением слизистой оболочки желудка (после введения L-тироксина индекс поражения при стрессе без адреналэктомии 0.12; на фоне адреналэктомии 1.19). Этому соответствует более низкая концентрация ЙТГ в крови (на 14–43%). Следовательно, малые дозы L-тироксина оказывают стресс-протекторное действие. Адреналэктомия лимитирует, однако не предупреждает полностью его реализацию. Это свидетельствует о том, что в формировании антистрессорного эффекта L-тироксина гормоны надпочечников играют важную, но не решающую роль.

Ключевые слова: йодсодержащие тиреоидные гормоны, стресс, адреналэктомия

ВВЕДЕНИЕ

Стресс представляет собой универсальное преморбидное состояние и является фактором риска возникновения многих заболеваний вследствие «аллостатической нагрузки» на организм. Более 70% заболеваний человека ассоциированы со стрессом [1].

Наиболее пролонгированные реакции на стресс обеспечивают гормоны. В последнее время активно развивается представление о важной роли йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ) в антистресс-системе организма, основанное на том, что гипотиреоз уменьшает, тогда как введение малых, близких к физиологическим доз экзогенного L-тироксина повышает устойчивость организма к стрессу различной природы [2]. Выявлены следующие механизмы стресс-протекторного эффекта ЙТГ: стимуляция активности антиоксидантной системы [3], связанная, в частности, с влиянием ЙТГ на Nrf2-сигнальный путь (nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, ядерный фактор эритроидного происхождения 2) [4], что усиливает опосредованную элементами антиоксидантного ответа (ARE) экспрессию антиоксидантных ферментов и цитопротекторных белков; увеличение синтеза белков теплового шока [5], экспрессии генов раннего реагирования *c-fos* и *c-jun* [6], активности ингибиторов протеолитических ферментов [7], дофаминергической трансмиссии в ЦНС [8].

Однако не установлено, опосредован ли антистрессорный эффект действием самих ЙТГ или их влиянием на активность других эндокринных осей, в частности, симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной. С учетом известного взаимоотношения между ними установлено, что повышение содержания ЙТГ в крови пациентов с гипертиреозом коррелирует с увеличением концентрации адреналина и норадреналина [9], а рост уровня ЙТГ при лечении гипотиреоза увеличивает содержание кортизола в сыворотке крови [10].

Цель исследования: изучить роль гормонов надпочечников в реализации защитного действия малых доз L-тироксина при стрессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 300 белых половозрелых беспородных крысах-самцах массой 220–240 г. Было сформировано 10 групп животных: «Интактные», «Контроль» (С), «Стресс» (S), «Тироксин» (Т), «Тироксин+стресс» (TS), «Ложная адреналэктомия», «Адреналэктомия» (А), «Адреналэктомия+стресс» (AS), «Тироксин+адреналэктомия» (ТА), «Тироксин+адреналэктомия+стресс» (TAS).

Для воспроизведения эмоционального стресса использовали ситуацию «дефицита времени» [11]: крыс по одной особи помещали в спиралевидно закрученный тоннель, который быстро заполняли холодной водой. Экспериментальное животное было вынуждено перемещаться вверх по ходу спирали. Состояние стресса формировалось за счет того, что крыса должна была быстро двигаться вверх и никак не могла повлиять своими действиями на ситуацию, в которой оказалась. После того как животное достигало верхнего отверстия тоннеля, его помещали в индивидуальную клетку.

Крысам групп «С», «S», «Ложная адреналэктомия», «А», «AS» внутривенно вводили 1%-ный крахмальный клейстер металлическим зондом с шаровидным наконечником в течение 28 дней. Это связано с тем, что животным групп «Т», «TS», «ТА», «TAS» L-тироксин (Berlin-Chemie AG, «Менарини Групп», Германия) вводили в 1%-ном крахмальном клейстере таким же способом и в течение такого же времени. Применяли малые, близкие к физиологическим дозы, не влияющие на частоту сердечных сокращений, прирост массы тела, концентрацию эндогенных ЙТГ в крови, еженедельно наращивая дозу от 1.5 (первая неделя) до 3 мкг/кг (последняя неделя).

Двухстороннюю адреналэктомию выполняли по методу Кабака [12] под эфирным наркозом. До этого животным вводили 1%-ный крахмальный клейстер в течение 14

дней. После операции в качестве питьевой воды для компенсации потерь ионов натрия в отсутствие альдостерона крысы получали изотонический раствор NaCl. Забой животных осуществляли через 14 дней после адреналэктомии. Все это время крысам продолжали вводить 1%-ный крахмальный клейстер.

Ложноадреналэктомированным животным проводили все этапы операции и послеоперационного периода за исключением удаления надпочечников.

Крысам группы «ТА» адреналэктомия выполняли на 15-й день введения L-тироксина и продолжали вводить L-тироксин еще на протяжении 14 дней.

Стресс в группах животных, получавших L-тироксин или крахмальный клейстер, воспроизводили на следующие сутки после окончания их введения.

Забой животных осуществляли под уретановым наркозом (внутрибрюшинно 1 г/кг уретана (Sigma-Aldrich, США)): в группах «С», «ТС», «АС», «ТАС» через 1 ч после стресса; в группах «С», «Т», «Ложная адреналэктомия», «А», «ТА» – на следующие сутки после окончания введения крахмального клейстера или L-тироксина.

Интенсивность общего адаптационного синдрома исследовали по: 1) изменениям относительной массы надпочечников, тимуса, селезенки (определяли по отношению абсолютной массы органов к массе тела, которые измеряли на весах OHAUS Corporation Adventurer Pro AV264 (Швейцария) и OHAUS Corporation Adventurer AR5120 (Китай) соответственно); 2) сдвигам концентрации стресс-гормонов в крови (изучали методом иммуноферментного анализа) – кортикостерона («Rat corticosterone», Bioassay Technology Laboratory, China) и инсулина («Инсулин», ООО «Хема», Россия); 3) состоянию слизистой оболочки желудка, оцениваемому в отраженном свете под малым увеличением лупы ($\times 5$) (за 24 ч до эксперимента животных лишали пищи, сохраняя свободный доступ к воде). Желудок вскрывали вдоль большой кривизны и промывали 0.9%-ным раствором NaCl. Определяли частоту поражения (отношение числа животных, имевших кровоизлияния в слизистую, к общему количеству крыс в группе, выраженное в %); тяжесть (в баллах: 0 – отсутствие кровоизлияний; 0.5 – гиперемия; 1 – единичные (1 или 2) точечные кровоизлияния; 2 – множественные (более 3), незначительные (площадью около 1 мм²) кровоизлияния; 3 – множественные, значительные (площадью более 1 мм²) кровоизлияния; 4 – массивные кровоизлияния, охватывающие практически всю поверхность слизистой; индекс поражения (произведение частоты и средней тяжести поражения (общее число баллов в группе, деленное на количество животных в ней) в группе, деленное на 100) [13]; 4) изменениям двигательной и исследовательской активности крыс, уровня их тревожности (оценивали в тесте «открытое поле» с использованием программного обеспечения SMART 3.0) и физической выносливости (изучали с помощью ротора LE8300 после 3-дневной адаптации).

Уровень ЙТГ – трийодтиронина (Т₃) и тироксина (Т₄), их свободных фракций (Т₃ св и Т₄ св), тиреотропного гормона (ТТГ) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов «Т3общий-ИФА-БЕСТ», «Т4общий-ИФА-БЕСТ», «ТТГ-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор Бест», Россия), «ДС-ИФА-Тироид-Т3свободный», «ДС-ИФА-Тироид-Т4свободный» (ООО «НПО диагностические системы», Россия).

Содержание гормонов, относительную массу стресс-сенситивных органов, показатели, характеризующие физическую выносливость, интенсивность локомоторных и исследовательских реакций, уровень тревожности животных определяли у 6 крыс из каждой экспериментальной группы, тяжесть поражения слизистой оболочки желудка – у 10, частоту – у 30.

Для статистической обработки данных применяли программу «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., STA999K347156-W). Поскольку после первоначального определения характера распределения признака (Shapiro-Wilk's test) было установлено, что оно отличалось от нормального, использовали непараметрические методы. Сравнение количественных показателей групп проводили с помощью двустороннего теста Манна – Уитни с поправ-

кой Бонферони. Данные по частоте поражения слизистой оболочки желудка, являющиеся качественными бинарными признаками, обрабатывали с использованием модулей «Непараметрические статистики», «Таблицы 2 x 2» (точный критерий Фишера).

Данные по содержанию гормонов в крови, относительной массе стресс-сенситивных органов, показателям, характеризующим физическую выносливость, двигательную и исследовательскую активность, уровень тревожности животных представляли в виде Me (LQ; UQ) (Me – медиана, (LQ; UQ) – интерквартильный интервал: верхняя

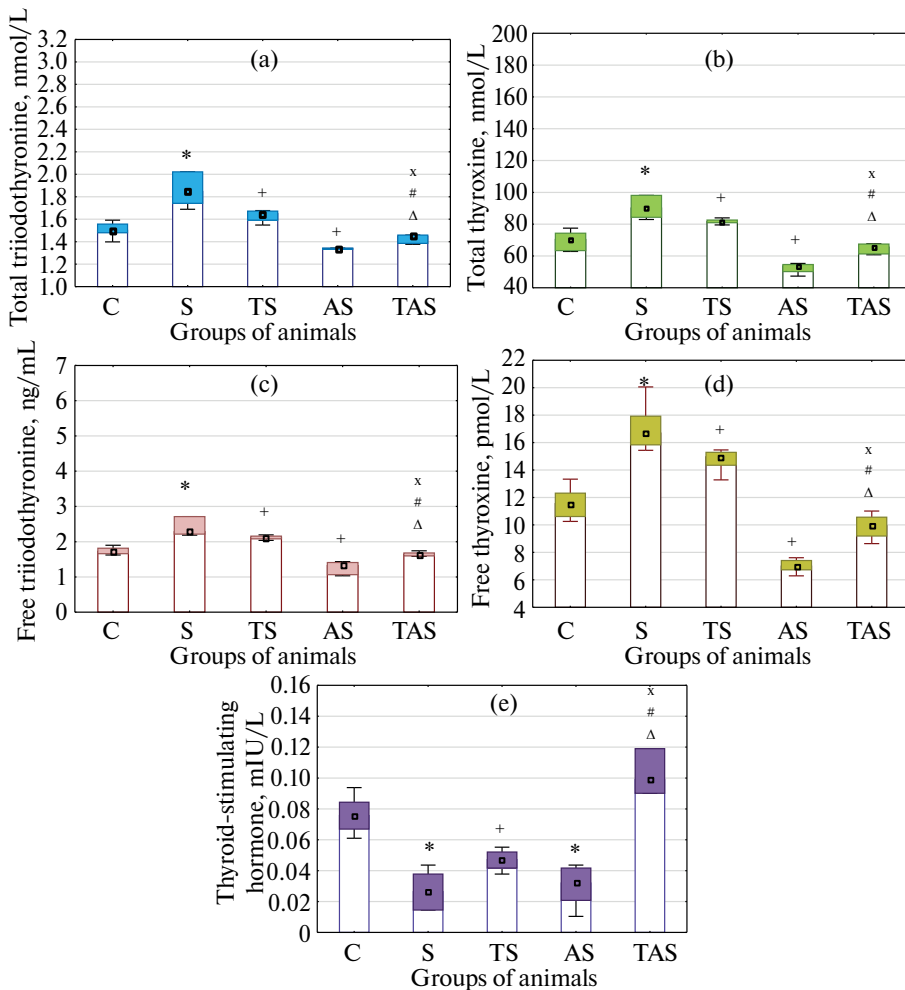


Рис. 1. Влияние введения близких к физиологическим доз L-тироксина на уровень общего трийодтиронина (a), общего тироксина (b), свободного трийодтиронина (c), свободного тироксина (d) и тиреотропного гормона (e) в крови животных с интактными и удаленными надпочечниками без и в условиях стресса.

Здесь и на рис. 2–4:

→ □ – медиана; □ – в верхняя граница нижнего квартиля и нижняя граница верхнего квартиля (LQ; UQ);
 ┴ – минимальное и максимальное значения показателя;

→ группы животных: C – контроль; S – стресс; TS – тироксин+стресс; AS – адреналэктомия+стресс; TAS – тироксин+ адреналэктомия +стресс;

→ $p < 0.05$ по отношению: * – к группе «C»; # – к группе «S»; + – к группам «C» и «S»; Δ – к группе «TS»; x – к группе «AS».

граница нижнего квартиля (LQ) и нижняя граница верхнего квартиля (UQ)), по тяжести поражения слизистой оболочки желудка в виде абсолютных и относительных частот. Критическим уровнем значимости был принят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У животных, которым вводили 1%-ный крахмальный клейстер (группа «С»), все изученные нами показатели не отличались от таковых у интактных и ложноадреналэктомированных крыс ($p > 0.05$).

Ситуация «дефицита времени» вызвала повышение концентрации ЙТГ в крови на 23–44% (рис. 1а – d). В ответ на это сывороточный уровень ТТГ снизился на 66% (рис. 1е). Относительная масса надпочечников увеличилась на 31% (рис. 2а), тимуса и селезенки упала на 26 и 14% (рис. 2б – с). Уровень кортикостероидов в крови возрос на 40% (рис. 3а), а инсулина, напротив, снизился на 46% (рис. 3б). У 80% животных, перенесших стресс, развилось поражение слизистой оболочки желудка с тяжестью 1 балл у 20% крыс, 2 или 3 балла у оставшихся 60% в соотношении 1 : 1. Индекс поражения составил 1.36. Физическая выносливость животных выросла на 35% (рис. 4), общая дистанция перемещения животных в тесте «открытое поле» увеличилась на 29%, число стоек снизилось на 43% (табл. 1). Латентный период входа в центр повысился на 48%, параллельный индекс, отражающий тонкие изменения в характере локомоторной активности, характерные для исследования животными незнакомой среды (чем ближе к -1.0 , тем интенсивнее исследовательские реакции), стал положительным (табл. 2). Общая длительность замирания увеличилась на 21% за счет возрастания времени неподвижности в периферической зоне на 25% (табл. 3).

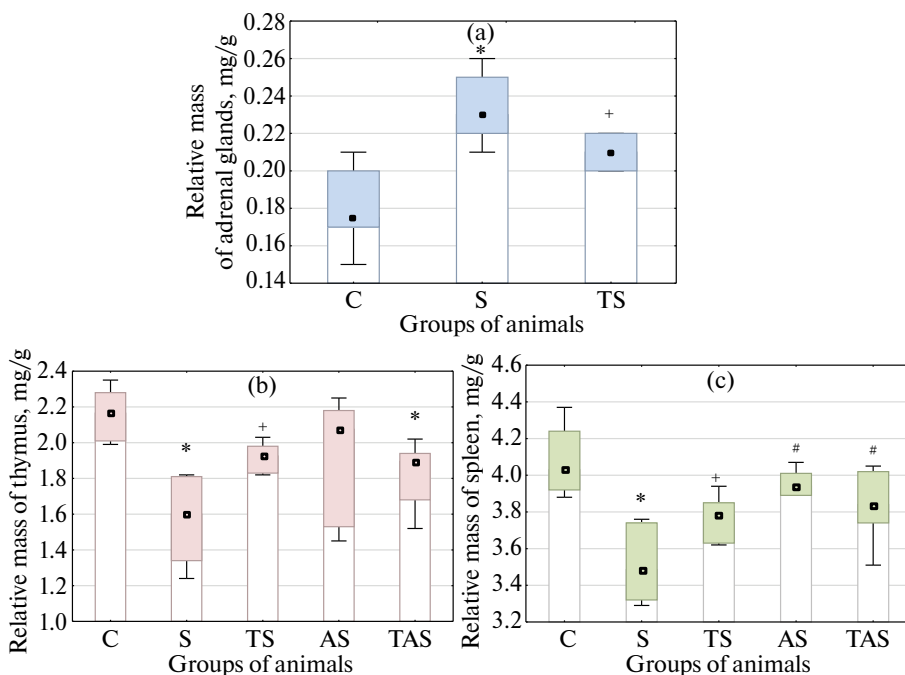


Рис. 2. Влияние введения малых доз L-тироксина на изменения относительной массы надпочечников (а), тимуса (б), селезенки (с) у крыс с интактными и удаленными надпочечниками без и после стресса.

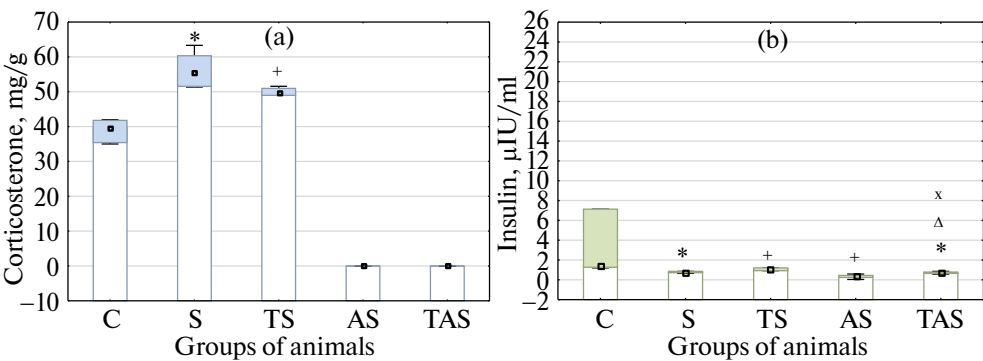


Рис. 3. Влияние L-тироксина на изменения уровня кортикостерона (а) и инсулина (б) в крови животных с интактными и удаленными надпочечниками без и в условиях стресса.

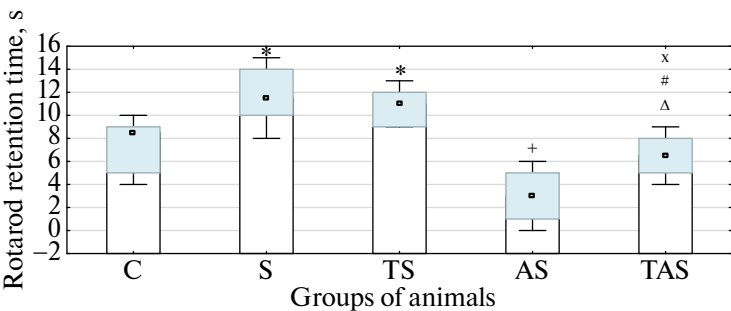


Рис. 4. Влияние малых доз L-тироксина на изменение физической выносливости животных с интактными и удаленными надпочечниками без и после стресса.

Таблица 1. Влияние малых доз L-тироксина на изменения двигательной активности животных с интактными и удаленными надпочечниками без и в условиях стресса

Группа животных	Общая дистанция, м	Дистанция на периферии, %	Дистанция в центре, %	Максимальная скорость перемещения, см/с	Количество вертикальных стоек
1. Контроль	14.18 (12.66; 16.12)	81.30 (73.19; 86.07)	18.71 (13.93; 26.81)	57.62 (45.44; 90.27)	11.5 (9.00; 14.00)
2. Стресс	18.27 (17.57; 19.53)	82.11 (72.66; 83.52)	17.90 (16.48; 27.34)	95.22 (85.71; 111.1)	6.5 (5.0; 8.0)
<i>p</i> 1–2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05
3. Тироксин +стресс	19.74 (18.28; 20.33)	54.57 (44.08; 55.11)	45.44 (44.89; 55.92)	84.58 (56.17; 115.15)	10.5 (9.0; 14.0)
<i>p</i> 1–3	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05

Окончание Таблицы 1

Группа животных	Общая дистанция, м	Дистанция на периферии, %	Дистанция в центре, %	Максимальная скорость перемещения, см/с	Количество вертикальных стоек
p 2–3	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
4. Адреналэктомия +стресс	3.03 (2.03; 3.61)	96.15 (93.86; 98.17)	3.86 (1.83; 6.14)	26.28 (19.38; 40.64)	2.5 (1.0; 4.0)
p 1–4	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
p 2–4	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
5. Тироксин +адреналэктомия +стресс	6.74 (5.99; 8.05)	78.73 (75.5; 82.57)	21.27 (17.43; 24.50)	49.33 (40.06; 65.32)	5.6 (5.0; 8.0)
p 1–5	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 4–5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$
p 2–5	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 3–5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$

Таблица 2. Влияние малых доз L-тироксина на интенсивность исследовательских реакций крыс с интактными и удаленными надпочечниками без и в условиях стресса

Группа животных	Время пребывания на периферии, %	Число входов в центр	Латентный период входа в центр, с	Параллельный индекс
1. Контроль	85.89 (78.97; 93.25)	12.5 (9.0; 18.0)	9.81 (4.85; 11.48)	–0.16 (–0.34; –0.11)
2. Стресс	88.43 (79.79; 92.21)	7.5 (5.0; 12.0)	14.55 (11.55; 19.35)	0.03 (–0.03; 0.06)
p 1–2	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
3. Тироксин+стресс	60.12 (53.58; 69.50)	15.5 (12.0; 23.0)	4.62 (1.18; 7.50)	–0.30 (–0.36; –0.14)
p 1–3	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 2–3	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
4. Адреналэктомия +стресс	95.67 (93.14; 98.16)	3.0 (1.0; 5.0)	20.17 (18.37; 25.19)	0.08 (0.02; 0.11)
p 1–4	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
p 2–4	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Окончание Таблицы 2

Группа животных	Время пребывания на периферии, %	Число входов в центр	Латентный период входа в центр, с	Параллельный индекс
5. Тироксин +адреналэктомия +стресс	80.07 (78.70; 84.47)	7.5 (6.0; 9.0)	11.76 (10.24; 14.65)	-0,20 (-0,28; -0,14)
p 1-5	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 4-5	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$
p 2-5	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$
p 3-5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$

Таблица 3. Влияние малых доз L-тироксина на уровень тревожности крыс с интактными и удаленными надпочечниками без и при стрессе

Группа животных	Время пребывания в центре, %	Общая длительность замирания, %	Длительность замирания на периферии, %	Длительность замирания в центре, %
1. Контроль	14.11 (6.75; 21.03)	43.63 (35.70; 49.29)	38.60 (34.67; 49.19)	1.86 (1.03; 8.28)
2. Стресс	11.57 (7.79; 20.21)	64.93 (61.75; 70.84)	63.81 (61.09; 67.49)	1.22 (1.00; 3.35)
p 1-2	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$
3. Тироксин+стресс	39.88 (30.50; 46.42)	58.60 (48.34; 73.43)	32.56 (27.30; 39.21)	17.96 (12.60; 29.74)
p 1-3	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 2-3	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$
4. дреналэктомия +стресс	4.34 (1.84; 6.86)	88.5 (85.22; 95.15)	86.81 (83.95; 90.27)	1.09 (0.18; 1.27)
p 1-4	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$
p 2-4	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
5.Тироксин +адреналэктомия +стресс	19.94 (15.53; 21.30)	52.87 (46.86; 60.19)	49.06 (43.18; 56.34)	3.97 (2.45; 5.29)
p 1-5	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
p 4-5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
p 2-5	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$
p 3-5	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Следовательно, примененное нами воздействие активирует тиреоидную функцию и вызывает появление классической «триады» стресса – увеличение относительной массы надпочечников, тимико-лимфатическую инволюцию и повреждение слизистой оболочки желудка, а также сдвиги уровня кортикостероидов и инсулина в крови. Горизонтальная двигательная активность, физическая выносливость и уровень тревожности животных повышаются, их вертикальная локомоторная активность и интенсивность исследовательских реакций, напротив, падают.

Адреналэктомия вызвала увеличение содержания ЙТГ в крови на 17–42%. Несмотря на это, концентрация ТТГ в крови также повысилась на 217%. Относительная масса тимуса увеличилась на 14%. Кортикостерон в крови не определялся. Сывороточный уровень инсулина уменьшился на 73%. Физическая выносливость животных снизилась на 59%, общая дистанция перемещения на 24%, максимальная скорость движения на 27%. Общая длительность замирания животных и таковая на периферии повысились на 15 и 14%.

Стресс у адреналэктомизированных крыс, в отличие от аналогичного воздействия у животных без адреналэктомии, сопровождался снижением концентрации ЙТГ в крови на 31–81% (рис. 1а–д). Концентрация ТТГ при этом также упала – на 275% (рис. 1е). В результате по отношению к значению аналогичных параметров в группе «S» концентрация ЙТГ в крови была меньше на 37–83%.

Как и в указанной группе сравнения, относительная масса тимуса падала – на 18% (рис. 2b), но относительная масса селезенки (рис. 2с) и концентрация инсулина в крови (рис. 3b) не уменьшались. Повреждение слизистой оболочки желудка было большим: отмечалось у всех животных и характеризовалось тяжестью 2 балла у 30% и 3 – у 70% крыс, индексом поражения 2.7.

Вертикальная локомоторная активность снижалась в той же степени (табл. 1). Физическая выносливость не возрастала (рис. 4), как и общая дистанция движения, которая даже падала – на 55% (табл. 1). В отличие от группы «S» изменялась структура поведения.

Исследовательская активность крыс уменьшалась, а уровень их тревожности возрастал более значительно, чем у животных группы «S» (табл. 2–3): число входов в центр «открытого поля», продолжительность замирания животных в нем, в отличие от указанной группы сравнения, в которой они не изменялись, падали на 48 и 7%. В большей степени повышались латентный период входа в центр – на 92%, общая длительность замирания и таковая на периферии – на 30 и 34%. Параллельный индекс превышал его величину в группе «A» на 0.19.

Следовательно, адреналэктомия предупреждает стимуляцию тиреоидной функции при стрессе и вместе с тем определяет более значительное повреждение СОЖ, препятствует уменьшению относительной массы селезенки и падению концентрации инсулина в крови, повышению физической выносливости и горизонтальной двигательной активности крыс, приводя к снижению последней, провоцирует более существенные возрастание уровня тревожности, падение исследовательской активности и вызывает изменение структуры поведения.

Введение L-тироксина крысам с удаленными надпочечниками предупреждает вызванные адреналэктомией активацию функции щитовидной железы и рост относительной массы тимуса, определяет более высокий уровень инсулина в крови, интенсивность горизонтальных локомоторных и исследовательских реакций, уменьшает тревожность.

Введение L-тироксина адреналэктомизированным крысам оказало защитный эффект в условиях стресса, проявляющийся в:

- 1) предупреждении снижения относительной массы тимуса,
- 2) минимизации повреждения слизистой оболочки желудка,

- 3) обеспечении более высокого содержания инсулина в крови, уровня физической выносливости, двигательной и исследовательской активности животных,
- 4) снижении их тревожности,
- 5) сохранении структуры поведения (рис. 2–4, табл. 1–3).

По сравнению с эффектом L-тироксина при стрессе у животных с неудаленными надпочечниками у адреналэктомированных крыс он был менее выраженным. Возможно, это связано с тем, что уровень ЙТГ в крови оказался ниже, чем у крыс группы «TS» (на 14–43%).

Повреждение слизистой оболочки желудка развивалось у 70% крыс с тяжестью поражения 1 балл у 10% животных, 2 балла у 20%, 3 балла у 40% и индексом поражения 1.19 (в группе «TS» частота повреждения СОЖ была меньше на 40%, индекс поражения в 9.9 раза).

По сравнению с их величиной в группе «TS» были ниже: сывороточное содержание инсулина на 29%, общее расстояние перемещения на 91%, дистанция и время нахождения в центре на 24 и 20%, число входов в него на 64%. Расстояние и продолжительность пребывания крыс на периферии поля были больше на 24 и 20%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что после удаления надпочечников повышаются концентрация ЙТГ в крови, относительная масса тимуса. Уровень инсулина в крови, физическая выносливость крыс, интенсивность горизонтальных двигательных реакций, напротив, уменьшаются. Уровень тревожности возрастает.

Увеличение содержания ЙТГ в крови после адреналэктомии может быть обусловлено активацией секреции АКТГ (в связи с отсутствием кортикостероидов), что вызывает реципрокное угнетение синтеза ТТГ [14] передней долей гипофиза, которое должно привести к снижению содержания ЙТГ. Далее, за счет срабатывания короткой петли обратной связи в системе гипоталамус – гипофиз – щитовидная железа стимулировалась секреция ТТГ аденогипофизом и синтез ЙТГ щитовидной железой. Данные изменения подтверждают нашими результатами: уровень ТТГ в крови крыс после адреналэктомии увеличивался.

Рост относительной массы тимуса может быть обусловлен обнаруженным другими авторами увеличением числа тимоцитов после адреналэктомии [15].

Снижение сывороточного уровня инсулина было обнаружено и другими авторами (наряду с падением концентрации глюкозы и уровня гликированного гемоглобина в крови), показавшими, что удаление надпочечников повышает захват глюкозы мышцами и синтез гликогена и увеличивает чувствительность гепатоцитов к инсулину [16].

Уменьшение физической выносливости и ряда показателей двигательной активности животных после адреналэктомии объясняется участием гормонов надпочечников в регуляции процессов, поддерживающих их уровень: поглощения глюкозы миоцитами за счет влияния на внутриклеточный уровень глюкозо-6-фосфата и фосфорилирования глюкозы; распада гликогена и окисления углеводов в скелетных мышцах [17]. Активация адреналином фосфорилазной стадии гликогенолиза, который далее регулируется на фосфофруктокиназной стадии с помощью фосфокреатина, а также, возможно, с помощью АМФ, ассоциирована с существенными сдвигами концентрации неорганического фосфата и внутриклеточного рН – факторов, влияющих на силу сокращения, что свидетельствует об их значении во влиянии адреналина на сократимость мышц [18]. Адреналин дифференцированно стимулирует углеводный и жировой обмен в гликолитических и окислительных мышцах: в первых увеличивает расщепление гликогена, во вторых – гидролиз липидов [19].

Для энергетического обеспечения сократительного акта также имеют значение глюкокортикоиды, которые регулируют многие аспекты гомеостаза глюкозы в скелет-

ных мышцах [20]. Эргогенный эффект глюкокортикоидов опосредован стимуляцией экспрессии фактора транскрипции Krüppel-like factor 15 (KLF15) [21].

Повышение уровня тревожности крыс после двустороннего удаления надпочечников связано с установленным другими авторами изменением активности нейросистем в этих условиях – повышением содержания норадреналина и дофамина в головном мозге крыс [22] и снижением обмена серотонина в стволе мозга, гипоталамусе и гиппокампе крыс [23]; ростом уровня мРНК $\alpha 1$ и $\gamma 2$ рецепторов ГАМК в СА3 области гиппокампа, мРНК $\alpha 2$ в зубчатой извилине гиппокампа и уменьшением содержания мРНК $\beta 2$ в зубчатой извилине и СА2 области гиппокампа крыс [24].

Далее, нами было показано, что у адреналэктомированных животных стресс развивается на фоне более низкой концентрации инсулина в крови и приводит к более значительному, чем у крыс с интактными надпочечниками, повреждению слизистой оболочки желудка, а также вызывает снижение физической выносливости, горизонтальной и вертикальной двигательной активности, интенсивности исследовательских реакций. Этому соответствует и меньший уровень ИТГ в крови животных группы «AS» по сравнению с таковым в группе «S».

Возможная причина – удаление надпочечников препятствовало реализации feedback связи в гипоталамусно-тиреоидной системе при стрессе, имевшей место у животных с интактными надпочечниками в этих условиях. Вероятно, это обусловлено уже отмеченным фактом того, что снижение уровня кортикостероидов в крови стимулирует синтез АКТГ, что, в свою очередь, угнетает синтез ТТГ. Отсутствие существенных сдвигов относительной массы лимфоидных органов и сывороточного уровня инсулина при стрессе у адреналэктомированных крыс, возможно, объясняется практически полным отсутствием глюкокортикоидов. Большее повреждение слизистой оболочки желудка у животных группы «AS», должно быть, является следствием ослабления межклеточных связей между эпителиоцитами слизистой оболочки желудка [25] и очаговых трофических нарушений в подэпителиальном слое [26], активации перекисного окисления липидов [27] у адреналэктомированных животных.

У животных с удаленными надпочечниками, которые получали L-тироксин, по сравнению с неполучавшими указанный препарат относительная масса тимуса была меньшей, как и уровень тревожности, тогда как сывороточная концентрация инсулина, двигательная и исследовательская активность, напротив, более высокими.

Указанное изменение относительной массы тимуса, возможно, связано с существенно (на 170%) более низким, чем в группе «A», уровнем ТТГ, который необходим для развития Т-клеток – показано, что у мышей с субклиническим гипотиреозом, у которых наблюдалось повышенное содержание ТТГ в крови, он подавлял апоптоз тимоцитов за счет модификации сигнальных путей с участием киназ 1 и 2, регулируемых внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases-1/2, ERK1/2) [28].

Снижение L-тироксином тревожности, показанное в нашем исследовании, согласуется с данными других авторов [29–31] и обусловлено влиянием ИТГ на концентрацию центральных тормозных медиаторов (ГАМК и глицина [2, 32], серотонина [33, 34], дофамина [35]).

Изменение уровня инсулина может быть связано с увеличением ИТГ экспрессии мРНК сиртуина 1 (улучшает секрецию и повышает чувствительность к инсулину, особенно в случаях инсулинорезистентности) и разобщающего белка 2 (способствует выработке митохондриальной АТФ и гомеостазу глюкозы), снижением экспрессии мРНК транспортера глюкозы 4-го типа (GLUT4), регулируемого инсулином [36].

Влияние ИТГ на функцию скелетных мышц определяется их участием в митохондриогенезе, активности митохондриального фермента карнитин пальмитоилтрансферазы 1В (Cpt1b), имеющего решающее значение для β -окисления длинноцепочечных жирных кислот; стимуляции экспрессии генов, участвующих в клеточных и метаболических процессах [37]; увеличением скорости метаболизма [38]; влиянием на со-

держание ацилкарнитининов и промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот [39] в мышцах. Влияние ЙТГ на сократительную функцию скелетных мышц, миогенез и биоэнергетический метаболизм зависит от присутствия их переносчиков МСТ8 и МСТ10 в плазматической мембране, экспрессии рецепторов ЙТГ ($TR\alpha$ или $TR\beta$) и доступности гормонов, которая определяется либо превращением T_4 в T_3 дейодиназой 2-го типа, либо инактивацией T_4 в реверсивный T_3 дейодиназой 3-го типа. Обе эти реакции катализируются дейодиназой 1-го типа. Скорость релаксации и сокращения скелетных мышц зависит от регуляции T_3 экспрессии миозина и энергии, образуемой при окислении субстратов в митохондриях [40].

Введение L-тироксина адреналэктомизированным крысам оказывает защитное действие при стрессе, проявляющееся в предупреждении снижения относительной массы тимуса, лимитировании повреждения слизистой оболочки желудка, обеспечении более высокой сывороточной концентрации инсулина, уровня физической выносливости, двигательной и исследовательской активности животных, уменьшении их тревожности и сохранении структуры поведения. Этому соответствует более высокое содержание ЙТГ в крови, которое, по нашему мнению, может быть связано со стимуляцией L-тироксинами синтеза тормозных медиаторов в головном мозге, которые, по данным [41], снижают концентрацию АКТГ (увеличенную вследствие отсутствия кортикостероидов в крови адреналэктомизированных крыс). Это реципрокно повышает секрецию ТТГ и, как следствие, сывороточное содержание ЙТГ.

При сопоставлении защитного эффекта L-тироксина при стрессе у крыс после и без удаления надпочечников установлено, что в первой группе он был выражен меньше, чему соответствовала и более низкая концентрация ЙТГ в крови. Это свидетельствует о том, что удаление надпочечников ограничивает, но не препятствует осуществлению протекторного действия малых доз ЙТГ при стрессе, это указывает на определяющую роль ЙТГ в его формировании.

В целом полученные нами результаты доказывают, что защитный эффект ЙТГ в условиях стресса частично опосредован гормонами, вырабатываемыми в надпочечниках, но в значительно большей мере определяется прямым действием ЙТГ – специфическим (на генетический аппарат клеток, что приводит к синтезу высокоспецифических белков, входящих в том числе в состав стресс-лимитирующих систем) и неспецифическим (на проницаемость клеточных мембран и интенсивность митохондриального дыхания), создающим субстратную базу для реализации специфических эффектов. Это открывает новый аспект понимания механизма стресс-протекторного эффекта ЙТГ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.В.Г.), сбор данных (Е.А.Г.), обработка данных (Е.А.Г.), написание и редактирование манускрипта (И.В.Г., Е.А.Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств задания темы ГПНИ Республики Беларусь на 2019–2020 гг. «Изучить возможность повышения устойчивости организма к стрессу за счет стимуляции центрального отдела антистресс-системы и снижения активности стресс-реализующей системы путем целенаправленной коррекции тиреоидного статуса (экспериментальное исследование)» (№ госрегистрации 20190176 от 14.03.2019 г.). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета, протокол № 5 от 03 января 2019 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee DY, Kim E, Choi MH (2015) Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep* 48(4): 209–216. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.4.275>
2. Городецкая ИВ, Гусакова ЕА (2021) Влияние йодсодержащих гормонов щитовидной железы на активность центрального отдела стресс-лимитирующей системы. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(3): 354–368. [Gorodetskaya IV, Gusakova EA (2021) The effect of iodine-containing thyroid hormones on the activity of the central department of the stress-limiting system. *Russ J Physiol* 108(3): 354–368. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813922030037>
3. Божко АП, Городецкая ИВ, Солодков АП (1990) Ограничение стрессорной активации перекисного окисления липидов малыми дозами тиреоидных гормонов. *Бюл экспер биол мед* 109(6): 539–541. [Bozhko AP, Gorodetskaya IV, Solodkov AP (1990) Limitation of stress activation of lipid peroxidation by small doses of thyroid hormones. *Bull Exp Biol Med* 109(6): 539–541. (In Russ)].
4. Sabatino L (2023) Nrf2-mediated antioxidant defense and thyroid hormone signaling: a focus on cardioprotective effects. *Antioxidants* 12(6): 1177. <https://doi.org/10.3390/antiox12061177>
5. Божко АП, Городецкая ИВ, Бахтина ЛЮ, Малышев ИЮ (2000) Значение тиреоидных гормонов в стресс-индуцированном синтезе белков теплового шока в миокарде. *Бюл экспер биол мед* 130(12): 617–619. [Bozhko AP, Gorodetskaya IV, Bakhtina LYu, Malyshev IYu (2000) Significance of thyroid hormones in stress-induced synthesis of heat shock proteins in the myocardium. *Bull Exp Biol Med* 130(12): 617–619. (In Russ)].
6. Городецкая ИВ, Евдокимова ОВ (2014) Влияние йодсодержащих тиреоидных гормонов на экспрессию ранних генов c-fos и c-jun в миокарде крыс при стрессе. *Вести НАН Беларуси. Сер мед наук* 2: 42–47. [Gorodetskaya IV, Evdokimova OV (2014) Effect of iodine-containing thyroid hormones on the expression of the early genes c-fos and c-jun in the myocardium of rats under stress. *Proc Natl Acad Sci Belarus. Med series* (2): 42–47. (In Russ)].
7. Gorodetskaya IV, Gusakova EA (2015) The Effects of Thyroid Status on the Proteolysis System in Stress. *Neurosci Behav Physiol* 45 (6): 693–700.
8. Bennett SN, Chang AB, Rogers FD, Jones P, Peña CJ (2023). Thyroid hormones mediate the impact of early-life stress on ventral tegmental area gene expression and behavior. *BioRxiv: the preprint server for biology*. 08.25.554785. <https://doi.org/10.1101/2023.08.25.554785>
9. Hong W, Li G, Nie Y, Zou L, Zhang X, Liu S, Li G, Xu H, Zhang CP, Liang S (2016) Potential Involvement of P2 Receptors in the Pathological Processes of Hyperthyroidism: A Pilot Study. *Ann Clin Lab Sci* 46(3): 254–259.
10. Yaamarthy V, Rani CJ, Hemamalini R, Iqbal AM (2023) Evaluation of serum cortisol levels in patients with hypothyroidism at a tertiary care hospital, Telangana, India: A Case-control Study. *J Clin Diagnostic Res* 17(3): 5–7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2023/59976.17588>
11. Гусакова ЕА, Городецкая ИВ (2019) Способ моделирования эмоционального стресса «дефицита времени». *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105(4): 520–530. [Gusakova EA, Gorodetskaya IV (2019) A method of modeling the emotional stress of «time deficiency». *Russ J Physiol* 105(4): 520–530. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0869813919040010>
12. Кабак ЯМ (ред) (1968) Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. М. Изд-во Моск универ [Kabak YaM (ed) (1968) Practicum on endocrinology. Basic methods of experimental endocrinological research. M. Moscow Univer Press. (In Russ)].
13. Миронов АН (ред) (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М. Гриф и К. [Mironov AN (ed) (2012) Guidelines for the pre-clinical studies of drugs. M. Grief and K. (In Russ)].
14. Ling C, Sun Q, Khang J, Felipa Lastarria M, Strong J, Stolze B, Yu X, Parikh TP, Waldman MA, Welsh K, Jonklaas J, Masika L, Soldin SJ (2018) Does TSH Reliably Detect Hypothyroid Patients? *Annu Thyroid Res* 4(1): 122–125. <https://doi.org/10.26420/annalsthyroidres.2018.1030>

15. *Talaber G, Tuckermann JP, Okret S* (2015) ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *FASEB J* 6: 2526–2534.
<https://doi.org/10.1096/fj.14-268508>
16. *Haluzik M, Dietz KR, Kim JK, Marcus-Samuels B, Shulman GI, Gavrilova O, Reitman ML* (2002) Adrenalectomy improves diabetes in A-ZIP/F-1 lipotrophic mice by increasing both liver and muscle insulin sensitivity. *Diabetes* 51(7): 2113–2118.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2113>
17. *Watt M, Howlett K, Febbraio M, Spriet L, Hargreaves M* (2001) Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J Physiol (London)* 534(1): 269–278.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00269.x>
18. *Kikuchi K, Yamad T, Sugi H* (2009) Effects of adrenaline on glycogenolysis in resting anaerobic frog muscles studied by ³¹P-NMR. *J Physiol Sci* 59: 439.
<https://doi.org/10.1007/s12576-009-0054-6>
19. *Peters SJ, Dyck DJ, Bonen A, Spriet LL* (1998) Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle. *Am J Physiol* 275(2): 300–309.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.275.2.E300>
20. *Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC* (2015) Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol* 872: 99–126.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5
21. *Morrison-Nozik A, Anand P, Zhu H, Duan Q, Sabeh M, Prosdocimo DA, Lemieux ME, Nordsborg N, Russell AP, MacRae CA, Gerber AN, Jain MK, Halder SM* (2015) Glucocorticoids enhance muscle endurance and ameliorate duchenne muscular dystrophy through a defined metabolic program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(49): 6780–6789.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1512968112>
22. *Orchinik M, Weiland N, McEwen B* (1994) Adrenalectomy selectively regulates GABAA receptor subunit expression in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 5(5): 451–458.
<https://doi.org/10.1006/mcne.1994.1055>
23. *Van Loon G, Shum A, Sole M* (1981) Decreased brain serotonin turnover after short term (two-hour) adrenalectomy in rats: a comparison of four turnover methods. *Endocrinology* 108(4): 1392–1402.
<https://doi.org/10.1210/endo-108-4-1392>
24. *Santibacez M, Gysling K, Forray M* (2005) Adrenalectomy decreases corticotropin-releasing hormone gene expression and increases noradrenaline and dopamine extracellular levels in the rat lateral bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci Res* 81(1): 140–152.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20538>
25. *Волков ВЕ, Волков СВ* (2005) Эрозивно-язвенные поражения желудочно-кишечного тракта в раннем послеоперационном периоде. *Вестн Чуваш универ* 2: 50–56. [*Volkov VE, Volkov SV* (2005) Erosive and ulcerative lesions of the gastrointestinal tract in the acute postoperative period. *Vest Chuvash univ* 2: 50–56. (In Russ)].
26. *Yusuf S, Adelaiye AB, Nok AJ, Ameh DA, Balogun EO* (2008) Effect of acute bilateral adrenalectomy and reserpine on gastric mucus secretion and mucosal injury in pyloric ligated rats. *Afr J Biotechnol* 7(17): 3143–3148.
27. *Hamadi N, Sheikh A, Madjid N, Lubbad L, Amir N, Shehab SA, Khelifi-Touhami F, Adem A* (2016) Increased pro-inflammatory cytokines, glial activation and oxidative stress in the hippocampus after short-term bilateral adrenalectomy. *BMC Neurosci* 17(1): 61.
<https://doi.org/10.1186/s12868-016-0296-1>
28. *Wu K, Zhao M, Ma C, Zhang H, Liu X, Zhou L, Zhao J, Gao L, Wang D* (2017) Thyrotropin alters t cell development in the thymus in subclinical hypothyroidism mouse model. *Scand J Immunol* 85(1): 35–42.
<https://doi.org/10.1111/sji.12507>. PMID: 27864993
29. *Kikuchi M, Komuro R, Oka H, Kidani T, Hanaoka A, Koshino Y* (2005) Relationship between anxiety and thyroid function in patients with panic disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(1): 77–81.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.10.008>
30. *Badihian S, Jalalpour P, Mirdamadi M, Moslehi M* (2016) Quality of life, anxiety and depression in patients with differentiated thyroid cancer under short term hypothyroidism induced by levothyroxine withdrawal. *Klin Onkol* 29(6): 439–444.
31. *Romero-Gómez B, Guerrero-Alonso P, Carmona-Torres JM, Notario-Pacheco B, Cobo-Cuenca AI* (2019) Mood disorders in levothyroxine-treated hypothyroid women. *Int J Environ Res Public Health* 16(23): 4776.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16234776>

32. Демченко ОМ (2014) Психоемоційний статус щурів за умов дисфункції щитовидної залози. Теорет мед 19(1): 10–15. [Demchenko OM (ed) (2014) Psycho-emotional status of rats with thyroid dysfunction. Theoret Med 19(1): 10–15. (In Ukr)].
33. Jawad A (2018) The consequences of terrorist and military operations in three regions of Baghdad, Iraq on serotonin and thyroid function. J Al-Nahrain University Sci 21: 32–36.
<https://doi.org/10.22401/JNUS.21.2.05>
34. Ito JM, Valcana T, Timiras PS (1977) Effect of hypo- and hyperthyroidism on regional monoamine metabolism in the adult rat brain. Neuroendocrinology 24(7): 55–64.
<https://doi.org/10.1159/000122696>
35. Lee EH, Kim SM, Kim CH, Pagire SH, Pagire HS, Chung HY, Ahn JH, Park CH (2019) Dopamine neuron induction and the neuroprotective effects of thyroid hormone derivatives. Sci Rep 9: 13659.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49876-6>
36. Vazquez-Anaya G, Martinez B, Soñanez-Organis JG, Nakano D, Nishiyama A, Ortiz RM (2017) Exogenous thyroxine improves glucose intolerance in insulin-resistant rats. J Endocrinol 232(3): 501–511.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0428>
37. Ucci S, Renzini A, Russi V, Mangialardo C, Cammarata I, Cavioli G, Santaguida MG, Virili C, Centanni M, Adamo S, Moresi V, Verga-Falzacappa C (2019) Thyroid hormone protects from fasting-induced skeletal muscle atrophy by promoting metabolic adaptation. Int J Mol Sci 20(22): 5754.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225754>
38. Nicolaisen TS, Klein AB, Dmytriyeva O, Lund J, Ingerslev LR, Fritzen AM, Carl CS, Lunds-gaard AM, Frost M, Ma T, Schjerling P, Gerhart-Hines Z, Flamant F, Gauthier K, Larsen S, Richter EA, Kiens B, Clemmensen C (2020) Thyroid hormone receptor α in skeletal muscle is essential for T3-mediated increase in energy expenditure. FASEB J 34(11): 15480–15491.
<https://doi.org/10.1096/fj.202001258RR>
39. Zhou J, Gauthier K, Ho JP, Lim A, Zhu XG, Han CR, Sinha RA, Cheng SY, Yen PM (2021) Thyroid hormone receptor α regulates autophagy, mitochondrial biogenesis, and fatty acid use in skeletal muscle. Endocrinology 162(8): 112.
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqab112>
40. Bloise FF, Cordeiro A, Ortega-Carvalho TM (2018) Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. J Endocrinol 236(1): 57–68.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0611>
41. Mei H, Yang C, Xie Q, Yang Y, Luo X, Jiao H, Gan L (2019) Effects of γ -aminobutyric acid on aggressive behaviour, jejunum villus morphology, serum biochemical indicators and hippocampal neuropeptide mRNA levels in piglets at weaning with mixing. Czech J Anim Sci 64: 151–159.
<https://doi.org/10.17221/33/2018-CJAS>

The Importance of Adrenal Hormones in the Implementation Stress-Protective Effect of Small Doses of L-thyroxine

E.A. Gusakova^{a, *}, and I. V. Gorodetskaya^a

^a*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus*

^{*}*e-mail: elena-gusakova83@mail.ru*

Previously, the possibility of increasing the body's resistance to stress with small doses of L-thyroxine was shown. It has not been established whether this effect is related to the action of L-thyroxine itself or is mediated by its activation/potentialization of the effects of other hormones. The aim of the work is to study the role of adrenal hormones in the realization of the protective effect of low doses of L-thyroxine under stress. The work was performed on white mongrel male rats. Stress was modeled by a «time deficit» situation. L-thyroxine was administered in small, close to physiological doses according to the following scheme: the first week – 1.5 µg/kg, the second week – 2.0 µg/kg, the third week – 2.5 µg/kg, the fourth week – 3.0 µg/kg. It was found that stress exposure increases the concentration of iodine-containing thyroid hormones (ITH) in the blood by 23–44%, corticosteroids by 40%, the relative mass (RM) of the adrenal glands by 31%; reduces the RM of the thymus and spleen by 26 and 14%, the level of insulin by 46%; causes damage to the gastric mucosa (GM) with the damage index (DI) is 1.36; increases physical endurance, motor activity and anxiety of animals, reducing the intensity of research reactions. Bilateral adrenalectomy (BA) prevents the activation of thyroid function and eliminates the growth of physical endurance, changes the structure of behavior, determines more significant damage to the GM (DI is 2.7), increased anxiety, inhibition of research behavior under stress. BA limits the protective effect of L-thyroxine under stress, which is manifested by lower values of horizontal motor and research activity, higher anxiety in rats and damage to GM (after administration of L-thyroxine DI under stress without BA is 0.12; against BA is 1.19). This corresponds to a lower concentration of ITH in the blood (by 14–43%). Consequently, small doses of L-thyroxine have a stress-protective effect. BA limits, but does not completely prevent its implementation. This indicates that adrenal hormones play an important but not decisive role in the formation of the anti-stress effect of L-thyroxine.

Keywords: iodine-containing thyroid hormones, stress, adrenalectomy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗООСМОТИЧЕСКАЯ СТРИКЦИЯ СОСУДИСТЫХ
ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ ПРИ АКТИВАЦИИ
ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ: РОЛЬ ХЛОРНОГО ТРАНСПОРТА**

© 2024 г. Л. В. Смаглий^{1, 2, 3, *}, В. С. Гусакова¹, С. В. Гусакова¹, М. А. Пшемьский¹,
С. О. Кошуба¹, Е. А. Голованов¹

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

²Томский государственный университет, Томск, Россия

³НИИ Северский биофизический научный центр, Северск, Россия

*E-mail: lud.smagly@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 09.09.2024 г.

Принята к публикации 24.09.2024 г.

Исследовали влияние пуринаргической сигнальной системы и вклад транспортеров Cl^- в изоосмотическую стрикцию сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК), возникающую при нормализации осмотического давления после длительной инкубации в гипоосмотической среде. Исследование проводили методом механографии на дезнотелизированных кольцевых сегментах аорты крыс-самцов линии Wistar. Изоосмотическую стрикцию вызывали помещением сосудистых сегментов в нормоосмотический раствор Кребса, содержащий 120 мМ NaCl после 40-минутной инкубации в гипоосмотическом растворе Кребса, содержащем 40 мМ NaCl. Пуринаргические рецепторы активировали неселективным агонистом P_2X и P_2Y рецепторов аденозин-5'-трифосфатом (АТФ, 500 мкМ) и селективным агонистом P_2Y рецепторов уридин-5'-трифосфатом (УТФ, 500 мкМ). АТФ и УТФ устраняли транзиторный характер изоосмотической стрикции ГМК аорты, не влияя на ее величину. Предобработка сегментов АТФ и УТФ во время инкубации в гипоосмотическом растворе полностью подавляла развитие изоосмотической стрикции в присутствии АТФ или УТФ, но не влияла на изоосмотическую стрикцию без активаторов пуринаргических рецепторов. Ингибитор Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорта (NKCC) буметанид (100 мкМ) устранял изоосмотическую стрикцию в присутствии АТФ, но не УТФ, однако восстанавливал ее транзиторный характер. Неселективный блокатор Cl^- -каналов и Cl^- , HCO_3^- -обменника DIDS (100 мкМ) подавлял развитие изоосмотической стрикции как в присутствии АТФ, так и УТФ. Блокатор калиевых каналов тетраэтиламмоний (10 мМ) потенцировал констрикторное действие УТФ на изоосмотическую стрикцию. Вероятно, пуринаргические рецепторы устраняют транзиторность изоосмотической стрикции за счет активации Cl^- -токов через активацию P_2Y рецепторов. Механизм взаимодействия пуринаргической сигнальной системы и транспорта Cl^- при изменении объема клетки требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: изоосмотическая стрикция, гладкомышечная клетка, АТФ, пуринаргические рецепторы, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт, Cl^- -каналы

ВВЕДЕНИЕ

Объем клеток является одним из ключевых параметров, влияющих на внутриклеточный гомеостаз, и подлежит строгому контролю. К изменению объема клеток приводит увеличение или уменьшение осмолярности внеклеточной или внутриклеточной среды, приводящее к сжатию или набуханию клеток соответственно [1]. Последнее наблюдается при таких патологических состояниях, как гипертензия [2], нарушения водно-солевого баланса (гипо- или гипернатриемия) [1]. Набухание и пролиферация гладкомышечных клеток (ГМК) легочной артерии в модели артериальной легочной гипертензии были продемонстрированы в работе Sun с соавт. [2], увеличение объема ГМК базиллярных артерий было продемонстрировано Shi с соавт. в модели почечной гипертензии [3]. Показано, что набухание ГМК активирует механизмы регуляторного снижения объема (regulatory volume decrease, RVD), которое сопровождается транзиторной сократительной реакцией – гипоосмотической стрикцией [4, 5]. В основе RVD лежит активация K^+ -каналов [5], Cl^- каналов [6, 7], K^+ , Cl^- -котранспорта [8], объем-регулируемых анионных каналов [9]. Инкубация ГМК в гипотонической среде приводит к снижению внутриклеточной концентрации Cl^- [3]. Продemonстрировано, что блокирование Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспорта (NKCC) подавляет гипоосмотическую стрикцию ГМК аорты крысы. С другой стороны, восстановление нормальной осмолярности после длительного воздействия гипоосмотической среды приводит к сжатию клеток [5], сопровождающемуся активацией механизмов регуляторного увеличения объема (regulatory volume increase, RVI), включающего активацию NKCC [10], H^+ , Na^+ -обменника и Cl^- , HCO_3^- -обменника [6]. В сосудистых ГМК регуляторное увеличение объема клеток сопровождается транзиторным сокращением – изоосмотической стрикцией клеток, амплитуда которой увеличивается при ингибировании NKCC [4].

Учитывая, что как снижение осмолярности инкубационной среды, так и восстановление ее нормальных значений приводят к повышению тонуса сосудистых ГМК, представляется важным исследование факторов, влияющих на величину и длительность описанных сократительных реакций. Одним из таких факторов является пуриnergическая сигнальная система, опосредуемая внеклеточным аденозин-5'-трифосфатом (АТФ). АТФ выделяется из эритроцитов [11], ГМК [12], эндотелиальных клеток [13], симпатических нервных окончаний [14] под действием таких факторов, как механическая деформация эритроцитов [15], снижение pH крови [16] и увеличение парциального давления CO_2 [11], турбулентный ток крови [17], умеренное повышение температуры [18]. АТФ активирует рецепторы групп P_2X и P_2Y на мембранах ГМК и эндотелиальных клеток [19]. Ранее на кольцевых сегментах легочной артерии крысы было показано, что неселективный активатор P_2X - и P_2Y -рецепторов АТФ устраняет транзиторный характер гипоосмотической стрикции, но подавляет развитие изоосмотической стрикции. Блокирование Cl^- -каналов, но не NKCC способствовало ее восстановлению [20].

Известно, что экспрессия подтипов P_2X - и P_2Y -рецепторов и физиологические эффекты их активации варьируют в зависимости от типа сосудистого ложа [19]. Так, ГМК аорты крысы экспрессируют рецепторы P_2X_1 и $P_2Y_{2,4,6}$, тогда как ГМК легочной артерии – P_2X_1 и $P_2Y_{2,4,6}$ [21]. Чтобы выявить возможные отличия в реакции ГМК сосудов большого и малого кругов кровообращения на изменение осмолярности среды и концентрации внеклеточного АТФ, мы исследовали влияние активаторов пуриnergических рецепторов на сосуды системного кровотока, выбрав в качестве модели аорту крысы, которая широко используется как в исследовании сигнальных механизмов регуляции ГМК, так и тестировании фармакологических соединений [22].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на изолированных кольцевых деэндоотелизированных сегментах грудного отдела аорты крыс – самцов линии Wistar массой 180–250 г, которых содержали в специализированном виварии с соблюдением всех установленных норм. Аорту выделяли после умерщвления животных методом ингаляции CO_2 . Выделенные сосуды помещали в физиологически сбалансированный солевой раствор Кребса, содержащий (мМ) 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 5.5 глюкозы, 15 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ [tris(hydroxymethyl)-aminomethane] (pH 7.4; 316.4 мОсм/л). Осмолярность растворов контролировали криоскопическим методом с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1 согласно стандартной методике измерения температуры замерзания раствора.

После удаления жировой и соединительной ткани сосуд нарезали на сегменты шириной 2–3 мм, эндотелий удаляли механически вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин. Отпрепарированные сегменты использовали немедленно. Удаление эндотелия контролировали по отсутствию реакции расслабления в ответ на добавление ацетилхолина (5–100 мкМ). Неиспользованную часть аорты сохраняли в холодильнике при 4 °C и использовали в течение двух дней с момента выделения сосуда. В предварительных экспериментах было показано, что 24-часовое хранение артерии при 4 °C не влияет на сократительные свойства гладких мышц.

Механическое напряжение (МН) сосудистых гладкомышечных сегментов (СГМС) измеряли с помощью четырехканальной механографической установки Myobath II и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (World Precision Instruments, Германия). Для этого СГМС фиксировали в рабочей камере объемом 10 мл, заполненной физиологическим раствором Кребса, растягивали нагрузкой 500 мг и термостатировали при 37 °C в течение 40–50 мин. Далее вызывали два последовательных сократительных ответа помещением СГМС в гиперкалиевый раствор (30 мМ KCl), который получали путем эквивалентного замещения 30 мМ NaCl на KCl в растворе Кребса. Амплитуда сократительного ответа на действие 30 мМ KCl соответствует полумаксимальной. Ранее было показано, что начиная со второго сокращения, наблюдаемого при помещении кольцевого препарата в раствор, содержащий 30 мМ KCl, СГМС сокращаются со стабильной амплитудой.

Для получения изоосмотической стрикции сегменты инкубировали в течение 60 мин в гипоосмотическом растворе Кребса, содержащем 40 мМ NaCl, и затем возвращали в нормальный раствор Кребса (120 мМ NaCl). Для активации пуринаргических рецепторов использовали неселективный активатор P_2X - и P_2Y -рецепторов АТФ и селективный активатор P_2Y -рецепторов (P_2Y_2 , P_2Y_4) уридин-5'-трифосфат (УТФ) [23, 24].

Влияние активаторов пуринаргических рецепторов на развитие изоосмотической стрикции оценивали тремя путями:

- 1) Инкубирование сегментов аорты в гипоосмотическом растворе Кребса (60 мин) и последующее их помещение в изоосмотический раствор Кребса, содержащий 500 мкМ АТФ или УТФ (рис. 1а).
- 2) Инкубирование сегментов аорты в гипоосмотическом растворе Кребса (60 мин), содержащем 500 мкМ АТФ или УТФ, и последующее их помещение в изоосмотический раствор Кребса, содержащий 500 мкМ АТФ или УТФ (рис. 1б).
- 3) Инкубирование сегментов аорты в гипоосмотическом растворе Кребса (60 мин), содержащем 500 мкМ АТФ или УТФ, и последующее их помещение в изоосмотический раствор Кребса, не содержащий активаторов пуринаргических рецепторов (рис. 1с).

Для исследования вклада транспорта Cl^- использовали ингибитор НКСС буметанид, неселективный блокатор Cl^- -каналов [25, 26] и HCO_3^- , Cl^- -обменника [27] DIDS (4,4-diisothiocyanostilbene-2,2-disulphonic acid). Для исследования вклада K^+ -каналов использовали неселективный блокатор K^+ -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА). Указанные соединения добавляли к СГМС перед заменой гипоосмотического раствора на

изоосмотический и инкубировали в течение времени, определенного в предварительных экспериментах и показавшего близкий к полумаксимальному эффект воздействия. Время предобработки буметанидом (100 мкМ), DIDS (100 мкМ) и ТЭА (10 мМ) составляло 15, 30 и 10 мин соответственно. Все реактивы произведены Sigma-Aldrich. Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (30 мМ KCl), которую принимали за 100%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 7.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде: медиана $\pm$ интерквартильный размах (Q_1 ; Q_3). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова – Смирнова. Сформированные выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для проверки статистических гипотез были использованы непараметрические критерии. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался U-критерий Манна – Уитни (Mann–Whitney U test). Достоверными считали различия при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние активаторов пуринергических рецепторов на изоосмотическую стрикцию

Помещение СГМС в нормальный раствор Кребса (120 мМ NaCl) после 60-минутной инкубации в гипоосмотической среде (40 мМ NaCl) приводило к развитию транзиторного сокращения амплитудой 21.6 (15.5; 27.7)% от контрольной гиперкалиевой контрактуры и длительностью 38.8 (37.2; 40.4) мин ($n = 10$).

В первой серии экспериментов, описанной в разделе «Методы исследования», оценивали влияние АТФ или УТФ на изоосмотическую стрикцию, полученную после инкубации в чистом гипоосмотическом растворе, не содержащем активаторы пуринергических рецепторов. В данной модели добавление как АТФ (500 мкМ), так и УТФ (500 мкМ) (рис. 1а) не оказывало статистически значимого влияния на амплитуду изоосмотической стрикции (МН составило 18.7 (15.2; 22.6)% и 19.5 (15.3; 24.2)% соответственно ($n = 4$, $p > 0.05$)). Однако в присутствии как АТФ, так и УТФ сегменты не расслаблялись: изоосмотическая стрикция приобретала поддерживаемый характер (рис. 1а).

Во второй серии экспериментов активаторы пуринергических рецепторов добавляли не только на фоне развития изоосмотической стрикции, но и к гипоосмотическому раствору, чтобы оценить влияние их длительного воздействия. В условиях предварительной инкубации сегментов в гипоосмотическом растворе, содержащем АТФ (500 мкМ) или УТФ (500 мкМ), добавление как АТФ (500 мкМ), так и УТФ (500 мкМ) (рис. 1б) к нормальному раствору Кребса, используемому для получения изоосмотической стрикции, полностью подавляло развитие последней ($n = 4$, $p < 0.05$).

В то же время отмывание СГМС чистым раствором Кребса после инкубации в гипоосмотическом растворе с АТФ приводило к развитию изоосмотической стрикции, параметры которой не отличались от контрольных значений: амплитуда сокращения составила 23.7 (6.9; 41.6)%, длительность 32.0 (22.0; 42.3) мин ($n = 4$, $p > 0.05$) (рис. 1с). В случае, если гипоосмотический раствор содержал УТФ (500 мкМ), амплитуда и длительность изоосмотической стрикции также не отличались от контрольных значений (24.3 (16.9; 31.0)% и 41.0 (40.5; 41.5) мин ($n = 4$, $p > 0.05$) (рис. 1с)).

Роль ионных транспортеров в действии активаторов пуринергических рецепторов на изоосмотическую стрикцию

Далее, чтобы изучить влияние активаторов пуринергических рецепторов непосредственно на изоосмотическую стрикцию, сегменты аорты инкубировали согласно первой схеме (рис. 1а). Для исследования вклада транспортеров ионов хлора и калия

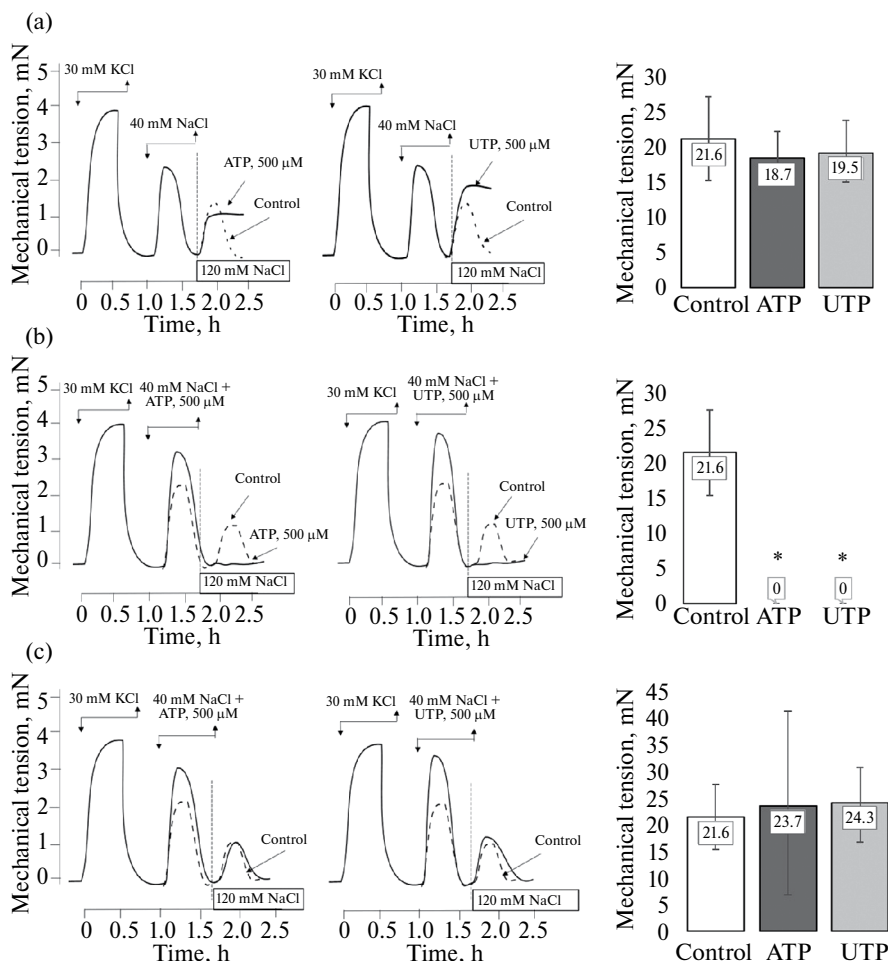


Рис. 1. Влияние активаторов пуринергических рецепторов на развитие изоосмотической стрикции гладкомышечных сегментов аорты крысы в сериях экспериментов, описанных в разделе «Методы исследования» (подробное описание результатов в тексте). (а) – влияние АТФ (500 мкМ) и УТФ (500 мкМ) на изоосмотическую стрикцию, полученную по первой схеме экспериментов. (б) – влияние АТФ (500 мкМ) и УТФ (500 мкМ) на изоосмотическую стрикцию, полученную по второй схеме экспериментов. (с) – влияние АТФ (500 мкМ) и УТФ (500 мкМ) на изоосмотическую стрикцию, полученную по третьей схеме экспериментов. По оси абсцисс – время (часы), по оси ординат – механическое напряжение (мН). Стрелками показано добавление и удаление растворов. Пунктирной линией показано изменение механического напряжения сегмента в контроле, сплошной – при добавлении АТФ или УТФ. На диаграммах представлены медиана и интерквартильный размах амплитуды изоосмотической стрикции в соответствующих сериях экспериментов. * – статистически значимые отличия от контрольных значений ($p < 0.05$).

сегменты перед заменой гипоосмотического раствора на изоосмотический инкубировали с соответствующими блокаторами в течение времени, определенного в предварительных экспериментах и показавшего полумаксимальный эффект воздействия (время предобработки блокаторами указано далее в тексте).

Сравнение влияния буметанида, DIDS и ТЭА на параметры изоосмотической стрикции представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние блокаторов ионных транспортеров на параметры изоосмотической стрикции

Блокаторы	Без блокаторов	Буметанид (100 мкМ)	DIDS (100 мкМ)	ТЭА (10 мМ)
МН, %	21.6 (15.5; 27.7)	39.5 (24.0; 54.2)*	14.0 (13.2; 15.4)*	70.7 (54.6; 79.3)*
t, мин	38.8 (37.2; 40.4)	143.8 (134.4; 152.4)*	28.1 (23.2; 35.4)*	Не расслаблялись

МН – механическое напряжение, t – длительность стрикции, * – достоверные отличия от значений, полученных в отсутствие блокаторов ($p < 0.05$).

Аналогичные данные, но в условиях добавления АТФ и УТФ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние блокаторов ионных транспортеров на параметры изоосмотической стрикции в присутствии АТФ или УТФ

	Без блокаторов	Буметанид (100 мкМ)	DIDS (100 мкМ)	ТЭА (10 мМ)
120 мМ NaCl + 500 мкМ АТФ				
МН, %	18.7 (15.2; 22.6)	0*	0*	55.9 (35.8; 94.8)*
t, мин	Не расслаблялись	0*	0*	Не расслаблялись
120 мМ NaCl + 500 мкМ УТФ				
МН, %	19.5 (15.3; 24.2)	23.3 (15.2; 33.6)	0*	97.1 (93.9; 120.4)*
t, мин	Не расслаблялись	31.5 (27.8; 34.0)*	0*	Не расслаблялись

МН – механическое напряжение, t – длительность стрикции, * – достоверные отличия от значений, полученных в отсутствие блокаторов ($p < 0.05$).

Предобработка буметанидом (100 мкМ, 15 мин) устраняла развитие изоосмотической стрикции в присутствии АТФ (500 мкМ) ($n = 7$, $p < 0.05$) (рис. 2а). В то же время буметанид (100 мкМ, предобработка 15 мин) не оказывал влияния на амплитуду изоосмотической стрикции в присутствии 500 мкМ УТФ (23.3 (15.2; 33.6)%, $p < 0.05$, $n = 4$) и возвращал ей транзиторный характер, однако несколько уменьшал длительность стрикции ($t = 31.5$ (27.8; 34.0) мин, $p < 0.05$) относительно контрольных значений (38.8 (37.2; 40.4) мин (рис. 2б)).

Ингибитор Cl⁻-каналов и Cl⁻/HCO₃⁻-обменника DIDS (100 мкМ, предобработка 30 мин) также устранял развитие изоосмотической стрикции в присутствии как АТФ, так и УТФ, которая в этом случае полностью отсутствовала (рис. 2а, б).

Неселективный блокатор калиевых каналов ТЭА (10 мМ, предобработка 10 мин) достоверно увеличивал амплитуду изоосмотической стрикции до 70.7 (54.6; 79.3)% ($n = 4$, $p < 0.05$), СГМС при этом не расслаблялись (табл. 1). Добавление 500 мкМ АТФ к сегментам, предобработанным ТЭА, не приводило к статистически значимому изменению параметров изоосмотической стрикции по сравнению с изоосмотической стрикцией в присутствии только ТЭА (МН составило 55.9 (35.8; 94.8)% ($n = 4$, $p > 0.05$)), СГМС при этом не расслаблялись (табл. 2). При тех же условиях амплитуда изоосмотической стрикции в присутствии 500 мкМ УТФ и на фоне блокирования калиевых каналов достоверно увеличивалась в сравнении со стрикцией в присутствии только ТЭА и составила 97.1 (93.9; 120.4)% ($n = 4$, $p < 0.05$), сегменты также не расслаблялись (табл. 2). В обоих случаях время достижения пика изоосмотической стрикции возрастало до ~ 60 мин (рис. 3).

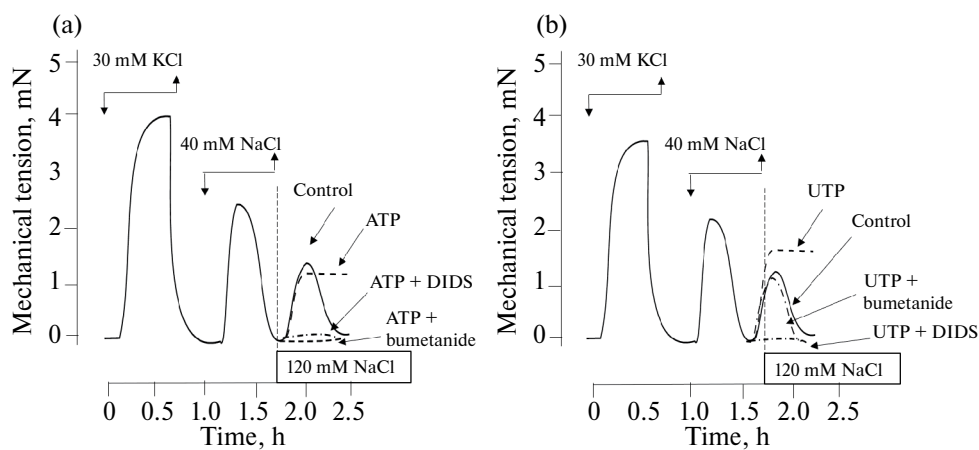


Рис. 2. Влияние ингибитора NKCC буметанида (100 мкМ, предобработка 15 мин) и ингибитора Cl^- -каналов и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника DIDS (100 мкМ, предобработка 30 мин) на развитие изоосмотической стрикции гладкомышечных сегментов аорты крысы в присутствии 500 мкМ АТФ (а) или 500 мкМ УТФ (б). Буметанид и DIDS добавляли за 15 или 30 мин соответственно до индукции изоосмотической стрикции. По оси абсцисс – время (ч), по оси ординат – механическое напряжение (мН). Стрелками показано добавление и удаление растворов.

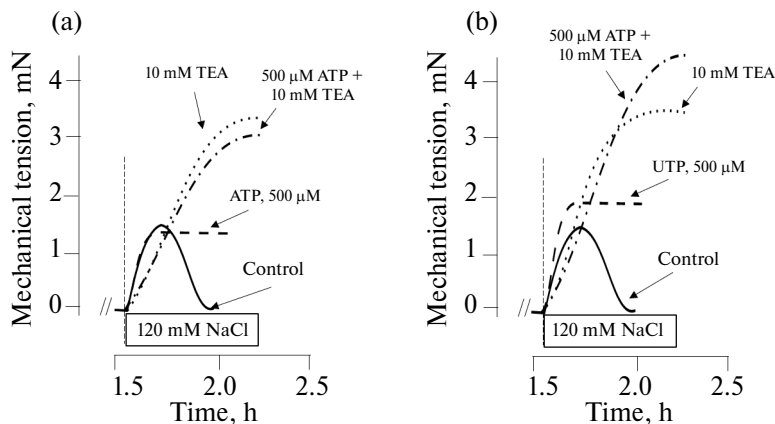


Рис. 3. Влияние ТЭА (10 мМ, предобработка 10 мин) на амплитуду и длительность изоосмотической стрикции аорты в присутствии АТФ (а) или УТФ (б). Сплошной линией показана контрольная изоосмотическая стрикция в отсутствие добавок, точками – изоосмотическая стрикция в присутствии ТЭА, пунктирными линиями – изоосмотическая стрикция в присутствии АТФ или УТФ, пунктирной линией с точкой – то же, но при действии ТЭА. ТЭА добавляли за 10 мин до индукции изоосмотической стрикции. По оси ординат – механическое напряжение (мН), по оси абсцисс – время (ч).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменение осмолярности среды при некоторых патологических состояниях может приводить к набуханию клеток. Набухание клеток при артериальной гипертензии было показано в моделях легочной и почечной артериальной гипертензии [2, 3]. В то же время восстановление осмолярности среды сопровождается сжатием клеток и транзиторной стрикцией кровеносных сосудов (изоосмотической стрикцией) [4, 6]. Однако повышение концентрации внеклеточных пуриновых нуклеотидов, в частности АТФ, препятствует расслаблению СГМС и приводит к длительному увеличению базального тонуса. Повышение концентрации АТФ в кровеносном русле наблюдается при гипоксии [28, 41] – состоянии, которое сопровождает ряд заболеваний, включая бронхолегочные заболевания, артериальную легочную гипертензию [30]. Взаимодействие АТФ с эндотелиальными рецепторами приводит к высвобождению NO и релаксации сосудов [29], однако дисфункция эндотелия, сопровождающая сердечно-сосудистые заболевания, может нарушать этот механизм. Ранее нами было продемонстрировано, что АТФ пролонгирует констрикцию сегментов легочной артерии в гипоосмотической среде, но подавляет изоосмотическую стрикцию. Этот эффект частично устранялся действием блокаторов Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов, но не буметанидом [20].

Изучение изоосмотической стрикции сегментов аорты как сосудов большого круга кровообращения показало реакцию на активаторы пуринергических рецепторов, отличную от легочной артерии. Так, в присутствии как АТФ, так и УТФ изоосмотическая стрикция приобретала поддерживаемый характер. Действие АТФ и УТФ на изоосмотическую стрикцию зависит от условий добавления этих веществ к СГМС. Так, в случае предобработки активаторами пуринергических рецепторов сегментов, инкубируемых в гипоосмотическом растворе, и последующей индукции изоосмотической стрикции раствором Кребса, не содержащем этих веществ, параметры изоосмотической стрикции достоверно не отличались от таковых, полученных в контрольных условиях. Следовательно, влияние активаторов P_2X - и P_2Y -рецепторов проявляется только в момент их непосредственного действия и носит временный характер.

С другой стороны, известно, что АТФ быстро разрушается эктонуклеотидазами мембраны клеток до аденозина [31]. Показано, что в культуральных СГМК (*in vitro*) аорты крысы экспрессируются следующие эктонуклеотидазы (в порядке убывания): *Entpd1*, *Entpd2*, *Nt5e* и *Entpd3* [32]. Образовавшийся аденозин далее взаимодействует с аденозиновыми рецепторами группы А: P_1A_1 , $\text{P}_1\text{A}_{2\alpha}$ и $\text{P}_1\text{A}_{2\beta}$, транспортируется в клетку или дезаминируется до инозина [33]. Эти данные позволяют предположить, что наблюдаемые нами сосудистые эффекты при добавлении АТФ и УТФ могут быть связаны не только с активацией P_2X - и P_2Y -рецепторов, но и рецепторов аденозина. С другой стороны, в работе Bertoni с соавт. на культуральных ГМК аорты крысы, инкубируемых с АТФ, продемонстрировано достаточно медленное расщепление АТФ, сопровождающееся медленным ростом продукции АДФ, АМФ и аденозина: через 180 мин инкубации концентрация АТФ составляла 50% от исходной [41]. Возможная причина низкой продукции аденозина из АТФ, по мнению авторов, заключается в ингибировании гидролиза АМФ вследствие того, что АТФ и АДФ являются мощными ингибиторами экто-5'-нуклеотидазы [32]. Тем не менее возможная модуляция изоосмотической стрикции аденозином как продуктом гидролиза АТФ эктонуклеотидазами требует дальнейших исследований.

Эксперименты с блокаторами транспорта Cl^- показали, что и DIDS – неселективный блокатор Cl^- -каналов и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника, и ингибитор NKCC буметанид полностью подавляли развитие изоосмотической стрикции в присутствии АТФ. В то же время ингибитор NKCC буметанид в отсутствие АТФ увеличивал амплитуду изоосмотической стрикции кольцевых сегментов аорты крысы. На данный момент невозможно

однозначно объяснить наблюдаемые изменения, особенно учитывая отличия в реакции изоосмотической стрикции на активацию пуринаргических рецепторов в аорте и легочной артерии.

Известно, что изоосмотическая стрикция сопровождается активацией НКСС, следствием чего является увеличение внутриклеточной концентрации ионов, транспорт в клетку воды и восстановление ее объема. С другой стороны, наблюдается значительное снижение $[Cl^-]_i$ [6]. Особенностью сосудистых ГМК является относительно высокая $[Cl^-]_i$, превышающая теоретически ожидаемые значения, определяемые равновесием Доннана [42], и варьирующая в диапазоне 30–50 мМ [43]. Установлено, что потенциал покоя мембраны сосудистых ГМК колеблется от –60 до –40 мВ, тогда как равновесный потенциал Cl^- составляет от –30 до –20 мВ. В данных условиях активация Cl^- -каналов приводит к выходу Cl^- из клетки и деполяризации мембраны [43], что было подтверждено ранее рядом исследований [43–46]. Можно предположить, что в основе уменьшения $[Cl^-]_i$ при изоосмотической стрикции лежит схожий механизм, заключающийся в обусловленном НКСС изначальном увеличении $[Cl^-]_i$, сдвиге равновесного потенциала Cl^- в сторону положительных значений и, как следствие, выходе Cl^- через Cl^- -каналы [34]. С другой стороны, снижение $[Cl^-]_i$ активирует серин-треониновые киназы WNK (в частности, WNK_3) [34, 35], которые, в свою очередь, фосфорилируют НКСС₁ по серину и треонину, увеличивая ее активность [6].

Активаторы пуринаргических рецепторов повышают вход в клетку Ca^{2+} , который напрямую активирует актомиозиновые взаимодействия, ряд ферментативных внутриклеточных систем, ионные транспортеры, включая Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, Cl^- -каналы и $Cl^-HCO_3^-$ -обменник [31], НКСС [6]. Каждый из этих регуляторных элементов может вносить свой вклад в формирование ответа и требует отдельного изучения. Одним из механизмов пролонгации изоосмотической стрикции можно предположить активацию НКСС и увеличение $[Na^+]_i$ на фоне АТФ-индуцированного входа Ca^{2+} . Снижение входящего градиента Na^+ ингибирует работу Na^+ , Ca^{2+} -обменника и тем самым способствует накоплению Ca^{2+} в цитоплазме [36], пролонгации актомиозинового взаимодействия, активации Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов и усилению выхода Cl^- за счет градиента, создаваемого НКСС. Тогда блокирование НКСС и Cl^- -каналов на фоне возможной активации Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов может ингибировать этот механизм, подавляя изоосмотическую стрикцию, что и наблюдалось в эксперименте.

Вместе с тем известно, что P_2X -рецепторы, являющиеся неселективными ионными каналами, увеличивают транспорт Ca^{2+} в клетку и быстро инактивируются, тогда как P_2Y -рецепторы, связанные с G-белком, образуют инозитол-трифосфат (ИФ₃) и диацилглицерол (ДАГ). ИФ₃ стимулирует выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума [37], тогда как ДАГ активирует ПКС [19] через фосфатидилинозитол-бифосфат (ФИФ₂) [38]. ПКС блокирует активность $Cl^-HCO_3^-$ -обменника [39], активирует Ca^{2+} -активируемые и объем-зависимые Cl^- -каналы [40], но ингибирует потенциал-зависимые Cl^- -каналы [41]. Снижение $[Cl^-]_i$ за счет активации этих каналов способствует усилению активности НКСС [6] и деполяризации мембраны по механизму, описанному выше (рис. 4). Во всяком случае, ингибирование НКСС в эксперименте способствовало восстановлению исходного МН при изоосмотической стрикции в присутствии активатора P_2Y -рецепторов УТФ. Таким образом, можно предположить, что пролонгированное увеличение тонуса СГМК при изменении осмолярности среды и одновременной активации пуринаргических рецепторов связано именно с киназными путями, активируемыми P_2Y -рецепторами. Дальнейшее и более детальное изучение регуляторных механизмов биологических веществ, в том числе пуринаргических нуклеотидов, на фоне активации механизмов регуляции объема клетки позволит выявить особенности их функционирования в условиях и при заболеваниях, сопровождающихся изменением осмолярности внутриклеточной среды.

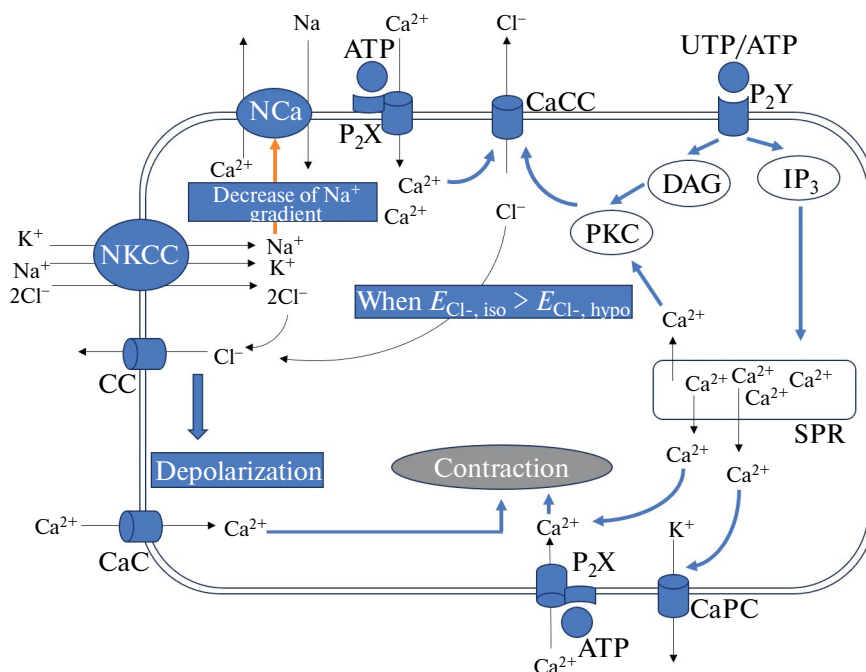


Рис. 4. Гипотетическая схема взаимодействия пуринергической сигнальной системы и механизмов регуляторного увеличения объема клеток при изотонической стрикции (пояснения в тексте). NKCC – Na^+ , K^+ , 2Cl^- -котранспорт, CC – хлорные каналы (без уточнения типа), CaCC – кальций-активируемые хлорные каналы, CaPC – кальций-активируемые калиевые каналы, CaC – потенциал-зависимые кальциевые каналы, NCa – Na^+ , Ca^{2+} -обменник, ATP – аденозин-5'-трифосфат, UTP – уридин-5'-трифосфат, P_2X – рецепторы, P_2Y – рецепторы, SPR – саркоплазматический ретикулум, IP_3 – инозитол-трифосфат, DAG – диацилглицерол, PKC – протеинкиназа C, $E_{\text{Cl}^-, \text{iso}}$ – равновесный потенциал Cl^- при инкубации в гипотонической среде; $E_{\text{Cl}^-, \text{hypo}}$ – равновесный потенциал Cl^- при возвращении в изотоническую среду. Синими стрелками показано активирующее влияние, красными – ингибирующее.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского фонда фундаментальных исследований (договор № 18-44-700009). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, протокол № 8556 от 21.01.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jentsch TJ* (2016) VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nature Rev Mol Cell Biol* 17(5): 293–307.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.29>
2. *Sun XZ, Tian XY, Wang DW, Li J* (2014) Effects of fasudil on hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(7): 959–964.
3. *Shi X-L, Wang G-L, Zhang Z, Liu Y-J, Chen J-H, Zhou J-G, Qiu Q-Y, Guan Y-Y* (2007) Alteration of Volume-Regulated Chloride Movement in Rat Cerebrovascular Smooth Muscle Cells During Hypertension. *Hypertension* 49: 1371–1377.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.084657>
4. *Anfinogenova YI, Baskakov MB, Kovalev IV, Kilin AA, Dulin NO, Orlov SN* (2004) Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -cotransport, intracellular Cl^- and L-type Ca^{2+} channels. *Pflügers Arch* 449(1): 42–55.
<https://doi.org/10.1007/s00424-004-1316-z>
5. *Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF* (2009) Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiol Rev* 89(1): 193–277.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
6. *O'Neill WC* (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Cell Physiol* 276(5): C995–C1011.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C995>
7. *Emma F, McManus M, Strange K* (1997) Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC. *Am J Physiol* 272(6 Pt 1): C1766–C1775.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.6.C1766>
8. *Lauf PK, Bauer J, Adragna NC, Fujise H, Zade-Oppen AMM, Ryu KH, Delpire E* (1992) Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am J Physiol* 263(5 Pt 1): C917–C932.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.263.5.C917>
9. *Ghouli MR, Fiocco TA, Binder DK* (2022) Structure-function relationships of the LRRC8 subunits and subdomains of the volume-regulated anion channel (VRAC). *Front Cell Neurosci* 16: 962714.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.962714>
10. *Qusous A, Geewan CS, Greenwell P, Kerrigan MJ* (2011) siRNA-mediated inhibition of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (NKCC1) and regulatory volume increase in the chondrocyte cell line C-20/A4. *J Membr Biol* 243: 25–34.
<https://doi.org/10.1007/s00232-011-9389-z>
11. *Bergfeld GR, Forrester T* (1992) Release of ATP from human erythrocytes in response to brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 26: 40–47.
<https://doi.org/10.1093/cvr/26.1.40>
12. *Takahara N, Ito S, Furiya K, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y* (2014) Real-time imaging of ATP release induced by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51(6): 772–782.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0008OC>
13. *Lohman AW, Billaud M, Isakson BE* (2012) Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res* 95(3): 269–280.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs187>
14. *Kennedy C* (2015) ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system. *Autonom Neuroscie: basic and clin* 191: P2–P15.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.004>
15. *Sprague RS, Ellsworth ML* (2012) Erythrocyte derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intracellular communication. *Microcirculation* 19: 430–439.
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00158.x>
16. *Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH* (1995) The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 269: H2155–H2161.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2155>
17. *Wan J, Ristenpart WD, Stone HA* (1998) Dynamics of shear induced ATP release from red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16432–16437.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805779105>
18. *Kalsi KK, Gonzalez-Alonso J* (2012) Temperature dependent release of ATP from human erythrocytes: mechanism for the control of local tissue perfusion. *Exp Physiol* 97: 419–432.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.064238>
19. *Burnstock G* (2018) Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* 2: 1–10.
<https://doi.org/10.1177/2398212818817494>

20. Смаглий ЛВ, Гусакова ВС, Горянова АМ, Голованов ЕА, Чибисов ЕЕ, Бирулина ЮГ, Гусакова СВ (2020) Роль АТФ и транспортеров ионов Cl^- в регуляции сократительной активности гладких мышц легочной артерии в гипоосмотической среде. Артер гипертен 25(6): 573–580. [Smaglii LV, Gusakova VS, Goryanova AM, Golovanov EA, Chibisov EE, Birulina JG, Gusakova SV (2020) Role of ATP and Cl^- transporters in regulation of contractile activity of pulmonary artery smooth muscles in hyposmotic conditions. Arterial Hyperten 25(6): 573–580. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18705/1607-419X-2020-26-5-573-580>
21. Burnstock G (2017) Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. Circulat Res 120(1): 207–228.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>
22. Rameshrad M, Babaei H, Azarmi Y, Fouladia DF (2016) Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. Life Sci 145: 190–204.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.043>
23. Choi RCY, Chu GKY, Siow NL, Yung AWY, Yung LY, Lee PSC, Lo CCW, Simon J, Dong TTX, Barnard EA, Tsim KWK (2013) Activation of UTP-sensitive P2Y2 receptor induces the expression of cholinergic genes in cultured cortical neurons: a signaling cascade triggered by Ca^{2+} mobilization and extracellular regulated kinase phosphorylation. Mol Pharmacol 84(1): 50–61.
<https://doi.org/10.1124/mol.112.084160>
24. Attah IY, Neumann A, Al-Hroub H, Rafahi M, Baqi Y, Namasivayam V, Müller CE (2020) Ligand binding and activation of UTP-activated G protein-coupled P2Y2 and P2Y4 receptors elucidated by mutagenesis, pharmacological and computational studies. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1864(3): 129501.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129501>
25. Koszela-Piotrowska I, Choma K, Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A, Kunz WS, Malekova L, Kominkova V, Ondrias K (2007) Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. Cell Mol Biol Lett 12(4): 493–508.
<https://doi.org/10.2478/s11658-007-0019-9>
26. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009) Chloride channels. Br J Pharmacol 158(Suppl 1): S130–S134.
https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00503_6.x
27. Zhang Q, Jian L, Yao D, Rao B, Xia Y, Hu K, Li S, Shen Y, Cao M, Qin A, Zhao J, Cao Y (2023) The structural basis of the pH-homeostasis mediated by the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, AE2. Nat Commun 14: 1812.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37557-y>
28. Farisa A, Spence DM (2008) Measuring the simultaneous effects of hypoxia and deformation on ATP release from erythrocytes. The Analyst 133: 678–682.
<https://doi.org/10.1039/B719990B>
29. Grygorczyk R, Orlov SN (2017) Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties – Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. Front Physiol 8: 1110.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01110>
30. Tuder RM, Yun JH, Bhunia A, Fijalkowska I (2007) Hypoxia and chronic lung disease. J Mol Med (Berl) 85: 1317–1324.
<https://doi.org/10.1007/s00109-007-0280-4>
31. Namkung W, Lee JA, Ahn W, Han WS, Kwon SW, Ahn DS, Kim KH, Lee MG (2003) Ca^{2+} Activates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator- and Cl^- -dependent HCO_3^- Transport in Pancreatic Duct Cells. J Biol Chem 278(1): 200–207.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207199200>
32. Bertoni APS, de Campos RP, Tamajusuku ASK, Stefani GP, Braganhol E, Battastini AMO, Wink MR (2020) Biochemical analysis of ectonucleotidases on primary rat vascular smooth muscle cells and in silico investigation of their role in vascular diseases. Life Sci 256: 117862.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117862>
33. Martin-Aragón Baudel M, Espinosa-Tanguma R, Nieves-Cintrón M, Navedo MF (2020) Purinergic Signaling During Hyperglycemia in Vascular Smooth Muscle Cells. Front Endocrinol (Lausanne) 11: 329.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00329>
34. Orlov SN, Koltsova SV, Kapilevich LV, Dulin NO, Gusakova SV (2014) Cation-Chloride Cotransporters: Regulation, Physiological Significance, and Role in Pathogenesis of Arterial Hypertension. Biochemistry (Moscow) 79(13): 1546–1561.
<https://doi.org/10.1134/S0006297914130070>
35. Park S, Ku SK, Ji HW, Choi JH, Shin DM (2015) Ca^{2+} is a Regulator of the WNK/OSR1/NKCC Pathway in a Human Salivary Gland Cell Line. Korean J Physiol Pharmacol 19(3): 249–255.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2015.19.3.249>

36. Zheng Y-M, Wang Y-X (2007) Sodium-calcium exchanger in pulmonary artery smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 1099: 427–435.
<https://doi.org/10.1196/annals.1387.017>
37. Ralevic V (2021) Purinergic signalling in the cardiovascular system – a tribute to Geoffrey Burnstock. *Purin Signal* 17: 63–69.
<https://doi.org/10.1007/s11302-020-09734-x>
38. Kheifets V, Mochly-Rosen D (2007) Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res* 55: 467–476.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.014>
39. Fraga S, Luo Y, Jose P, Zandi-Nejad K, Mount DB, Soares-da-Silva P (2006) Dopamine D1-like receptor-mediated inhibition of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activity in rat intestinal epithelial IEC-6 cells is regulated by G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK 6). *Cell Physiol Biochem* 18(6): 347–360.
<https://doi.org/10.1159/000097612>
40. Yu K, Jiang T, Cui Y, Tajkhorshid E, Hartzell HC (2019) A network of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding sites regulates gating of the Ca^{2+} -activated Cl^- channel ANO1 (TME-M16A). *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 19952–19962.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1904012116>
41. Gada KD, Logothetis DE (2022) PKC regulation of ion channels: The involvement of PIP2. *J Biol Chem* 298(6): 102035.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102035>
42. Chipperfield AR, Harper AA (2000) Chloride in smooth muscle. *Progr Biophys Mol Biol* 74(3–5): 175–221.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00024-9)
43. Bulley S, Jaggar JH (2014) Cl^- channels in smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 466(5): 861–872.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1357-2>
44. Thomas-Gatewood C, Neeb ZP, Bulley S, Adebiyi A, Bannister JP, Leo MD, Jaggar JH (2011) TMEM16A channels generate Ca^{2+} -activated Cl^- currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(5): H1819–H1827.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00404.2011>
45. Salter KJ, Turner JL, Albarwani S, Clapp LH, Kozlowski RZ (1995) Ca^{2+} -activated Cl^- and K^+ channels and their modulation by endothelin-1 in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Exp Physiol* 80(5): 683–884.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1995.sp003889>
46. Bae YM, Kim KS, Park JK, Ko E, Ryu SY, Baek HJ, Lee SH, Ho WK, Earm YE (2001) Ca^{2+} -i-dependent membrane currents in vascular smooth muscle cells of the rabbit. *Life Sci* 69(21): 2451–2466.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01323-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01323-6)

Isosmotic Striction of Rat Aorta Smooth Muscle Cells During Activation of Purinergic Receptors: Role of Chlorine Transport

L. V. Smaglii^{a, b, c, *}, V. S. Gusakova^a, S. V. Gusakova^a, M. A. Pshemyskiy^a,
S. O. Koshuba^a, and E. A. Golovanov^a

^a*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

^b*Tomsk State University, Tomsk, Russia*

^c*Seversk biophysical scientific center, Seversk, Russia*

^{*}*e-mail: lud.smagly@yandex.ru*

We studied the effect of the purinergic signaling system and Cl⁻-transporters on vascular smooth muscle cells (SMC) isosmotic striction that occurs when osmotic pressure is normalized after prolonged incubation in a hypoosmotic medium. The study was performed with the method of myography on endothelium-denuded ring segments of the male Wistar rats aorta. Isosmotic striction was induced by placing the vascular segments in normosmotic Krebs solution containing 120 mM NaCl after a 40-minute incubation in a hyposmotic Krebs solution containing 40 mM NaCl. Purinergic receptors were activated by adenosine 5'-triphosphate (ATP, 500 μM) as nonselective P₂X and P₂Y receptor agonist, and uridine 5'-triphosphate (UTP, 500 μM) as selective P₂Y receptor agonist. ATP and UTP eliminated the transient nature of the aorta SMC isosmotic striction without affecting its amplitude. Pretreatment of vascular segments with ATP and UTP during incubation in a hyposmotic solution completely suppressed the development of isosmotic striction in the presence of ATP or UTP, but did not affect isosmotic striction without activators of purinergic receptors. The inhibitor of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport (NKCC) bumetanide (100 μM) abolished isosmotic striction in the presence of ATP, but not UTP, but restored its transient character. A non-selective blocker of Cl⁻ channels and Cl⁻, HCO₃⁻ exchanger DIDS (100 μM) suppressed the development of isosmotic striction both in the presence of ATP and UTP. The potassium channel blocker tetraethylammonium (10 mM) potentiates the constrictor action of UTP on isosmotic striction. We suppose purinergic receptors eliminate the transient isosmotic striction by activating Cl⁻ currents through activation of P₂Y receptors. The mechanism of interaction between the purinergic signaling system and Cl⁻ transport during changes in cell volume requires further study.

Keywords: isosmotic striction, smooth muscle cell, ATP, purinergic receptors, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport, Cl⁻-channels

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МЕТИЛОБОГАЩЕННАЯ ДИЕТА МАТЕРИ УЛУЧШАЕТ
ЭПИЗОДИЧЕСКУЮ ПАМЯТЬ И НЕ ВЛИЯЕТ НА ПАМЯТЬ
ОБ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОМ СТРАХЕ У ПОТОМСТВА КРЫС
ЛИНИИ WAG/RIJ**

© 2024 г. Е. А. Федосова^{1, *}, А. Б. Шацкова¹, К. Ю. Саркисова¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

**E-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

Поступила в редакцию 27.01.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к публикации 27.04.2024 г.

Цель данной работы – выяснить, какое влияние оказывает метилобогащенная диета (МОД) матери в перинатальном периоде на когнитивные функции взрослого потомства крыс линии WAG/Rij – модели наследственной absence-эпилепсии с коморбидной депрессией. Когнитивные функции (обучение и память) оценивались в тестах распознавания нового объекта (РНО) и выработки условно-рефлекторной реакции страха (fear conditioning). Эксперименты проводили на 6-месячных крысах-самцах линии WAG/Rij. Матери крыс экспериментальной группы потребляли МОД, а матери контрольной группы – контрольную диету. Тест РНО использовался для оценки эпизодической памяти. Данный тест основан на врожденной исследовательской мотивации (мотивации предпочтения новизны), которая обычно понижена при депрессии. Выработка условно-рефлекторного страха (fear conditioning) представляет собой выработку классического павловского оборонительного условного рефлекса, проявляющегося в виде реакций замираний в ответ на негативное подкрепление (электрическое раздражение лап). В тесте РНО у крыс экспериментальной группы индекс распознавания нового объекта (показатель эпизодической памяти), а также число выходов в центр арены (показатель исследовательской мотивации) были значительно больше по сравнению с аналогичными показателями у контрольной группы. Однако не было обнаружено межгрупповых различий в проявлении памяти об условно-рефлекторном страхе (% реакций замирания) на контекст и звуковой сигнал. Результаты свидетельствуют о том, что МОД матери улучшает эпизодическую память в тесте РНО, но не влияет на память об условно-рефлекторном страхе, связанном с контекстом и звуковым сигналом, у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij.

Ключевые слова: абсанс-эпилепсия, коморбидная депрессия, когнитивная функция, исследовательская мотивация, распознавание нового объекта, эпизодическая память, память о страхе, болевая чувствительность, материнская метилобогащенная диета, крыса линии WAG/Rij

DOI: 10.31857/S0869813924050097, **EDN:** VKUPEK

ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij являются моделью наследственной absence-эпилепсии (АЭ) с коморбидной депрессией [1]. АЭ – неконвульсивная форма эпилепсии, характерным признаком которой является наличие спонтанных генерализованных пик-волновых разрядов (ПВР) на ЭЭГ, сопровождающихся отключением сознания (отсутствие реагирования на внешние стимулы). Первые одиночные ПВР у крыс линии WAG/Rij появляются примерно в возрасте 2–3 месяцев, а к 5–6-месячному возрасту число и длительность ПВР увеличиваются [1]. По мере увеличения числа и длительности ПВР у крыс линии WAG/Rij усиливаются симптомы депрессивноподобного поведения: пониженное предпочтение сахарозы в тесте потребления сахарозы (ангедония) и повышенный уровень иммобильности в тесте вынужденного плавания (поведенческая «депрессия») [1].

Несмотря на то, что патологический фенотип у крыс линии WAG/Rij генетически обусловлен, он может быть модифицирован под влиянием ранних средовых воздействий, таких как материнская забота [2, 3], обогащенная/обедненная среда [3], а также диета матери во время перинатального периода [3–8]. В качестве механизма ранних воздействий среды рассматриваются эпигенетические процессы, которые модулируют экспрессию генов без изменения последовательности ДНК. Одним из наиболее изученных эпигенетических механизмов является метилирование ДНК. Для осуществления процесса метилирования ДНК необходимы доноры метильных групп [3, 9]. Паттерн метилирования ДНК формируется на самых ранних стадиях онтогенеза, поэтому в перинатальном периоде он особенно чувствителен к воздействиям окружающей среды, прежде всего к составу материнской диеты [3].

Ранее была показана возможность коррекции проявлений АЭ и коморбидной депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij с помощью метилобогатой диеты (МОД) матери [3–5]. Установлено, что у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД в перинатальном периоде, симптомы АЭ и коморбидной депрессии были выражены меньше по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли контрольную диету [4, 5].

Когнитивные нарушения являются частью симптоматики как АЭ [10], так и депрессии [11, 12]. Так, у крыс линии WAG/Rij – генетической модели АЭ с коморбидной депрессией – было выявлено нарушение долгосрочной памяти в тесте «Платформа с отверстиями» и в тестах выработки условного рефлекса пассивного [1] и активного [13] избегания. При реверсивном обучении в сложном лабиринте крысы линии WAG/Rij медленнее выполняли прямую и обратную задачи и делали больше ошибок по сравнению с неэпилептическими крысами Wistar [14, 15]. В одной из наших предыдущих работ у крыс линии WAG/Rij были показаны нарушения эпизодической памяти в тесте распознавания нового объекта [16, 17]. Этосуксимид – препарат первого выбора при АЭ, не обладающий собственной антидепрессантной активностью [18, 19], подавлял пик-волновую активность, повышал исследовательскую мотивацию и улучшал эпизодическую память у крыс линии WAG/Rij [17]. У крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, которые потребляли МОД в перинатальном периоде, также было меньше генетически обусловленных ПВР (без изменения их длительности) по сравнению с контрольными крысами [4, 5].

Цель данной работы – выяснить, какое влияние оказывает МОД матери в перинатальном периоде на когнитивные функции (обучение и память) взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Для оценки когнитивных функций в данной работе использовали тесты распознавания нового объекта (РНО) и выработки условно-рефлекторной реакции страха (fear conditioning). Тест РНО использовали для оценки эпизодической памяти (по индексу распознавания нового объекта). Врожденная потребность животных в новизне, в том числе в исследовании новых объектов, формирует исследовательскую мотивацию, уровень которой в тесте РНО оценивали по числу выходов в центр арены и числу стоек без опоры [17]. Тест выработки условной реакции страха использовали для оценки памя-

ти о страхе, связанном с контекстом и сигналом (по % реакций замирания). Выработка условнорефлекторной реакции страха (fear conditioning) основана на оборонительной мотивации: потребности животных в самозащите от внешнего негативного раздражителя (электрическое раздражение лап), который использовался в данном тесте как негативное подкрепление. Поскольку в качестве негативного подкрепления применяли умеренное болевое воздействие в виде электрического раздражения лап, необходимо было сравнить порог болевой чувствительности у животных экспериментальной и контрольной группы. Для этой цели использовали тест отдергивания хвоста (tail flick test).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на 22 крысах-самцах линии WAG/Rij: 11 животных, рожденных матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа), и 11 животных, рожденных матерями, потреблявшими контрольную диету (контрольная группа). Для получения потомства самкам крыс линии WAG/Rij предоставляли контрольную диету (КД) или МОД в течение одной недели до беременности, во время беременности и в течение одной недели после рождения детенышей.

Использовали следующие метилсодержащие добавки (на 1 кг пищи): холин – 5 г; бетаин – 15 г; фолиевая кислота – 15 мг; витамин B12 – 1.5 мг; L-метионин – 7.5 г; цинк – 150 мг. Для приготовления МОД метилсодержащие добавки смешивали с 4-зерновой кашей, творогом и свежими яйцами [4, 5]; для приготовления КД использовали только 4-зерновую кашу, творог и свежие яйца [4, 5].

Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде по 4–5 особей в клетке (70 x 40 x 40), в условиях естественного цикла день – ночь (день около 10 ч).

Схема эксперимента. Оценку когнитивных функций – обучения и памяти проводили у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа) или КД (контрольная группа). Возраст животных контрольной и экспериментальной группы составлял 6–7 месяцев, когда ПБР и симптомы депрессии хорошо выражены [1]. Для оценки обучения и памяти в данной работе использовали тесты распознавания нового объекта (РНО) и выработки условно-рефлекторной реакции страха (fear conditioning). Оценку болевой чувствительности у животных экспериментальной и контрольной группы проводили в тесте отдергивания хвоста (tail flick test).

Процедура тестирования в сумме составляла 9 дней. Выработка условно-рефлекторной реакции страха с использованием негативного подкрепления оказывает стрессогенное воздействие на животных в большей степени, чем тест РНО, который основан на врожденном исследовательском поведении. Чтобы исключить потенциальное влияние негативного подкрепления – электрического раздражения лап на результаты теста РНО, был использован следующий порядок проведения тестов: 2 дня – тест РНО; 2 дня – перерыв; 2 дня – обучение и тестирование выработки условно-рефлекторной реакции страха; 2 дня – перерыв; 1 день – тест отдергивания хвоста. Выполнение поведенческих тестов в разные дни и наличие перерывов между ними позволяет значительно уменьшить влияние одного теста на результаты другого [20].

Тест РНО. В данной работе использована схема эксперимента, которая применялась в наших предыдущих работах [16, 17]. Исследование проводили на квадратной арене (80 x 80 см). Объекты находились на одинаковом (20 см) расстоянии от боковых стенок арены и друг от друга. Перед каждым тестом с новым животным арену и объекты протирали 70%-ным этиловым спиртом. Процедура тестирования составляла 2 дня.

- 1) В первый день проводили фазу адаптации (А): крысу сажали в центр арены (без объектов) и в течение 5 мин регистрировали следующие показатели поведения: число стоек с опорой и без опоры, число выходов в центр, число

реакций груминга (короткие и длинные). Данные показатели регистрировали и анализировали в программе «RealTimer» (Open Science, Россия).

- 2) На следующем этапе исследования проводили фазу ознакомления (T1), тестовую фазу 1 (T2) и тестовую фазу 2 (T3). В фазе ознакомления животным предъявляли два одинаковых объекта. Через 1 ч после фазы ознакомления проводили тестовую фазу 1 (T2): один из знакомых объектов (ЗО) меняли на незнакомый объект (НО1). Через 24 ч после тестовой фазы 1 проводили тестовую фазу 2 (T3): незнакомый объект 1 меняли на незнакомый объект 2 (НО2). Незнакомый объект отличался от знакомого по форме и цвету. В каждую из фаз тестирования (T1, T2 и T3) крысу сажали в центр арены хвостом по направлению к предъявляемым объектам и в течение 5 мин регистрировали время (продолжительность) обследования каждого из объектов, а также число подходов к каждому из объектов и число переходов между ними. Эти показатели также регистрировали и анализировали в программе «RealTimer» (Open Science, Россия). Степень предпочтения незнакомого объекта характеризует индекс распознавания (ИР), который рассчитывают по формуле: $ИР = (\text{время обследования НО} - \text{время обследования ЗО}) / (\text{время обследования НО} + \text{время обследования ЗО})$ [21].

Выработка условно-рефлекторной реакции страха (fear conditioning). Условно-рефлекторную реакцию страха вырабатывали в экспериментальной установке Startle and Fear Combined System компании PanLab Harvard apparatus (Испания, 2000). Установка состояла из камеры размером 250 × 250 × 250 мм, которая была помещена в звуконепроницаемую камеру размером 670 × 530 × 550 мм.

Память о страхе в тесте выработки условно-рефлекторной реакции страха оценивается по % реакций замирания (% freezing) на условные раздражители (контекст и звуковой сигнал), ассоциированные с электрошоковым раздражением лап. Замиранием считали периоды неподвижности длительностью не менее 2 с, когда можно наблюдать только дыхательные движения животного. Замирание определяли по записи механограммы пола камеры с помощью амплитудного и временного порогов. Амплитудный порог зависел от массы тела крысы, коэффициента усиления и выставлялся таким образом, чтобы отсечь интервалы с активным движением животного.

Крыс тестировали в течение 2 дней. В первый день проводили обучение животных:

- 1) крысу помещали в звуконепроницаемую камеру, в течение 120 с животное исследовало камеру при включенном свете;
- 2) затем свет выключали и в течение 28 с подавали звуковой сигнал (60 дБ);
- 3) после окончания действия звука (свет был выключен) в течение 2 с производили электрошоковое раздражение лап животного (2 мА);
- 4) в течение 30 с животное находилось без какого-либо воздействия в камере с включенным светом.

На второй день проводили тестирование выработанного условно-рефлекторного страха:

- 1) на 3 мин крысу помещали в камеру с включенным светом;
- 2) затем свет выключали и в течение 3 мин подавали звуковой сигнал.

Обработку данных проводили с помощью стандартной программы, прилагающейся к установке фирмы Panlab, которая позволяла идентифицировать реакции замирания и определять их длительность. Программа также позволяла регистрировать % реакций замирания (% freezing) – это процент времени замирания от времени регистрации. Данный показатель фиксировали до (реакция на контекст, context test) и во время (реакция на контекст и сигнальный раздражитель, cued test) действия звука в течение двух дней тестирования [22].

Стоит отметить, что замирания как проявление условно-рефлекторного страха внешне напоминают замирания у крыс линии WAG/Rij во время абсансов длитель-

ностью 2–5 с, которые сопровождаются подергиванием вибрисс и наклоном головы. Однако абсансные припадки возникают преимущественно во время пассивного бодрствования (33.1%) и легкого медленноволнового сна (48.4%). В экспериментальных ситуациях, вызывающих активное поведение животных, например, при проведении любых поведенческих тестов [1], особенно связанных с избеганием/ожиданием болевого воздействия, абсансные припадки не возникают. Поэтому замирания, связанные с абсансными припадками, не могут оказать существенного влияния на результаты выработки условно-рефлекторного страха у крыс линии WAG/Rij.

Тест отдергивания хвоста (оценка болевой чувствительности). Тест отдергивания хвоста – это один из тестов для определения болевой чувствительности и оценки анальгетических свойств у фармакологических препаратов [23]. Для определения болевой чувствительности с помощью теста отдергивания хвоста использовали долориметр проводимости компании ITC Life Science. Стимул подается в виде сфокусированного пучка света размером 4 x 6 мм на дорзальную поверхность хвоста («tail flick test»). Для этого животное удерживали на верхней панели долориметра таким образом, что его хвост располагался под установленным источником света. В момент фокусировки луча света на хвосте животного запускался таймер. Когда животное взмахивало хвостом, источник света выключали и таймер останавливали. Порогом болевой чувствительности считают период времени между началом термальной стимуляции хвоста животного и реакцией отдергивания хвоста (латентный период отдергивания хвоста). Латентный период отдергивания хвоста зависит от места приложения светового стимула: время реакции снижается по мере удаления точки приложения стимула от основания хвоста. Методика проведения теста для определения болевой чувствительности требует, чтобы болевое воздействие было хорошо ощутимо для животного, но не оказывало повреждений [23]. Поэтому расстояние от основания хвоста до точки приложения светового стимула в нашем исследовании составляло 5 см, так как это конечная точка самой «чувствительной» первой трети хвоста (длина хвоста крысы составляет в среднем 15 см, она примерно равна длине тела 15.8 ± 5.5 см).

Статистическая обработка данных. Обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ «STATISTICA release 7». Тип распределения исследуемых показателей и степень его близости к нормальному определяли по критериям Колмогорова – Смирнова и Лиллиефорса (Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors test). Если распределение показателя соответствовало критерию нормальности, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) (для показателей в тестах РНО и tail flick test), а также однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (one-way ANOVA with repeated measures) для % реакций замирания в тесте выработки условно-рефлекторной реакции страха. Последующее определение статистической значимости различий в средних значениях показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмана – Кеулса (Newman–Keuls test). В случае несоответствия критерию нормальности применяли непараметрический аналог ANOVA – Kruskal-Wallis H test (one-way ANOVA by ranks) с последующим определением значимости различий между группами с использованием множественного сравнения (Multiple comparisons of mean ranks for all groups).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) показал отсутствие влияния фактора «диета матери» на длительность исследования правого объекта ($F_{(1, 20)} = 1.7, p = 0.2$), левого объекта ($H_{(1, 23)} = 0.2, p = 0.7$), а также на число подходов к правому ($F_{(1, 20)} = 1.3, p = 0.3$) и левому ($F_{(1, 20)} = 0.9, p = 0.4$) объекту в фазе ознакомления (предъявление двух одинаковых объектов). Эти показатели значимо не отличались у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД ($p > 0.05$). Дисперси-

онный анализ также показал отсутствие значимых различий по времени исследования правого и левого объектов ($H_{(1,23)} = 0.1, p = 0.8$ – МОД и $H_{(1,23)} = 2.8, p = 0.1$ – КД) и по числу подходов к объектам ($F_{(1,20)} = 0.01, p = 0.9$ – МОД и $F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.8$ – КД). Это свидетельствует о том, что исходное предпочтение правого или левого объекта у крыс линии WAG/Rij в обеих группах отсутствовало.

Для ИР1 в тестовой фазе 1 дисперсионный анализ показал значимость фактора «диета матери» ($H_{(1,23)} = 14.6, p < 0.01$). Крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, $\approx$ в 1.8 раз дольше ($p < 0.05$) исследовали незнакомый объект (15.7 ± 2.1 с), чем крысы, рожденные матерями, потреблявшими КД (8.6 ± 2.1 с). Знакомый объект, напротив, животные, рожденные матерями, потреблявшими МОД, исследовали $\approx$ в 1.6 раз меньше (17.3 ± 3.7 с) по сравнению с животными контрольной группы (27.6 ± 3.7 с) ($p < 0.05$). Вследствие этого ИР1 у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, был значимо больше, чем у крыс, рожденных матерями, потреблявшими КД (рис. 1, T2). По числу подходов к правому ($F_{(1,20)} = 0.3, p = 0.6$) и левому ($F_{(1,20)} = 1.4, p = 0.3$) объекту, а также по числу переходов между фигурами ($F_{(1,20)} = 0.8, p = 0.4$), характеризующих двигательную активность животных в этом тесте, различий между группами не наблюдали.

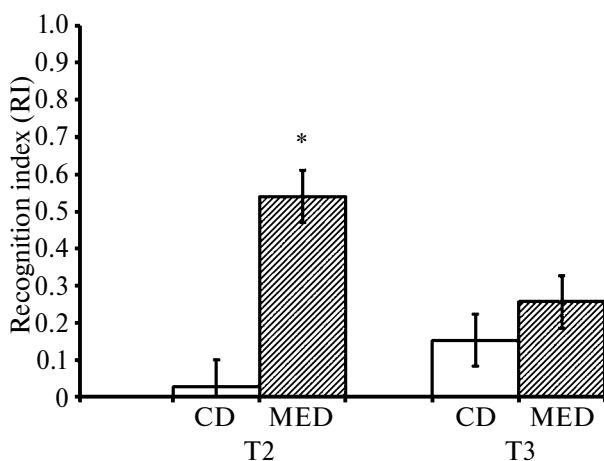


Рис. 1. Индекс распознавания нового объекта через 1 ч (ИР 1 – в тестовую фазу 1, T2) и через 24 ч (ИР 2 – в тестовую фазу 2, T3) после предъявления двух одинаковых объектов. CD – контрольная диета, MED – метилбогаченная диета. * $p < 0.05$ – у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с крысами линии WAG/Rij, рожденными матерями, потреблявшими КД.

В отличие от ИР1 в тестовой фазе 1, для индекса распознавания в тестовой фазе 2 (ИР2) дисперсионный анализ показал отсутствие значимости факторов «диета матери» ($F_{(1,20)} = 0.9, p = 0.5$). Длительность исследования как незнакомого ($F_{(1,20)} = 1.7, p = 0.2$), так и знакомого объекта ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.8$) значимо не отличалась у крыс экспериментальной группы по сравнению с контрольной. Вследствие этого межлинейные различия по ИР2 отсутствовали (рис. 1, T3). Крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, не отличались от животных контрольной группы также ни по числу подходов к правому ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.9$) или левому ($F_{(1,20)} = 0.4, p = 0.5$) объекту, ни по числу переходов между объектами ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.7$).

Таблица 1. Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в фазе адаптации в тесте РНО

Показатели поведения		КД	МОД
Число выходов в центр		1.2 ± 0.3	$2.5 \pm 0.3^*$
Число стоек без опоры		5.3 ± 1.1	$10.5 \pm 1.1^+$
Число стоек с опорой		4.5 ± 1.3	4.8 ± 1.3
Число реакций груминга	Короткие	0.5 ± 0.3	$1.4 \pm 0.3^+$
	Длинные	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2
Число болюсов		1.5 ± 0.4	0.9 ± 0.4

КД – контрольная диета, МОД – метилобогащенная диета. $*p < 0.05$ – у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с крысами линии WAG/Rij, рожденными матерями, потреблявшими КД; $^+ 0.05 < p < 0.1$ (тенденция).

Во время фазы адаптации между крысами экспериментальной и контрольной группы не наблюдали различий по числу стоек с опорой ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.9$), по числу длинных реакций груминга ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.9$) и по числу болюсов ($F_{(1,20)} = 1.1, p = 0.3$). Различия между крысами экспериментальной и контрольной группы обнаружены по такому важному показателю исследовательской мотивации, как число выходов в центр арены ($F_{(1,20)} = 12.5, p = 0.01$). У крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (2.5 ± 0.3), этот показатель был $\approx$ в 2 раза больше, чем у животных, рожденных матерями, потреблявшими КД (1.2 ± 0.3). Различие между группами по другому показателю исследовательской мотивации, такому как число стоек без опоры ($F_{(1,20)} = 2.7, p = 0.07$), было на уровне тенденции (у крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД, этот показатель был больше по сравнению с контрольной группой). Наблюдали также тенденцию к увеличению числа коротких реакций груминга ($F_{(1,20)} = 3.9, p = 0.06$) (табл. 1).

Тест выработки условно-рефлекторной реакции страха ANOVA с повторными измерениями показал значимость фактора «день эксперимента» (1-й день – обучение, 2-й день – тестирование) ($F_{(1,20)} = 23.7, p < 0.001$), а также значимость взаимодействия факторов «день эксперимента» и «диета матери» ($F_{(1,20)} = 13.1, p < 0.01$) для % реакций замирания при помещении в камеру (до действия звука). Влияние фактора «диета матери» было незначимым ($F_{(1,20)} = 1.2, p = 0.2$). У крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (25.4 ± 5.2 – первый день тестирования; 67.1 ± 6.6 – второй день тестирования), также как и у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД (33.9 ± 5.2 – первый день тестирования; 63.9 ± 6.6 – второй день тестирования), % реакций замирания при повторном тестировании (при помещении в камеру без действия звука) значимо возрастал, что указывает на выработку условной эмоциональной реакции на контекст – contextual fear memory (рис. 2).

Для % реакций замирания при действии сигнального раздражителя – звука показана значимость фактора «день эксперимента» ($F_{(1,20)} = 14.2, p < 0.001$), а также значимость взаимодействия факторов «день эксперимента» и «диета матери» ($F_{(1,20)} = 76.4, p < 0.001$). Влияние фактора «диета матери» также было незначимым ($F_{(1,20)} = 0.1, p = 0.9$). У крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (25.7 ± 5.6 – первый день тестирования; 82.5 ± 5.6 – второй день тестирования), также как и у животных, рожденных матерями, потреблявшими КД (44.0 ± 8.1 – первый день тестирования; 82.7 ± 8.1 – второй день тестирования), % реакций замирания при повторном тестировании (при помещении в камеру при действии звука) значимо возрастал, что указывает на выработку условной эмоциональной реакции страха на сигнальный раздражитель – cued fear memory (рис. 2).

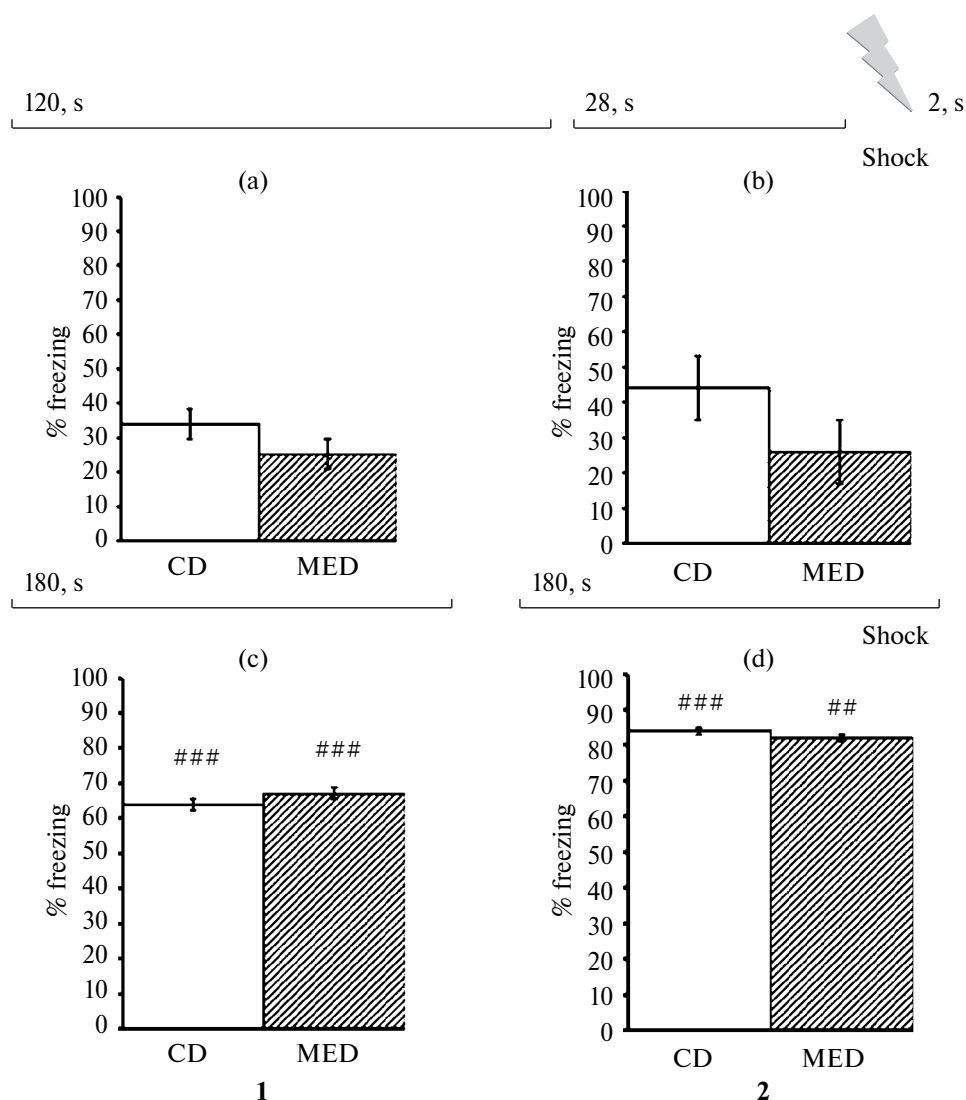


Рис. 2. Влияние МОД матери на выработку условно-рефлекторной реакции страха у крыс линии WAG/Rij. % реакций замирания в фоне во время обучения (а) и тестирования (с). % реакций замирания на условный стимул (звук) при обучении (б) и тестировании (д). По вертикали – % реакций замирания. 1 – % реакций замирания при помещении в камеру без действия звука (контекст), 2 – % реакций замирания при действии звука (сигнальный раздражитель). Размещенные над графиками серые линии, ограниченные с двух сторон, показывают каждую фазу теста с указанием их длительности. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – в день тестирования (2-й день) по сравнению с днем обучения (1-й день).

По данным однофакторного дисперсионного анализа, фактор «диета матери» не оказал значимого эффекта на порог болевой чувствительности ($F_{(1, 20)} = 1.8$, $p = 0.2$) в тесте отдергивания хвоста. У крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (2.8 ± 0.4 с), порог болевой чувствительности значимо не отличался от данного показателя у животных, рожденных матерями, потреблявшими КД (3.5 ± 0.4 с) ($p = 0.2$) (рис. 3).

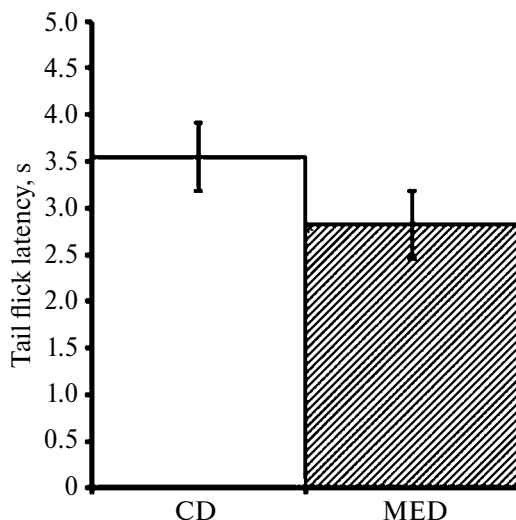


Рис. 3. Влияние МОД матери на болевую чувствительность у крыс линии WAG/Rij (латентный период отдергивания хвоста, tail flick latency). CD – контрольная диета, MED – метилобогатая диета.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В фазе ознакомления в тесте РНО ни экспериментальная, ни контрольная группа животных не проявляла предпочтение правого или левого объекта. Это говорит о том, что было выполнено одно из важнейших условий проведения теста РНО – отсутствие выраженного исходного предпочтения одной из двух одинаковых фигур.

В тестовой фазе 1 у крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД, ИР1 был значительно больше, чем у животных, рожденных матерями, потреблявшими КД. Это свидетельствует о том, что МОД оказала благоприятное воздействие на эпизодическую память у крыс в фазу тестирования 1, когда незнакомый объект предъявлялся через 1 ч после ознакомления животных с двумя одинаковыми объектами (фаза ознакомления). В тестовой фазе 2 у крыс экспериментальной группы не было обнаружено различий в ИР2 по сравнению с крысами контрольной группы. Вероятно, на второй день тестирования интерес к исследованию объектов у обеих групп животных снижается в одинаковой степени. Поэтому можно сделать вывод о том, что МОД не оказывала влияние на эпизодическую память у крыс в фазу тестирования 2 (через 24 ч после фазы ознакомления). Показано, что у исследуемых животных наибольшая длительность исследования нового объекта в тесте РНО наблюдается в начале тестовой фазы 1. Впоследствии данный показатель уменьшается, и в случае, если тестовая фаза 1 длится продолжительное время (разное для разных видов животных), незнакомый объект для исследуемого животного становится неотличим от знакомого [24]. В тестовой фазе 2 – через 24 ч после фазы ознакомления – большинство животных отличает новый предмет от знакомого [21, 25]. Однако межгрупповые различия в ИР2 обнаруживаются в большинстве случаев после фармакологических воздействий [21, 26]. Так, введение кофеина предотвратило вызванное скополамином нарушение эпизодической памяти, которая оценивалась спустя 1 и 24 ч после фазы ознакомления [26]. В нашей предыдущей работе было показано, что антиабсансный препарат этосуксимид подавлял пик-волновую активность и увеличивал как ИР1, так и ИР2 [17].

Межгрупповое различие ИР1 в тестовой фазе 1 достигалось за счет более длительного исследования незнакомого объекта животными экспериментальной группы и, напротив, более длительного исследования знакомого объекта животными контрольной группы [17, 21]. Помимо времени (длительности) исследования объектов, мы регистрировали число подходов к знакомому и незнакомому объекту, а также число переходов между объектами, которые служили показателями двигательной активности. Различия в двигательной активности отсутствовали у крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД по сравнению с КД как в тестовой фазе 1, так и в тестовой фазе 2. Это указывает на то, что выявленные различия в эпизодической памяти не могут быть связаны с изменением двигательной активности животных.

В нашей предыдущей работе [17] было показано, что у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 месяцев отсутствие хорошо выраженной пик-волновой активности и коморбидной депрессии сопровождалось отсутствием нарушений эпизодической памяти через 1 и 24 ч после фазы ознакомления в тесте РНО. В возрасте 6 месяцев крысы линии WAG/Rij демонстрировали нарушение эпизодической памяти в тестовой фазе 1 по сравнению со здоровыми крысами Wistar, что, вероятно, связано с проявлением в этом возрасте хорошо выраженных ПВР на ЭЭГ и симптомов депрессивноподобного поведения. Однако у 6-месячных животных не наблюдали значимых межлинейных различий в ИР2 – показателе эпизодической памяти, регистрируемом через 24 ч после фазы ознакомления [16, 17].

Тест РНО не требует предварительного обучения животных, он основан на врожденном исследовательском поведении грызунов. Важным проявлением исследовательского поведения является внимание – избирательная направленная активность животного на исследование незнакомого объекта [17, 21]. В нашей предыдущей работе [17] показано, что отсутствие избирательной направленности на исследование незнакомого объекта (отсутствие предпочтения незнакомого объекта по сравнению со знакомым) косвенно можно расценивать как дефицит внимания у крыс линии WAG/Rij. В настоящей работе показано, что животные экспериментальной группы дольше исследовали новый объект в Т2, и разница в ИР1 достигается не за счет числа подходов к незнакомому объекту, а за счет более длительного исследования нового объекта в Т2. Это может свидетельствовать о том, что МОД матери в перинатальном периоде оказывает благоприятное влияние на внимание у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij.

Было высказано предположение [17] о том, что возможной причиной нарушений эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij может быть пониженный уровень исследовательской мотивации – одного из наиболее заметных поведенческих признаков депрессивных нарушений у животных. Как было показано ранее, стойки без опоры и выходы в центр арены во время стадии адаптации являются надежными поведенческими маркерами успешности последующего распознавания нового объекта в тесте РНО (по крайней мере в тестовой фазе 1, Т2). Так, обнаружена положительная корреляция между показателем эпизодической памяти в тесте РНО (ИР1) и такими показателями исследовательской мотивации, как число выходов в центр арены и число стоек без опоры [17]. В настоящей работе показано, что число выходов в центр арены и число стоек без опоры (на уровне тенденции) было больше у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД по сравнению с КД. Таким образом, можно говорить о том, что МОД матери повышает исследовательскую мотивацию, что, наряду с улучшением внимания, улучшает эпизодическую память. Стоит отметить, что благоприятное влияние МОД матери на результаты теста РНО нельзя объяснить ее влиянием на уровень тревожности крыс линии WAG/Rij. В ранее проведенных тестах свето-темнового выбора, открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта различий в уровне тревожности между потомством крыс линии WAG/Rij, рожденным матерями, потреблявшими МОД или КД, не обнаружено [4, 5].

Действие МОД матери можно сравнить с эффектами антиабсансного препарата этосуксимида. Данный препарат, как было показано ранее, не обладает собственной анти-

депрессантной активностью [18, 19]. Этосуксимид подавлял симптомы АЭ и коморбидной депрессии, улучшал эпизодическую память в тесте РНО и повышал оба показателя исследовательской мотивации – число выходов в центр арены и число стоек без опоры у 6-месячных крыс линии WAG/Rij [17]. МОД матери во время перинатального периода также уменьшает проявление симптомов АЭ (уменьшает число ПБР без изменения их длительности) и коморбидной депрессии, повышает уровень исследовательской мотивации, исходно низкий у крыс линии WAG/Rij [17]. Эти данные свидетельствуют о том, что благоприятный эффект МОД матери на эпизодическую память в тесте РНО связан с коррекцией патологического фенотипа крыс линии WAG/Rij (симптомов АЭ и коморбидной депрессии), в том числе пониженной исследовательской мотивации [17].

У крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, так же, как и у крыс этой линии, рожденных матерями, потреблявшими КД, % реакций замирания при повторном тестировании (при помещении в камеру без действия звука) значимо возрастал по сравнению с первым тестированием. Это указывает на выработку условной эмоциональной реакции страха на контекст – contextual fear memory. Аналогичная картина наблюдалась при повторном тестировании при помещении в камеру при действии звука: % реакций замирания значимо возрастал у животных экспериментальной и контрольной группы на второй день тестирования по сравнению с первым. Это значит, что обе группы крыс линии WAG/Rij – потомство матерей, потреблявших МОД и КД, выработали условную эмоциональную реакцию страха на контекст и сигнальный раздражитель (звук), а значимые различия между группами отсутствовали.

Учитывая тот факт, что МОД матери не оказала значимого эффекта на порог болевой чувствительности у крыс, можно сделать вывод о том, что реакция на негативное подкрепление была практически одинаковой у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД. У крыс исследуемой линии ранее было выявлено нарушение долгосрочной памяти в тестах выработки условного рефлекса пассивного [1] и активного [13] избегания в 5–6-месячном возрасте. Однако, по данным других авторов, в тесте пассивного избегания у крыс линии WAG/Rij в возрасте 5–6 месяцев не было обнаружено дефицита обучения и памяти. Нарушение долговременной памяти в этом тесте было показано у этих животных только в возрасте 13 месяцев [27].

В клинических исследованиях последних десятилетий представлены многочисленные данные о нарушениях в сфере внимания и особенно памяти при депрессии. Нарушения этих когнитивных функций наиболее ярко обнаруживаются при оперировании эмоционально окрашенными стимулами (феномены негативного сдвига и снижения чувствительности к положительной обратной связи) [28–34]. Для больных депрессией характерна пониженная чувствительность к поощрению, а также неадаптивный ответ на наказание [28–30]. Это проявляется в вероятностных задачах, основанных на принципах азартной игры (существуют наказание за ошибку и поощрение за верный ответ). Здоровые испытуемые демонстрируют сдвиг в сторону поощряемых ответов, в то время как при субклинических депрессиях и депрессивных расстройствах этот сдвиг минимизирован [28, 29].

Негативный сдвиг – избирательно повышенное внимание к потенциально угрожающим или фрустрирующим стимулам. Метаанализ показал, что пациенты с депрессией запоминают примерно на 10% больше негативных слов, чем позитивных [30]. Имеются данные о гиперреактивности больных на ошибку и негативную обратную связь, что нарушает их дальнейшую деятельность [31]. Вместе с тем имеются данные и об отсутствии этих признаков [31]. Нейровизуализационные исследования выявили аномальное возрастание нейронного ответа в ростральной части поясной извилины [32] и в миндалине [33] в ответ на предъявление испытуемым негативно окрашенной информации. Устойчивый сдвиг в сторону усиленной обработки негативной информации при этом объясняют недостаточной регуляцией активности со стороны префронтальной коры [34]. Примечательно, что гипофункция дофаминергической системы, выявленная у крыс линии WAG/Rij,

начинается со снижения уровня дофамина в префронтальной коре в возрасте 2-х месяцев, когда фенотипические проявления АЭ [1] и депрессии [13] еще отсутствуют. В дальнейшем гипопункция дофаминергической системы мозга у крыс линии WAG/Rij нарастает, что сопровождается усилением симптомов АЭ и депрессии [1].

У пациентов с депрессией [31], так же, как и у моделей депрессии на животных, выявление феномена негативного сдвига вызывает некоторые трудности. У крыс линии WAG/Rij результаты тестов с использованием негативного подкрепления и их интерпретация остаются противоречивыми до настоящего времени [1, 13, 27]. Внимание к потенциально угрожающим стимулам, вызывающим страх, и целенаправленная адекватная реакция на них играют важнейшую роль в адаптации субъекта к постоянно меняющимся условиям окружающей среды. Эта адаптивная функция связана с возможностью возникновения ассоциаций между нейтральными стимулами, включая контекст, и негативным событием. Отсюда следует вывод о том, что выявить нарушения памяти о страхе при обучении с отрицательным подкреплением у животных моделей депрессии практически невозможно, если оценивать состояние памяти о страхе однократно. Одна из известных экспериментальных моделей депрессии – мыши линии *Disc1-Q31L* несут точечную мутацию во 2-м экзоне гена *Disc1* (*Disrupted-In-Schizophrenia-1*), приводящую к замене глицина на лейцин в положении 31-й аминокислоты в белке DISC1 [35]. Для этой мутантной линии показано нарушение процесса угашения условной реакции пассивного избегания. У самцов мышей линии *Disc1-Q31L* достижение полного угашения было выявлено только во время 19-го тестирования (у контрольных мышей – во время 10-го тестирования). У самок линии *Disc1-Q31L* не было обнаружено угашения условной реакции пассивного избегания в течение всех 24 дней теста [36]. Интересно, что различия в выработке условной реакции пассивного избегания между мутантными (депрессивными) и контрольными мышами не обнаружены. Известно, что мутация *Disc1-Q31L* вызывает истощение основных нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина и норадреналина), что проявляется большим спектром депрессивно-подобных нарушений поведения, в том числе нарушением угашения условной реакции пассивного избегания [35, 36]. Можно предположить, что влияние МОД матери на память об условно-рефлекторном страхе могло бы быть выявлено у крыс линии WAG/Rij при исследовании угашения условной реакции страха.

Таким образом, в настоящей работе впервые установлено, что МОД матери во время перинатального периода улучшает эпизодическую память в тесте РНО, основанном на врожденном исследовательском поведении, но не влияет на память о страхе, обусловленном негативным подкреплением, у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. МОД матери в перинатальном периоде улучшает эпизодическую память у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij в тесте РНО, оцениваемую через 1 ч после предъявления двух одинаковых объектов.
2. Предполагается, что благоприятный эффект МОД матери на эпизодическую память у потомства крыс линии WAG/Rij основан на повышении исследовательской мотивации.
3. МОД матери не влияет на память об условно-рефлекторном страхе, обусловленном негативным подкреплением: обе группы крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, выработали условную эмоциональную реакцию страха на контекст и сигнальный раздражитель (звук). Значимые различия между группами не обнаружены.
4. МОД матери не оказала значимого эффекта на порог болевой чувствительности у крыс линии WAG/Rij.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

WAG/Rij – Wistar Albino Glaxo/Rijswijk

АЭ – абсанс-эпилепсия

ПВР – пик-волновые разряды

МОД – метилобогащенная диета

КД – контрольная диета

РНО – распознавание нового объекта

ЗО – знакомый объект

НО – незнакомый объект

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Ю.С.); постановка экспериментов, сбор данных (Е.А.Ф., А.Б.Ш.); обработка данных (Е.А.Ф.); написание и редактирование рукописи (Е.А.Ф., К.Ю.С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20–015–00327а). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, протокол № 5 от 02.12.2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarkisova K, van Luijteleaar G* (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(4): 854–876.
https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010_1
2. *Sarkisova KY, Gabova AV* (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17(7): e12477.
https://doi.org/10.1111/gbb.12477_4
3. *Sarkisova K, van Luijteleaar G* (2022) The impact of early-life environment on absence epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *IBRO Neurosci Rep* 13: 436–468.
https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.10.012_5
4. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Narkevich VB, Kudrin VS* (2022) Maternal Methyl-Enriched Diet Increases Dopaminergic Tone of the Mesolimbic Brain System in Adult Offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 506 (1): 145–149.
https://doi.org/10.1134/S001249662205012X_7
5. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Gabova AV, Rudenok MM, Stanishevskaya VA, Slobinsky PA* (2021) Maternal methyl- enriched diet alters absence seizures, depression- like comorbidity and DNMT1, HCN1 and TH gene expression in adult offspring. *Epilepsia* 62(S3): 1–2.
<https://doi.org/10.29003/m2311.sudak.ns2021-17/334-335>
6. *Van den Veyver IB* (2002) Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr* 22: 255–282.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932>

7. *Herbeck YE, Gulevich RG, Amelkina OA, Plyusnina IZ, Oskina IN* (2010) Conserved methylation of the glucocorticoid receptor gene exon 1(7) promoter in rats subjected to a maternal methyl-supplemented diet. *Int J Dev Neurosci* 28(1): 9–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.10.004>
8. *Poletaeva II, Surina NM, Ashapkin VV, Fedotova IB, Merzalov IB, Perepelkina OV, Pavlova GV* (2014) Maternal methyl-enriched diet in rat reduced the audiogenic seizure proneness in progeny. *Pharmacol Biochem Behav* 127: 21–26.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.018>
9. *Jaenisch R, Bird A* (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245–254.
<https://doi.org/10.1038/ng1089>
10. *Cheng D, Yan X, Gao Z, Xu K, Zhou X, Chen Q* (2017) Common and distinctive patterns of cognitive dysfunction in children with benign epilepsy syndromes. *Pediatr Neurol* 72: 36–41.
<http://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.12.005>
11. *Czerwińska A, Pawłowski T* (2020) Cognitive dysfunctions in depression – significance, description and treatment prospects. *Psychiatr Pol* 54(3): 453–466.
<https://doi.org/10.12740/PP/OnlineFirst/105415>
12. *Di Sciascio G, Furio MA, Palumbo C* (2015) Cognitive deficits in depressive illness: how many and which instruments to identify them? *Riv Psichiatr* 50(3): 110–117.
<https://doi.org/10.1708/1910.20790>
13. *Fedosova EA, Sarkisova KYu, Kudrin VS, Narkevich VB, Bazyan AS* (2015) Behavioral and Neurochemical Characteristics of Two Months Old WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Int J Clin Exp Neurol* 3(2): 32–44.
<https://doi.org/10.12691/IJCN-3-2-2 10>
14. *Malyshev AV, Zakharov AM, Sarkisova KYu, Dubynin VA* (2012) Reverse learning in WAG/Rij rats with depression-like behavior. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 62(5): 580–590.
<https://doi.org/10.1007/s11055-013-9869-y>
15. *Федосова ЕА, Шацкова АБ, Саркисова КЮ* (2022) Этосуксимид улучшает когнитивную гибкость при реверсивном обучении у крыс линии WAG/Rij с абсанс-эпилепсией и коморбидной депрессией. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(1): 36–58 [*Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KY* (2022) Ethosuximide improves cognitive flexibility during reversal learning in WAG/Rij rats with absence epilepsy and comorbid depression. *Russ J Physiol* 108(1): 36–58. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S086981392201006X 11>
16. *Leo A, Citraro R, Tallarico M, Iannone M, Fedosova E, Nesci V, De Sarro G, Sarkisova K, Russo E* (2019) Cognitive impairment in the WAG/Rij rat absence model is secondary to absence seizures and depressive-like behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 94: 109652.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109652 12>
17. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KY* (2021) Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 51(4): 501–512.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01097-z 13>
18. *Sarkisova KYu, Kuznetsova GD, Kulikov MA, van Luijtelaaar G* (2010) Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia* 51: 146–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02260.x 14>
19. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Folomkina AA* (2011) Does antiabsence drug ethosuximide exert antidepressant effect? *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 61(2): 227–235.
20. *Hänell A, Marklund N* (2014) Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci* 8: 252.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00252>
21. *Antunes M, Biala G* (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure and its modifications. *Cogn Process* 13: 93–110.
<https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
22. *Pavlova IV, Rysakova MP, Zaichenko MI, Broshevitskaya ND* (2020) Behavior of Rats with High and Low Levels of Freezing in Defensive Situations and on Selection of Food Reinforcement. *Neurosci Behav Physiol* 50: 126–136.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00878-x>
23. *Deuis J, Dvorakova L, Vetter I* (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10.
<https://doi.org/10.3389/fnfmol.2017.00284>
24. *Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE* (2010) Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17: 5–11.
<https://doi.org/10.1101/lm.1650110>

25. Shimoda S, Ozawa T, Ichitani Y, Yamada K (2021) Long-term associative memory in rats: Effects of familiarization period in object-place-context recognition test. *PLoS One* 16(7): e0254570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254570>
26. Botton PH, Costa MS, Ardaïs AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciu'ncula LO (2010) Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res* 214: 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.034>
27. Karson A, Utkan T, Balç F, Arıcıoğlu F, Ates N (2012) Age-dependent decline in learning and memory performances of WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Behav Brain Funct* 8: 51. <http://doi.org/10.1186/1744-9081-8-51>
28. Kunisato Y, Okamoto Y, Ueda K, Onoda K, Okada G, Yoshimura S, Suzuki S, Samejima K, Yamawaki S (2012) Effects of depression on reward-based decision making and variability of action in probabilistic learning. *J Behav Ther Exp Psychiatry* 43(4): 1088–1094. <https://doi.org/10.1016/j.jbtep.2012.05.007>
29. Henriques JB, Davidson RJ (2000) Decreased responsiveness to reward in depression. *Cogn Emot* 14(5): 711–724. <https://doi.org/10.1080/02699930050117684>
30. Dai Q, Feng Z (2012) More excited for negative facial expressions in depression: evidence from an event-related potential study. *Clin Neurophysiol* 123(11): 2172–2179. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.04.018>
31. Eshel N, Roiser JP (2010) Reward and punishment processing in depression. *Biol Psychiatry* 68(2): 118–124. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.027>
32. Fales CL, Barch DM, Rundle MM, Mintun MA, Snyder AZ, Cohen JD, Mathews J, Sheline YI (2008) Altered emotional interference processing in affective and cognitive-control brain circuitry in major depression. *Biol Psychiatry* 63(4): 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.06.012>
33. Dannlowski U, Ohrmann P, Bauer J, Kugel H, Arolt V, Heindel W, Kersting A, Baune BT, Suslow T (2007) Amygdala reactivity to masked negative faces is associated with automatic judgmental bias in major depression: a 3 T fMRI study. *J Psychiatry Neurosci* 32(6): 423–429.
34. Clark L, Chamberlain SR, Sahakian BJ (2009) Neurocognitive mechanisms in depression: implications for treatment. *Annu Rev Neurosci* 32: 57–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125618>
35. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JCC (2007) Behavioral Phenotypes of Disc1 Missense Mutations in Mice. *Neuron* 54: 387–402. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.015>
36. Чижова НД, Смирнова КВ, Дубровина НИ, Калугев АВ, Амстиславская ТГ (2023) Особенности угашения памяти о страхе у самцов и самок мышей Disc1-Q31L. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(12): 1898–1907. [Chizhova ND, Smirnova KV, Dubrovina NI, Kaluev AV, Amstislavskaya TG (2023) Peculiarities of Fear Memory Disturbance in Male and Female Disc1-Q31L Mice. *Russ J Physiol* 109(12): 1898–1907. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813923120038>

Maternal Methyl-Enriched Diet Improves Episodic Memory and Does Not Affect the Conditioned Fear Memory in Offspring of WAG/Rij Rats

E. A. Fedosova^{a, *}, A. B. Shatskova^a, and K. Yu. Sarkisova^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

The purpose of this study is to find out what effect the maternal methyl-enriched diet (MED) in the perinatal period exerts on cognitive functions in adult offspring of WAG/Rij rats, a genetic model of absence epilepsy with comorbid depression. Cognitive functions (learning and memory) were evaluated in tests of a novel object recognition (NOR) and a conditioning of fear memory (fear conditioning). The experiments were carry out on 6-months old male WAG/Rij rats. The mothers of the experimental group fed MED, and the mothers of the control group fed the control diet. The NOR test was used to assess episodic memory. This test is based on innate exploratory motivation (novelty preference motivation), which is usually reduced in depression. The conditioning of fear memory is the classic Pavlovian defensive conditioned reflex, manifested in the form of freezing reactions in response to negative reinforcement (electrical stimulation of paws). In the NOR test, in rats of the experimental group the recognition index (a measure of episodic memory), as well as the number of entries to the center of the arena (a measure of explorative motivation) were significantly higher compared with corresponding measures in the control group. However, no intergroup differences were found in the manifestation of the conditioned fear memory (% of freezing reactions) to the context and sound signal. The results indicate that the maternal MED improves episodic memory in the NOR test, but does not affect the conditioned fear memory associated with context and sound signal in adult offspring of WAG/Rij rats.

Keywords: absence epilepsy, comorbid depression, cognitive function, exploratory motivation, novel object recognition, episodic memory, fear memory, pain sensitivity, maternal methyl-enriched diet, WAG/Rij rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПОДАВЛЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ СНИЖАЕТ
ВЫРАЖЕННОСТЬ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ВЕТВЕЙ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ
И УЛУЧШАЕТ ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКОЙ
ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

© 2024 г. А. А. Карпов^{1,3,4}, А. А. Крылов^{1,2}, Л. А. Шиленко¹, А. М. Михайлова¹,
Д. Д. Ваулина^{1,*}, Д. Ю. Ивкин³, Н. П. Исакова², А. В. Воротилов¹, Н. Ю. Семенова¹,
В. А. Цинзерлинг¹, М. М. Галагудза¹

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

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

³Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава
России, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им.
В. И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: uplavice@gmail.com

Поступила в редакцию 26.02.2024 г.

После доработки 07.04.2024 г.

Принята к публикации 27.04.2024 г.

Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) – осложнение тром-
боэмболии легочной артерии, характеризующееся повышением давления в легочной
артерии и нарушением лизиса тромбоэмболов. Ранее было выявлено наличие асепти-
ческого воспаления при ХТЭЛГ в стенке ветвей легочной артерии и периваскулярно.
Однако роль этого воспаления в формировании ХТЭЛГ неизвестна. Целью исследо-
вания было изучить влияние асептического воспаления на формирование и прогрес-
сирование ХТЭЛГ. Эксперименты были выполнены на 54 крысах-самцах стока Wistar
конвенциональной категории. Модель ХТЭЛГ воспроизводилась путем многократно-
го внутривенного введения частично биodeградируемых микросфер. Сразу после по-
следнего введения микросфер все животные были разделены на группы: контрольная
ХТЭЛГ (к.ХТЭЛГ) – внутримышечно (в/м) вводился физиологический раствор в те-
чение 6 недель; низкая доза преднизолона (НД) – в/м вводился преднизолон в дозе
1.5 мг/кг; высокая доза (ВД) – преднизолон в дозе 6 мг/кг; здоровые животные. Через 6
недель выполнялись: тредмил-тест, эхокардиографическое исследование, катетериза-
ция сердца с манометрией, гистологическое исследование легких. В отдельной серии
экспериментов оценивалась выраженность воспалительной инфильтрации сосудистой
стенки и периваскулярной зоны с помощью иммуногистохимического исследования.
В группе НД отмечалось снижение индекса гипертрофии и процента коллагеновых во-
локон в сосудистой стенке по сравнению с к.ХТЭЛГ. Было отмечено значимо большее
снижение ИГ по сравнению с ВД. В группе ВД было выявлено положительное влияние
на процент коллагеновых волокон в структуре сосудистой стенки, этот показатель зна-
чимо не отличался от группы здоровых животных. По данным иммуногистохимиче-
ского исследования преднизолон в низкой дозе эффективно подавлял воспалительную

инфильтрацию сосудистой стенки и периваскулярного пространства. По результатам исследования выявлена способность преднизолонa путем подавления асептического воспаления снижать выраженность ремоделирования ветвей легочной артерии.

Ключевые слова: хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия, воспаление, фиброз, ремоделирование легочной артерии, преднизолон, крысы

DOI: 10.31857/S0869813924050109, **EDN:** BKNFTX

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) является одним из наиболее тяжелых осложнений тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) и характеризуется стабильным повышением давления в легочной артерии и нарушением лизиса тромбозов [1]. Повышенное давление в легочной артерии приводит к быстрому ремоделированию правого желудочка (ПЖ) и сосудов малого круга кровообращения, сердечной недостаточности и в конечном итоге к смерти [2]. Несмотря на развитие хирургических подходов к лечению ХТЭЛГ, таких как легочная эндартерэктомия (РЕА) и баллонная легочная ангиопластика, значительное число пациентов остается неоперабельными, или эффект от проведенного хирургического лечения недостаточен [3]. В этой связи консервативные подходы к лечению ХТЭЛГ имеют существенное значение. В настоящее время в качестве ЛАГ-специфических препаратов используются вазодилататоры малого круга кровообращения [2]. Однако даже при лечении ЛАГ-специфическими препаратами средняя пятилетняя выживаемость пациентов с неоперабельной ХТЭЛГ остается на уровне 53–69% [4, 5]. Поэтому более глубокое понимание патогенеза ХТЭЛГ могло бы способствовать разработке новых терапевтических стратегий.

Современные концепции утверждают, что ХТЭЛГ – это двойное сосудистое заболевание со стенозом, фиброзными сетями и окклюзиями в легочных артериях большого и среднего размера в области, где располагался тромбоз. Кроме того, отмечается формирование вторичной микроваскулопатии, затрагивающей преимущественно мелкие резистивные сосуды [6]. Характерными морфологическими признаками ремоделирования сосудистого русла при ХТЭЛГ в крупных сосудах является наличие организованных тромбов, атеросклеротических бляшек, разрушения эластических волокон меди. В мелких сосудах гистологическая картина близка к изменениям при легочной артериальной гипертензии: отмечается гипертрофия меди, формирование неоинтимы, плексиформных изменений, расширение различных типов анастомозов [7]. Одним из ключевых неблагоприятных факторов ремоделирования сосудистого русла вне зависимости от диаметра является отложение коллагена [8]. Фиброзирование сосудистой стенки приводит к увеличению ее жесткости, что, в свою очередь, ведет к повышению легочного сосудистого сопротивления и значительному ухудшению прогноза. При этом в целом ряде недавних исследований было показано наличие асептического воспаления как в стенке ветвей легочной артерии, так и периваскулярно [9, 10]. Кроме того, в тканях и плазме крови при ХТЭЛГ изменяется паракринный профиль. Многие исследования показывают повышение провоспалительных цитокинов в плазме крови, таких как интерлейкин ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), трансформирующий фактор роста бета (TGF β) [11, 12], С-реактивный белок и моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1/CCL2) [13]. Некоторые исследования отметили увеличение концентрации CXCL9, CXCL13 [12], CCL3 (MIP-1 α), CCL-5 (RANTES), CXCL10 (IP-10 (IFN γ -индуцируемый белок 10)) [14]. В большинстве исследований отмечено увеличение вазоконстриктора эндотелина-1 (ET-1) как показателя эндотелиальной дисфункции [15]. Также отмечено значительное увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток VCAM-1, ICAM-1 [16].

Однако роль этого воспаления в формировании и прогрессировании ХТЭЛГ неизвестна и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: изучить влияние асептического воспаления на формирование и прогрессирование ХТЭЛГ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе было использовано 54 крысы-самцы стока Wistar конвенциональной категории массой 223 ± 38 г. Все животные содержались в стандартизированных условиях вивария барьерного типа, имели неограниченный доступ к полнорационному гранулированному корму и воде.

Эмболизирующие частицы

В качестве эмболизирующих частиц были использованы частично биodeградируемые микросферы, полученные из ультрачистого альгината натрия (Sigma-Aldrich, США) с помощью электростатического инкапсулятора В-390 (Buchi, Швейцария). В качестве стабилизирующего агента использовали 2%-ный раствор хлорида бария. Целевой размер частиц – 180 ± 30 мкм. Все микросферы производились в стерильных условиях.

Расчет дозы преднизолона

Преднизолон вводился крысам в двух вариантах: низкая доза – 1.5 мг/кг и высокая доза – 6 мг/кг. С учетом разницы метаболических процессов это соответствует 0.25 мг/кг и 1 мг/кг для человека [17]. Доза для животного (мг/кг) рассчитывалась как произведение дозы для человека (мг/кг) и коэффициента преобразования (k), где k для крыс составляет 6 [18].

Дизайн исследования

В основной экспериментальной серии было использовано 44 животных. Для моделирования ТЭЛА микросферы в объеме 50 мкл были суспензированы в 1 мл физиологического раствора и вводились в хвостовую вену 8 раз с интервалом в 4 дня. После этого все животные случайным образом были разделены на следующие группы:

- Контрольная ХТЭЛГ (к.ХТЭЛГ) ($n = 10$) – животным сразу после последнего введения микросфер внутримышечно вводился физиологический раствор ежедневно в течение 6 недель.
- Низкая доза преднизолона (НД) ($n = 10$) – по аналогичному протоколу внутримышечно вводился преднизолон в дозе 1.5 мг/кг/сутки.
- Высокая доза преднизолона (ВД) ($n = 11$) – внутримышечно вводился преднизолон в дозе 6 мг/кг/сутки.
- Здоровые животные (Интакт) ($n = 10$).

Через 6 недель после последнего введения микросфер выполнялись следующие исследования: тредмил-тест, эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), измерение систолического давления в ПЖ (СДПЖ) путем катетеризации, гистологические исследования легких (рис. 1).

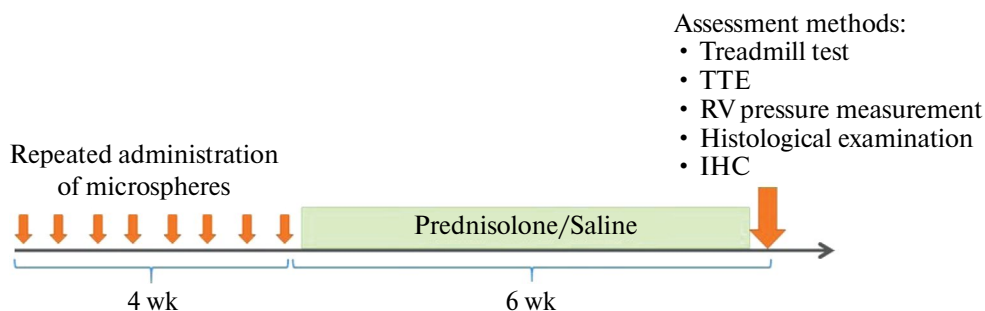


Рис. 1. Дизайн исследования.

Отдельная серия экспериментов была выполнена для иммуногистохимического исследования. Целью этого анализа стала оценка выраженности воспалительной инфильтрации сосудистой стенки и перифокальной зоны, определение ее клеточного состава, а также влияния преднизолона на эту инфильтрацию. В исследование было включено 10 животных. Моделирование ХТЭЛГ производилось по ранее описанному протоколу. После этого все выжившие животные были разделены на 3 группы:

- Контрольная ХТЭЛГ (к.ХТЭЛГ) ($n = 2$) – животным сразу после последнего введения микросфер внутримышечно вводился физиологический раствор ежедневно в течение 6 недель.
- Применение глюкокортикостероида ($n = 3$) – сразу после последнего введения микросфер внутримышечно вводился преднизолон в дозе 1.5 мг/кг/сутки ежедневно в течение 6 недель.
- Здоровые животные ($n = 3$).

Тредмил-тест

Оценка толерантности к физической нагрузке выполнялась с помощью аппарата Treadmill LE8710 (Harvard Apparatus, США). В ходе исследования производилось градIENTное увеличение каждые 30 с скорости вращения ленты: с 5 м/мин до 40 м/мин. Регистировалась пройденная каждым животным дистанция (м).

Эхокардиографическое исследование

ЭХО-КГ выполнялось с помощью ультразвуковой установки высокого разрешения MyLab One Touch SL 3116 (Esaote; Италия) с сосудистым линейным датчиком (частота – 13 МГц, глубина сканирования – 2 см). Животные были наркотизированы изофлураном, подаваемым ингаляционно с помощью SomnoSuite Low-Flow Anesthesia System (Kent Scientific, Torrington, CT, США). Ключевыми параметрами оценки были: диаметр легочного ствола (мм), максимальная скорость потока в легочной артерии (м/с), диаметр выносящего тракта ПЖ (мм), максимальная скорость потока в выносящем тракте ПЖ (м/с), систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана (TAPSE) (мм), частота сердечных сокращений (ЧСС), конечный диастолический размер левого желудочка (ЛЖ) (мм), конечный систолический размер ЛЖ (мм), фракция укорочения (ФУ) ЛЖ.

Катетеризация сердца с манометрией

Перед катетеризацией сердца животные были наркотизированы по протоколу, идентичному с проведением ЭХО-КГ. Животные располагались на термостатируемом столике TCAT-2LV Animal Temperature Controller (Physitemp Instruments Inc., США). Искусственная вентиляция легких осуществлялась с помощью аппарата SAR – 830/AP (CWE Inc., США). Параметры вентиляции: частота дыхания – 60/мин, дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела. Измерение СДПЖ выполнялось с помощью пункции верхушки.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования

Перед гистологическим исследованием животные были эвтаназированы путем передозировки изофлурана. Нижняя доля правого легкого была использована для гистологического и иммуногистохимического исследований. Она была разделена на 4 равные части. Срезы изготавливались толщиной 3–5 мкм и окрашивались методом Пикро – Маллори, специфичным к соединительной ткани. Анализ проводился в двух дистальных срезах легкого во всех идентифицированных сосудах, принадлежащих к ветвям легочной артерии. Исследование препаратов выполнялось с помощью микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) при увеличении от $\times 10$ до $\times 40$. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения Nis Elements Br4 (Nikon, Япония) и ImageJ (Wayne Rasband, США). В качестве критериев оценки ремоделирования легочных артерий были использованы следующие показатели: индекс гипертрофии сосудистой стенки, рассчитанный как отношение площади сосудистой стенки к площади всего сосуда в поперечном сечении в процентах, и процент коллагеновых волокон в структуре сосудистой стенки.

Для иммуногистохимического исследования использовалась поливалентная система визуализации EnVision FLEX, High pH (Dako, Дания). Для оценки воспалительной инфильтрации выявлялись маркеры: CD45 (общелейкоцитарный антиген, RTU, Dako, Дания), CD68 (моноциты/макрофаги, RTU, Dako, Дания), CD3 (Т-лимфоциты, RTU, Dako, Дания), CD20 (В-лимфоциты, RTU, Dako, Дания). Подсчет иммунных клеток осуществлялся с помощью наложения на микрофотографию сосуда сетки со стороной ячейки 32 мкм (площадь ячейки 1024 мкм²). Для каждого сосуда произвольно выбиралось 5 ячеек, захватывающих стенку сосуда и периваскулярную область. В выбранных зонах рассчитывалось количество меченых клеток с последующим определением среднего содержания клеток для каждого сосуда.

Анализ данных

Анализ полученных данных производился с помощью пакета программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft; США), GraphPad Prism (Dotmatics; США). Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Ме [Q1; Q3]). Учитывая небольшие размеры выборки и ненормальное распределение, различия проанализированы с использованием непараметрических тестов. Критерий Краскела – Уоллиса использован для определения общих различий между группами по всем протестированным конечным точкам. Парные сравнения между группами выполнены с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость животных

В основной серии экспериментов при введении микросфер смертность в группах моделирования ХТЭЛГ составила 6.8% (3 животных). Причинами смерти животных во всех случаях была острая правожелудочковая недостаточность и парадоксальная эмбо-

лия с развитием острой недостаточности мозгового кровообращения. В последующие 6 недель потерь животных не было (рис. 2).

В дополнительной серии, выполненной с целью иммуногистохимического исследования, смертность составила 2 животных. Причины смерти не отличались от основной серии.

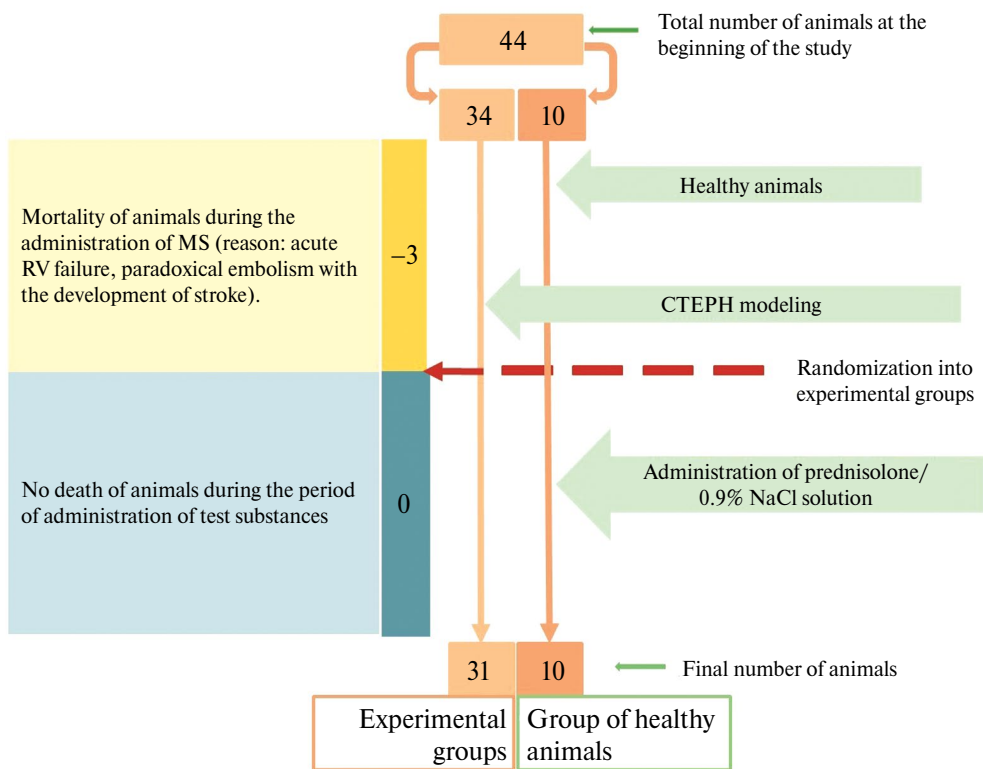


Рис. 2. Схема потерь экспериментальных животных в основной серии.

СТЕРН – хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия, MS – микросферы, RV – правый желудочек, Saline – физиологический раствор.

Эхокардиографическое исследование

По данным ЭХО-КГ в группе к.ХТЭЛГ было выявлено значимое снижение TAPSE по сравнению с группой здоровых животных ($p < 0.001$). В группах, получавших преднизолон, значимого снижения систолической функции ПЖ не отмечалось (рис. 3а). В группе НД было выявлено снижение $V_{\max}$ легочного ствола по сравнению со здоровыми животными ($p = 0.02$) (рис. 3б). По другим показателям значимых различий между исследуемыми группами получено не было (табл. 1).

Таблица 1. Результаты эхокардиографического исследования

Параметры	Интакт.	к.ХТЭЛГ	НД	ВД
Диаметр ЛС (мм)	3.04 [2.92; 3.13]	2.88 [2.82; 3.03]	2.98 [2.58; 3.54]	3.05 [2.85; 3.3]
Диаметр ВТПЖ (мм)	3.82 [3.11; 3.93]	3.74 [3.54; 3.81]	3.43 [3.35; 3,6]	3.61 [3.54; 3.78]
Vmax ВТПЖ (м/с)	2.67 [2.46; 2.78]	2.79 [2.62; 3.24]	2.75 [2.55; 2.89]	2.72 [2.56; 2.88]
ЧСС (в мин)	363 [335; 377]	366 [351; 394]	374 [369; 385]	365 [336; 396]
ФУ ЛЖ (%)	54.5 [49.4; 61.2]	48.3 [46.4; 53,4]	51.7 [48.0; 58.9]	49.7 [47.8; 51.7]

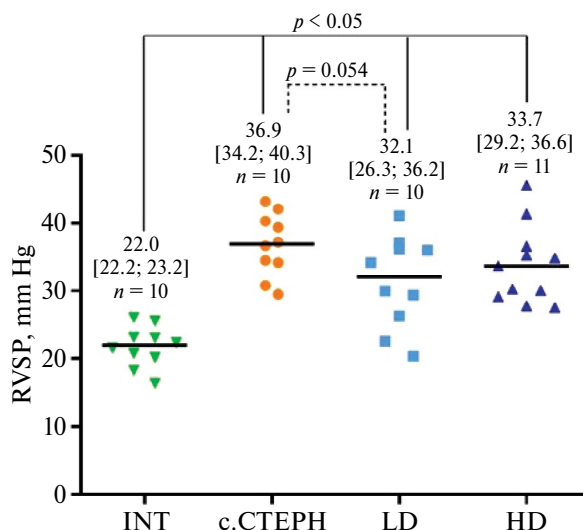
Интакт. – группа здоровых животных, к.ХТЭЛГ – группа контрольной хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, НД – низкая доза преднизолона, ВД – высокая доза преднизолона, ЛС – легочный ствол, Vmax – максимальная линейная скорость потока, ВТПЖ – выносящий тракт правого желудочка, ЧСС – частота сердечных сокращений, ЛЖ – левый желудочек, ФУ – фракция укорочения.

Тредмил-тест

По данным тредмил-теста толерантность к физической нагрузке в группах к.ХТЭЛГ и ВД была значимо ниже, чем у здоровых животных ($p < 0.001$). Напротив, в группе НД не было выявлено значимого снижения пройденной дистанции по сравнению со здоровыми животными ($p = 0.11$) (рис. 3б).

Катетеризация сердца с манометрией

По данным катетеризации сердца СДПЖ во всех экспериментальных группах было значимо выше по сравнению с группой здоровых животных ($p < 0.05$). При этом отмечалась тенденция ($p = 0.05$) к снижению СДПЖ в группе НД по сравнению с к.ХТЭЛГ (рис. 4).

**Рис. 4.** Систолическое давление в правом желудочке (RVSP) по данным катетеризации сердца.

INT – группа здоровых животных, с.СТЕРН – группа контрольной хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, LD – низкая доза преднизолона, HD – высокая доза преднизолона.

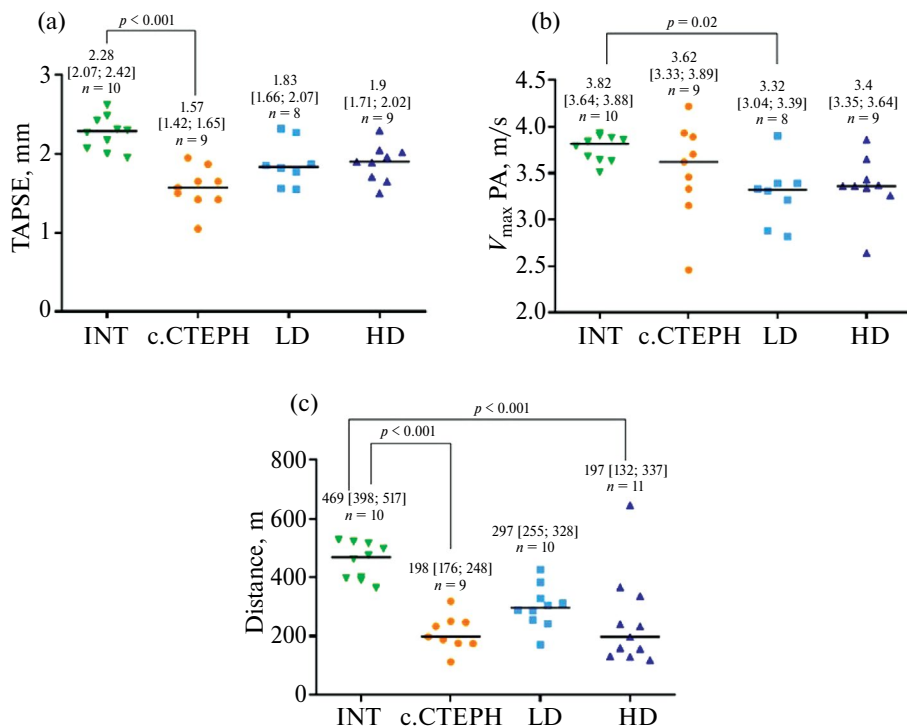


Рис. 3. Результаты неинвазивных тестов.

(а – б) – результаты эхокардиографического исследования. (а) – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана (TAPSE). (б) – максимальная линейная скорость потока ($V_{\max}$) в легочном стволе (ЛС). (с) – пройденная дистанция по данным тредмил-теста. Int – группа здоровых животных, с.СТЕРН – группа контрольной хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, LD – низкая доза преднизолона, HD – высокая доза преднизолона.

Гистологическое исследование

По данным гистологического исследования процент коллагеновых волокон в сосудистой стенке в исследуемых группах составил: к.ХТЭЛГ – 10.6 [5.8; 15.9]%, HD – 6.6 [4.1; 10.4]%, ВД – 5.4 [3.3; 11.2]%, в группе здоровых животных – 3.9 [1.4; 6.5]%. Было выявлено значимое повышение этого показателя в группах к.ХТЭЛГ и HD по сравнению со здоровыми животными ($p < 0.001$ и $p = 0.031$ соответственно). При этом как в группе HD, так и в группе ВД отмечалось снижение процента коллагеновых волокон по сравнению с группой к.ХТЭЛГ ($p = 0.001$ и $p < 0.001$ соответственно). Значимых различий между группами HD и ВД выявлено не было (рис. 5а – д).

Индекс гипертрофии сосудистой стенки в группе к.ХТЭЛГ 30.6 [24.8; 35.1]% был выше, чем в группе здоровых животных 25.4 [20.7; 30.2]% ($p = 0.036$). Значимых различий в группах HD 24.0 [20.6; 28.7]% и ВД 26.6 [21.7; 45.3]% по сравнению со здоровыми животными выявлено не было. Кроме того, в группе HD этот показатель был ниже, чем в группах ВД и к.ХТЭЛГ ($p < 0.001$) (рис. 5е). В просвете части ветвей легочной артерии диаметром 100–250 мкм обнаруживались нерастворенные микросферы, что указывало на частично сохранявшуюся обструкцию сосудистого русла.

По данным иммуногистохимического исследования общее количество лейкоцитов (CD45+ клетки) и отдельно количество макрофагов (CD68+ клетки), а также Т-лимфо-

цитов (CD3⁺ клетки) в группе к.ХТЭЛГ было выше, чем в группе здоровых животных ($p < 0.001$) и в группе ГКС ($p < 0.001$) (рис. 6а – б). Значимых различий по всем указанным маркерам между группами ГКС и здоровыми животными выявлено не было. При анализе количества В-лимфоцитов (CD20⁺ клетки) отмечалась та же тенденция: в группе к.ХТЭЛГ количество позитивных клеток было выше, чем в группе здоровых животных ($p = 0.008$) и в группе ГКС ($p < 0.001$). Однако было выявлено значимое снижение В-лимфоцитов в группе ГКС по сравнению со здоровыми животными ($p = 0.026$) (рис. 6д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом этого исследования стала выявленная способность преднизолона путем подавления асептического воспаления снижать выраженность ремоделирования ветвей легочной артерии.

В данном исследовании использовалась модель ХТЭЛГ, основанная на введении частично биodeградируемых микросфер из альгината натрия, в связи с тем, что она позволяет наиболее точно моделировать патогенез этой патологии у крыс [19]. Более того, в группе к.ХТЭЛГ были достигнуты все критерии моделируемой патологии [1]: стабильное повышение СДПЖ, остаточная обструкция сосудистого русла, снижение толерантности к физической нагрузке, выраженное ремоделирование ветвей легочной артерии, что свидетельствует об эффективности выбранного протокола моделирования. В сосудистой стенке и периваскулярном пространстве ветвей легочной артерии в группе к.ХТЭЛГ обнаруживалась значимая воспалительная инфильтрация с преимущественным содержанием CD68⁺ клеток (макрофаги). Эти данные согласуются с ранее опубликованными результатами, где использовался материал, полученный от пациентов с ХТЭЛГ [10].

С учетом того, что в настоящее время не существует препаратов для лечения ХТЭЛГ, которые использовались бы непосредственно для подавления асептического воспаления и связанного с ним фиброза [20, 21], в качестве эталона коррекции иммунной гиперреактивности в этом исследовании был выбран преднизолон в двух различных дозах: низкой дозы (1.5 мг/кг/сутки, что соответствует 0.25 мг/кг/сутки у человека) и высокой (6 мг/кг/сутки, что соответствует 1 мг/кг/сутки у человека). Иммуносупрессивное действие глюкокортикостероидов, в том числе преднизолона, обусловлено как супрессией генов, кодирующих провоспалительные цитокины (ФНО- α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), ИЛ-8), хемокины (CCL1, CCL5, CXCL8) и молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1), так и активацией транскрипции противовоспалительных белков, таких как аннексин-1, β 2-адренорецептор, ингибитор ядерного фактора κ B (I κ B- α), секреторная лейкопротеаза (SLPI), митоген-активируемая киназа фосфатаза-1 (МКР-1). В дальнейшем МКР-1 действует как ингибитор на пути MAP-киназы, необходимой для стабилизации мРНК таких цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , GM-CSF, COX-2 [22].

В настоящем исследовании применение преднизолона оказывало влияние как на ремоделирование сосудов малого круга кровообращения, так и на функциональные показатели, такие как толерантность к физической нагрузке и систолическая функция ПЖ. Кроме того, отмечалось значимое снижение воспалительной инфильтрации сосудистой стенки и периваскулярного пространства.

При использовании низкой дозы преднизолона (1.5 мг/кг/сутки) отмечалось снижение индекса гипертрофии и процента коллагеновых волокон в сосудистой стенке ветвей легочной артерии по сравнению с к.ХТЭЛГ. По данным ЭХО-КГ, в отличие от группы к.ХТЭЛГ, не было отмечено снижения систолической функции ПЖ, оцененной с помощью TAPSE, однако наблюдалось снижение V_{max} легочного ствола по сравнению со здоровыми животными. Данное изменение потребует уточнения в дальнейших исследованиях. Толерантность к физической нагрузке у животных из этой группы была наибольшей из всех опытных групп и значимо не отличалась от группы здоровых животных.

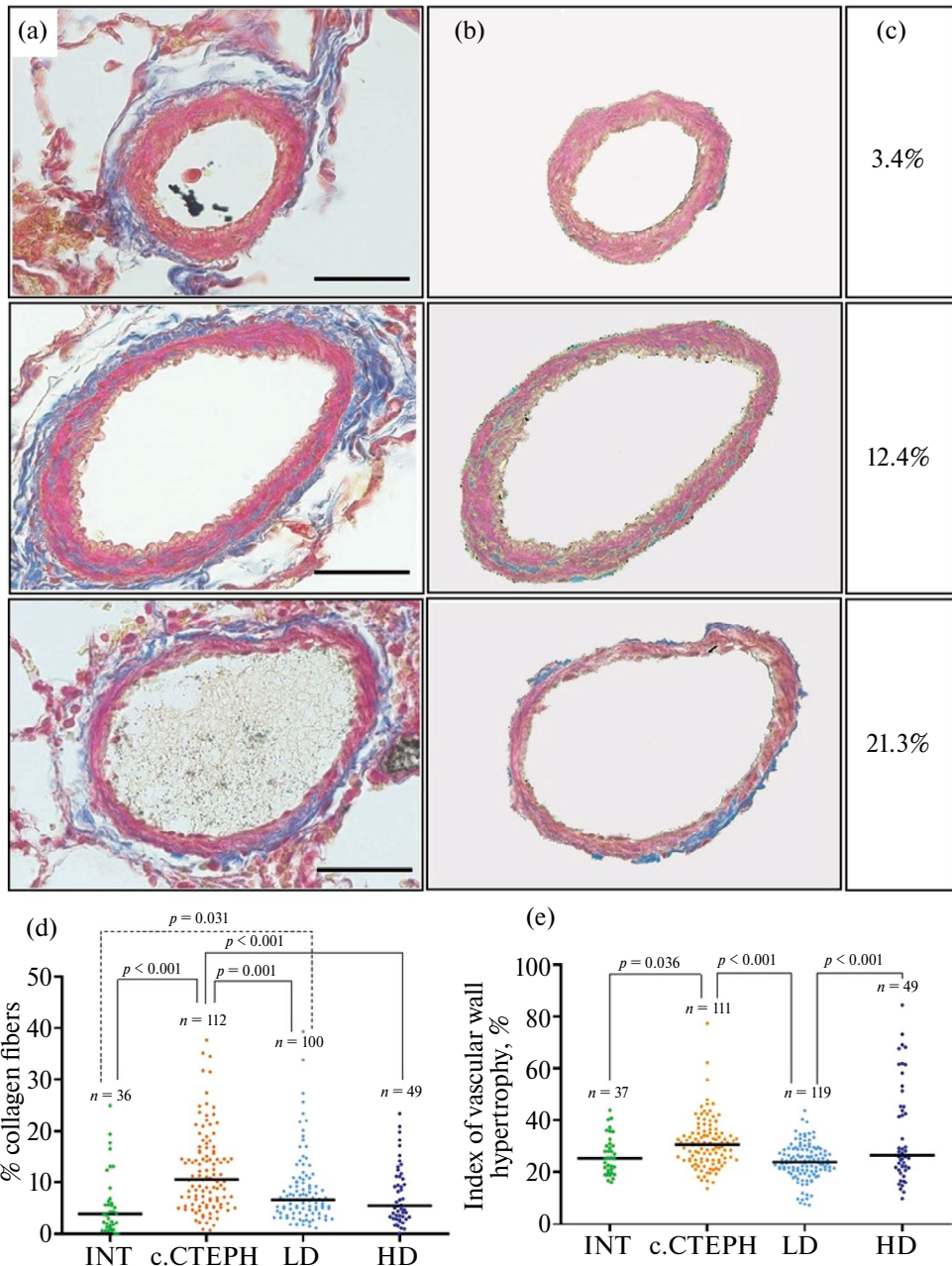


Рис. 5. Результаты гистологического исследования.

(а – б) – репрезентативные микрофотографии сосудов: (а) – окрашивание по методу Пикро – Маллори; (б) – выбор границ сосудов с помощью ImageJ (Wayne Rasband, США); (с) – номинальный процент фиброза сосудистой стенки на репрезентативных микрофотографиях; (д) – процент коллагеновых волокон в структуре сосудистой стенки ветвей легочной артерии в исследуемых группах; (е) – индекс гипертрофии сосудистой стенки. Одно деление = 100 мкм. INT – группа здоровых животных, с.СТЕРН – группа контрольной хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, LD – низкая доза преднизолона, HD – высокая доза преднизолона.

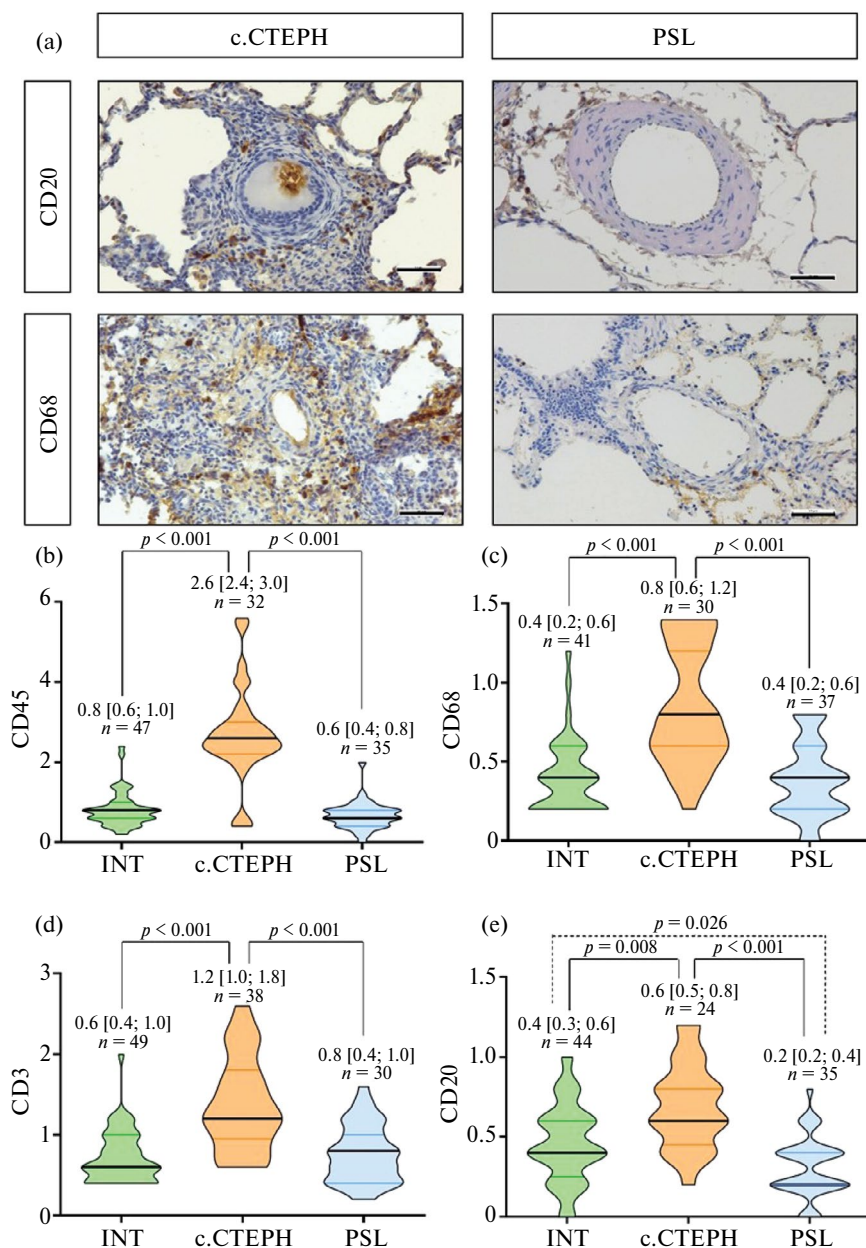


Рис. 6. Результаты иммуногистохимического исследования для оценки воспалительной инфильтрации сосудистой стенки и перифокальной области.

(a) – репрезентативные микрофотографии иммуногистохимических препаратов в группах к.ХТЭЛГ и ГКС: верхний ряд – окрашивание на CD20 (В-лимфоциты), нижний ряд – окрашивание на CD68 (моноциты / макрофаги). Позитивные клетки маркированы ярким коричневым окрашиванием мембран. (b–e) – среднее количество позитивных клеток в анализируемых ячейках для каждого сосуда. (b) – CD45 (общелейкоцитарный антиген); (c) – CD68 (моноциты / макрофаги), (d) – CD3 (Т-лимфоциты); (e) – CD20 (В-лимфоциты). Одно деление = 50 мкм. Int – группа здоровых животных, с.СТЕРН – группа контрольной хронической тромбоэмболической легочной гипертензии, PSL – группа применения низкой дозы преднизолона.

В группе применения высокой дозы преднизолона (6 мг/кг/сутки) было выявлено положительное влияние на процент коллагеновых волокон в структуре сосудистой стенки, этот показатель значимо не отличался от здоровых животных. Однако, в отличие от группы применения низких доз преднизолона, не было выявлено значимого снижения индекса гипертрофии по сравнению с группой к.ХТЭЛГ. Это, вероятнее всего, связано с тем, что высокие дозы преднизолона могут способствовать повышению давления в малом круге кровообращения за счет неиммунного механизма, как это происходит и в большом круге кровообращения. Подтверждением этого служат ранее опубликованные данные. Так, в статье Chapados с соавт. на модели асфиксии-реоксигенации новорожденных поросят продемонстрировано увеличение давления в легочной артерии после применения гидрокортизона в дозировке 1 мг/кг через 2 ч после его перорального введения. Авторы указали, что это связано с влиянием гидрокортизона на изменения уровня эндотелина-1, но не на NO, пероксинитрит, MMP-2 или MMP-9 [23]. Более того, похожий эффект глюкокортикостероидов был показан в работе Gluskowski с соавт. в ходе клинических исследований преднизолона на пациентах со 2-й или 3-й стадией саркоидоза [24]. Также косвенным подтверждением этого служит отсутствие снижения СДПЖ в группе высоких доз преднизолона по сравнению с к.ХТЭЛГ, в то время как в группе применения низких доз преднизолона отмечалась тенденция к снижению этого показателя ($p = 0.054$). На фоне использования высоких доз преднизолона отсутствовало отрицательное действие на уровень TAPSE, что положительно отличало эту группу от к.ХТЭЛГ. Однако толерантность к физической нагрузке, в отличие от группы НД, была снижена по сравнению со здоровыми животными.

Среди ранее опубликованных работ существует лишь несколько исследований, посвященных тестированию глюкокортикостероидов при лечении ХТЭЛГ. Kerr с соавт. [25] применили короткий курс метилпреднизолона непосредственно перед легочной тромбэндартерэктомией для предотвращения острого повреждения легких. Было продемонстрировано снижение уровней ИЛ-6 и ИЛ-8 наряду с увеличением ИЛ-10 в плазме крови, а также снижение ИЛ-1 и ИЛ-6 в бронхоальвеолярном лаваже через сутки после операции. Однако эти молекулярные изменения не повлияли на частоту острого повреждения легких.

В настоящем исследовании преднизолон, используемый в низкой дозе, эффективно подавлял воспалительную инфильтрацию сосудистой стенки и периваскулярного пространства, уменьшал выраженность ремоделирования ветвей легочной артерии не только за счет ограничения гипертрофии сосудистой стенки, но и за счет подавления отложения коллагена. Таким образом, была продемонстрирована существенная роль асептического воспаления в патогенезе развития и прогрессирования ХТЭЛГ. Полученные данные могут быть использованы при разработке новых подходов в лечении данной патологии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А. А. Карпов – разработка концепции и дизайна исследования, статистический анализ и интерпретация данных, участие в написании рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации. А. А. Крылов – анализ и интерпретация данных гистологического исследования. Л. А. Шиленко – проведение тредмил-теста, инвазивное измерение гемодинамики, анализ и интерпретация данных, участие в написании рукописи. А. М. Михайлова, Д. Д. Ваулина – изготовление эмболизующих частиц, участие в их внутривенном введении, статистический анализ данных, участие в написании рукописи. Д. Ю. Ивкин, Н. П. Исакова – статистический анализ и интерпретация данных, участие в написании рукописи. А. В. Воротилов – проведение тредмил-теста, инвазивное измерение гемодинамики, анализ и интерпретация данных. Н. Ю. Семенова, В. А. Цинзерлинг – проведение иммуногистохимического исследования, анализ и интерпретация данных. М. М. Галагудза – разработка концепции и дизайна исследования, участие в написании рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет гранта Российского научного фонда № 23–75–10122 <https://rscf.ru/project/23–75–10122/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения РФ (протокол БЭК СПбХФУ Rats-02.2019–5 от 12 февраля 2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R* (2019) Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53(1): 1801913. <https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018>
2. *Humbert M, Kovacs G, Hoepfer MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, Carlsen J, Coats AJS, Escribano-Subias P, Ferrari P, Ferreira DS, Ghofrani HA, Giannakoulas G, Kiely DG, Mayer E, Meszaros G, Nagavci B, Olsson KM, Pepke-Zaba J, Quint JK, Rådegran G, Simonneau G, Sitbon O, Tonia T, Toshner M, Vachiery JL, Vonk Noordegraaf A, Delcroix M, Rosenkranz S; ESC/ERS Scientific Document Group* (2022) 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 43(38): 3618–3731. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>
3. *Yang J, Madani MM, Mahmud E, Kim NH* (2023) Evaluation and Management of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Chest* 164(2): 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2023.03.029>
4. *Rådegran G, Kjellström B, Ekmehag B, Larsen F, Rundqvist B, Blomquist SB, Gustafsson C, Hesselstrand R, Karlsson M, Kornhall B, Nisell M, Persson L, Ryfstenius H, Selin M, Ullman B, Wall K, Wikström G, Willehadson M, Jansson K, Söderberg S, on behalf of SveFPH and SPAHR* (2016) Characteristics and survival of adult Swedish PAH and CTEPH patients 2000–2014. *Scand Cardiovasc J* 50(4): 243–250. <https://doi.org/10.1080/14017431.2016.1185532>
5. *Quadery SR, Swift AJ, Billings CG, Thompson AAR, Elliot CA, Hurdman J, Charalampopoulos A, Sabroe I, Armstrong IJ, Hamilton N, Sephton P, Garrad S, Pepke-Zaba J, Jenkins DP, Screaton N, Rothman AM, Lawrie A, Cleveland T, Thomas S, Rajaram S, Hill C, Davies C, Johns CS, Wild JM, Condliffe R, Kiely DG* (2018) The impact of patient choice on survival in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 52(3): 1800589. <https://doi.org/10.1183/13993003.00589-2018>
6. *Lang IM, Dorfmueller P, Vonk Noordegraaf A* (2016) The Pathobiology of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Ann Am Thorac Soc* 13 Suppl 3: S215–S221. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-620AS>
7. *Delcroix M, Vonk Noordegraaf A, Fadel E, Lang I, Simonneau G, Naeije R* (2013) Vascular and right ventricular remodelling in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 41(1): 224–232. <https://doi.org/10.1183/09031936.00047712>
8. *Andersen S, Reese-Petersen AL, Braams N, Andersen MJ, Mellekjær S, Andersen A, Bogaard HJ, Genovese F, Nielsen-Kudsk JE* (2023) Biomarkers of collagen turnover and wound healing in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients before and after pulmonary endarterectomy. *Int J Cardiol* 384: 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2023.05.016>
9. *Matthews DT, Hemnes AR* (2016) Current concepts in the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 6(2): 145–154. <https://doi.org/10.1086/686011>

10. Quarck R, Wynants M, Verbeken E, Meyns B, Delcroix M (2015) Contribution of inflammation and impaired angiogenesis to the pathobiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 46(2): 431–443.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00009914>
11. Zhang M, Zhang Y, Pang W, Zhai Z, Wang C (2019) Circulating biomarkers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 9(2): 2045894019844480.
<https://doi.org/10.1177/2045894019844480>
12. Koudstaal T, van Uden D, van Hulst JAC, Heukels P, Bergen IM, Geenen LW, Baggen VJM, van den Bosch AE, van den Toorn LM, Chandoesing PP, Kool M, Boersma E, Hendriks RW, Boomars KA (2021) Plasma markers in pulmonary hypertension subgroups correlate with patient survival. *Respir Res* 22(1): 137.
<https://doi.org/10.1186/s12931-021-01716-w>
13. Magoń W, Stępniewski J, Waligóra M, Jonas K, Przybylski R, Podolec P, Kopeć G (2022) Changes in Inflammatory Markers in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Treated with Balloon Pulmonary Angioplasty. *Cells* 11(9): 1491.
<https://doi.org/10.3390/cells11091491>
14. Zabini D, Heinemann A, Foris V, Nagaraj C, Nierlich P, Bálint Z, Kwapiszewska G, Lang IM, Klepetko W, Olschewski H, Olschewski A (2014) Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients. *Eur Respir J* 44(4): 951–962.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00145013>
15. Reesink HJ, Meijer RC, Lutter R, Boomsma F, Jansen HM, Kloek JJ, Bresser P (2006) Hemodynamic and clinical correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J* 70(8): 1058–1063.
<https://doi.org/10.1253/circj.70.1058>
16. Smolders VFED, Lodder K, Rodríguez C, Tura-Ceide O, Barberà JA, Jukema JW, Quax PHA, Goumans MJ, Kurakula K (2021) The Inflammatory Profile of CTEPH-Derived Endothelial Cells Is a Possible Driver of Disease Progression. *Cells* 10(4): 737.
<https://doi.org/10.3390/cells10040737>
17. Ferré A, Thille AW, Mekontso-Dessap A, Similowski T, Legriel S, Aegerter P, Demoule A; Réseau Européen de Recherche en Ventilation Artificielle (REVA) research network (2023) Impact of corticosteroids on the duration of ventilatory support during severe acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in patients in the intensive care unit: a study protocol for a multi-centre, randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Trials* 24(1): 231.
<https://doi.org/10.1186/s13063-023-07229-9>
18. Nair AB, Jacob S (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7(2): 27–31.
<https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
19. Karpov AA, Anikin NA, Mihailova AM, Smirnov SS, Vaulina DD, Shilenko LA, Ivkin DY, Bagrov AY, Moiseeva OM, Galagudza MM (2021) Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in Rats Caused by Repeated Intravenous Administration of Partially Biodegradable Sodium Alginate Microspheres. *Int J Mol Sci* 22(3): 1149.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031149>
20. Mukhopadhyay S, Johnson TA, Duru N, Buzza MS, Pawar NR, Sarkar R, Antalis TM (2019) Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution. *Front Immunol* 10: 1348.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01348>
21. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, Hoeper MM, Preston IR, Souza R, Waxman A, Escribano Subias P, Feldman J, Meyer G, Montani D, Olsson KM, Manimaran S, Barnes J, Linde PG, de Oliveira Pena J, Badesch DB; PULSAR Trial Investigators (2021) Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 384(13): 1204–1215.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024277>
22. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K (2005) Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 25(3): 552–563.
<https://doi.org/10.1183/09031936.05.00117504>
23. Chapados I, Lee TF, Chik CL, Cheung PY (2011) Hydrocortisone administration increases pulmonary artery pressure in asphyxiated newborn piglets reoxygenated with 100% oxygen. *Eur J Pharmacol* 652(1–3): 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.089>
24. Gluskowski J, Hawrylkiewicz I, Zych D, Zieliński J (1990) Effects of corticosteroid treatment on pulmonary haemodynamics in patients with sarcoidosis. *Eur Respir J* 3(4): 403–407.
25. Kerr KM, Auger WR, Marsh JJ, Devendra G, Spragg RG, Kim NH, Channick RN, Jamieson SW, Madani MM, Manecke GR, Roth DM, Shragg GP, Fedullo PF (2012) Efficacy of methylprednisolone in preventing lung injury following pulmonary thromboendarterectomy. *Chest* 141(1): 27–35.
<https://doi.org/10.1378/chest.10-2639>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИЛ – интерлейкин
ЛС – легочный ствол
ЛЖ – левый желудочек
ПЖ – правый желудочек
СДПЖ – систолическое давление в правом желудочке
ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии
ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа
ФУ – фракция укорочения
ХТЭЛГ – хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия
ЭХО-КГ – эхокардиографическое исследование
TAPSE – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана
Vmax – максимальная линейная скорость потока

Suppression of Aseptic Inflammation Reduces the Severity of Remodeling of the Pulmonary Artery Branches and Improves Progressing of Experimental Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

A. A. Karpov^{a, c, d}, A. A. Krylov^{a, b}, L. A. Shilenko^a, A. M. Mihailova^a, D. D. Vaulina^{a, *}, D. Yu. Ivkin^c, N. P. Isakova^b, A. V. Vorotilov^a, N. Y. Semenova^a, V. A. Zinserling^a, and M. M. Galagudza^a

^aAlmazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

^bHerzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg, Russia

^cSaint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

^dSaint-Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: uplavice@gmail.com

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a complication of pulmonary embolism, characterized by increased pressure in the pulmonary artery and impaired lysis of thromboemboli. Previously, the presence of aseptic inflammation in CTEPH was identified in the wall of the pulmonary artery branches and perivascularly. However, the role of this inflammation in the CTEPH formation is unknown. The aim of the work was to study the effect of aseptic inflammation on the CTEPH formation and progression. The experiments were performed on 54 male rats. The CTEPH model was reproduced by repeated intravenous administration of partially biodegradable microspheres (MS). Immediately after the last administration of MS, all animals were divided into groups: control CTEPH (c.CTEPH) – saline solution was administered intramuscularly (i/m) for 6 weeks; low dose of prednisolone (LD) – prednisolone was administered i/m at a dose of 1.5 mg/kg; high dose (HD) – prednisolone was administered i/m at a dose of 6 mg/kg; healthy animals. After 6 weeks, the following was performed: treadmill test, TTE, cardiac catheterization with manometry, and histological examination of the lungs. In a separate series of experiments, the severity of inflammatory infiltration of the vascular wall and perivascular zone was assessed by immunohistochemical studies (IHC). In the LD group, there was the decreasing of hypertrophy index (HI) and the percentage of collagen fibers in the vascular wall compared to c.CTEPH. There was a significantly greater reduction in HI compared to HD. In the HD group, there was positive effect on the percentage of collagen fibers in the vascular wall, this parameter did not significantly differ from healthy animals. According to IHC data, prednisolone in low dose effectively suppressed inflammatory infiltration of the vascular wall and perivascular space. The results of the study revealed the ability of prednisolone, by suppressing aseptic inflammation, to reduce the severity of remodeling of the pulmonary artery branches.

Keywords: chronic thromboembolic pulmonary hypertension, inflammation, remodeling of the pulmonary artery, fibrosis, prednisolone, rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ КАРДАРИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ БЕЛКОВ,
ВОВЛЕЧЕННЫХ В ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗ, В ГИППОКАМПЕ КРЫС
В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2024 г. А. Р. Харисова¹, А. И. Рогинская¹, О. Е. Зубарева¹

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

* E-mail: ZubarevaOE@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принята к публикации 24.04.2024 г.

В последние годы активно обсуждается роль в патогенезе эпилепсии астро- и микроглиальных клеток и связанного с ними нейровоспаления. Эти клетки могут быть в разных функциональных состояниях, крайние из которых A1 и M1 фенотипы продуцируют преимущественно провоспалительные (способствующие эпилептогенезу) белки, а A2 и M2 фенотипы – противовоспалительные (предотвращающие эпилептогенез) белки. Предполагается, что использование препаратов, способных стимулировать поляризацию от M1 и A1 к M2 и A2 фенотипам, может стать успешной стратегией лечения эпилепсии. К таким препаратам относятся агонисты ядерных рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs). Целью данной работы стало изучение изменений экспрессии микро- и астроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза, в дорзальном гиппокампе крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии и исследование влияния на эти процессы агониста PPAR бета/дельта кардарина. Кардарин вводили на начальных этапах эпилептогенеза (в течение 7 дней после индукции TLE модели), через два месяца (хроническая фаза модели) проводили анализ экспрессии генов интереса в дорзальном гиппокампе методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Проведенное исследование выявило изменение экспрессии генов астро- и микроглиальных белков в процессе эпилептогенеза, в основном связанное с усилением нейровоспалительных процессов и ослаблением нейропротекторных свойств этих клеток. У TLE крыс увеличивалась экспрессия генов маркеров активации астро- (*Gfap*) и микроглии (*Aif1*), про- (*Il1b*, *Nlrp3*) и противовоспалительных (*Il1rn*) белков, маркеров фенотипа A1 астроцитов (*Lcn2*, *Gbp2*) и ростовых факторов (*Bdnf*, *Fgf2*). Экспрессия гена защитного M2 фенотипа *Arg1* снижалась у TLE крыс. Наиболее яркий эффект введения кардарина проявился в усилении экспрессии гена маркера A2 фенотипа астроцитов *S100a10*.

Ключевые слова: литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии, кардарин (GW 501516), глия, провоспалительные гены, M1/M2 поляризация, A1/A2 поляризация, трофические факторы

DOI: 10.31857/S0869813924050115, **EDN:** BKJEXJ

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных и тяжелых неврологических заболеваний [1]. Около 30% больных эпилепсией оказываются нечувствительными к существующим методам лечения [2]. Используемые в клинике препараты устраняют симптомы заболевания, но они не позволяют полностью предотвратить эпилептогенез [3]. Более чем у 17% пациентов прием используемых в клинике противосудорожных препаратов приводит к развитию нежелательных побочных нервно-психических нарушений [4]. Поэтому поиск новых методов лечения, способных предотвращать развитие эпилептических процессов и связанных с ними нарушений, является актуальной проблемой.

Традиционно развитие эпилептических нарушений в мозге связывают с дисбалансом активности возбуждающих и тормозных систем в нейронных сетях [5], однако в последнее время появляется все больше данных о роли в патогенезе эпилепсии микро- и астроглиальных клеток, а также связанных с ними процессов: нейровоспаления и метаболических нарушений [6, 7]. Роль нейровоспаления в патогенезе острых судорог и эпилепсии доказана с помощью применения противовоспалительной терапии [8], использования животных, нокаутных по гену рецептора провоспалительного цитокина интерлейкина-1 [9] и в других моделях. Астро- и микроглиальные клетки играют ключевую роль в индукции воспалительных реакций в мозге [10]. При этом они могут быть в различных функциональных состояниях, крайние из которых соответственно A1 и M1 фенотипы продуцируют преимущественно провоспалительные (способствующие эпилептогенезу), а A2 и M2 фенотипы – противовоспалительные (предотвращающие эпилептогенез) белки. Выдвинута гипотеза, согласно которой успешной стратегией лечения заболеваний, патогенез которых связан с нейровоспалением, включая эпилепсию, может быть использование препаратов, способных стимулировать поляризацию от M1 и A1 к M2 и A2 фенотипам [11, 12].

Среди препаратов, способных влиять на поляризацию глиальных клеток, снижать выраженность нейровоспалительных процессов, регулировать липидный и энергетический обмен, в настоящее время активно изучаются агонисты ядерных рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs) [13, 14]. PPARs бывают трех типов – альфа (α), бета/дельта (β/δ) и гамма (γ). Все типы PPARs экспрессируются в различных клетках организма, включая клетки мозга: они обнаружены в нейронах [15], олигодендроцитах [16], микроглии [17] и астроцитах [18]. Естественными лигандами этих рецепторов являются свободные жирные кислоты, эйкозаноиды и др. [19]. Выявлено, что терапевтические эффекты кетогенной диеты опосредуются PPARs [20]. Нейропротекторные свойства синтетических агонистов PPARs показаны в моделях различных нейропатологий, включая эпилепсию [21, 22]. Наибольшее число работ, выполненных на моделях эпилепсии, посвящено описанию защитных свойств агонистов PPAR γ [23]. В частности, эти эффекты были показаны на модели острых судорог, индуцированных пентилентетразолом [23], и на модели хронической височной эпилепсии [24]. Защитное действие агонистов PPAR γ при эпилепсии реализуется через подавление окислительного стресса и нейровоспаления [24, 25]. Значительно хуже в экспериментальных моделях эпилепсии исследованы свойства агонистов PPARs других типов – альфа и бета/дельта, несмотря на то, что они также показывают противовоспалительные свойства в других моделях нервных заболеваний [26].

В данной работе мы исследовали эффекты агониста PPAR β/δ кардарина (GW 501516) в хронической литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс. Данная модель по патофизиологическим, патоморфологическим, биохимическим и поведенческим показателям достаточно точно воспроизводит патологические процессы, наблюдающиеся при развитии височной эпилепсии у людей [27, 28]. В частности, после индукции патологического процесса (у человека – травма или другая па-

тология, провоцирующая эпилептогенез, в модели – введение пилокарпина) сначала судороги не проявляются (латентный период), а затем развиваются спонтанные рецидивирующие судороги (хронический период). В проведенном исследовании мы оценили влияние введений кардарина в латентный период TLE модели на наблюдаемые в хронический период модели изменения экспрессии генов микроглиальных и астроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Работа выполнена на 7–8-недельных самцах крыс аутбредной линии Вистар, масса тела 110–210 г (среднее – 140.2 ± 27.7 г). Животных содержали в стандартных условиях по 4–6 крыс в клетке при 12-часовом световом цикле (ночь – с 8 вечера до 8 утра). На протяжении всего эксперимента животные имели свободный доступ к корму и воде.

Литий-пилокарпиновая модель и введение кардарина

Схема эксперимента представлена на рис. 1. Для моделирования височной эпилепсии (TLE) крысам внутрибрюшинно (в/б) вводили 127 мг/кг хлорида лития (LiCl, Sigma-Aldrich, США), что позволяло снизить дозу пилокарпина и уменьшить смертность животных [29]. 23 ч спустя крысам вводили (–) скополамин метилбромид (в/б, 1 мг/кг, Sigma-Aldrich) для предотвращения периферических эффектов пилокарпина и через 1 ч – агонист мускариновых рецепторов пилокарпин (в/б, Sigma-Aldrich). Пилокарпин вводили поэтапно по 10 мг/кг каждые 30 мин до развития 4-й стадии судорог (rearing) по модифицированной шкале Racine [30]. Суммарная доза пилокарпина составляла 20–40 мг/кг. Крысы, у которых после четвертой инъекции (40 мг/кг) судороги не развились, были исключены из эксперимента. Судороги останавливали через 90 мин введением диазепама (в/б, 10 мг/кг, Sigma-Aldrich). Контрольным животным вводили раствор LiCl. Ранее нами было показано, что подобная схема индукции модели вызывает развитие TLE у большинства экспериментальных животных [8].

Далее крысы случайным образом были разделены на 4 группы (всего 47 животных): 1) контрольная нелеченая группа крыс (Cntr+Veh; $n = 6$), которым вводился растворитель (1 мл/кг диметилсульфоксид, DMSO, в/б); 2) экспериментальная группа без терапии – крысы, которым вводили пилокарпин с растворителем (TLE+Veh; $n = 7$); 3) контрольные животные с введением кардарина (GW 501516; 2.5 мг/кг, в/б), растворенного в DMSO (Cntr+GW; $n = 7$); 4) экспериментальная группа с лечением (TLE+GW; $n = 7$). DMSO использовался в качестве растворителя, поскольку кардарин нерастворим в воде. Кардарин вводили 1 раз в день в указанной дозе в течение первой экспериментальной недели. Первая инъекция была сделана через сутки после введения пилокарпина. Указано число выживших животных, использованных для биохимического анализа. Немногим более 30% леченых и нелеченых крыс, которым вводили пилокарпин, погибли в процессе эксперимента. Кардарин не влиял на выживаемость животных. Для улучшения выживаемости в первые дни после введения пилокарпина экспериментальные крысы получали специальный уход: их кормили влажным кормом (фрукты, каши). Животным, которые сильно теряли вес, вводили внутримышечно 15%-ный раствор глюкозы.

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией

Через 120 дней после индукции TLE животных декапитировали. Мозг быстро извлекали и замораживали при температуре -80°C . Выделение ткани мозга производили на срезах, сделанных на замораживающем микротоме OTF5000 (Bright Instruments, Лутон, Великобритания) при температуре -20°C . Дорзальную область гиппокампа (рис. 1) вы-

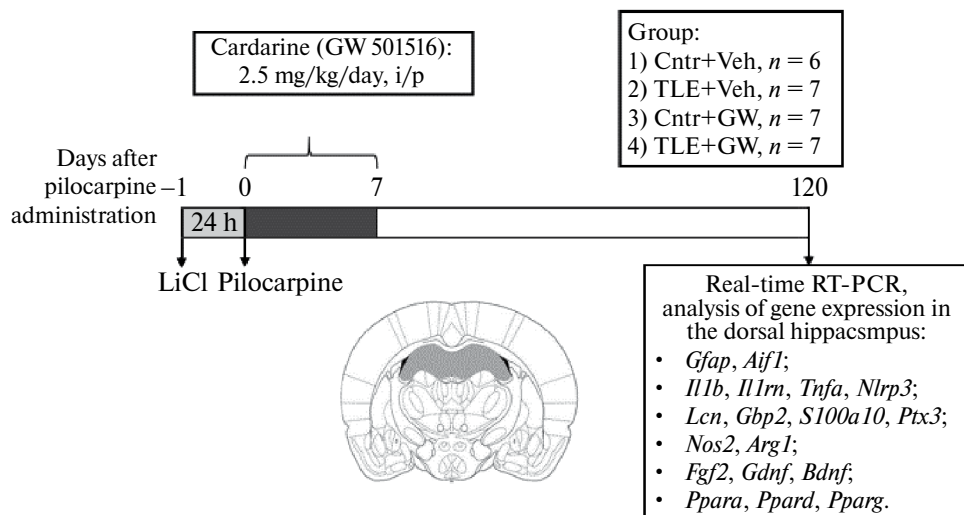


Рис. 1. Схема эксперимента. Cntr+Veh – контрольная группа без введения кардарина; TLE+Veh – экспериментальная группа без введения кардарина; Cntr+GW – контрольная группа с введением кардарина; TLE+GW – экспериментальная группа с введением кардарина. На срезе мозга представлена схема выделения дорзального гиппокампа.

деляли согласно атласу мозга крыс [31]. Гиппокамп был выбран для анализа как структура, играющая ключевую роль в развитии TLE [32]. Схема выделения представлена на рис. 1. Тотальную РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) на основе поглощения при 260 нм и соотношении поглощения при 260/280 нм соответственно.

Далее проводили обратную транскрипцию. Для синтеза кДНК мы использовали 1 мкг тотальной РНК, олиго-dT (0.5 мкг на 1 мкг РНК) и 9-мерные случайные праймеры (0.25 мкг на 1 мкг РНК, ООО "Синтез ДНК", Москва, Россия), 100 единиц обратной транскриптазы М-MLV (Evrogen) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию проводили в общем объеме 20 мкл. Полученную кДНК разводили в 10 раз перед проведением ПЦР.

ПЦР проводили с использованием технологии TaqMan на термочиклере C1000 Touch в сочетании с CFX384 Touch™ (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) в общем объеме 6 мкл с 0.8 мкл кДНК, 0.5 единиц Taq М-полимеразы (Alkor Bio, Санкт-Петербург, Россия), 3.5 mM MgCl₂ и специфическими прямыми и обратными праймерами и зондами. Последовательности праймеров и зондов, а также полные названия генов приведены в табл. 1, они были изготовлены ООО "ДНК-Синтез". Все пробы были проанализированы в 3 повторах.

В работе анализировали мРНК генов белков, уровень экспрессии которых изменяется в эпилептогенезе (см. ссылки далее): 1) маркеров активации астроглиальных (*Gfap*) [33] и микроглиальных (*Aif1*) [34] клеток; 2) провоспалительных (*Il1b*, *Nlrp3*, *Tnfa*) и противовоспалительных (*Il1rn*) белков [3, 35]; 3) маркеров провоспалительного (A1) (*Lcn2*, *Ptx3*) и нейротрофического фенотипа (A2) астроглии (*S100a10*, *Gbp2*) [12, 36]; маркеров провоспалительного M1 (*Nos2*) [37] и противовоспалительного M2 (*Arg1*, *Tgfb1*) фенотипов микроглии [38, 39]; 4) нейротрофических факторов *Fgf2* [40],

Bdnf [40, 41], *Gdnf* [42]. Кроме того, мы оценили влияние кардарина на экспрессию генов PPARs (*Ppara*, *Ppard*, *Pparg*) [23, 26].

Относительная экспрессия генов интереса была рассчитана методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [43]. Нормализация данных была выполнена по среднему геометрическому значению для трех наиболее стабильных референсных генов, выбранных из 9 референсных генов (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*). Референсные гены были отобраны на основе всестороннего ранжирования, полученного с помощью онлайн-инструмента RefFinder® (<http://blooge.cn/RefFinder/>) в соответствии с описанным ранее протоколом [44]. В проведенном исследовании для нормализации данных были использованы следующие референсные гены: *Sdha*, *Gapdh* и *Ywhaz*.

Таблица 1. Используемые последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'
<i>Actb</i> (actin beta) NM_031144 [45] (праймеры) [44] (зонд)	TGTCACCAACTGGGACGATA GGGGTGTGAAGGTCTCAAA FAM-CGTGTGGCCCTGAGGAGCAC-BHQ1
<i>Gapdh</i> (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) NM_017008 [46]	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTC R6G-ATCACGCCACAGCTTTCAGAGGG-BHQ2
<i>B2m</i> (beta-2-microglobulin) NM_012512 [47]	TGCCATTCAGAAACTCCCC GAGGAAGTTGGGCTTCCCATTT ROX-ATTCAGTGTACTCTCGCCATCCACCG-BHQ1
<i>Rpl13a</i> (ribosomal protein L13a) NM_173340 [48] (праймеры) [44] (зонд)	GGATCCCCTCCACCTATGACA CTGGTACTTCCACCCGACCTC FAM-CTGCCCTCAAGGTTGTGCGGCT-BHQ1
<i>Sdha</i> (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A) NM_130428 [49] (праймеры) [44] (зонд)	AGACGTTTGACAGGGGAATG TCATCAATCCGCACCTTGTA R6G-ACCTGGTGGAGACGCTGGAGCT-BHQ2
<i>Ppia</i> (peptidylprolyl isomerase A) NM_017101 [44]	AGGATTCATGTGCCAGGGTG CTCAGTCTTGGCAGTGCAGA ROX-CACGCCATAATGGCACTGGTGGCA-BHQ1
<i>Hprt1</i> (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) NM_012583 [48] (праймеры) [44] (зонд)	TCCTCAGACCGCTTTTCCCGC TCATCATCACTAATCACGACGCTGG FAM-CCGACCGGTTCTGTGCATGTCGACCCT-BHQ1

Продолжение таблицы 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'
<i>Pgk1</i> (phosphoglycerate kinase 1) NM_053291 [50] (праймеры) [44] (зонд)	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTC R6G-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2
<i>Ywhaz</i> (tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein zet) NM_013011 [50] (праймеры) [44] (зонд)	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ1
<i>Il1b</i> (interleukin 1 beta) NM_031512 [51]	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC FAM-TGTCCCGACCATGCTGTTTCCTAG-BHQ1
<i>Aif1</i> (allograft inflammatory factor 1) NM_017196.3 [51]	CAACACACTGCAGCCTCATC AAGCTTTTCCTCCCTGCAAA Cy5-CCCCACCTAAGGCCACCAGCGTCTGA-BHQ3
<i>Gfap</i> (glial fibrillary acidic protein) NM_017009.2 [52]	TGGCCACCAGTAACATGCAA CAGTTGGCGGCGATAGTCAT HEX-CGGTCCAAGTTTGAGACCTCACAG-BHQ2
<i>Il1rn</i> (interleukin 1 receptor antagonist) NM_022194.2 [52]	GGGGACCTTACAGTCACCTAAT GGTTAGTATCCAGATTCTGAAGG ROX-AGTCAGCTGGCCACCCTGCTGGGA-BHQ2
<i>Nlrp3</i> (NLR family pyrin domain containing 3) NM_001191642	CAGACCCTCATGTTGCCTGT AGACCTCGGCAGAAGCTAGA FAM-CCAGACTGGTGAAGTCTGCCTCA-BHQ1
<i>Lcn2</i> (lipocalin 2) NM_130741.1	AGCTACGATGTGCAAGTGGC CCCCTTGGTTCTTCCGTACA FAM-CGACACTGACTACGACCAGTTGCCA-BHQ1
<i>Arg1</i> (arginase 1) NM_017134.3 [53] (праймеры)	AGCTGGGAATTGGCAAAGTG AACTCAGGTGAATGGGCCTT HEX-TGGAAGAGACCTTCAGCTACCTGC-BHQ2
<i>S100a10</i> (S100 calcium binding protein A10) NM_031114.1	CATTTCACAGGTTTGAGGGG GCACTGGTCCAGGTCTTTCA Cy5-AGGACCCTCTGGCTGTGGACA-BHQ3

Окончание таблицы 1

Ген	Последовательность праймеров и зондов 5' → 3'
<i>Ptx3</i> (pentraxin 3) NM_001109536.2	AAACTTCGCCTCTCCAGCAA CATGGTGTGGGGTCTCTCG HEX-TGCTCTCTGGTCTGCAGTGTGGC-BHQ2
<i>Gbp2</i> (guanylate binding protein 2) NM_133624.2	AGTCAATGGGCCACGTCTAA AGTGGGTGATGGCCTTTTGT HEX-AGCAGTGGGTCTCTCCCCTGCA-BHQ2
<i>Nos2</i> (nitric oxide synthase 2) NM_012611.3 [54]	CAGAAGCAGAATGTGACCATCAT CGGAGGGACCAGCCAAATC ROX-CCACCACACAGCCTCAGAGTCCTT-BHQ2
<i>Ppara</i> (peroxisome proliferator activated receptor alpha) NM_013196.2 [55] (праймеры) [52] (зонд)	AATCCACGAAGCCTACCTGA GTCTTCTCAGCCATGCACAA FAM-AGGCCCGGGTCATACTCGCAGGAA-BHQ1
<i>Ppard</i> (peroxisome proliferator activated receptor delta) NM_013141.2 [52]	CAAACCCACGGTAAAGGCGG TGGCTGTTCATGACTGACC HEX-CCAGGCCTGCAGGCGCCACGCCA-BHQ2
<i>Pparg</i> (peroxisome proliferator activated receptor gamma) NM_013124.3 [56] (праймеры) [52] (зонд)	CCTGAAGCTCCAAGAATACC GATGCTTTATCCCCACAGAC HEX-CCCTCATGGCCATCGAGTGCC-BHQ2
<i>Gdnf</i> (glial cell derived neurotrophic factor) NM_019139.2	GACCGGATCCGAGGTGC GCGCTTCGAGAAGCCTCTTA HEX-TGCCTTCCCGCTGCCCCGCCG-BHQ2
<i>Bdnf</i> (brain derived neurotrophic factor) NM_001270630.1	CCATAAGGACGCGGACTTGTAC GAGGAGGCTCAAAGGCACTT ROX-CTTCCCGGGTGATGCTCAGCAGT-BHQ2
<i>Fgf2</i> (fibroblast growth factor 2) NM_019305.2	AGCGGCTCTACTGCAAGAAC TGGAGCTGTAGTTTGACGTGT R6G-AGACGGCCGCGTGGACGGCGTCCG-BHQ2

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводился с использованием программ SPSS Statistics 23 (IBM, США) и GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Выбросы определяли с помощью квартильного метода. Для проверки нормальности распределений использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Однородность дисперсии оценивали по методу Ливиня. Для данных с нормальным распределением использовался двухфакторный ANOVA (модель x лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака, для ненормально распределенных данных и для групп с большой разницей в дисперсиях – тест Крускала – Уоллиса с последующим апостериорным тестом множественных сравнений Данна. Данные на графиках представлены в виде среднего и стандартных ошибок (в случае нормального распределения данных) либо в виде медианы и квартилей (для ненормально распределенных данных). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку эпилептогенез сопровождается астро- и микроглиозом, связанными с развитием спонтанных рецидивирующих судорог [57], мы оценили экспрессию генов маркеров активации астроцитов (*Gfap*) и микроглии (*Aifl*) у леченых и нелеченых TLE крыс. Показано, что экспрессия названных генов резко возрастает в процессе формирования TLE ($p < 0.001$). Кардарин не оказывал влияния на экспрессию этих генов (рис. 2), аналогичные изменения наблюдались как у леченых, так и нелеченых крыс.

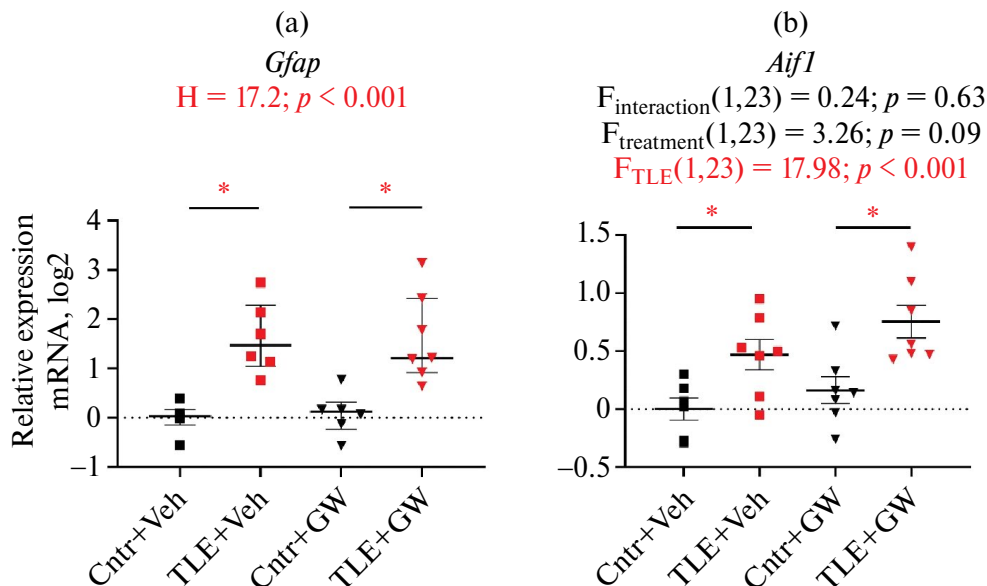


Рис. 2. Относительная экспрессия генов маркера активации астроцитов *Gfap* (a) и микроглиальных клеток *Aifl* (b) в дорзальном гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс; * $p < 0.05$, двухфакторный ANOVA (модель x лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака или непарметрический аналог ANOVA тест Крускала – Уоллиса с апостериорным тестом множественных сравнений Данна.

Учитывая важную роль нейровоспаления в развитии эпилептических процессов [3], мы также оценили экспрессию генов провоспалительных и противовоспалительных белков в гиппокампе экспериментальных животных. TLE крысы отличались повышенной экспрессией провоспалительных генов *Il1b* (seizure – $F_{1,19} = 9.23$; $p < 0.01$) и *Nlrp3* ($H = 14.37$; $p < 0.01$) (рис. 3), однако апостериорные сравнения не выявили достоверного отличия леченых и нелеченых экспериментальных крыс от контроля по показателям экспрессии гена *Il1b*. По уровню мРНК *Nlrp3* достоверные различия между контрольными и TLE крысами обнаружены только в группах животных, которым вводили кардарин ($p < 0.01$). Экспрессия провоспалительного гена *Tnfa* достоверно не изменялась ни в одной из групп (рис. 3). Продукция мРНК гена противовоспалительного цитокина антагониста рецепторов интерлейкина-1 *Il1rn* усиливалась у TLE крыс (seizure – $F_{1,23} = 20.55$; $p < 0.001$). Эти изменения в равной степени отмечались как у леченых, так и нелеченых животных (рис. 3, $p < 0.05$).

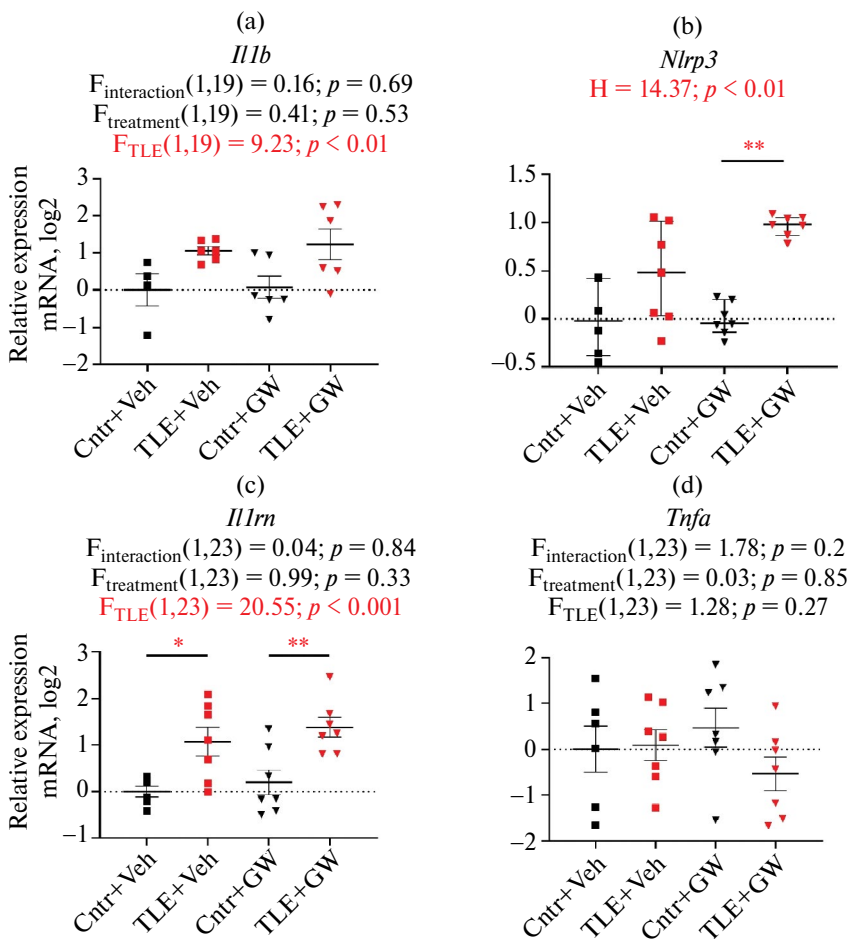


Рис. 3. Относительная экспрессия генов провоспалительных белков *Il1b* (a), *Nlrp3* (b), *Tnfa* (d) и противовоспалительного цитокина *Il1rn* (c) в дорзальном гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, двухфакторный ANOVA (модель x лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака или непараметрический аналог ANOVA тест Крускала – Уоллиса с апостериорным тестом множественных сравнений Данна.

Одним из основных вопросов, ответ на который мы хотели получить в настоящем исследовании, было изучение возможного влияния кардарина на поляризацию астро- и микроглии, поскольку ранее было показано, что эпилептогенез связан с увеличением доли глиальных клеток с провоспалительными A1 и M1 фенотипами [11]. Мы предполагали, что кардарин может обратить этот процесс, направив поляризацию в сторону защитных A2 и M2 фенотипов. Для решения этого вопроса мы провели анализ экспрессии генов маркерных белков, характерных соответственно для провоспалительных и защитных фенотипов астро- (рис. 4) и микроглии (рис. 5).

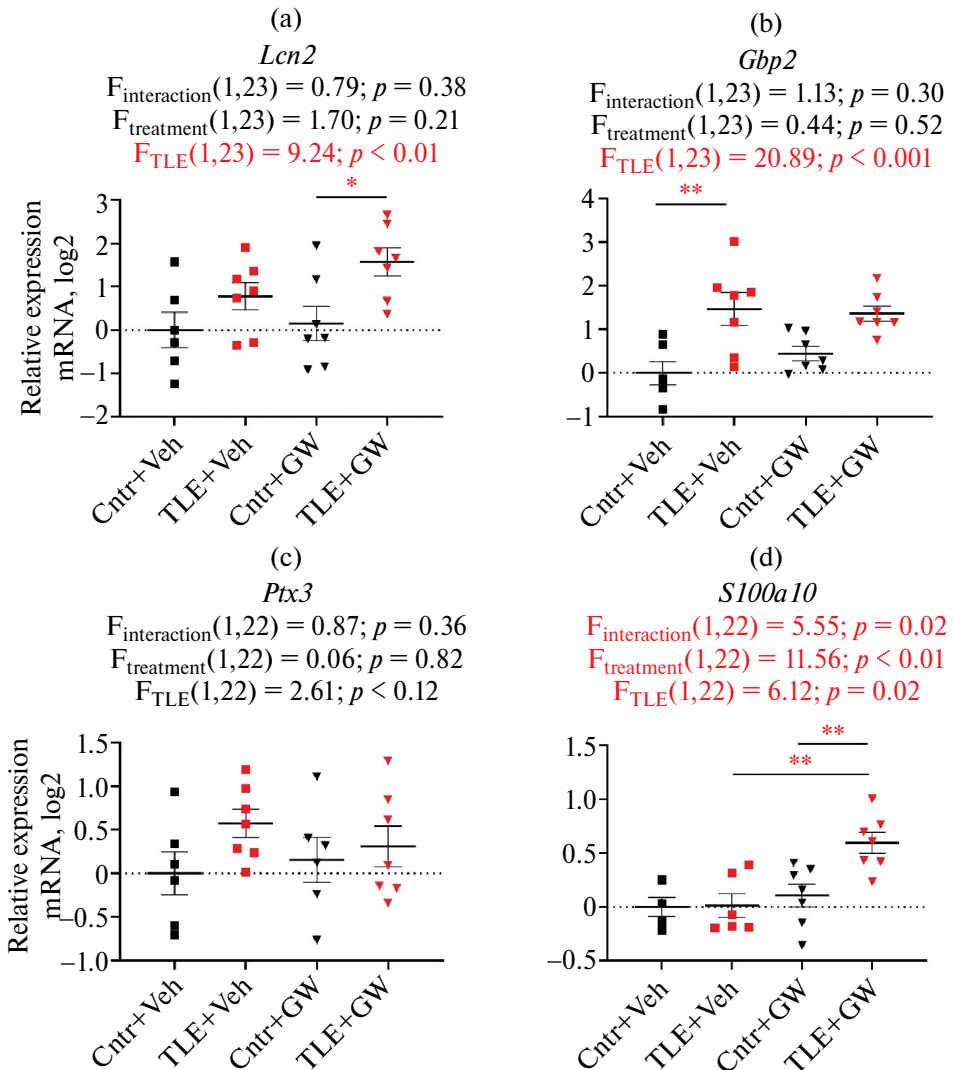


Рис. 4. Относительная экспрессия генов маркеров провоспалительного A1 фенотипа (a, b) и нейропротекторного фенотипа A2 (c, d) астроглии в дорзальном гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, двухфакторный ANOVA (модель $\times$ лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака.

Нами показано, что экспрессия генов маркеров провоспалительного A1 фенотипа астроцитов *Lcn2* и *Gbp2* увеличивается у TLE крыс (соответственно $F_{1,23} = 9.24$; $p < 0.01$ и $F_{1,23} = 20.89$; $p < 0.001$). Эти изменения носили однонаправленный характер у леченых и нелеченых крыс, хотя для *Lcn2* межгрупповые сравнения выявляют достоверные различия в группах животных, которым вводили кардарин, а для *Gbp2* – в группах нелеченых крыс. Продукция мРНК белка защитного A2 фенотипа *Ptx3* значимо не изменялась, а экспрессия гена другого маркера A2 *S100a10* зависела как от TLE ($F_{1,22} = 6.12$; $p = 0.02$), так и от лечения кардарином ($F_{1,22} = 11.56$; $p < 0.01$), взаимодействие факторов ($F_{1,22} = 5.55$; $p = 0.02$). Максимальное увеличение экспрессии этого гена маркера A2 астроцитов отмечается у леченых TLE крыс.

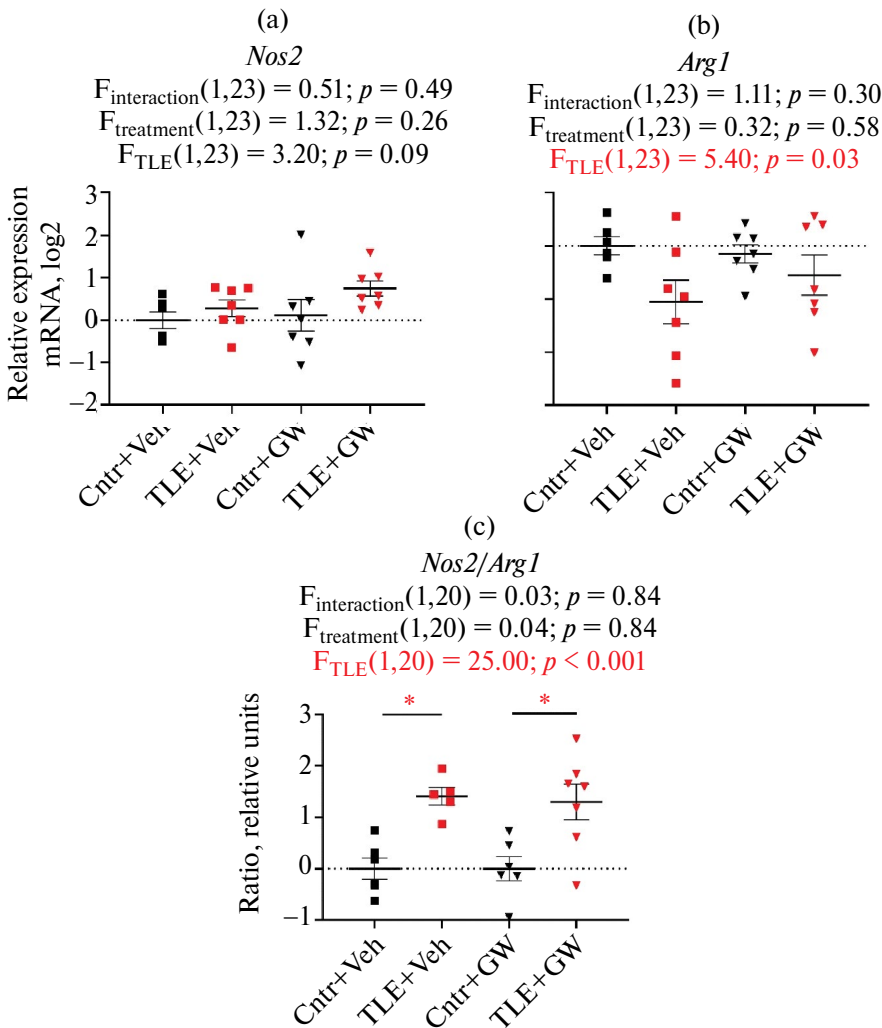


Рис. 5. Относительная экспрессия генов маркеров провоспалительного M1 (a) и противовоспалительного M2 (b) фенотипа микроглии, а также их соотношение (c) в дорзальном гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. * $p < 0.05$ в двухфакторном ANOVA (модель $\times$ лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака.

Экспрессия гена маркера M1 микроглии *Nos2* немного усиливалась у TLE крыс, однако различия не достигали статистической значимости ($F_{1,22} = 3.20$; $p = 0.09$, рис. 5). При этом TLE приводила к уменьшению продукции мРНК маркера защитного M2 фенотипа *Arg1* ($F_{1,22} = 5.40$; $p = 0.04$). Известно, что в макрофагах и микроглии ферменты аргиназа (ген *Arg1*) и индуцибельная NO-синтаза (ген *Nos2*) конкурируют за субстрат L-аргинин, что может активировать внутриклеточные каскады, связанные с продукцией защитных (M2) или провоспалительных (M1) факторов [58]. Поэтому мы дополнительно проанализировали соотношение *Arg1/Nos2* как показатель баланса нейротрофических и повреждающих механизмов. Соотношение *Arg1/Nos2* снижалось ($F_{1,20} = 25.00$; $p < 0.001$), что свидетельствует о превалировании активности M1 микроглии у TLE крыс. Кардарин значимо не влиял на эти изменения.

Далее мы исследовали экспрессию генов нескольких трофических факторов, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза – *Bdnf*, *Gdnf* и *Fgf2* (рис. 6). Экспрессия *Bdnf* и *Fgf2* увеличивалась у TLE животных (соответственно $F_{1,21} = 12.52$; $p < 0.01$ и $F_{1,22} = 8.28$; $p < 0.01$), при этом при межгрупповом сравнении достоверные отличия от контроля для *Bdnf* выявлены у нелеченых, а для *Fgf2* – у леченых крыс.

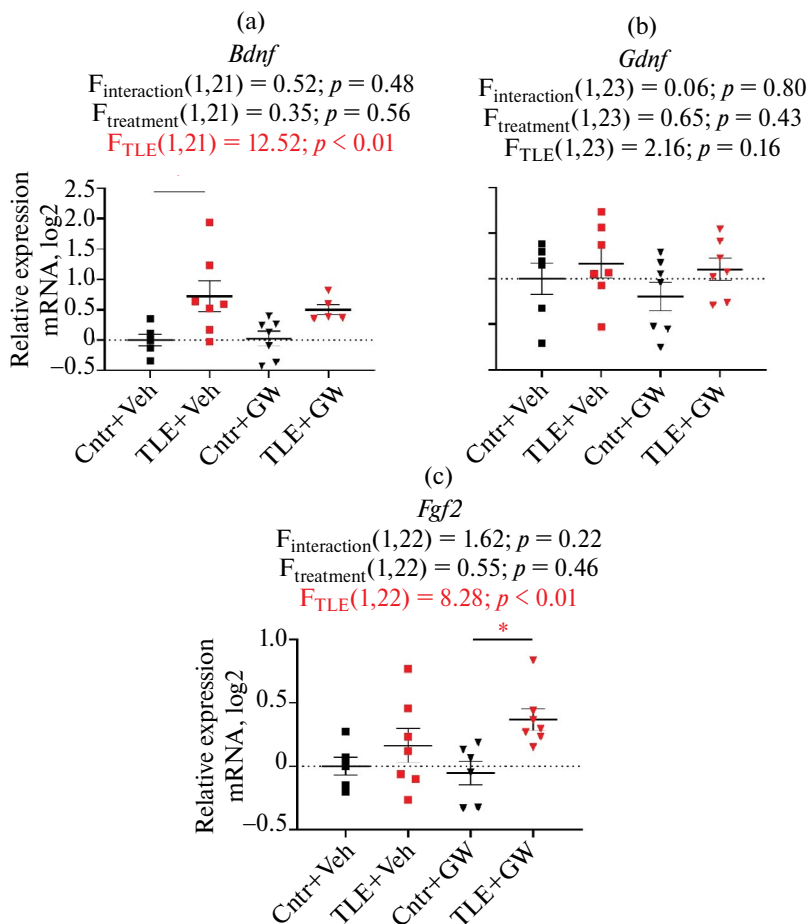


Рис. 6. Относительная экспрессия генов нейротрофических факторов *Bdnf* (a), *Gdnf* (b) и *Fgf2* (c) в дорзальном гиппокампе крыс; * $p < 0.05$; двухфакторный ANOVA (модель x лечение) с апостериорным тестом множественных сравнений Сидака.

Мы также исследовали, может ли введение кардарина повлиять на экспрессию генов PPARs у наших животных (рис. 7). Исследование показало, что TLE не влияла на экспрессию генов *Ppara* и *Pparg*. Экспрессия *Ppara* снижалась у TLE крыс ($F_{1,22} = 5.16$; $p = 0.03$), однако это снижение наблюдалось преимущественно в группе нелеченых крыс (апостериорные сравнения, критерий Тьюки, между Cntr+Veh и TLE+Veh группами – $p = 0.07$; между Cntr+GW и TLE+GW группами – $p = 0.94$). Достоверного влияния кардарина в использованной нами дозе и схеме введения на экспрессию генов PPARs не обнаружено.

Таким образом, проведенное исследование выявило, что экспрессия большинства исследованных генов (показателей активации микро- и астроглиальных клеток, маркеров нейровоспаления, M1, A1, M2, A2 фенотипов, ростовых факторов) изменяется в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели. Кардарин усиливал экспрессию генов *Nlrp3*, *Lcn2*, *S100a10*, *Tgfb2* и *Fgf2*, а также ослаблял повышенную у TLE крыс экспрессию генов *Gbp2*, *Bdnf*.

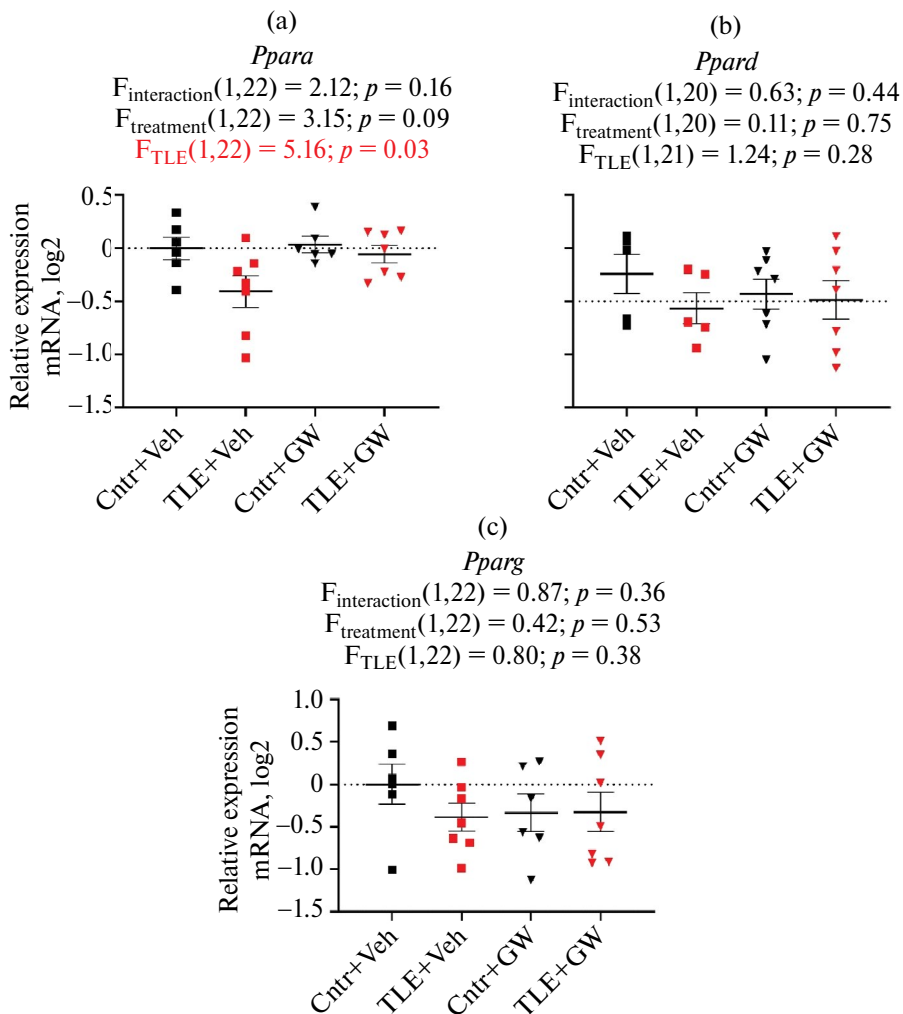


Рис. 7. Относительная экспрессия генов PPARs: *Ppara* (a), *Ppard* (b), *Pparg* (c) в дорзальном гиппокампе крыс; двухфакторный ANOVA (модель x лечение).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс мы изучили изменения экспрессии в клетках гиппокампа генов астро- и микроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза, а также оценили возможность предотвращения развития этих нарушений с помощью введения агониста PPAR бета/дельта кардарина. Доза и схема введения кардарина были подобраны в нашем предыдущем исследовании как эффективные для уменьшения TLE-индуцированных нарушений поведения [59].

Проведенное исследование выявило изменение экспрессии большого числа исследованных глиальных генов в хроническую фазу TLE модели. В частности, эпилептогенез был сопряжен с увеличением экспрессии генов маркеров активации астро- (*Gfap*) и микроглии (*Aif1*). Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) считается маркером реактивного астроглиоза [60], а воспалительный фактор аллотрансплантата 1 (AIF1) – маркером микроглиоза [61]. Гиппокампальный астро- и микроглиоз, также как и повышение экспрессии генов *Gfap* и *Aif1*, характерны для клиники TLE [62] и неоднократно были описаны в литий-пилокарпиновой модели [63]. Астро- и микроглиозис не только являются следствием эпилептогенеза, но и могут усиливать дальнейшее развитие эпилептических процессов [64]. Кардарин не влиял на TLE-индуцированное усиление экспрессии генов *Gfap* и *Aif1*.

Сам по себе факт активации микро- и астроглиальных клеток не позволяет судить об их свойствах, поскольку они могут находиться в различных функциональных состояниях (фенотипах), полярными из которых являются соответственно провоспалительные M1 и A1 и защитные M2 и A2 фенотипы, хотя и существует целый ряд промежуточных состояний, и клетки могут переходить от одного фенотипа к другому [12, 65]. Препараты, способные усилить поляризацию в сторону защитных фенотипов, рассматриваются как перспективные для лечения различных нервных заболеваний, патогенез которых связан с нейровоспалением [86–88]. Такими свойствами могут обладать агонисты PPARs. На культуре микроглиальных клеток, стимулированных бактериальным эндотоксином (что усиливает M1 поляризацию), было показано, что добавление в культуральную среду агониста PPAR γ росиглитазона способствует сдвигу от M1 к M2 фенотипу. Этот эффект был связан с улучшением аутофагии через активацию сигнального пути LKB1/AMPK [14].

Нейровоспаление играет ключевую роль в эпилептогенезе [3, 66]. Однако в моделях эпилепсии способность агонистов PPARs влиять на поляризацию глиальных клеток ранее не изучалась. В данной работе мы исследовали влияние агониста PPAR бета/дельта на экспрессию про- и противовоспалительных генов, а также генов маркеров A1/A2 и M1/M2 фенотипов в литий-пилокарпиновой модели TLE.

Нами показано, что в хроническую фазу TLE модели у животных имеет место развитие воспалительных процессов – усиливается экспрессия гена провоспалительного цитокина интерлейкина 1 бета (*Il1b*), основного компонента инфламماسом (*Nlrp3*), маркеров астроцитарного A1 фенотипа липокалина (*Lcn2*) и интерферон-индуцированного гуанилат-связывающего белка 2 (*Gbp2*). Аналогичная тенденция наблюдалась в отношении маркера микроглиального фенотипа M1 индуцибельной NO-синтазы (*Nos2*), что наряду с увеличением соотношения *Nos2/Arg1* свидетельствует о сдвиге M1/M2 поляризации в сторону провоспалительного M1 фенотипа. Эти изменения наблюдались как у леченых, так и у нелеченых животных. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее нами [3, 52], и с данными других авторов [36, 67], выявившими усиление экспрессии провоспалительных генов *Il1b*, *Nlrp3* и *Lcn2* при эпилептогенезе. Кардарин незначительно усиливал экспрессию генов *Nlrp3* и *Lcn2*, но ослаблял повышенную экспрессию гена *Gbp2* и не влиял на TLE-индуцированное усиление экспрессии гена *Il1b*, поэтому мы не можем сделать однозначный вывод о влиянии карда-

рина на экспрессию провоспалительных генов и генов – маркеров провоспалительных фенотипов. Ранее противовоспалительные свойства кардарина были продемонстрированы на культуре клеток эмбрионального мозга крыс, стимулированных бактериальным липополисахаридом [68]. Отсутствие выраженного действия кардарина на экспрессию провоспалительных генов в нашем исследовании может быть связано с тем, что мы использовали другую экспериментальную модель, изучали отсроченные эффекты лечения, использовали животных другого возраста и более низкую дозу препарата. При этом следует отметить, что *Gbp2* не только является маркером A1 астроцитов, но он также повышает апоптоз нейронов в патологических условиях [69], поэтому вызванное кардариним ослабление экспрессии гена *Gbp2* может играть положительную роль для предотвращения TLE-индуцированной гибели нервных клеток.

В отличие от генов – маркеров провоспалительных A1 и M1 фенотипов, экспрессия которых усиливалась в хроническую фазу TLE модели, экспрессия генов защитных белков A2 и M2 фенотипов у экспериментальных крыс менялась разнонаправленно: продукция мРНК аргиназы 1 (*Arg1*, маркер M2) снижалась, экспрессия гена пентраксина 3 (*Ptx3*, маркер A2) значимо не изменялась, а экспрессия гена противовоспалительного цитокина антагониста рецепторов IL-1 (*Il1rn*) увеличивалась в гиппокампе как леченых, так и нелеченых TLE крыс. Усиление экспрессии гена *Il1rn* в гиппокампе крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели ранее было показано [52]. Экспрессия генов *Arg1* и *Ptx3* в литий-пилокарпиновой модели исследована впервые.

Наиболее яркие эффекты кардарина показаны в отношении экспрессии гена маркера A2 фенотипа *S100a10*, она увеличивалась только у леченых животных. Ранее усиление экспрессии гена *S100a10* было выявлено в гиппокампе крыс в каинатной модели височной эпилепсии [70]. Данный белок традиционно рассматривается как маркер A2 астроцитов [71], хотя его экспрессия также обнаружена в некоторых других клетках мозга [72]. Белок S100A10 в комплексе с аннексином A2 вовлечен в организацию липидных микродоменов на клеточной мембране, он участвует в связывании актиновых филаментов и каркасов цитоскелета, в мембранном транспорте и фибринолизе [73, 74], что объясняет его вовлеченность в нейрорепаративные процессы. Однако в наибольшей степени функции S100A10 в мозге обсуждаются в связи с его возможной ролью в патогенезе депрессивных расстройств [75]: нехватка этого белка вызывает депрессивно-подобное поведение, а лечение антидепрессантами усиливает экспрессию гена *S100a10* в гиппокампе [75]. В недавно проведенном исследовании нами были выявлены анксиолитические эффекты кардарина в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [59]. Возможно, хотя бы частично эти эффекты опосредуются усилением экспрессии гена *S100a10*.

Нами также была исследована экспрессия генов трех ростовых факторов – BDNF, FGF2 и GDNF, продуцируемых микро- и астроглиальными клетками [76–78] и вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза. В данном исследовании нами показано, что экспрессия генов *Bdnf* и *Fgf2* увеличивается у TLE крыс, а экспрессия гена *Gdnf* не изменяется. Ранее усиление экспрессии гена *Bdnf* было показано в височных областях мозга пациентов с эпилепсией [79] и гиппокампе экспериментальных животных в пилокарпиновой модели эпилепсии [80]. Роль BDNF при эпилептогенезе в настоящее время активно дискутируется [81]. С одной стороны, связываясь с мембранным рецептором тирозинкиназы B (*TrkB*), он запускает серию каскадных реакций, которые приводят: 1) к фосфорилированию и активации циклического аденозинмонофосфат-связывающего белка (CREB), который опосредует транскрипцию генов, связанных с дифференцировкой нейронов и их выживанием [82]; 2) к снижению возбудимости пирамидных нейронов энторинальной коры [83]. Эти эффекты BDNF препятствуют эпилептогенезу. С другой стороны, BDNF может способствовать развитию эпилептических процессов. Показано, что внутригиппокампальное введение BDNF может индуцировать судороги, вероятно, за счет стимуляции прорастания мшистых волокон (важный патогенетиче-

ский механизм эпилепсии [84]). В целом предполагается [81], что в физиологических концентрациях BDNF способствует выживанию нейронов, однако избыточная экспрессия BDNF может значительно повышать возбудимость нейронов и увеличивать восприимчивость к эпилепсии. В нашем исследовании TLE приводила к многократному усилению экспрессии гена *Bdnf* в клетках гиппокампа, кардарин ослаблял эти нарушения, что, вероятно, можно рассматривать как антиэпилептогенный эффект.

Нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF) является мощным фактором выживания для некоторых типов нейронов. Повышение уровня GDNF путем инъекций в гиппокамп вирусных агентов, продуцирующих этот белок, снижает выраженность судорог в экспериментальных моделях эпилепсии [85]. Ранее было показано усиление экспрессии гена *Gdnf* в гиппокампе крыс в первые часы после судорог, индуцированных введением каиновой кислоты [86] либо пилокарпина [87]. Возможно, что усиление экспрессии этого гена отражает запуск защитных систем мозга на ранних этапах эпилептогенеза. В проведенном нами эксперименте мы не наблюдали усиления экспрессии гена *Gdnf* в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии.

Мы показали также, что у животных с TLE в дорзальном гиппокампе возрастает экспрессия гена *Fgf2*, и этот эффект сильнее выражен у крыс, которым вводили кардарин. FGF2 является многофункциональным фактором роста, вовлеченным в регуляцию процессов нейрогенеза, нейровоспаления и синаптической пластичности [88], нарушенной при эпилептогенезе [89]. Нейропротекторные и регенеративные свойства FGF2 показаны на многих моделях нервных заболеваний [88]. Экспрессия гена *Fgf2* в гиппокампе возрастает во многих моделях острых судорог и эпилепсии [90]. Так же как и BDNF, FGF2 может оказывать разнонаправленное действие на развитие эпилептических процессов, с одной стороны, усиливая процессы возбуждения, с другой – предотвращая гибель нейронов [90]. В частности, было показано, что внутримозговое введение фармакологических доз FGF2 провоцирует икctalную активность в нейронах гиппокампа [91]. Однако хроническое введение низких доз FGF2 не изменяет тяжесть каинат-индуцированных судорог, но предотвращает связанную с ними гибель нейронов в гиппокампе [92], а также блокирует развитие поведенческих нарушений в данной модели эпилепсии [91]. В нашем исследовании отмечается относительно небольшое увеличение экспрессии гена *Fgf2*, незначительно усиленное кардарин. Ранее нами показано, что кардарин ослабляет поведенческие нарушения в TLE модели [59]. Эти факты позволяют рассматривать повышение экспрессии гена *Fgf2* в нашем эксперименте скорее как нейропротекторный эффект.

В проведенном нами исследовании впервые показано, что при развитии TLE в дорзальном гиппокампе крыс снижается экспрессия гена *Ppara*. Ранее было показано, что агонисты PPAR α ослабляют развитие нейровоспаления в различных экспериментальных моделях [93, 94]. Также выявлено, что активация PPAR α снижает выраженность никотин-индуцированных судорог у крыс [95] и уменьшает частоту приступов у пациентов с фармакорезистентной ночной лобной эпилепсией [96]. Поэтому выявленное нами уменьшение экспрессии гена *Ppara* свидетельствует о подавлении естественных нейропротекторных механизмов у крыс с TLE.

В целом проведенное нами исследование выявило изменение активности астро- и микроглии в процессе эпилептогенеза, в основном связанное с усилением нейровоспалительных процессов и ослаблением нейропротекторных свойств этих клеток. Влияние кардарина на эти нарушения было умеренным, основной его эффект проявился в усилении экспрессии гена защитного маркера A2 астроцитов *S100a10*.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование работы и экспериментов (О.Е.З.), проведение экспериментов и сбор данных (А.Р.Х., А.И.Р.), обработка данных (А.Р.Х., А.И.Р.), написание и редактирование манускрипта (О.Е.З., А.Р.Х.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 23–25–00480). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты, проводимые с животными, были согласованы и утверждены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол № 1–16 / 2023 заседания № 1 комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН от 26.01.2023 г.). Все эксперименты проводятся в соответствии с Руководством по обращению с лабораторными животными, действующими в Институте эволюционной физиологии и биохимии. Это руководство соответствует Директиве ЕС 2010/63/ЕС об экспериментах на животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N* (2017) Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88: 296–303.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
2. *Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D* (2013) New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 12: 757–776.
<https://doi.org/10.1038/nrd4126>
3. *Soltani Khaboushan A, Yazdanpanah N, Rezaei N* (2022) Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. *Mol Neurobiol* 59: 1724–1743.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02725-6>
4. *Chen B, Choi H, Hirsch LJ, Katz A, Legge A, Buchsbaum R, Detyniecki K* (2017) Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy Behav* 76: 24–31.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.08.039>
5. *Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN* (2021) Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci* 265: 118826.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118826>
6. *Boison D, Steinhäuser C* (2018) Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66: 1235–1243.
<https://doi.org/10.1002/glia.23247>
7. *Pracucci E, Pillai V, Lamers D, Parra R, Landi S* (2021) Neuroinflammation: A Signature or a Cause of Epilepsy? *Int J Mol Sci* 22: 6981.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136981>
8. *Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV* (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel)* 13: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
9. *Dubé C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ* (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57: 152–155.
<https://doi.org/10.1002/ana.20358>
10. *Kwon HS, Koh S-H* (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9: 42.
<https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
11. *Deng X-L, Feng L, Wang Z-X, Zhao Y-E, Zhan Q, Wu X-M, Xiao B, Shu Y* (2020) The Runx1/Notch1 Signaling Pathway Participates in M1/M2 Microglia Polarization in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy and in BV-2 Cells. *Neurochem Res* 45: 2204–2216.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03082-3>
12. *Fan Y-Y, Huo J* (2021) A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int* 148: 105080.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>

13. Hong F, Pan S, Guo Y, Xu P, Zhai Y (2019) PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 24: 2545.
<https://doi.org/10.3390/molecules24142545>
14. Ji J, Xue T-F, Guo X-D, Yang J, Guo R-B, Wang J, Huang J-Y, Zhao X-J, Sun X-L (2018) Antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor γ facilitates M1-to-M2 shift of microglia by enhancing autophagy via the LKB1-AMPK signaling pathway. *Aging Cell* 17: e12774.
<https://doi.org/10.1111/ace1.12774>
15. Kr marik-Bouillaud P, Schohn H, Dauca M (2000) Regional distribution of PPAR β in the cerebellum of the rat. *J Chem Neuroanat* 19: 225–232.
[https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(00\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(00)00065-X)
16. Granneman J, Skoff R, Yang X (1998) Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 51: 563–573.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980301\)51:5<563::AID-JNR3>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980301)51:5<563::AID-JNR3>3.0.CO;2-D)
17. Bernardo A, Ajmone-Cat MA, Levi G, Minghetti L (2003) 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 regulates the functional state and the survival of microglial cells through multiple molecular mechanisms. *J Neurochem* 87: 742–751.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02045.x>
18. Cristiano L, Bernardo A, Cer  MP (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol* 30: 671–683.
<https://doi.org/10.1023/A:1016525716209>
19. Grygiel-G rniak B (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J* 13: 17.
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
20. Knowles S, Budney S, Deodhar M, Matthews SA, Simeone KA, Simeone TA (2018) Ketogenic diet regulates the antioxidant catalase via the transcription factor PPAR γ 2. *Epilepsy Res* 147: 71–74.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2018.09.009>
21. Senn L, Costa A-M, Avallone R, Socala K, Wla  P, Biagini G (2023) Is the peroxisome proliferator-activated receptor gamma a putative target for epilepsy treatment? Current evidence and future perspectives. *Pharmacol Ther* 241: 108316.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108316>
22. Pérez-Segura I, Santiago-Balmaseda A, Rodríguez-Hernández LD, Morales-Martínez A, Martínez-Becerril HA, Martínez-Gómez PA, Delgado-Minjares KM, Salinas-Lara C, Martínez-D vila IA, Guerra-Crespo M, Pérez-Severiano F, Soto-Rojas LO (2023) PPARs and Their Neuroprotective Effects in Parkinson’s Disease: A Novel Therapeutic Approach in α -Synucleinopathy? *Int J Mol Sci* 24: 3264.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043264>
23. Adabi Mohazab R, Javadi-Paydar M, Delfan B, Dehpour AR (2012) Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 101: 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2012.02.015>
24. Yu X, Shao X-G, Sun H, Li Y-N, Yang J, Deng Y-C, Huang Y-G (2008) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1200: 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.047>
25. Peng J, Wang K, Xiang W, Li Y, Hao Y, Guan Y (2019) Rosiglitazone polarizes microglia and protects against pilocarpine-induced status epilepticus. *CNS Neurosci Ther* 25: 1363–1372.
<https://doi.org/10.1111/cns.13265>
26. Tang X, Yan K, Wang Y, Wang Y, Chen H, Xu J, Lu Y, Wang X, Liang J, Zhang X (2020) Activation of PPAR- β/δ Attenuates Brain Injury by Suppressing Inflammation and Apoptosis in a Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage Mouse Model. *Neurochem Res* 45: 837–850.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-02956-w>
27. Ahmed Juvala II, Che Has AT (2020) The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6: e04557.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
28. Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, Costantino L, Biagini G (2014) Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Current Med Chem* 21: 663–688.
<https://doi.org/10.2174/0929867320666131119152201>
29. Bojja SL, Singh N, Kolathur KK, Rao CM (2022) What is the Role of Lithium in Epilepsy? *Curr Neuropharmacol* 20: 1850–1864.
<https://doi.org/10.2174/1570159X20666220411081728>

30. *Furtado MA, Castro OW, Vecchio FD, Oliveira JAC de, Garcia-Cairasco N* (2011) Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy and Behavior* 20: 257–266.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.11.024>
31. *Paxinos G, Watson C* (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. Elsevier/Acad Press. Amsterdam, Boston.
32. *Dubey V, Roy A, Dixit AB, Tripathi M, Pandey S, Jain S, Chandra PS, Banerjee J* (2023) Dendritic reorganization in the hippocampus, anterior temporal lobe, and frontal neocortex of lithium-pilocarpine induced Status Epilepticus (SE). *J Chem Neuroanat* 133: 102329.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102329>
33. *Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ* (2021) Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules* 11: 1361.
<https://doi.org/10.3390/biom11091361>
34. *Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ* (2020) Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14: 198.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
35. *Wu C, Zhang G, Chen L, Kim S, Yu J, Hu G, Chen J, Huang Y, Zheng G, Huang S* (2019) The Role of NLRP3 and IL-1 β in Refractory Epilepsy Brain Injury. *Front Neurol* 10: 1418.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01418>
36. *Shin HJ, Jeong EA, Lee JY, An HS, Jang HM, Ahn YJ, Lee J, Kim KE, Roh GS* (2021) Lipocalin-2 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Neuroinflammation and Results in Attenuation of Kainic Acid-Induced Hippocampal Cell Death. *Antioxidants* 10: 100.
<https://doi.org/10.3390/antiox10010100>
37. *Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T* (2019) Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. *J Neurosci Res* 97: 1363–1377.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24205>
38. *Munder M* (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638–651.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
39. *Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK* (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflamm* 11: 98.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
40. *Simonato M* (2014) Gene therapy for epilepsy. *Epilepsy Behav* 38: 125–130.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.09.013>
41. *AlRuwalli R, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Ali NH, Alexiou A, Papadakis M, Saad HM, Batiha GE-S* (2024) The Possible Role of Brain-derived Neurotrophic Factor in Epilepsy. *Neurochem Res* 49: 533–547.
<https://doi.org/10.1007/s11064-023-04064-x>
42. *Chiavellini P, Canatelli-Mallat M, Lehmann M, Goya RG, Morel GR* (2022) Therapeutic potential of glial cell line-derived neurotrophic factor and cell reprogramming for hippocampal-related neurological disorders. *Neural Regen Res* 17: 469–476.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.320966>
43. *Livak KJ, Schmittgen TD* (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
44. *Schwarz AP, Malygina DA, Kovalenko AA, Trofimov AN, Zaitsev AV* (2020) Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol Cell Probes* 53: 101611.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101611>
45. *Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G* (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* 62: 302–309.
<https://doi.org/10.1002/syn.20496>
46. *Lin W, Burks CA, Hansen DR, Kinnamon SC, Gilbertson TA* (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J Neurophysiol* 92: 2909–2919.
<https://doi.org/10.1152/jn.01198.2003>
47. *Yamaguchi M, Yamauchi A, Nishimura M, Ueda N, Naito S* (2005) Soybean oil fat emulsion prevents cytochrome P450 mRNA down-regulation induced by fat-free overdose total parenteral nutrition in infant rats. *Biol Pharm Bull* 28: 143–147.
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.143>
48. *Swijsen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo J-M, Hoogland G* (2012) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 5: 685.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-685>

49. *Pohjanvirta R, Niittynen M, Lindén J, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB* (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem Biol Interact* 160: 134–149.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.01.001>
50. *Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G* (2008) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol* 9: 53.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>
51. *Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF* (2004) Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin Exp Immunol* 137: 65–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02499.x>
52. *Zubareva OE, Dyomina AV, Kovalenko AA, Roginskaya AI, Melik-Kasumov TB, Korneeva MA, Chuprina AV, Zhabinskaya AA, Kolyhan SA, Zakharova MV, Gryaznova MO, Zaitsev AV* (2023) Beneficial Effects of Probiotic *Bifidobacterium longum* in a Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. *Int J Mol Sci* 24: 8451.
<https://doi.org/10.3390/ijms24098451>
53. *Su J-C, Zhang Y, Cheng C, Zhu Y-N, Ye Y-M, Sun Y-K, Xiang S-Y, Wang Y, Liu Z-B, Zhang X-F* (2021) Hydrogen regulates the M1/M2 polarization of alveolar macrophages in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 47: 301–310.
<https://doi.org/10.1080/01902148.2021.1919788>
54. *Sang N, Yun Y, Li H, Hou L, Han M, Li G* (2010) SO₂ inhalation contributes to the development and progression of ischemic stroke in the brain. *Toxicol Sci* 114: 226–236.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq010>
55. *Cernecka H, Doka G, Srankova J, Pivackova L, Malikova E, Galkova K, Kyselovic J, Krenek P, Klimas J* (2016) Ramipril restores PPAR β/δ and PPAR γ expressions and reduces cardiac NADPH oxidase but fails to restore cardiac function and accompanied myosin heavy chain ratio shift in severe anthracycline-induced cardiomyopathy in rat. *Eur J Pharmacol* 791: 244–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.08.040>
56. *Chistyakov DV, Aleshin SE, Astakhova AA, Sergeeva MG, Reiser G* (2015) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) α and γ of rat brain astrocytes in the course of activation by toll-like receptor agonists. *J Neurochem* 134: 113–124.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13101>
57. *Johnson AM, Sugo E, Barreto D, Hiew C-C, Lawson JA, Connolly AM, Somerville E, Hasic E, Bye AM, Cunningham AM* (2016) The Severity of Gliosis in Hippocampal Sclerosis Correlates with Pre-Operative Seizure Burden and Outcome After Temporal Lobectomy. *Mol Neurobiol* 53: 5446–5456.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9465-y>
58. *Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M* (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* 5: 532.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
59. *Subkhankulov MR, Sinyak DS, Guk VA, Postnikova TYu, Roginskaya AI, Zubareva OE* (2024) Cardarin Effect on the Formation of Histopathological and Behavioral Abnormalities in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy in Rats. *J Evol Biochem Phys* 60: 316–331.
<https://doi.org/10.1134/S002209302401023X>
60. *Xu Z, Xue T, Zhang Z, Wang X, Xu P, Zhang J, Lei X, Li Y, Xie Y, Wang L, Fang M, Chen Y* (2011) Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. *Neurochem Res* 36: 2208–2215.
<https://doi.org/10.1007/s11064-011-0576-1>
61. *Flores-Cuadrado A, Saiz-Sanchez D, Mohedano-Moriano A, Lamas-Cenfor E, Leon-Olmo V, Martinez-Marcos A, Ubeda-Bañon I* (2021) Astroglial and sexually dimorphic neurodegeneration and microglial in the olfactory bulb in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 7: 11.
<https://doi.org/10.1038/s41531-020-00154-7>
62. *Kandratavicius L, Peixoto-Santos JE, Monteiro MR, Scanduzzi RC, Carlotti CG, Assirati JA, Hallak JE, Leite JP* (2015) Mesial temporal lobe epilepsy with psychiatric comorbidities: a place for differential neuroinflammatory interplay. *J Neuroinflamm* 12: 38.
<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0266-z>
63. *Kyriatzis G, Bernard A, Bôle A, Khrestchatisky M, Ferhat L* (2024) In the Rat Hippocampus, Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Is Associated with Reactive Glia and Concomitant Increased Expression of CD31, PDGFR β , and Collagen IV in Endothelial Cells and Pericytes of the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci* 25: 1693.
<https://doi.org/10.3390/ijms25031693>
64. *Robel S, Sontheimer H* (2016) Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nat Neurosci* 19: 28–33.
<https://doi.org/10.1038/nn.4184>

65. *Robel S* (2017) Astroglial Scarring and Seizures: A Cell Biological Perspective on Epilepsy. *Neuroscientist* 23: 152–168.
<https://doi.org/10.1177/1073858416645498>
66. *Rana A, Musto AE* (2018) The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammat* 15: 144.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
67. *Pohlentz MS, Müller P, Cases-Cunillera S, Opitz T, Surges R, Hamed M, Vatter H, Schoch S, Becker AJ, Pitsch J* (2022) Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 17: e0271995.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271995>
68. *Defaux A, Zurich M-G, Braissant O, Honegger P, Monnet-Tschudi F* (2009) Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination. *J Neuroinflammat* 6: 15.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-15>
69. *Alese OO, Mabanlla MV* (2019) Upregulation of hippocampal synaptophysin, GFAP and mGluR3 in a pilocarpine rat model of epilepsy with history of prolonged febrile seizure. *J Chem Neuroanat* 100: 101659.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101659>
70. *Dahal A, Govindarajan K, Kar S* (2023) Administration of Kainic Acid Differentially Alters Astrocyte Markers and Transiently Enhanced Phospho-tau Level in Adult Rat Hippocampus. *Neuroscience* 516: 27–41.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.02.010>
71. *Fei X, Dou Y-N, Wang L, Wu X, Huan Y, Wu S, He X, Lv W, Wei J, Fei Z* (2022) Homer1 promotes the conversion of A1 astrocytes to A2 astrocytes and improves the recovery of transgenic mice after intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammat* 19: 67.
<https://doi.org/10.1186/s12974-022-02428-8>
72. *Milosevic A, Liebmann T, Knudsen M, Schintu N, Svenningsson P, Greengard P* (2017) Cell- and region-specific expression of depression-related protein p11 (S100a10) in the brain. *J Comp Neurol* 525:955–975.
<https://doi.org/10.1002/cne.24113>
73. *Ogwen G, Murungi E* (2023) Evolving Paradigms in Laboratory Biomarkers of Fibrinolysis Phenotypes and Association with Post-Traumatic Vascular Thrombosis. In book: *Advances in the Diagnosis and Management of Vascular Thrombosis*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.111678>
74. *Okura G, Bharadwaj A, Waisman Dm* (2023) Recent Advances in Molecular and Cellular Functions of S100A10. *Biomolecules* 13(10): 1450.
<https://doi.org/10.3390/biom13101450>
75. *Svenningsson Per, Kim K, Warner-Schmidt J, Oh Y, Greengard P* (2013) p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nature Rev Neurosci* 14(10): 673–680.
<https://doi.org/10.1038/nrn3564>
76. *Yamagata K, Hakata K, Maeda A, Mochizuki C, Matsufuji H, Chino M, Yamori Y* (2007) Adenosine induces expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in primary rat astrocytes. *Neurosci Res* 59: 467–474.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.08.016>
77. *Fahmy GH, Moflah MZ* (2010) FGF-2 in Astroglial Cells During Vertebrate Spinal Cord Recovery. *Front Cell Neurosci* 4.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00129>
78. *Ferrini F, De Koninck Y* (2013) Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. *Neural Plasticity* 2013: e429815.
<https://doi.org/10.1155/2013/429815>
79. *Martinez-Levy GA, Rocha L, Rodriguez-Pineda F, Alonso-Vanegas MA, Nani A, Buentello-García RM, Briones-Velasco M, San-Juan D, Cienfuegos J, Cruz-Fuentes CS* (2018) Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcripts I and VI, cAMP Response Element Binding, and Glucocorticoid Receptor in the Cortex of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Mol Neurobiol* 55: 3698–3708.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0597-0>
80. *Schmidt-Kastner R, Humpel C, Wetmore C, Olson L* (1996) Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Brain Res* 107: 331–347.
<https://doi.org/10.1007/BF00230416>

81. Gliwińska A, Czubilińska-Lada J, Więckiewicz G, Świętochowska E, Badeński A, Dworak M, Szczepańska M (2023) The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Diagnosis and Treatment of Epilepsy, Depression, Schizophrenia, Anorexia Nervosa and Alzheimer's Disease as Highly Drug-Resistant Diseases: A Narrative Review. *Brain Sci* 13: 163.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13020163>
82. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3: 1.
<https://doi.org/10.3389/neuro.02.001.2010>
83. Gibon J, Buckley SM, Unsain N, Kaartinen V, Séguéla P, Barker PA (2015) proBDNF and p75NTR Control Excitability and Persistent Firing of Cortical Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 35: 9741–9753.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4655-14.2015>
84. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD (2002) Spontaneous limbic seizures after intra-hippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 174: 201–214.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7869>
85. Kanter-Schlifke I, Georgievska B, Kirik D, Kokaia M (2007) Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. *Mol Ther* 15: 1106–1113.
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300148>
86. Humpel C, Hoffer B, Strömberg I, Bektesh S, Collins F, Olson L (1994) Neurons of the hippocampal formation express glial cell line-derived neurotrophic factor messenger RNA in response to kainate-induced excitation. *Neuroscience* 59: 791–795.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90284-4)
87. Schmidt-Kastner R, Tomac A, Hoffer B, Bektesh S, Rosenzweig B, Olson L (1994) Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA upregulation in striatum and cortical areas after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 26: 325–330.
[https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90106-6)
88. Woodbury ME, Ikezu T (2014) Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J Neuroimmun Pharmacol* 9: 92–101.
<https://doi.org/10.1007/s11481-013-9501-5>
89. Postnikova TY, Diespirov GP, Amakhin DV, Vylekzhanina EN, Soboleva EB, Zaitsev AV (2021) Impairments of Long-Term Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Young Rats during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Mol Sci* 22: 13355.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413355>
90. Paradiso B, Zucchini S, Simonato M (2013) Implication of fibroblast growth factors in epileptogenesis-associated circuit rearrangements. *Front Cell Neurosci* 7: 152.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00152>
91. Liu Z, Holmes GL (1997) Basic fibroblast growth factor-induced seizures in rats. *Neurosci Lett* 233: 85–88.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00627-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00627-7)
92. Liu Z, D'Amore PA, Mikati M, Gatt A, Holmes GL (1993) Neuroprotective effect of chronic infusion of basic fibroblast growth factor on seizure-associated hippocampal damage. *Brain Res* 626: 335–338.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90598-h](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90598-h)
93. Esmaili MA, Yadav S, Gupta RK, Waggoner GR, Deloach A, Calingasan NY, Beal MF, Kiaei M (2016) Preferential PPAR- α activation reduces neuroinflammation, and blocks neurodegeneration in vivo. *Hum Mol Genet* 25: 317–327.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv477>
94. Ibáñez C, Acuña T, Quintanilla ME, Pérez-Reytor D, Morales P, Karahanian E (2023) Fenofibrate Decreases Ethanol-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress and Reduces Alcohol Relapse in Rats by a PPAR- α -Dependent Mechanism. *Antioxidants (Basel)* 12: 1758.
<https://doi.org/10.3390/antiox12091758>
95. Puligheddu M, Pillolla G, Melis M, Lecca S, Marrosu F, De Montis MG, Scheggi S, Carta G, Murru E, Aroni S, Muntoni AL, Pistis M (2013) PPAR-alpha agonists as novel antiepileptic drugs: preclinical findings. *PLoS One* 8: e64541.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064541>
96. Puligheddu M, Melis M, Pillolla G, Milioli G, Parrino L, Terzano GM, Aroni S, Sagheddu C, Marrosu F, Pistis M, Muntoni AL (2017) Rationale for an adjunctive therapy with fenofibrate in pharmacoresistant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* 58: 1762–1770.
<https://doi.org/10.1111/epi.13863>

Effect of Cardarin on Gene Expression of Proteins Involved in Epileptogenesis in Rat Hippocampus in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy

A. R. Kharisova^a, A. I. Roginskaya^a, and O. E. Zubareva^{a,*}

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

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

In recent years, the role of astro- and microglial cells and associated neuroinflammation in the pathogenesis of epilepsy has been extensively discussed. These cells can be in different functional states, the extreme A1 and M1 phenotypes producing predominantly pro-inflammatory (promoting epileptogenesis) proteins, and the A2 and M2 phenotypes producing anti-inflammatory (preventing epileptogenesis) proteins. It has been suggested that the use of drugs that can stimulate polarisation from M1 and A1 to M2 and A2 phenotypes may be a successful strategy for the treatment of epilepsy. Such drugs include agonists of peroxisome proliferator-activated receptor nuclear receptors (PPARs). The aim of this study was to investigate changes in the expression of micro- and astroglial proteins involved in the regulation of epileptogenesis in the dorsal hippocampus of rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (TLE) and to investigate the effect of the PPAR agonist beta/delta cardarine on these processes. Cardarin was administered at the initial stages of epileptogenesis (within 7 days after induction of the TLE model), and two months later (chronic phase of the model) we analysed the expression of genes of interest in the dorsal hippocampus by real-time RT-PCR. The performed study revealed changes in gene expression of astro- and microglial proteins during epileptogenesis, mainly associated with the enhancement of neuroinflammatory processes and weakening of neuroprotective properties of these cells. In TLE rats the expression of genes of markers of astro- (Gfap) and microglia activation (Aif1), pro- (Il1b, Nlrp3) and anti-inflammatory (Il1rn) proteins, markers of the A1 phenotype of astrocytes (Lcn2, Gbp2) and growth factors (Bdnf, Fgf2) was increased. Gene expression of the protective M2 phenotype Arg1 gene was decreased in TLE rats. The most striking effect of cardarine administration was manifested in the enhanced expression of the marker A2 gene of the S100a10 astrocyte phenotype.

Keywords: lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, cardarin (GW 501516), glia, proinflammatory genes, M1/M2 polarisation, A1/A2 polarisation, trophic factors

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ
И ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ
НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ**

© 2024 г. Е. Г. Орлова^{1,*}, О. А. Логинова¹, О. Л. Горбунова¹, С. В. Ширшев¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

* E-mail: orlova_katy@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

При беременности функции натуральных киллеров (НК-клеток) периферической крови существенно меняются, что главным образом связано с угнетением их цитотоксичности. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом, однако эти изменения при физиологической беременности не исследованы. Цель данной работы – изучить экспрессию молекул Glut-1, CD94 и CD107a, характеризующих метаболическую и цитотоксическую активность, а также массу митохондрий разных субпопуляций НК-клеток периферической крови в I и III триместрах физиологической беременности. Объектом исследования являлась периферическая кровь практически здоровых женщин в I и III триместрах физиологической беременности. Группу сравнения составили практически здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Экспрессию молекул Glut-1, CD94, CD107a и массу митохондрий оценивали методом проточной цитофлуориметрии на регуляторных (CD16⁺CD56^{bright}), цитотоксических (CD16⁺CD56^{dim}), минорных цитотоксических (CD16^{hi}CD56⁺) НК-клетках. Установлено, что у небеременных минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56⁺НК обладают наибольшей экспрессией Glut-1, CD107a и наименьшей экспрессией CD94 по сравнению с остальными субпопуляциями НК-клеток. На регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}НК экспрессия этих молекул сравнима между собой, как и масса митохондрий во всех исследуемых субпопуляциях. В I триместре экспрессия Glut-1 была выше на регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК, а масса митохондрий и экспрессия CD94, CD107a на всех НК-клетках не отличалась от небеременных. В III триместре в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}НК масса митохондрий была выше, а экспрессия CD94 ниже, чем у небеременных, а на регуляторных CD16⁺CD56^{bright}НК экспрессия CD94 была выше по сравнению с таковой в I триместре. Экспрессия CD107a в минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56⁺НК была ниже, чем у небеременных, а в остальных субпопуляциях не менялась, как и экспрессия Glut-1. Таким образом, разные субпопуляции НК-клеток периферической крови гетерогенны по экспрессии Glut-1, CD107a, CD94. Экспрессия этих молекул при физиологической беременности меняется по триместрам. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций НК-клеток при беременности.

Ключевые слова: НК-клетки, беременность, Glut-1, масса митохондрий, CD94, CD107a

ВВЕДЕНИЕ

Натуральные киллеры (НК-клетки) являются эффекторами врожденного иммунитета лимфоидного происхождения и играют важную роль в противовирусной и противоопухолевой защите организма человека [1, 2]. Более 90% НК-клеток периферической крови имеют фенотип $CD16^+CD56^{dim}$ и обладают высокой цитотоксичностью, а около 10% являются регуляторными $CD16-CD56^{bright}$ НК-клетками с ограниченной цитотоксичностью, но способными к активной продукции цитокинов [1, 2]. Также присутствует минорная субпопуляция цитотоксических $CD16^{hi}CD56$ НК-клеток, которая, по-видимому, является терминальной стадией дифференцировки НК-клеток, однако ее функциональные особенности остаются неизученными [3, 4]. НК-клетки не имеют специфических антиген-распознающих рецепторов, гены которых подвергаются реаранжировке, как у Т- и В-лимфоцитов, но экспрессируют большое количество активирующих и ингибирующих рецепторов, регулирующих их активность [1, 2]. С помощью активирующих рецепторов НК-клетки распознают поверхностные молекулы, экспрессия которых обнаруживается только при инфицировании, опухолевой трансформации или повреждении клеток собственного организма. Среди ингибирующих рецепторов на НК-клетках наиболее часто присутствуют гетеродимеры $CD94-NKG2A$ суперсемейства лектиноподобных белков С-типа, которые распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости I типа HLA-E (human leukocyte antigen) на клетках-мишенях, что инициирует угнетающий сигнал, подавляет активацию и препятствует цитолизу клеток-мишеней [5–8]. При отсутствии или трансформации молекул HLA-I типа на клетках-мишенях активированные НК-клетки осуществляют цитолиз, секретируя гранулы с перфорином и гранзимами, но также и путем контактного взаимодействия и индукции апоптоза [6, 7]. Следствием дегрануляции является появление на НК-клетках белка мембраны литических гранул $CD107a$ [9]. Также НК-клетки с помощью рецептора $CD16$ распознают конститутивный Fc-фрагмент антител на поверхности клеток-мишеней и лизируют их [10]. Таким образом, изучение экспрессии вышеупомянутых молекул важно для понимания механизмов регуляции цитотоксической функции НК-клеток.

НК-клетки активно участвуют в иммуно-эндокринных взаимодействиях, поскольку экспрессируют рецепторы к гормонам [11, 12]. Так, при физиологической беременности под влиянием гормонов, продуцируемых плацентой, происходит трансформация фенотипа и функций НК-клеток, что необходимо для благополучного исхода беременности [12]. Разные trimestры отличаются по направленности изменений иммунореактивности организма матери [12]. Первый триместр характеризуется наибольшей частотой спонтанных аборт в связи с началом экспрессии молекул HLA клетками трофобласта и «лютеоплацентарной сменой» [13]. При этом цитотоксический потенциал НК-клеток, продукция провоспалительных цитокинов снижаются, а выработка противовоспалительных цитокинов увеличивается [14–17]. Регуляторные НК-клетки периферической крови в ранние сроки беременности мигрируют в матку, где формируют пул децидуальных НК-клеток, которые являются основными эффекторами иммунной толерантности в зоне фетоплацентарного контакта, ограничивают цитотоксические реакции к антигенам плода, продуцируют факторы, способствующие инвазивному росту трофобласта [15, 18, 19]. Увеличение общего количества и цитотоксической активности НК-клеток периферической крови и децидуальных НК-клеток ассоциировано со спонтанными абортами и другими патологиями беременности (преэклампсией) [14, 19, 20]. В третьем триместре беременности иммунореактивность организма матери определяется подготовкой к родам и восстановлением измененных функций [13, 15, 19].

Беременность сопровождается глубокими изменениями метаболического обмена в организме матери. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом. Основным источником энергии для НК-клеток являет-

ся глюкоза, которая попадает в клетку с помощью белков-транспортеров (Glut-1) [21, 22]. Метаболизм глюкозы в клетке включает гликолиз и окислительное фосфорилирование [21, 22]. Незрелые НК-клетки обладают высокой метаболической активностью и преимущественно используют гликолиз даже при достаточном присутствии кислорода [22–24]. По мере созревания НК-клеток поглощение глюкозы, экспрессия ферментов гликолиза снижаются, а окислительное фосфорилирование становится основной метаболической программой зрелых нестимулированных НК-клеток [22, 23, 24]. При активации зрелых НК-клеток увеличиваются экспрессия Glut-1 и потребление глюкозы, интенсивность гликолиза и окислительного фосфорилирования, нарастает масса митохондрий [21, 22, 24]. Однако взаимосвязь функций НК-клеток с их метаболическим статусом при физиологической беременности не исследованы. Поэтому цель работы – изучить экспрессию молекул Glut-1, CD94 и CD107a, характеризующих метаболическую и цитотоксическую активность и массу митохондрий разных субпопуляций НК-клеток периферической крови в I и III триместрах физиологической беременности. Учитывая высокую частоту патологий беременности иммунного генеза, а также широкое использование НК-клеток для иммунотерапии онкологических заболеваний, значимость изучения механизмов, регулирующих их функциональную активность, не вызывает сомнений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования

Исследовали периферическую кровь условно здоровых женщин в I и III триместрах физиологической беременности. В группу сравнения вошли практически здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Критериями включения являлись следующие характеристики: наличие одной и более успешно завершившихся беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических соматических, эндокринных, аутоиммунных, генетических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных, гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов; наличие добровольного информированного согласия на использование биологического материала. Клиническая и демографическая характеристика участниц исследования представлена в табл. 1. Исследуемые группы не отличались по возрасту.

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика участниц исследования

Исследуемые группы	<i>n</i>	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	7	29 (20–37)	-
Беременные, I триместр	7	26 (21–35)	10 (5–12)
Беременные, III триместр	7	33 (27–41)	35 (28–39)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1 – Q3); *n* = количество проведенных исследований.

2. Анализ фенотипа клеток

Венозную кровь забирали из локтевой вены утром натощак в объеме 2 мл в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли методом седиментации в градиенте плот-

ности фиколл-урографина (1.077 г/см^3) по стандартной методике. РВМС дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), затем определяли количество регуляторных $\text{CD16}^- \text{CD56}^{\text{bright}} \text{NK}$, цитотоксических $\text{CD16}^+ \text{CD56}^{\text{dim}} \text{NK}$ и $\text{CD16}^{\text{hi}} \text{CD56}^- \text{NK}$ методом проточной цитометрии. Характеристика используемых антител представлена в табл. 2.

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител

Моноклональные антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Компания-производитель
CD3	PE	ОКТ3	Mouse/IgG2a, κ	eBioscience, США
CD14	PE	M5E2	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend, США
CD19	PE	H1B19	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 605™	HCD56	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD16	Pacific blue™	3G8	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
Glut-1	PE-Cy5.5	polyclonal	Rabbit/IgG	Biorbyt, Великобритания
CD94	APC/Fire™ 750	DX22	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD107a (LAMP-1)	APC	H4A3	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США

Стратегия гейтирования представлена на рис. 1. Живые клетки (living cells) отделяли с использованием красителя Zombie UV™ (BioLegend, США). Фенотип клеток анализировали на проточном цитометре «CytoFlexS» с использованием программного обеспечения «CytExpert 2.0», Beckman Coulter, США). Для анализа фенотипа клеток использовали не менее 1×10^6 событий в каждой пробе. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие контроли: негативный и изотипические. Затем в каждой субпопуляции NK-клеток определяли экспрессию молекулы Glut-1, CD94, CD107a (рис. 1). Для оценки массы митохондрий вносили митохондриальный зонд MitoSpy™ Green FM (BioLegend, США) в конечных концентрациях 250 нМ в соответствии с инструкцией производителя. Краситель MitoSpy Green избирательно накапливается в матриксе митохондрий, где ковалентно взаимодействует с белками митохондрий, связываясь со свободными тиоловыми группами остатков цистеина [25, 26]. Накопление этого флуоресцентного маркера в матриксе митохондрий прямо пропорционально их массе и объему, не зависит от их мембранного потенциала [25]. После окрашивания (37 °C, 30 мин) клетки отмывали центрифугированием в растворе ФСБ.

3. Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы «Prism 8.0.1.» (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий между группами: небеременные – NP (группа сравнения); беременные в I триместре (I); беременные в III триместре (III) – определяли с использованием критерия Крускала – Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Взаимосвязь признаков оценивали, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона (r). Данные на рисунке представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних (UQ) квартилей. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

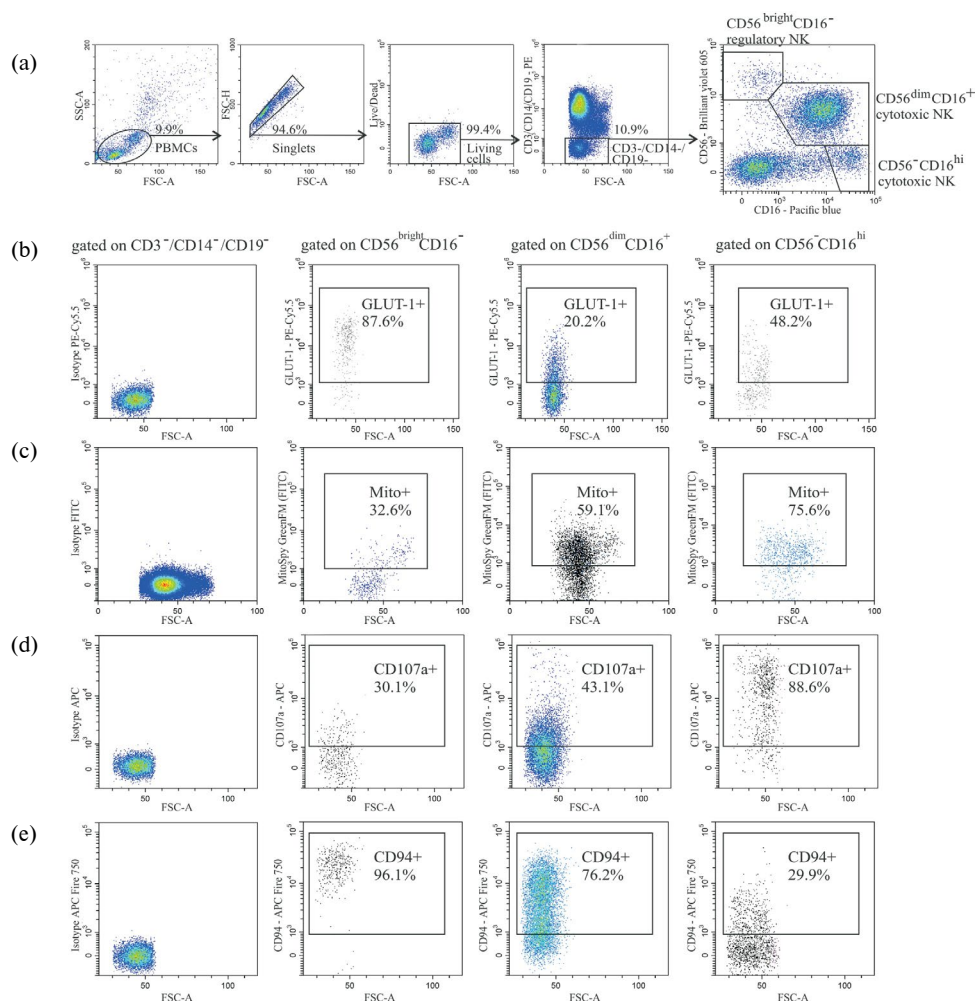


Рис. 1. Стратегия гейтирования, используемая для анализа разных субпопуляций NK-клеток периферической крови и экспрессии молекул Glut-1, CD94, CD107a, массы митохондрий

(a) – выделение гейта лимфоцитов по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/FSC-H); определение живых клеток (living cells), негативных по окрашиванию ZombieUV™ (ZombieUV™ Fixable Viability Kit, Bio Legend); выделение негативной популяции по маркерам CD3/CD14/CD19 в гейте живых PBMC; определение регуляторной субпопуляции (regulatory) NK-клеток как процента CD16⁻CD56^{bright} и цитотоксических субпопуляций (cytotoxic) NK-клеток как процента CD16⁺CD56^{dim} и CD16^{hi}CD56⁻ – в гейте CD3/CD14/CD19-негативных PBMC. На рис. 1 представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента.

(b) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы Glut-1 в исследуемых субпопуляциях NK-клеток.

(c) Негативный контроль и процент накапливающих MitoSpy Green (Mito⁺) клеток в разных субпопуляциях NK-клеток.

(d) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы CD107a в разных субпопуляциях NK-клеток.

(e) Изотипический контроль и оценка экспрессии молекулы CD94 в исследуемых субпопуляциях NK-клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия транспортера глюкозы Glut-1

При изучении экспрессии транспортера глюкозы Glut-1 установлено, что у небеременных женщин проценты Glut-1-экспрессирующих регуляторных CD16⁺CD56^{bright}NK и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK не отличались между собой, а наибольшее количество Glut-1-позитивных клеток было обнаружено среди минорной субпопуляции цитотоксических CD16^{hi}CD56⁺NK (рис. 2а).

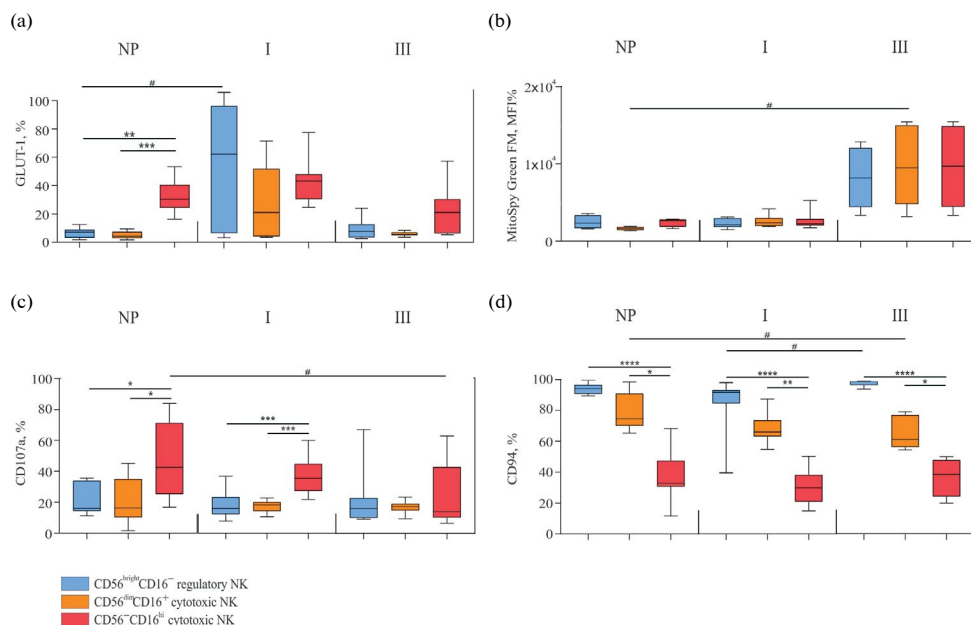


Рис. 2. Процент клеток, позитивных по экспрессии Glut-1, CD107a, CD94, включению митохондриального зонда MitoSpy Green FM в разных субпопуляциях NK-клеток периферической крови у небеременных (NP), беременных в I и III триместрах физиологической беременности.

CD16⁺CD56^{bright}NK – регуляторные NK-клетки; CD16⁺CD56^{dim}NK – цитотоксические NK-клетки; CD16^{hi}CD56⁺NK – минорная субпопуляция цитотоксических NK-клеток; данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1 – Q3); на рис. 2b по оси ординат представлена медиана яркости флуоресценции (MFI, Median Fluorescence Intensity) в клетках, содержащих MitoSpy Green FM; # – $p < 0.05$ по отношению к группе небеременных (NP) по критерию Крускала – Уоллиса; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$ между процентом разных типов NK-клеток в одной группе по критерию Крускала – Уоллиса.

В I триместре беременности количество регуляторных Glut-1⁺CD16⁺CD56^{bright}NK значительно выше, чем у небеременных (рис. 2а). Подобная тенденция присутствует и для цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, но не является достоверной. В III триместре количество Glut-1-экспрессирующих клеток в каждой субпопуляции NK-клеток не отличается от показателей небеременных. Можно полагать, что усиление экспрессии Glut-1 на регуляторных и цитотоксических NK-клетках свидетельствует об их активации в I триместре и, как следствие, повышенном потреблении глюкозы и усилении ее метаболизма. В то же время в III триместре уровень потребления глюкозы NK-клетка-

ми возвращается к значениям у небеременных. Количество Glut-1-экспрессирующих клеток среди минорной субпопуляции цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK не меняется ни в I, ни в III триместре беременности, что, очевидно, объясняется исходно высокой экспрессией Glut-1 на этих клетках.

Анализ массы митохондрий с использованием MitoSpy Green FM

При анализе с использованием MitoSpy Green FM установлено, что как у небеременных, так и в I триместре беременности способность регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16^{hi}CD56-NK накапливать MitoSpy Green сравнима между собой, что свидетельствует о сходной массе и объеме митохондрий в обеих группах (рис. 2b). В III триместре беременности средняя интенсивность свечения усиливается во всех типах NK-клеток, но достоверно только в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK. Можно заключить, что в III триместре беременности в цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK-клетках масса и объем митохондрий увеличиваются по сравнению с параметрами небеременных.

Экспрессия CD107a

CD107a является маркером дегрануляции и активации NK-клеток [10]. У небеременных цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторные CD16-CD56^{bright}NK обладают сравнимой экспрессией CD107a, а минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56-NK имеют наибольшую экспрессию CD107a среди субпопуляций NK-клеток периферической крови, что свидетельствует об их высокой цитотоксической активности и согласуется с высокой экспрессией CD16 (рис. 1, 2с). В I и III триместрах беременности экспрессия CD107a не меняется на цитотоксических и регуляторных NK-клетках, несмотря на их активацию, о чем можно судить по экспрессии Glut-1 и увеличению массы митохондрий. А на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK экспрессия CD107a выше в I триместре, а в III триместре ниже, чем у небеременных.

Экспрессия CD94

Установлено, что у небеременных женщин наименьшая экспрессия молекулы CD94 выявляется на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK, тогда как на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK экспрессии молекулы CD94 сравнимы между собой. В I триместре экспрессия CD94 на регуляторных и цитотоксических NK-клетках не меняется, в III триместре на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK снижается по сравнению с небеременными, а на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, напротив, увеличивается по сравнению с показателями I триместра. Анализ корреляционных связей показывает, что экспрессия CD94 имеет обратную зависимость с присутствием CD107a на минорных цитотоксических CD16^{hi}CD56-NK ($r = -0.98$; $p < 0.05$), цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.88$; $p < 0.05$) и регуляторных CD16-CD56^{bright}NK ($r = -0.93$; $p < 0.05$) как у небеременных, так и в I триместре беременности соответственно CD16^{hi}CD56-NK ($r = -0.95$; $p < 0.05$), цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK ($r = -0.86$; $p < 0.05$) и регуляторных CD16-CD56^{bright}NK ($r = -0.95$; $p < 0.05$), что подтверждает взаимосвязь экспрессии CD94 с ограничением цитотоксической функции NK-клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, беременность сопровождается глубокими изменениями гормонально-цитокиновых ансамблей, что необходимо для поддержания толерантности иммунной системы организма матери к полуаллогенному плоду [12, 33]. Функции NK-клеток периферической крови при беременности также находятся под

контролем гормонов и других факторов, продуцируемых плацентой, поскольку они экспрессируют специфические рецепторы к ним [11–13, 34]. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом, однако эти изменения при физиологической беременности практически не изучены. В проведенных исследованиях установлено, что популяция НК-клеток периферической крови гетерогенна по экспрессии молекул Glut-1, CD107a и CD94. Так, у небеременных минорные цитотоксические CD16^{hi}CD56-NK обладают наибольшей экспрессией Glut-1 и CD107a, но имеют наименьшую экспрессию CD94 по сравнению с остальными субпопуляциями НК-клеток. Регуляторные CD16-CD56^{bright}NK имеют тенденцию к большей экспрессии CD94, чем цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK, достоверность данных не достигнута. Подобные результаты описаны и другими авторами [6]. Цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK и регуляторные CD16-CD56^{bright}NK не отличаются между собой по экспрессии Glut-1, CD107a. Масса митохондрий также сравнима у всех исследуемых субпопуляций. Анализируя полученные результаты, можно полагать, что гетерогенность по экспрессии CD94 связана, по-видимому, с разной степенью зрелости НК-клеток и обуславливает разную цитотоксичность [1, 2]. Известно, что экспрессия CD94 снижается по мере созревания НК-клеток, и преобладающими ингибирующими рецепторами становятся KIR (иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров) [5–8]. Регуляторные CD16-CD56^{bright}NK являются менее зрелыми по сравнению с цитотоксическими CD16⁺CD56^{dim}NK, а CD16^{hi}CD56-NK-клетки считаются конечной стадией их дифференцировки, что полностью согласуется с последовательной утратой CD94 по мере созревания НК-клеток [5–8] (рис. 2d). В то же время цитотоксическая активность субпопуляций НК-клеток изменяется в обратной зависимости, что подтверждается экспрессией CD107a и CD16 на разных субпопуляциях и выявленными корреляционными взаимосвязями. Согласно современным данным, взаимодействие рецепторного комплекса CD94-NKG2A с неклассическими молекулами HLA-E на клетках-мишенях подавляет цитотоксическую активность НК-клеток [30]. В ряде работ показано, что на НК-клетках периферической крови преобладают гетеродимерные рецепторы CD94-NKG2A, при этом экспрессия молекул NKG2A увеличивается при беременности [5–8], что дает возможность говорить о преобладающей ингибиторной функции CD94 на НК-клетках. Однако следует отметить, что CD94 образует гетеродимеры и с другими молекулами семейства NKG2 – C, B, E, причем гетеродимеры CD94-NKG2B являются ингибирующими, а CD94-NKG2C/E активирующими рецепторами [31].

Отличия по экспрессии Glut-1a отражают разную способность к потреблению глюкозы и, как следствие, разную метаболическую активность. Так, у небеременных наиболее метаболически активными, по-видимому, являются CD16^{hi}CD56-NK, которые обладают и наибольшей цитотоксичностью, судя по высокой экспрессии CD107a, CD16 и низкой экспрессии CD94. А регуляторные CD16-CD56^{bright}NK и цитотоксические CD16⁺CD56^{dim}NK сравнимы по показателям метаболической активности и интенсивности дегрануляции. Можно полагать, что реализация цитотоксической функции CD16^{hi}CD56-NK требует повышенного потребления глюкозы. Хотя функции CD16^{hi}CD56-NK до конца не изучены, полученные результаты делают их перспективным объектом для использования в иммунотерапии.

В I триместре беременности происходит активация в первую очередь регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, что выражается в усилении экспрессии Glut-1. По-видимому, это связано с усилением миграционной способности этих клеток в этот период. Также прослеживается тенденция к увеличению экспрессии Glut-1 и на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, но не на CD16^{hi}CD56-NK, что, очевидно, объясняется исходно высокой экспрессией Glut-1 на них. Масса митохондрий не меняется ни на регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, ни на цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16^{hi}CD56-NK. Поэтому можно полагать, что увеличение потребления глюкозы активирует главным образом гликолиз в регуляторных CD16-CD56^{bright}NK, поскольку они не являются зре-

лыми [22–24]. При этом, несмотря на тенденцию к активации метаболизма, цитотоксичность $CD16^+CD56^{dim}NK$, $CD16^{hi}CD56-NK$ не меняется, что подтверждается отсутствием изменений в экспрессии $CD107a$, $CD94$.

В III триместре происходит активация преобладающей субпопуляции цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$, что выражается в увеличении массы и объема митохондрий и, по-видимому, свидетельствует об усилении процессов окислительного фосфорилирования в этой субпопуляции. Экспрессия $Glut-1$ во всех исследуемых субпопуляциях NK -клеток возвращается к исходным значениям у небеременных женщин. Активация цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$ сопровождается снижением экспрессии $CD94$ на них, что, по-видимому, является следствием их активации и/или созревания, однако это не сопровождается усилением экспрессии $CD107a$. Для цитотоксических $CD16^{hi}CD56-NK$ также выявляется тенденция к увеличению массы и объема митохондрий, что вместе с высокой экспрессией $Glut-1$ на протяжении всей беременности характеризует их высокую метаболическую активность. Экспрессия $CD94$ на $CD16^{hi}CD56-NK$ остается низкой как в I, так и в III триместре беременности по сравнению с другими субпопуляциями NK -клеток, но экспрессия $CD107a$ в III триместре на них снижается, что свидетельствует об ограничении процессов дегрануляции, и, как следствие, цитотоксичности, характерной для физиологической беременности [29]. На регуляторных $CD16-CD56^{bright}NK$ экспрессия $CD94$ увеличивается в III триместре по сравнению с I триместром, что согласуется с их незрелым статусом и низкой цитотоксичностью. Можно заключить, что одним из возможных механизмов ограничения цитотоксичности NK -клеток при физиологической беременности является регуляция экспрессии $CD94$. Другим механизмом, ограничивающим дегрануляцию NK -клеток в поздние сроки беременности, является увеличение экспрессии $Tim-3$ (иммуноглобулиновый и муциновый домен T -клеток) и $CD9$, описанное в работах ряда авторов [17, 32].

Суммируя полученные результаты, можно полагать, что при физиологической беременности в I триместре происходит активация метаболизма преимущественно в регуляторных $CD16-CD56^{bright}NK$, а в III триместре – в цитотоксических $CD16^+CD56^{dim}NK$, однако это не влияет на их дегрануляцию. Минорная субпопуляция $CD16^{hi}CD56-NK$ сохраняет высокую активность на протяжении всей беременности, но к концу беременности их цитотоксическая активность снижается. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций NK -клеток при беременности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Г.О. и С.В.Ш.), сбор данных (О.А.Л.; О.Л.Г.), обработка данных (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г.), написание и редактирование манускрипта (Е.Г.О.; О.А.Л.; О.Л.Г., С.В.Ш.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 22–25–00694). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Локальным этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, протокол № 16 от 5.06.2022 г.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A (2008) The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 77(1): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.04.007>
2. Di Santo JP (2008) Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol* 38(11): 2948–2951. <https://doi.org/10.1002/eji.200838830>
3. Cocker ATH, Liu F, Djaoud Z, Guethlein LA, Parham P (2022) CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. *Front Immunol* 13: 992723. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.992723>
4. Wijaya RS, Read SA, Schibeci S, Han S, Azardaryany MK, van der Poorten D, Lin R, Yuen L, Lam V, Douglas MW, George J, Ahlenstiel G (2021) Expansion of dysfunctional CD56-CD16⁺ NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 41(5): 969–981. <https://doi.org/10.1111/liv.14784>
5. Braud VM, Allan DSJ, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795–799. <https://doi.org/10.1038/35869>
6. Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y (2006) Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol* 70(1–2): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.12.008>
7. Moffett A, Shreeve N (2015) First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 30: 1519–1525. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev098>
8. Shreeve N, Depierreux D, Hawkes D, Traherne JA, Sovio U, Huhn O, Jayaraman J, Horowitz A, Ghadially H, Perry JRB, Moffett A, Sled JG, Sharkey AM, Colucci F (2021) The CD94/NKG2A inhibitory receptor educates uterine NK cells to optimize pregnancy outcomes in humans and mice. *Immunity* 54(6): 1231–1244.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.021>
9. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294: 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>
10. Galandrin R, Palmieri G, Paolini R, Piccoli M, Frati L, Santoni A (1997) Selective binding of shc-SH2 domain to tyrosine-phosphorylated zeta but not gamma-chain upon CD16 ligation on human NK cells. *J Immunol* 159(8): 3767–3773. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.159.8.3767>
11. Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L (2008) NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J Immunol* 180(8): 5746–5753. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5746>
12. Shirshov SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG (2017) Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Dokl Biol Sci* 472(1): 28–30. <https://doi.org/10.1134/S0012496617010021>
13. Szekeres-Bartho J (2009) Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* (5): 873–882. <https://doi.org/10.2217/imt.09.54>. PMID: 20636029
14. Shojaei Z, Jafarpour R, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Pashangzadeh S, Motalebnezhad M (2022) Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol Res Pract* 238: 154062. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154062>
15. Mikhailova V, Grebenkina P, Khokhlova E, Davydova A, Salloum Z, Tyshchuk E, Zagainova V, Markova K, Kogan I, Selkov S, Sokolov D (2022) Pro- and anti-inflammatory cytokines in the context of NK cell-trophoblast interactions. *Int J Mol Sci* 23(4): 2387. <https://doi.org/10.3390/ijms23042387>

16. Shi Y, Ling B, Zhou Y, Gao T, Feng D, Xiao M, Feng L (2007) Interferon-gamma expression in natural killer cells and natural killer T cells is suppressed in early pregnancy. *Cell Mol Immunol* 4(5): 389–394. <http://www.cmi.ustc.edu.cn/4/5/389.pdf>
17. Орлова ЕГ, Логинова ОА, Горбунова ОЛ, Каримова НВ, Ширишев СВ (2023) Экспрессия молекул TIM-3, CD49a, CD9 на натуральных киллерах (NK) и Т-лимфоцитах с функциями NK периферической крови в разные сроки физиологической беременности. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(5): 572–587. [Orlova EG, Loginova OA, Gorbunova OL, Karimova NV, Shirshov SV (2023) Expression of TIM-3, CD49a, CD9 molecules on natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions of peripheral blood at different periods of physiological pregnancy *Russ J Physiol* 109(5): 572–587. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093023030146>
18. Михайлова ВА, Белякова КЛ, Сельков СА, Соколов ДИ (2017) Особенности дифференцировки NK-клеток: CD56^{dim} и CD56^{bright} NK-клетки во время и вне беременности *Мед иммунол* 19(1): 19–26. [Mikhailova VA, Belyakova KL, Selkov SA, Sokolov DI (2017) Features of NK cell differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells during and outside pregnancy *Med Immunol* 19(1): 19–26. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>
19. Sotnikova N, Voronin D, Antsiferova Y, Bukina E (2014) Interaction of decidual CD56⁺NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scand J Immunol* 80(3): 198–208. <https://doi.org/10.1111/sji.12196>
20. Гребнева ОС, Зильбер МЮ (2015) Особенности субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток плаценты после преждевременной отслойки. *Пермск мед журн* 32(1): 12–17. [Grebneva OS, Silber MU (2015) Characteristics of the subpopulation composition of immunocompetent cell placenta after a pre-existing layer *Perm Med J* 32(1): 12–17. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/pmj32112-17>
21. Keating SE, Zaatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, Gardiner CM (2016) Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56^{bright} NK Cells. *J Immunol* 196(6): 2552–2560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501783>
22. Cong J (2020) Metabolism of natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Front Immunol* 11: 1989. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01989>
23. Highton AJ, Diercks BP, Möckl F, Martrus G, Sauter J, Schmidt AH, Bunders MJ, Körner C, Guse AH, Altfeld M (2020) High metabolic function and resilience of NKG2A-educated NK cells. *Front Immunol* 11: 559576. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.559576>
24. Pfeifer C, Highton AJ, Peine S, Sauter J, Schmidt AH, Bunders MJ, Altfeld M, Körner C (2018) Natural killer cell education is associated with a distinct glycolytic profile. *Front Immunol* 9: 3020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03020>
25. Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA (2003) MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 793: 141. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00371-4)
26. Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF (2011) Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A* 79(6): 405–425. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>
27. Meggyes M, Miko E, Polgar B, Bogar B, Farkas B, Illes Z (2014) Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One* 9(3): e92371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092371>
28. Meggyes M, Nagy DU, Feik T, Boros A, Polgar B, Szereday L (2022) Examination of the TIGIT-CD226-CD112-CD155 immune checkpoint network during a healthy pregnancy. *Int J Mol Sci* 23(18): 10776. <https://doi.org/10.3390/ijms231810776>
29. Whettlock M, Woon E, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V (2022) Dynamic changes in uterine NK cell subset frequency and function over the menstrual cycle and pregnancy Emily. *Front Immunol* 13: 880438. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.880438>
30. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* 89(2): 216–224. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>

31. Beziat V, Hervier B, Achour A, Boutolleau D, Marfain-Koka A, Vieillard V (2011) Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* 117: 4394–4396. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319194>
32. Reyes R, Cardenes B, Machado-Pineda Y, Cabañas C (2018) Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 9: 863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00863>
33. Ширшев СВ (2009) Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург: УрО РАН. [Shirshev SV (2009) Immunology of maternal-fetal interactions. Ekaterinburg. Ural branch RAS. (In Russ)].
34. Shirshev SV, Nekrasova IV, Gorbunova OL, Orlova EG, Maslennikova IL (2017) MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function. *Dokl Biochem Biophys* 474(1): 168–172. <https://doi.org/10.1134/S160767291703005X>

Expression of Molecules Characterizing Metabolic and Cytotoxic Activity of Natural Killer Different Subpopulations of Peripheral Blood During Pregnancy

E. G. Orlova^{a, #}, O. A. Loginova^a, O. L. Gorbunova^a, and S. V. Shirshev^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS – branch of Perm Federal Research Center UB RAS, Perm, Russia*

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

The functions of peripheral blood NK cells change significantly during pregnancy, which is mainly due to the inhibition of their cytotoxicity. The functional activity of NK cells is directly related to their metabolic status, but these changes in physiological pregnancy have not been studied. The aim of this work is to study the expression of Glut-1, CD94 and CD107a molecules characterizing metabolic and cytotoxic activity, as well as the mitochondrial mass of different subpopulations of peripheral blood NK cells in the I and III trimesters of physiological pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of healthy women in the I and III trimesters of physiological pregnancy. The control group consisted of healthy non-pregnant women in the follicular phase of the menstrual cycle. The expression of Glut-1, CD94, CD107a molecules and the mitochondrial mass were analyzed by flow cytometry on regulatory (CD16⁺CD56^{bright}), cytotoxic (CD16⁺CD56^{dim}), minor cytotoxic (CD16^{hi}CD56⁻) NK cells. It was found that in non-pregnant women, minor cytotoxic CD16^{hi}CD56⁻ NK have the highest expression of Glut-1, CD107a and the lowest expression of CD94 compared to other NK cell subpopulations. On regulatory CD16⁺CD56^{bright} and cytotoxic CD16⁺CD56^{dim} NK, the expression of these molecules is comparable to each other. The mitochondrial mass is similar in all studied subpopulations. In the first trimester, the expression of Glut-1 increases on regulatory CD16⁺CD56^{bright} NK, the mitochondrial mass and the expression of CD94, CD107a in all NK cells do not differ from non-pregnant ones. In the third trimester, the mitochondrial mass increases in cytotoxic CD16⁺CD56^{dim} NK cells, but CD94 expression decreases compared to non-pregnant ones, and the expression CD94 in regulatory CD16⁺CD56^{bright} NK increases compared to the first trimester. CD107a expression in minor cytotoxic CD16^{hi}CD56⁻ NK decreases, but in other subpopulations does not change compared to non-pregnant. The expression of Glut-1 does not change in all subpopulations. Thus, different subpopulations of peripheral blood NK cells are heterogeneous in the expression of Glut-1, CD107a, CD94. The expression of these molecules during physiological pregnancy varies by trimester. The obtained results are important for understanding the mechanisms of NK cell function regulations during pregnancy.

Keywords: NK cells, pregnancy, Glut-1, mitochondrial mass, CD94, CD107a

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОЗНАВАЕМЫЕ И НЕОСОЗНАВАЕМЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЗАДАЧЕ
АРИФМЕТИЧЕСКОГО ПРАЙМИНГА ЗАВИСЯТ ОТ УРОВНЯ
АРИФМЕТИЧЕСКОГО НАВЫКА

© 2024 г. В. М. Князева^{1,*}, Н. В. Полякова¹, Д. Г. Федоров¹, Д. Д. Ситникова¹,
А. А. Александров¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: v. m.knyazeva@spbu.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 06.02.2024 г.

Принята к публикации 06.02.2024 г.

В исследовании изучался вклад осознанных и неосознанных процессов в задаче арифметического прайминга в зависимости от уровня арифметического навыка испытуемых. Испытуемые были разделены на две группы по степени сформированности навыка на основании результатов теста на скорость и точность арифметических вычислений. Во время эксперимента на экране монитора предъявлялись замаскированные и незамаскированные примеры на сложение однозначных чисел (праймы) и следующие за ними правильные и неправильные ответы. В задаче осознанного восприятия (незамаскированный прайминг) при предъявлении ответа на примеры большой и малой проблем (результатом сложения операндов является число больше или меньше 10 соответственно) наблюдалось возникновение арифметического эффекта N400 и поздней позитивной волны (LPC) в обеих группах испытуемых. В случае неосознанного восприятия (замаскированный прайминг) при предъявлении ответа на примеры малой проблемы арифметический эффект LPC появлялся в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком. Таким образом, арифметический эффект LPC может являться индикатором процессов кодирования и извлечения информации, которые связаны с уровнем арифметического навыка испытуемых. Обнаружение арифметического эффекта LPC при неосознанном предъявлении примеров может свидетельствовать о независимом от активного внимания характере этих процессов.

Ключевые слова: арифметика, замаскированный прайминг, неосознанное восприятие, сложение, вызванные потенциалы, N400, поздняя позитивная волна (LPC)

DOI: 10.31857/S0869813924080135, EDN: CMZZHA

ВВЕДЕНИЕ

Базовая арифметика, то есть умение складывать, вычитать, умножать и делить целые числа – это основной навык, который приобретается на ранних этапах обучения и играет ключевую роль в развитии математических способностей. Разница в успешности освоения математического навыка определяется индивидуальными различиями на нейрональном и поведенческом уровнях, что наблюдается как у детей, так и у взрослых

испытываемых [1, 2]. При решении арифметических задач с целыми числами используются две основные стратегии: извлечение результата из долговременной памяти и последовательное вычисление. Выбор той или иной стратегии зависит от сложности задачи, арифметических способностей испытуемого и напрямую влияет на скорость вычислений и количество совершенных ошибок. Тот факт, что взрослые испытуемые массово сообщают об использовании стратегии извлечения результата из памяти для примеров с суммой слагаемых меньше 10 [3], может свидетельствовать о том, что простые арифметические операции уже автоматизированы и больше не находятся под сознательным контролем. С другой стороны, несмотря на то, что в литературе существует консенсус в отношении того, что дети в возрасте старше 10 лет извлекают результаты простых задач на сложение из долговременной памяти, имеются данные, что дети [4] и взрослые [5] по-прежнему полагаются на процедуры счета для решения простых задач.

Исследования реакции мозга на примеры разной степени сложности выявили изменения электрофизиологической активности как во время процесса вычисления [6, 7], так и во время проверки ответа [8–10]. Задача на проверку правильности ответа позволяет оценить точность поиска решения, а также выявить различия в используемой вычислительной стратегии в зависимости от индивидуального уровня арифметического навыка. Электрофизиологическими показателями реакции мозга на предъявление результата решения арифметического примера служит генерация двух компонент вызванного потенциала (ВП) – волны N400 и следующей за ней поздней позитивной волны (late positive component, LPC), амплитуды которых увеличиваются при предъявлении ошибочного результата. Возникающая разница в амплитуде ВП, регистрируемого в ответ на предъявление верного и ошибочного результата, носит название арифметического эффекта волны N400 и волны LPC. Эту разницу принято связывать с активацией механизмов памяти [8, 9, 11].

Существуют данные, что нейронные системы, задействованные в обработке семантических и арифметических элементов, не обязательно идентичны, но имеют определенное функциональное сходство [12, 13]. Задача проверки правильности ответа является аналогом задачи семантического прайминга (т. н. «эффект предшествования») и приводит к ускорению реакции на целевой стимул с помощью связанного с контекстом предшествующего стимула (прайма) [14]. Существуют две гипотезы о возможных когнитивных механизмах, лежащих в основе эффекта прайминга: сознательная обработка стимула и неосознаваемое автоматическое распространение активации на связанные области семантической сети [15]. Согласно первой из предложенных гипотез, эффект прайминга является результатом сознательно контролируемых процессов, таких как семантическое сопоставление или семантическое ожидание, и зависит от ресурсов внимания [14]. Вторая гипотеза предполагает, что предъявление прайма активирует соответствующие концептуальные представления в семантической сети, и активация распространяется на семантически связанные узлы, тем самым повышая уровень их активации, что облегчает узнавание контекстно связанных стимулов. Предполагается, что автоматическое распространение активации не зависит от ограниченных возможностей процессов внимания [15].

Для исследования возможных механизмов осознаваемых и неосознаваемых процессов широкое применение нашла парадигма замаскированного прайминга [16], в которой сознательное восприятие контекста нарушается путем предъявления после прайма так называемой “маски” (например, случайная последовательность букв или символов). В такого рода исследованиях участники обычно не могут сообщить, что видели прайм или опознать его после эксперимента. Электрофизиологические и поведенческие результаты, получаемые в задаче замаскированного прайминга, в целом повторяют данные, полученные в задачах с осознаваемым восприятием прайма, хотя они обычно несколько менее выражены [16]. Таким образом, считается, что полученные результаты свидетельствуют о наличии автоматических процессов при распознавании стимулов.

Поведенческие исследования с использованием замаскированного прайминга в арифметической задаче проверки ответа свидетельствуют о том, что человек способен неосознаваемо выполнять такие арифметические вычисления с однозначными целыми числами, как умножение, сложение и вычисление среднего [17–19]. Было установлено, что время реакции на предъявление целевых чисел уменьшается в случае предъявления перед ними замаскированного примера, результат вычисления которого совпадает по значению с целевым числом.

С другой стороны, электрофизиологические исследования процессов неосознаваемого арифметического прайминга крайне немногочисленны. В настоящее время нам известны только два исследования, посвященные изучению нейрофизиологических механизмов неосознаваемого восприятия арифметических примеров. В исследовании Strauss и Dehaene [20] испытуемым, находящимся в состоянии сна, предъявляли аудиозапись, состоящую из арифметических примеров и следующих за ними правильных или неправильных ответов. Во время эксперимента использовалась одновременная регистрация электро- и магнитоэнцефалограммы (МЭГ). В результате было обнаружено достоверное влияние правильности ответа на параметры ВП в интервале 316–640 мс, но только для данных МЭГ. Аналогичный эксперимент был повторно проведен на испытуемых, находящихся в состоянии бодрствования со смещенным вниманием: участникам исследования предъявлялись аудиостимулы и давалась посторонняя задача на определение тона голоса. В эксперименте со смещенным вниманием влияние правильности ответа на параметры ВП было обнаружено в интервале с сильно увеличенной латентностью – от 524 до 712 мс, однако также только для данных МЭГ. Таким образом, полученные результаты позволили авторам предположить, что доступ к арифметическим фактам, хранящимся в долговременной памяти, возможен и без участия сознания.

В исследовании 2019 г. [21] было продемонстрировано наличие эффекта N400 при замаскированном предъявлении табличных примеров на умножение. Испытуемым предъявлялся замаскированный пример на умножение, состоящий из двух однозначных чисел, и следующий за ним правильный или неправильный ответ. Эксперимент состоял из трех блоков – два блока замаскированного прайминга, между которыми был осознаваемый блок без маскировки прайма. Эффект N400 был обнаружен только для второго неосознаваемого блока. Кроме того, был проведен аналогичный эксперимент, в котором испытуемые накануне вечером до эксперимента в течение 10 мин повторяли таблицу умножения, в результате чего эффект N400 стал обнаруживаться в обоих неосознаваемых блоках. Таким образом, эта работа служит подтверждением возможности бессознательных арифметических операций, в данном случае умножения.

Принимая во внимание различные стратегии решения арифметических примеров разной степени сложности и их зависимость от индивидуальных арифметических способностей, а также свидетельства того, что человек способен бессознательно применять правила арифметического вычисления для таких операций как умножение, сложение и нахождение среднего, можно предположить, что различия в электрофизиологических показателях в зависимости от индивидуальных арифметических способностей существуют в том числе и при выполнении задачи замаскированного арифметического прайминга. Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение особенностей электрофизиологических показателей осознаваемых и неосознаваемых процессов в зависимости от индивидуальных арифметических способностей испытуемых.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые. В исследовании приняли участие 26 человек (12 мужчин и 14 женщин). Средний возраст испытуемых составил 21.4 ± 1.8 лет, коэффициент моторной асимметрии по результатам эдинбургского тестирования 65.6 ± 18.1 . По результатам опроса у всех испытуемых была нормальная или скорректированная до нормы острота

зрения, нормальный слух, никто из испытуемых не сообщил о наличии неврологических заболеваний в анамнезе за последние три года. Два испытуемых были исключены из последующего анализа из-за большого числа артефактов при записи электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

Для оценки уровня арифметического навыка был использован тест на скорость и точность арифметических вычислений [22], который включал три блока с примерами на сложение, вычитание и умножение двузначных чисел. Средние значения теста по всем блокам составили 30.54 ± 11.40 баллов (при шкале от 0 до 180). Так как парадигма нашего эксперимента включала только примеры на сложение, было решено разделить испытуемых на группы по уровню арифметического навыка на основании результатов блока с примерами на сложение. Средние значения теста по блоку с примерами на сложение составили 13.71 ± 4.73 баллов (при шкале от 0 до 60). Испытуемые с результатом ниже среднего значения были отнесены к группе со слабым арифметическим навыком, с результатом выше – к группе с сильным арифметическим навыком (каждая группа включала 12 человек).

Парадигма. В задаче арифметического прайминга испытуемым предъявлялись два экспериментальных блока: блок с осознаваемым восприятием прайма всегда предшествовал блоку с неосознаваемым восприятием [21]. Временная последовательность предъявления стимулов в блоках с осознаваемым и неосознаваемым восприятием стимулов представлена на рис. 1.

Во время исследования испытуемый сидел напротив экрана в комфортном положении, расстояние от центра монитора до глаз составляло 100 см, угловой размер стимулов составлял 2.86° по горизонтали и 2.00° по вертикали. Стимулы располагались в центре экрана (частота обновления 60 Гц). Стимулы предъявлялись с помощью программы Presentation (Neurobehavioral Systems Inc., Олбани, Калифорния, США).

В качестве праймов предъявлялись арифметические примеры на сложение, состоящие из двух однозначных чисел и знака сложения между ними (например, $3 + 2$). Для оценки фактора трудности задания примеры, результатом сложения операндов которых является число меньше 10, были обозначены как простые (32 примера, т. н. «малая проблема»), МП), а примеры с результатом вычисления больше 10 – как сложные (32 примера, т. н. «большая проблема»), БП) [23]. Были исключены примеры с одинаковыми слагаемыми (например, $2 + 2$) и примеры с ответом, равным 10 [24]. В каждом блоке демонстрировалось три сегмента по 64 примера: 32 малые проблемы и 32 большие проблемы, всего 384 примера в каждом. Длительность сегмента составляла около 4 мин, между сегментами давалось время для отдыха. Каждая последовательность стимулов начиналась с предъявления пустого экрана на 200 мс, после чего демонстрировался арифметический пример (прайм) длительностью 32 мс [17, 19, 21]. Через 468 мс после предъявления примера демонстрировался результат его вычисления, который мог быть верным или неверным с вероятностью 50%. Величина ошибки для неверных ответов генерировалась случайно и составляла $\pm 1-3$. В блоке с неосознаваемым восприятием сразу после появления примера предъявлялась маска (96 мс) в виде набора символов “&@&”, после чего через 372 мс показывался результат вычисления примера. Значения длительности предъявления стимулов и синхронизация предъявления с кадровой разверткой оценивались с использованием датчика яркости светового потока OPT101 (Texas Instruments, США). После эксперимента все испытуемые заявили, что не замечали цифр и знака сложения перед маской.

Главное отличие нашей задачи от применяемой в других исследованиях состояло в том, что испытуемые должны были решить пример до предъявления ответа, но не оценивать правильность предъявляемого решения или классифицировать его [25]. После осознаваемого блока проводился опрос, где испытуемых просили оценить, сколько примеров в процентном соотношении было успешно решено до предъявления ответа и/или одновременно с его появлением. В неосознаваемом блоке для под-

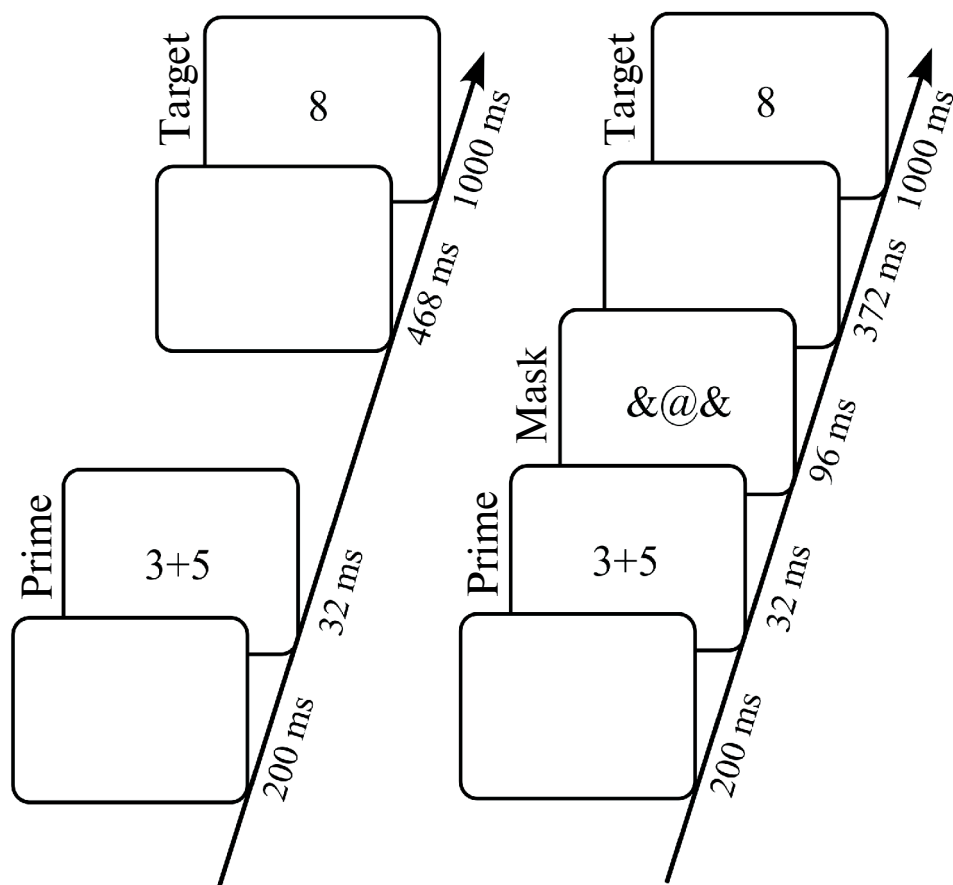


Рис. 1. Временная последовательность предъявления стимулов в блоках с осознваемым (слева) и неосознаваемым (справа) восприятием стимулов.

держания внимания предъявлялось двенадцать примеров на сложение без маскировки с последующим правильным ответом. Во время предъявления стимулов испытуемый должен был внимательно смотреть на экран и при появлении примера сложить предъявляемые числа до появления ответа. Испытуемому не сообщалось, что перед маской также предъявлялись примеры. После этого блока задавались те же вопросы, что и в блоке с осознваемым восприятием стимулов, а также уточнялось, что в маскируемых примерах испытуемый видел только маску. Таким образом, мы старались свести к минимуму интерференцию когнитивных и моторных процессов, которая наблюдалась при решении задачи классификации [26]. Кроме того, отсутствие моторного ответа обеспечило совпадение задач в осознваемом и неосознаваемом блоках.

В ходе эксперимента регистрировалась 31-канальная ЭЭГ с помощью электроэнцефалографа “Мицар-ЭЭГ-202” и пакета программного обеспечения WinEEG (ООО Мицар, Санкт-Петербург, Россия). В качестве референта использовался объединенный ушной электрод, заземляющий электрод располагался на лбу. Сопротивление электродов не превышало 10 кОм. Сигнал оцифровывался с частотой дискретизации 500 Гц

и полосой пропускания 0.53–30 Гц. Предварительная обработка ЭЭГ представляла собой удаление глазодвигательных артефактов методом независимых компонент, а также удаление артефактов, превышающих по амплитуде 100 мкВ.

Статистическая обработка результатов. По завершении предварительной обработки записей ЭЭГ проводился расчет индивидуальных вызванных потенциалов (ВП), а затем усредненных ВП для двух групп испытуемых. По кривой ВП, усредненной для всех отведений, типов стимулов и групп испытуемых (grand-grand average), а также на основании данных литературы [9, 27] были идентифицированы основные компоненты ВП и интервалы для их статистического анализа. Анализ амплитуды компонента N400 проводился в пределах временного окна 300–350 мс (пик 325 мс), компонента LPC – в пределах 450–550 мс.

Для статистического анализа были выбраны 9 отведений: F_3 , F_z , F_4 , C_3 , C_z , C_4 , P_3 , P_z , P_4 . Статистическая оценка результатов проводилась с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (IBM SPSS Statistic v. 21, IBM Corporation, Нью-Йорк, США) отдельно для блоков осознаваемого и неосознаваемого предъявления стимулов с внутригрупповыми факторами: «Тип ответа» (2 уровня: правильный и неправильный ответ), «Размер проблемы» (2 уровня: большая и малая проблема), «Каудальность» (3 уровня: фронтальные, медиальные и теменные отведения), «Латерализация» (3 уровня: правое и левое полушарие, центральные отведения) и межгрупповым фактором «Группа» (2 уровня: сильные арифметические способности и слабые арифметические способности). Тест Шапиро – Уилка не обнаружил значимого отклонения распределения значений от нормального. В случае значимого отклонения от предположения о сферичности, оцениваемого с помощью критерия Моучли, применялась поправка статистики F-критерия по методу Гринхауса – Гейссера. Апостериорный анализ проводился с помощью метода парных сравнений с коррекцией Бонферони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ компонента N400. При анализе компонента N400 в осознаваемом блоке (рис. 2) обнаружено достоверное влияние факторов «Тип ответа» ($F_{(1, 22)}^{(1, 22)} = 11.826$, $p = 0.002$, $\eta^2 = 0.350$) и «Размер проблемы» ($F_{(1, 22)}^{(1, 22)} = 33.998$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.607$), что позволяет говорить об увеличении негативности волны N400 в рассматриваемом диапазоне при предъявлении неправильного ответа, а также о достоверно более положительной амплитуде ВП при предъявлении примеров БП.

Наблюдается асимметрия в распределении амплитуд ВП на исследуемом интервале, что показано на топографических картах распределения электрической активности (рис. 3). Обнаружено значимое взаимодействие факторов «Размер проблемы» х «Латерализация» ($F_{(1.55, 34.218)}^{(1.55, 34.218)} = 4.029$, $p = 0.036$, $\eta^2 = 0.155$): при демонстрации задачи МП амплитуда N400 в отведениях правого полушария достоверно менее негативная по сравнению с ответом, который регистрируется в центральных отведениях ($p = 0.003$) и в отведениях левого полушария ($p = 0.002$). В случае с задачей БП такое же снижение негативности амплитуды в отведениях правого полушария наблюдается по сравнению с отведениями, расположенными в левом полушарии ($p = 0.037$). Кроме того, наблюдается разница в распределении ответа в росто-каудальном направлении («Каудальность» х «Латерализация», $F_{(2.525, 55.544)}^{(2.525, 55.544)} = 22.367$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.504$) с достоверно более негативной амплитудой в отведении P_z по сравнению с C_z ($p = 0.004$) и F_z ($p = 0.028$).

Анализ компонента N400 при неосознаваемом восприятии стимулов (рис. 4) выявил достоверное взаимодействие факторов «Размер проблемы» х «Каудальность» х «Латерализация» ($F_{(3.342, 73.533)}^{(3.342, 73.533)} = 2.937$, $p = 0.034$, $\eta^2 = 0.118$). Апостериорный анализ показал, что при предъявлении ответов на примеры МП наблюдается достоверно менее негативная амплитуда в отведении F_z по сравнению с отведениями F_3 ($p = 0.001$)

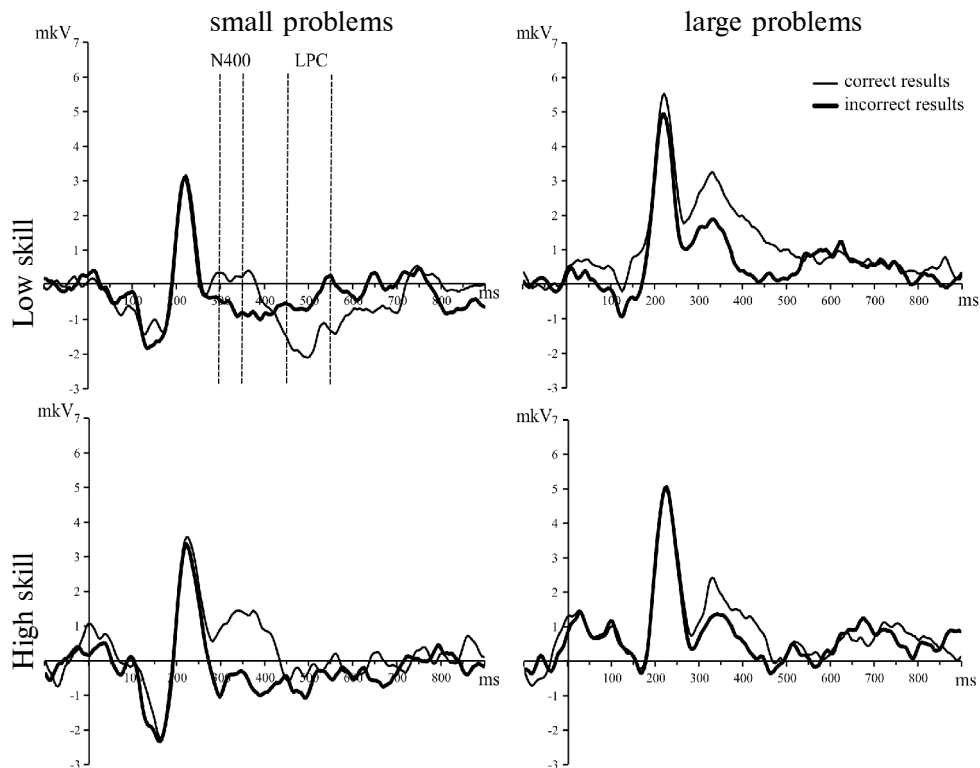


Рис. 2. Вызванные потенциалы в ответ на предъявление правильных (тонкая линия) и неправильных (толстая линия) решений, зарегистрированные в отведении Cz в блоке осознаваемого восприятия стимулов для примеров МП (слева) и БП (справа) для испытуемых с сильным (внизу) и слабым (вверху) арифметическим навыком. Пунктирной линией показаны интервалы анализа основных компонент.

и F_4 ($p = 0.004$), а также более негативная амплитуда ответа в отведении Pz по сравнению с отведениями P_3 ($p < 0.001$) и P_4 ($p = 0.003$).

В левом и правом полушарии при предъявлении ответов на примеры МП также наблюдалась менее негативная амплитуда ответа в парietальных отведениях по сравнению с медианными (P_3/C_3 : $p < 0.001$; P_4/C_4 : $p < 0.001$) и фронтальными (P_3/F_3 : $p = 0.023$; P_4/F_4 : $p = 0.005$). При предъявлении ответов на примеры БП во фронтальных и теменных отведениях обнаруживалась достоверная разница в амплитуде ответа между центральными отведениями и отведениями левого и правого полушария ($Fz > F_3$: $p < 0.001$; $P_3 > Pz$: $p = 0.008$; $P_4 > Pz$: $p = 0.003$). В левом и правом полушариях при предъявлении ответов на примеры БП также наблюдалась менее негативная амплитуда ответа в парietальных отведениях по сравнению с медианными (P_3/C_3 : $p < 0.001$; P_4/C_4 : $p < 0.001$) и фронтальными (P_3/F_3 : $p = 0.013$; P_4/F_4 : $p = 0.006$).

Анализ компонента LPC. Результаты дисперсионного анализа компонента LPC при осознаваемом восприятии стимулов (рис. 2) выявили достоверное влияние фактора «Размер проблемы» ($F_{(1, 22)} = 9.686$, $p = 0.005$, $\eta^2 = 0.306$), а также взаимодействие факторов «Тип ответа» х «Размер проблемы» х «Группа» ($F_{(1, 22)} = 5.117$, $p = 0.033$, $\eta^2 = 0.190$). Апостериорный анализ показал значимо более положительную амплитуду LPC при предъявлении неправильного ответа на примеры МП в группе испытуемых

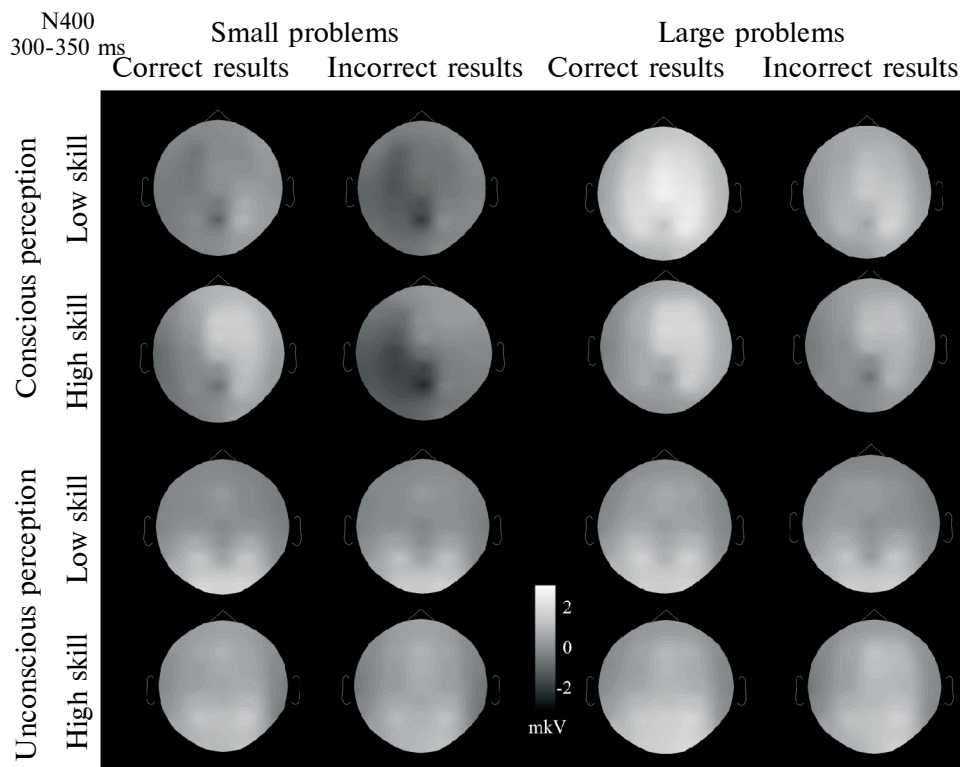


Рис. 3. Топографические карты распределения электрической активности для испытуемых с сильным и слабым арифметическим навыком в окне 300–350 мс от начала предъявления результата решения арифметического примера.

со слабым арифметическим навыком ($p = 0.037$). Кроме того, в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком амплитуда ВП в ответ на предъявление правильного ответа на примеры БП была достоверно более положительной по сравнению с примерами МП ($p < 0.001$).

Дисперсионный анализ также выявил значимое взаимодействие факторов «Размер проблемы» х «Латерализация» ($F_{(1.768, 38.906)} = 7.398, p = 0.003, \eta^2 = 0.252$) и «Каудальность» х «Латерализация» ($F_{(3.300, 72.592)} = 22.367, p < 0.001, \eta^2 = 0.451$). Апостериорный анализ показал наличие асимметрии ответа: при предъявлении ответов на примеры МП амплитуда ВП была достоверно менее положительной в отведениях левого полушария по сравнению с отведениями, расположенными в правом полушарии ($p = 0.032$). Кроме того, обнаруживается снижение амплитуды в отведениях Pz по сравнению с отведениями Cz ($p = 0.002$) и Fz ($p = 0.011$). Топографические карты распределения электрической активности на исследуемом интервале представлены на рис. 5.

Анализ компонента LPC при неосознаваемом восприятии стимулов (рис. 4) выявил достоверное взаимодействие факторов «Тип ответа» х «Размер проблемы» х «Группа» ($F_{(1, 22)} = 6.953, p = 0.015, \eta^2 = 0.240$). Апостериорный анализ показал значимо более положительную амплитуду LPC при предъявлении неправильного ответа на примеры МП в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком ($p = 0.033$). В группе испытуемых со слабым арифметическим навыком амплитуда ВП в ответ на

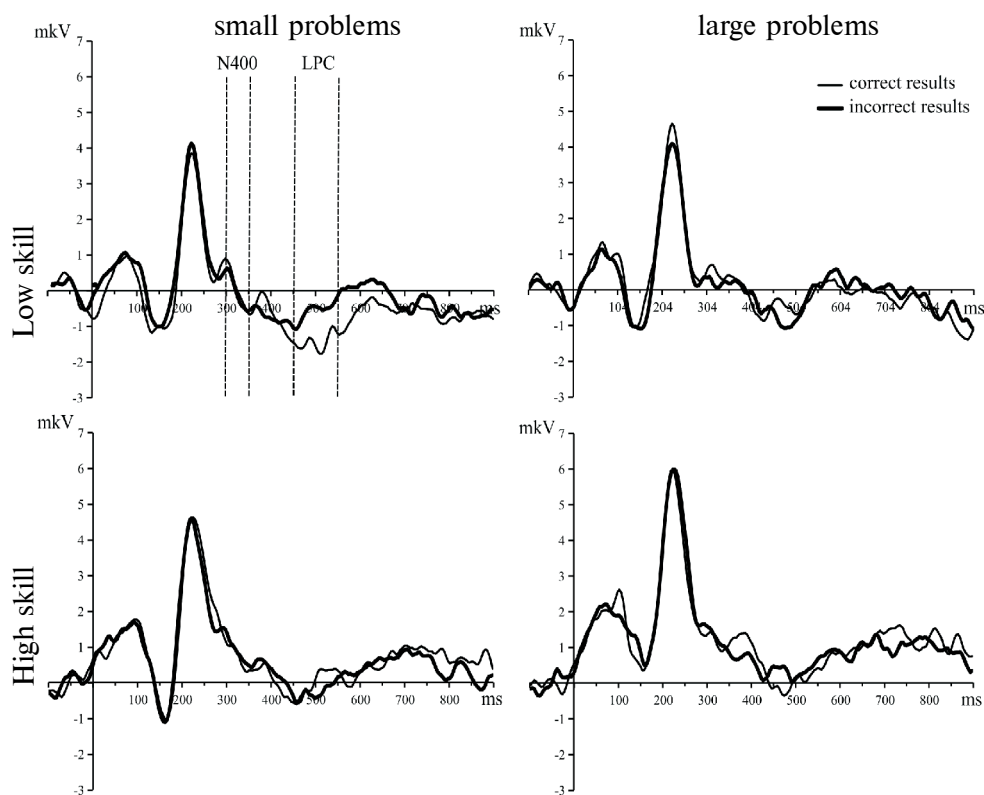


Рис. 4. Вызванные потенциалы в ответ на предъявление правильных (тонкая линия) и неправильных (толстая линия) решений, зарегистрированные в отведении Cz в блоке неосознаваемого восприятия стимулов для примеров МП (слева) и БП (справа) для испытуемых с сильным (внизу) и слабым (вверху) арифметическим навыком. Пунктирной линией показаны интервалы анализа основных компонент.

предъявление правильного ответа на примеры БП была достоверно больше по сравнению с примерами МП ($p = 0.008$), а также наблюдалось снижение амплитуды ВП при предъявлении правильных ответов на примеры МП в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком по сравнению с испытуемыми с сильным арифметическим навыком ($p = 0.017$).

Выявлено взаимодействие факторов «Каудальность» $\times$ «Латерализация» ($F_{(2.783, 61.235)} = 10.318, p < 0.001, \eta^2 = 0.319$). Результаты дальнейшего анализа показали, что в теменных отведениях наблюдается достоверно большая амплитуда ответа в левом полушарии по сравнению с центральными отведениями ($P_3/P_z: p = 0.016$), а в медианных и фронтальных отведениях амплитуда ответа в центральных отведениях больше, чем в левом ($F_z/F_3: p = 0.005$) и правом ($C_z/C_4: p = 0.003; F_z/F_4: p = 0.002$) полушариях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель нашего исследования заключалась в изучении осознаваемых (контролируемых) и неосознаваемых (рефлекторных) процессов в задаче арифметического прайминга в зависимости от уровня арифметического навыка испытуемых. Арифметические

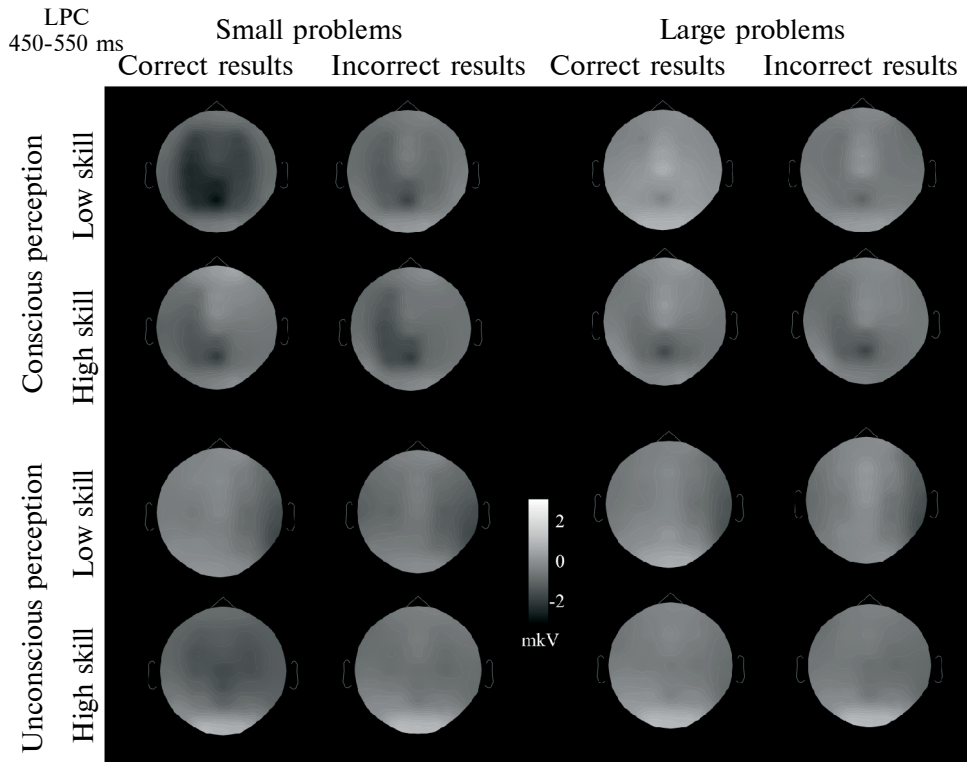


Рис. 5. Топографические карты распределения электрической активности для испытуемых с сильным и слабым арифметическим навыком в окне 450–550 мс от начала предъявления результата решения арифметического примера.

примеры на сложение предъявлялись в условиях замаскированного и незамаскированного прайминга. В задаче осознанного восприятия (незамаскированный прайминг) при предъявлении ответа на примеры БП и МП наблюдалось возникновение арифметического эффекта N400 и LPC в обеих группах испытуемых. В случае неосознанного восприятия (замаскированный прайминг) при предъявлении ответа на примеры МП наблюдалось появление арифметического эффекта LPC в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком.

На интервале 300–350 мс от начала предъявления стимула, вне зависимости от уровня арифметического навыка, наблюдалась более негативная амплитуда вызванного потенциала при предъявлении неправильного ответа, что является свидетельством возникновения арифметического эффекта волны N400. Такой вывод согласуется со множеством литературных данных [8, 9, 27], в которых арифметический эффект N400 был зарегистрирован в интервале от 250 до 500 мс. Полученное распределение значений амплитуды N400 согласуется с полученными ранее данными: компонент N400 имеет асимметричное распределение с увеличением амплитуды в правой полушарии [27]. Кроме того, установлено влияние фактора трудности задания: в обеих группах испытуемых амплитуды ВП в интервале анализа волны N400 при решении примеров БП оказались больше, чем для МП. Это может отражать так называемый «эффект величины операндов», который заключается в увеличении времени обработки и числа

ошибок при увеличении размера операндов, участвующих в задаче. Этот эффект подробно описан в литературе как в поведенческих [28], так и в электрофизиологических исследованиях [29]. Считается, что эффект величины операндов обусловлен различными стратегиями решения примера. Для небольших задач намного чаще используется стратегия извлечения результата решения примера из памяти, чем непосредственно счет. Первая стратегия более эффективна, чем вторая, что приводит к возникновению эффекта величины операндов. Кроме того, МП встречаются чаще, и поэтому ответы на них извлекаются из долговременной памяти быстрее [30].

В задаче замаскированного прайминга (неосознаваемое восприятие) в интервале анализа волны N400 не обнаружено достоверной разницы между правильным и неправильным ответом для обеих групп испытуемых, что говорит об отсутствии эффекта N400 в этом блоке. Также отсутствует асимметрия ответа, наблюдаемая в осознаваемом блоке, и эффект величины операндов. В нашей предыдущей работе эффект N400 был зафиксирован при выполнении задачи неосознаваемого арифметического прайминга только для примеров на умножение после предварительной тренировки тех же примеров, которые были использованы в эксперименте [21]. Похожий эффект был описан в литературе: информация, которая встречается чаще или к которой недавно обращались, будет иметь более высокие базовые состояния активности в семантической памяти, что может отражаться в параметрах N400 [12]. Эти данные согласуются с представлением о природе N400 как связанной с процессами узнавания, усиливающимися при повторном предъявлении стимулов в задачах на запоминание.

В неосознаваемом блоке при анализе компонента LPC в интервале 450–550 мс от начала предъявления стимула в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком наблюдалась достоверно более позитивная амплитуда вызванного потенциала при предъявлении неправильного ответа на примеры МП, что является отражением арифметического эффекта LPC. Эффект LPC в неосознаваемом блоке полностью совпадает с результатами осознаваемого блока, в котором у испытуемых со слабым арифметическим навыком также наблюдалась достоверно более позитивная амплитуда ВП при предъявлении неправильного ответа на примеры МП. Кроме того, в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком амплитуда ВП в ответ на предъявление правильного ответа на примеры БП была достоверно больше по сравнению с примерами МП, а также наблюдалось снижение амплитуды ВП при предъявлении правильных ответов на примеры МП в группе испытуемых со слабым арифметическим навыком.

Полученные результаты согласуются с результатами предыдущих исследований, демонстрирующих зависимость амплитуды LPC от трудности примера и уровня арифметических способностей испытуемых: эффект LPC появляется у испытуемых со слабым арифметическим навыком при решении простых примеров, а у более арифметически успешных испытуемых эффект LPC возникает только при решении сложных примеров с двузначными числами [7]. Также известно, что на амплитуду LPC может влиять тренировка арифметического навыка: чем более развит арифметический навык, тем менее выражен данный компонент. Это связывают с тем, что практика облегчает извлечение ответа напрямую из долговременной памяти [6, 31].

В настоящий момент имеется крайне мало электрофизиологических исследований природы неосознаваемого восприятия при обработке арифметических примеров. По имеющимся данным, в задачах с отсутствием внимания или замаскированным предъявлением примера наблюдалось возникновение эффекта, по временным и пространственным характеристикам похожего на арифметический эффект волны N400 [20, 21]. Эти данные похожи на результаты, получаемые в задачах семантического прайминга, где в случае замаскированного предъявления прайма наблюдается генерация компонента N400, что интерпретируется как автоматическая природа волны N400 и контролируемая – волны LPC [32]. С другой стороны, при выполнении задания со смещен-

ным вниманием был обнаружен эффект, имеющий топографическое сходство с волной P600/LPC, который авторы связывают с отложенной сознательной оценкой арифметических фактов [20].

Взаимосвязь внимания и автоматических процессов достаточно противоречива. С одной стороны, наиболее общепринятой интерпретацией эффектов замаскированного прайминга является автоматическое распространение активации в нейрональных сетях, вызванное связанным контекстом стимулом [15]. С другой стороны, ряд исследований выявил, что для возникновения эффекта прайминга необходимо наличие внимания во временном окне предъявления маскированного стимула даже при отсутствии его осознаваемого восприятия [33, 34]. Также установлено, что такие компоненты ВП, как волна P300, традиционно связываемые с контролируемыми процессами, могут возникать при предъявлении стимулов на неосознаваемом уровне [35]. Таким образом, имеются данные о том, что эффекты прайминга могут быть связаны с уровнем внимания вне зависимости от того, являются ли эти процессы автоматическими или контролируемыми [33].

Эффект LPC, возникающий при распознавании стимулов в различном контексте, указывает на то, что эта волна отражает некоторый процесс, связанный с кодированием информации. Некоторые исследователи связывают семантическую волну LPC с попыткой пересмотреть первоначальный анализ предложения. В этом случае она часто возникает без предвещающей ее волны N400 при предъявлении синтаксически ошибочных предложений [36]. В арифметических задачах величина волны LPC и наличие арифметического эффекта LPC зависят от уровня арифметического навыка испытуемых. Испытуемые с более сформированным арифметическим навыком быстрее отклоняют неправильные решения, тогда как арифметически слабые испытуемые воспринимают неправильные ответы как возможные варианты на роль правильных и пытаются пересмотреть предложенное решение. Таким образом, предполагается, что LPC в такого рода задачах отражает степень несоответствия предъявляемого стимула предшествующему контексту и является индексом контекстуальной интеграции и пересмотра схемы, связанной с процессом категоризации стимулов [27, 37].

Полученный в нашем исследовании результат является, по нашим данным, первым свидетельством наличия арифметического эффекта LPC при отсутствии активного внимания. Следует отметить, что в нашем исследовании мы не просили испытуемых классифицировать ответы на правильные и неправильные, а также выполнять моторный ответ. Мы планировали максимально исключить вероятность интерференции моторных и когнитивных процессов при выполнении задания, а также обеспечили совпадение задач в осознаваемом и неосознаваемом блоках. Таким образом, в нашем исследовании влияние волны P300, частично совпадающей по времени возникновения с волной LPC, было минимально, что подтверждается снижением амплитуды ответа в париетальных областях. Волна, регистрируемая таким образом, не несет в себе вклада процессов категоризации стимула, которые в случае с неосознаваемым восприятием прайма также могут быть неверно классифицированы. Следовательно, можно предположить, что выявляемый в нашем исследовании эффект LPC при неосознаваемом восприятии прайма является непосредственным индикатором процессов кодирования и извлечения информации, отражающим нейрофизиологические особенности, связанные с уровнем арифметического навыка испытуемых.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.А.А., В.М.К., Н.В.П.), разработка методики экспериментов (А.А.А., В.М.К., Н.В.П., Д.Г.Ф.), сбор данных (В.М.К., Н.В.П., Д.Г.Ф., Д.Д.С.), обработка данных (В.М.К., Д.Д.С.), написание и редактирование манускрипта (В.М.К., А.А.А., Н.В.П., Д.Г.Ф., Д.Д.С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет гранта Российского научного фонда № 23–78–01220, <https://rscf.ru/project/23–78–01220>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского психологического общества в области исследований с привлечением людей (протокол № 25 от 26.10.2023 г.).

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Suárez-Pellicioni M, Prado J, Booth JR* (2022) Neurocognitive mechanisms underlying multiplication and subtraction performance in adults and skill development in children: a scoping review. *Current Opin Behav Sci* 48: 101228. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2022.101228>
2. *Vanbinst K, De Smedt B* (2016) Individual differences in children's mathematics achievement: The roles of symbolic numerical magnitude processing and domain-general cognitive functions. *Progr Brain Res* 227: 105–130. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.001>
3. *LeFevre J-A, Bisanz J, Daley KE, Buffone L, Greenham SL, Sadesky GS* (1996) Multiple routes to solution of single-digit multiplication problems. *J Exp Psychol: General* 125(3): 284–306. <https://doi.org/10.1037/0096-3445.125.3.284>
4. *Thevenot C, Barrouillet P, Castel C, Uittenhove K* (2016) Ten-year-old children strategies in mental addition: A counting model account. *Cognition* 146: 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2015.09.003>
5. *Barrouillet P, Thevenot C* (2013) On the problem-size effect in small additions: Can we really discard any counting-based account? *Cognition* 128(1): 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2013.02.018>
6. *Núñez-Peña MI* (2008) Effects of training on the arithmetic problem-size effect: An event-related potential study. *Exp Brain Res* 190(1): 105–110. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1501-y>
7. *Núñez-Peña MI, Gracia-Bafalluy M, Tubau E* (2011) Individual differences in arithmetic skill reflected in event-related brain potentials. *Int J Psychophysiol* 80(2): 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2011.02.017>
8. *Jost K, Hennighausen E, Rösler F* (2003) Comparing arithmetic and semantic fact retrieval: Effects of problem size and sentence constraint on event-related brain potentials. *Psychophysiology* 41(1): 46–59. <https://doi.org/10.1111/1469-8986.00119>
9. *Prieto-Corona B, Rodríguez-Camacho M, Silva-Pereyra J, Marosi E, Fernández T, Guerrero V* (2010) Event-related potentials findings differ between children and adults during arithmetic-fact retrieval. *Neurosci Lett* 468(3): 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.094>
10. *Avancini C, Galfano G, Szűcs D* (2014) Dissociation between arithmetic relatedness and distance effects is modulated by task properties: An ERP study comparing explicit vs. implicit arithmetic processing. *Biol Psychol* 103: 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2014.10.003>
11. *Szűcs D, Soltész F* (2010) Event-related brain potentials to violations of arithmetic syntax represented by place value structure. *Biol Psychol* 84(2): 354–367. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.04.002>

12. *Kutas M, Federmeier KD* (2011) Thirty years and counting: finding meaning in the N400 component of the event-related brain potential (ERP). *Annu Rev Psychol* 62: 621–647.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.131123>
13. *Heidekum AE, Grabner RH, De Smedt B, De Visscher A, Vogel SE* (2019) Interference during the retrieval of arithmetic and lexico-semantic knowledge modulates similar brain regions: Evidence from functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Cortex* 120: 375–393.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.06.007>
14. *Neely JH* (2012) Semantic priming effects in visual word recognition: A selective review of current findings and theories. In: *Besner D, Humphreys GW* (eds) *Basic Processes in Reading*. 1st edn. Routledge. New York. 264–336.
15. *Posner MI, Snyder CR, Solso R* (2004) Attention and cognitive control. In: *Balota D, Marsh EJ* (ed) *Cognitive Psychology: Key Readings*. 1st edn. Psychol Press. London. 55–85.
16. *Marcel AJ* (1983) Conscious and unconscious perception: Experiments on visual masking and word recognition. *Cogn Psychol* 15(2): 197–237.
[https://doi.org/10.1016/0010-0285\(83\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0010-0285(83)90009-9)
17. *García-Orza J, Damas-López J, Matas A, Rodríguez JM* (2009) “2 x 3” primes naming “6”: evidence from masked priming. *Attent Percept Psychophys* 71(3): 471–480.
<https://doi.org/10.3758/APP.71.3.471>
18. *Ric F, Muller D* (2012) Unconscious addition: When we unconsciously initiate and follow arithmetic rules. *J Exp Psychol Gen* 141(2): 222–232.
<https://doi.org/10.1037/a0024608>
19. *Van Opstal F, de Lange FP, Dehaene S* (2011) Rapid parallel semantic processing of numbers without awareness. *Cognition* 120(1): 136–147.
<https://doi.org/10.1016/j.cognition.2011.03.005>
20. *Strauss M, Dehaene S* (2019) Detection of arithmetic violations during sleep. *Sleep* 42(3): zsy232.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsy232>
21. *Полякова НВ, Александров АА* (2019) Использование компонента N400 для анализа математических вычислений на бессознательном уровне. *Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова* 69(3): 325–333. [*Polyakova NV, Aleksandrov AA* (2019) N400 component for analysis of unconscious mathematical calculations. *Zhurn vyssh nerv deyateln im IP Pavlova* 69(3): 325–333. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0044467719030109>
22. *Sowinski C, Dunbar K, LeFevre J* (2014) Calculation fluency test (Unpublished technical report). Math Lab. Carleton Univer. Ottawa. Canada.
23. *Wilson AJ, Revkin SK, Cohen D, Cohen L, Dehaene S* (2006) An open trial assessment of "The Number Race", an adaptive computer game for remediation of dyscalculia. *Behav Brain Funct* 2: 1–16.
<https://doi.org/10.1186/1744-9081-2-20>
24. *Blankenberger S* (2001) The arithmetic tie effect is mainly encoding-based. *Cognition* 82(1): B15–B24.
[https://doi.org/10.1016/S0010-0277\(01\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0010-0277(01)00140-8)
25. *Zbrodoff NJ, Logan GD* (1990) On the relation between production and verification tasks in the psychology of simple arithmetic. *J Exp Psychol: Learning, Memory, and Cognition* 16(1): 83.
<https://doi.org/10.1037/0278-7393.16.1.83>
26. *Dickson DS, Wicha NYY* (2019) P300 amplitude and latency reflect arithmetic skill: An ERP study of the problem size effect. *Biol Psychol* 148: 107745.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2019.107745>
27. *Niedeggen M, Rösler F* (1999) N400 effects reflect activation spread during retrieval of arithmetic facts. *Psychol Sci* 10(3): 271–276.
<https://doi.org/10.1111/1467-9280.00149>
28. *Zbrodoff NJ, Logan GD* (2005) What everyone finds: The problem-size effect. In: *Campbell JID* (ed) *The Handbook of Mathematical Cognition*. 1 edn. Psychol Press. London. 331–345.
29. *Jost K, Khader PH, Burke M, Bien S, Rösler F* (2011) Frontal and parietal contributions to arithmetic fact retrieval: a parametric analysis of the problem-size effect. *Hum Brain Mapp* 32(1): 51–59.
<https://doi.org/10.1002/hbm.21002>
30. *Imbo I, Vandierendonck A* (2008) Practice effects on strategy selection and strategy efficiency in simple mental arithmetic. *Psychol Res* 72: 528–541.
<https://doi.org/10.1007/s00426-007-0128-0>
31. *Pauli P, Lutzenberger W, Rau H, Birbaumer N, Rickard TC, Yaroush RA, Bourne Jr LE* (1994) Brain potentials during mental arithmetic: effects of extensive practice and problem difficulty. *Cogn Brain Res* 2(1): 21–29.
[https://doi.org/10.1016/0926-6410\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0926-6410(94)90017-5)

-
32. Bakker I, Takashima A, van Hell JG, Janzen G, McQueen JM (2015) Tracking lexical consolidation with ERPs: Lexical and semantic-priming effects on N400 and LPC responses to newly-learned words. *Neuropsychologia* 79: 33–41.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2015.10.020>
 33. Kiefer M, Brendel D (2006) Attentional modulation of unconscious “automatic” processes: Evidence from event-related potentials in a masked priming paradigm. *J Cogn Neurosci* 18(2): 184–198.
<https://doi.org/10.1162/jocn.2006.18.2.184>
 34. Naccache L, Blandin E, Dehaene S (2002) Unconscious masked priming depends on temporal attention. *Psychol Sci* 13(5): 416–424.
<https://doi.org/10.1111/1467-9280.00474>
 35. Shevrin H (2001) Event-related markers of unconscious processes. *Int J Psychophysiol* 42(2): 209–218.
[https://doi.org/10.1016/S0167-8760\(01\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8760(01)00165-9)
 36. Thornhill DE, Van Petten C (2012) Lexical versus conceptual anticipation during sentence processing: Frontal positivity and N400 ERP components. *Int J Psychophysiol* 83(3): 382–392.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2011.12.007>
 37. Núñez-Peña MI, Suárez-Pellicioni M (2012) Processing false solutions in additions: differences between high- and lower-skilled arithmetic problem-solvers. *Exp Brain Res* 218: 655–663.
<https://doi.org/10.1007/s00221-012-3058-z>

Conscious and Unconscious Processes in the Arithmetic Priming Task Depend on the Arithmetic Skill

V. M. Knyazeva^{a, *}, N. V. Polyakova^a, D. G. Fedorov^a, D. D. Sitnikova^a,
and A. A. Aleksandrov^a

^a*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

^{*} *e-mail: v. m.knyazeva@spbu.ru*

The study examined the role of conscious and unconscious processes depending on the level of arithmetic skill. The participants were divided into two groups according to their arithmetic skill based on the calculation fluency test results. Masked and unmasked single-digit addition problems (primes) followed by correct and incorrect results were presented on the screen. In a conscious perception task (unmasked priming), when large and small problem results were presented, an arithmetic N400 and LPC effects were observed in both groups. In the case of unconscious perception (masked priming), when small problem results were presented, the LPC effect was observed in the group with low arithmetic skill. The fact that the LPC arithmetic effect was discovered during the unconscious presentation may indicate the automatic nature of the encoding and retrieving information processes, reflecting neurophysiological characteristics associated with the level of arithmetic skill.

Keywords: arithmetic, masked priming, unconscious perception, addition, event related potentials, N400, late positive component (LPC)