



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

www.sciensejournals.ru

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



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 4, 2023

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Функциональная синергия, обеспечивающая остановку на батуте после прыжка <i>С. А. Моисеев, Е. А. Михайлова</i>	243
Динамика разобшающего белка UCP1 в жировых тканях аутбредных мышей ICR в постнатальном онтогенезе <i>А. В. Якуненок, Е. И. Елсукова, И. О. Наточий</i>	255
Адаптивная модификация пулов аминокислот в миокарде длиннохвостого суслика <i>Urocitellus undulatus</i> на разных стадиях гибернации <i>М. В. Каранова, Н. М. Захарова</i>	262
Реконструкция метаболической активности кишечной микробиоты у детей и взрослых при ожирении и ее взаимосвязь с представленностью алкилрезорцинолов в кале <i>А. А. Заболотнева, А. Б. Итов, Т. В. Григорьева, И. Ю. Васильев, С. А. Румянцев, А. М. Гапонов, А. В. Шестопалов</i>	271
Постколитные перестройки в ноцицептивных свойствах нейронов большого и дорсального ядер шва крысы <i>Б. М. Сушкевич, И. Б. Сиваченко, О. А. Любашина</i>	293
Кальций-аккумулирующая способность митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности <i>С. И. Хизриева, Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев</i>	311
Изменения в нейрогенной нише гиппокампа крыс при гипоксическом воздействии <i>Е. Н. Федорова, Д. Н. Воронков, А. В. Егорова, Т. И. Баранич, В. В. Глинкина, Э. Л. Германова, Л. Д. Лукьянова, В. С. Сухоруков</i>	320
Распределение популяций парвальбумин-экспрессирующих нейронов в сегментах шейного и поясничного отделов спинного мозга кошки <i>А. А. Вещицкий, П. Е. Мусиенко, Н. С. Меркульева</i>	333

Contents

Vol. 59, No. 4, 2023

EXPERIMENTAL ARTICLES

Functional Synergy Ensures a Trampoline Jump Stopping <i>S. A. Moiseev and E. A. Mikhaylova</i>	243
Uncoupling Protein UCP1 Expression Dynamics in Adipose Tissues of the Outbred ICR Mice in Postnatal Ontogenesis <i>A. V. Yakunenko, E. I. Elsukova, and I. O. Natochy</i>	255
Adaptive Modification of Amino Acid Pools in the Myocardium of the Long-Tailed Ground Squirrel <i>Urocyon undulatus</i> at Different Stages of Hibernation <i>M. V. Karanova and N. M. Zakharova</i>	262
Reconstruction of the Metabolic Activity of the Intestinal Microbiota in Children and Adults with Obesity and Its Relationship with the Representation of Alkylresorcinols in Feces <i>A. A. Zabolotneva, A. B. Ito, T. V. Grigorieva, I. Yu. Vasiliev, S. A. Roumiantsev, A. M. Gaponov, and A. V. Shestopalov</i>	271
Postcolitis Alterations in Nociceptive Properties of Neurons in the Rat Raphe Magnus and Dorsal Raphe Nuclei <i>B. M. Sushkevich, I. B. Sivachenko, and O. A. Lyubashina</i>	293
Calcium-Accumulating Ability of Rat Liver Mitochondria During Hypothermia of Various Durations <i>S. I. Khizrieva, R. A. Khalilov, A. M. Dzhabarova, and V. R. Abdullaev</i>	311
Changes in the Neurogenic Niche of the Rat Hippocampus Under Hypoxic Exposure <i>E. N. Fedorova, D. N. Voronkov, A. V. Egorova, T. I. Baranich, V. V. Glinkina, E. L. Germanova, L. D. Lukyanova, and V. S. Sukhorukov</i>	320
Distribution of Parvalbumin-Expressing Neuronal Populations in the Cat Cervical and Lumbar Spinal Cord Gray Matter <i>A. A. Veshchitskii, P. E. Musienko, and N. S. Merkulyeva</i>	333

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СИНЕРГИЯ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ОСТАНОВКУ НА БАТУТЕ ПОСЛЕ ПРЫЖКА

© 2023 г. С. А. Моисеев^{1,*}, Е. А. Михайлова¹

¹Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, Великие Луки, Россия

*e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru

Поступила в редакцию 04.04.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 28.05.2023 г.

В работе рассматривается структура межмышечного синергетического взаимодействия, обеспечивающая остановку тела спортсмена на сетке батута после прыжка. Предполагалось сопоставить пространственно-временные характеристики мышечных синергий, извлекаемых из данных об электроактивности скелетных мышц и о частоте следования биопотенциалов. Планировалось выяснить, отражают ли извлекаемые кинематические модули центральные механизмы управления структурой движения и определить переменные, на стабилизацию которых направлена активность мышечных синергий. Извлечение синергий реализовано с применением метода факторизации матриц. Установлено, что остановка после прыжка на батуте может быть реализована с применением общих паттернов пространственно-временной активации мышечных синергий. Синергетические эффекты, получаемые с применением разных подходов инструментальной оценки электроактивности скелетных мышц, могут отражать различные механизмы контроля, реализуемые на разных уровнях ЦНС. Мышечные синергии направлены на стабилизацию перемещений отдельных антропометрических точек, а также сегментов тела, объединенных в кинематические модули. Структура самих кинематических модулей указывает на эффективную организацию межмышечного взаимодействия, косвенно отражая центральные механизмы управления сложным многосуставным движением.

Ключевые слова: функциональная синергия, межмышечное взаимодействие, двигательный контроль, вариативность, тактики построения движения, прыжки на батуте

DOI: 10.31857/S0044452923040058, **EDN:** KXWEGM

ВВЕДЕНИЕ

Способность сохранять вертикальное положение, эффективно реагируя на дестабилизирующие факторы, является фундаментальной двигательной функцией человека. Эффективная регуляция позы обеспечивается тремя компонентами, включающими центральную регуляцию, активность сенсорных систем и функционирование скелетно-мышечной системы [1]. Поддержание поустуральной устойчивости, наряду с рефлекторными и автоматическими реакциями, может быть реализовано системой сознательных корковых реакций [2]. Такие реакции призваны, посредством мышечных усилий, формировать целевые поступательные движения сегментов тела, направленные на стабилизацию важной переменной контроля. Согласованные мышечные усилия и сочетанное изменение кинематических характеристик движения формируют функциональные образования — синергии. Примеры таких образований известны, например, “дыхательная” синергия, призванная компенсировать колебания тела в ортоградной позе вследствие возмущений, вызываемых дыхательным циклом [3].

Исследованы поустуральные синергии, названные стратегиями “лодыжки”, “бедра”, “шага”, основанные на наблюдениях за изменениями суставных углов при восстановлении равновесия после возмущающих воздействий [4]. Описана синергия, включающая скоординированные движения множества суставов нижних конечностей в связи с изменениями ориентации головы [5]. Однако такие функциональные синергии далеко не единственные, а скорее уникальные для конкретных условий их реализации. Объединяющим фактором для таких образований может являться то, что они формируются с целью достижения конкретной двигательной задачи — обеспечения стабильности важной переменной двигательного контроля [6].

В структуре многих многосуставных движений человека присутствует фаза приземления. Особенно велико значение эффективного поддержания устойчивости вертикального положения тела в этот период в сфере спортивной деятельности, поскольку это во многом определяет спортивный результат, например, в прыжках на батуте. Выявление функциональных синергий и изучение их

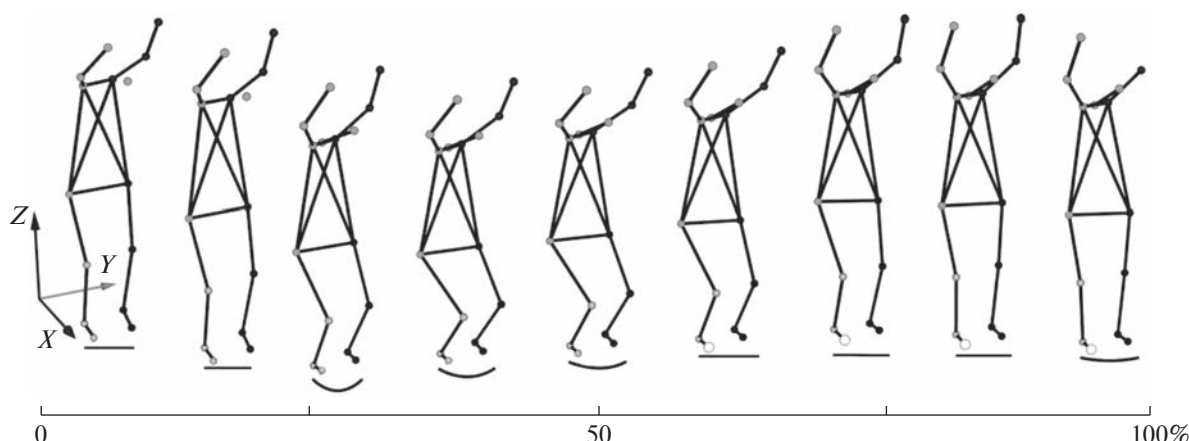


Рис. 1. Кинематограмма приземления после прыжка на батуте. По оси абсцисс — прогресс движения.

структуры является важной задачей не только для понимания фундаментальных механизмов (стратегий) двигательного контроля, но и для выработки практических приемов направленной коррекции нарушений равновесия в процессе реализации спортивных упражнений. Исходя из этого, целью работы явилось изучение мышечных синергий, стабилизирующих положение тела спортсмена при остановке на сетке батута. В работе предполагалось решить следующие задачи и ответить на ряд вопросов: а) сопоставить пространственно-временные характеристики мышечных синергий, извлекаемые из данных об электроактивности скелетных мышц и о частоте следования биопотенциалов; б) выяснить, отражают ли извлекаемые кинематические модули центральные механизмы управления структурой движения; в) определить переменные, на стабилизацию которых направлена активность мышечных синергий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены с участием восьми гимнастов, специализирующихся в прыжках на батуте. Испытуемые выполняли темповые подскоки (прыжки) с махом руками. Анализировали период приземления, от момента касания батута конечной антропометрической точки до завершения движения, компенсирующего вертикальное перемещение тела за счет амортизации сетки батута (рис. 1). Граничным положением, определяющим окончание движения, являлся момент завершения разгибания в коленном суставе. Для определения граничных моментов и дальнейшего анализа использовали систему 3D-видеозахвата Qualisys (Швеция), включающую восемь высокоскоростных камер Oqus, частота оцифровки составляла 500 Гц. Светоотражающие маркеры были размещены на основных антропометрических точках, соответствующих осям вращения в суставах. Программное обеспечение Qual-

isys Track Manager (QTM) позволило получить координаты исследуемых точек по трем осям (X, Y, Z), соответствующим перемещению по сагиттали, фронтالي и вертикали. Эти данные, после процедуры фильтрации (аппроксимизация кривой 2-й степени в системе QTM), были экспортированы в виде вариационных рядов в систему Statistica (StatSoft, Inc., version 10) для дальнейшего анализа.

Одновременно с видеорядом регистрировали электромиограммы (ЭМГ) шестнадцати поверхностных билатеральных скелетных мышц: передней большеберцовой (TA), икроножной медиальной (MG), двуглавой мышцы бедра (BF), латеральной широкой мышцы бедра (VL), мышцы, выпрямляющей позвоночник на уровне T9 (ES), большой ягодичной (GM), средней части прямой мышцы живота (RA), дельтовидной (Delta). Для регистрации и первичной обработки ЭМГ применяли биомонитор ME6000 и программное обеспечение "Megawin" (Финляндия). Частота оцифровки сигналов составляла 2 кГц. Для отведения ЭМГ применяли накожные одноразовые самоклеющиеся электроды с токопроводящим гелем и активной площадью контакта 2.5 см^2 , $36 \times 45 \text{ мм}$ (Swaromed, Австрия). Электроды накладывались биполярно, при этом активный располагался в области проекции двигательной точки исследуемой мышцы, а референтный прикреплялся по ходу ее волокон с межэлектродным расстоянием 2 см, предусматривался дополнительный электрод заземления на каждом канале [7]. Первый вариант обработки данных в системе Megawin включал полосовую фильтрацию ЭМГ фильтром 30–450 Гц с усреднением в интервалах 0.002 с и повторно применялся фильтр низких частот 15 Гц. Второй вариант обработки (для дальнейшего выделения частотных синергий) не предполагал фильтрации, а использовались интерференционные ЭМГ. Электромиограммы экспортировали в систему Statistica для дальнейшего анализа.

Синхронизированные вариационные ряды (метка на регистрируемых сигналах подавалась с применением штатного канала синхронизации) формировали в системе Statistica матрицу исходных данных (X), размерностью ($I \times J$), где I — число отчетов (измерений), а J — число независимых переменных (вариационных рядов ЭМГ, координат антропометрических точек по трем осям — всего 66). Создавались дополнительные переменные, содержащие сведения, позволяющие идентифицировать принадлежность измерений к различным испытуемым, попыткам, равновесиям и пр. [8]. К данным в матрице применяли процедуру стандартизации к единице стандартного отклонения.

Дальнейшая обработка ЭМГ включала получение “амплитудных” и “частотных” мышечных синергий. Для определения амплитудных синергий из матриц извлекали компоненты с помощью факторного анализа (ФА). Матрица X разлагалась на произведение двух матриц: $X = T \times P + E$, где T — матрица счетов, P — матрица нагрузок, E — матрица остатков [9]. Разложение матриц осуществляли в среде Statistica, используя стандартный модуль “Mult/Exploratory — Factor”. Для определения частотных синергий вариационные ряды ЭМГ делили на 20 равных отрезков, в каждом из которых рассчитывали среднее число турнов. За единицу турна принимали изменение направления кривой (поворот) с амплитудой не менее 10 мкВ [10]. Таким образом формировались новые вариационные ряды, содержащие данные о последовательности основных колебаний ЭМГ каждой из исследуемых мышц [11]. Извлечение компонент (синергий) из таких данных осуществляли методом, описанным выше. В обоих случаях при рассмотрении мышечных синергий учитывали компоненты, имеющие собственные значения (eigenvalues) больше единицы и опускающие не менее 10% общей дисперсии. Анализировали следующие параметры: количество извлекаемых компонент, процент общей дисперсии, учитываемый каждым фактором в общем наборе данных (VAF), весовые коэффициенты и коэффициенты активации. Аналогичную методику извлечения синергий применяли и при работе с кинематическими синергиями, только применяли метод главных компонент (PCA), реализованный в виде модуля “Advanced/Multivariate — PCA”.

Для выявления переменных, на стабилизацию которых направлена мышечная активность, применяли линейный регрессионный анализ с помощью стандартного модуля Statistica — “Multiple Linear Regression”. Предварительно осуществляли анализ диаграмм рассеяния с целью выявления наличия зависимостей и их формы. Осуществляли анализ корреляционных матриц на предмет: мультиколлинеарности; достоверности получаемых β -коэффициентов; нормальности распределения остатков; соответствия предсказанных и наблюдаемых значений [12]. В случае положительной про-

верки по этим параметрам регрессионную модель считали приемлемой. В качестве зависимых переменных последовательно выступали вариационные ряды извлеченных методами факторизации кинематических модулей — коэффициентов активации КинС и траекторий движений основных антропометрических точек нижних конечностей. Независимыми переменными являлись извлеченные мышечные модули — мышечные синергии. Анализировали коэффициенты детерминации (R^2).

Математико-статистическая обработка данных выполнена в Statistica 10.0 и включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (SE), стандартного отклонения (SD), коэффициентов вариативности (CV). При сравнении вариационных рядов в некоторых условиях (оценка схожести рядов предсказанных и наблюдаемых значений при регрессионном анализе, оценке сходства профилей активации МС и КинС и др.) применяли анализ максимальных значений кросскорреляционных функций с учетом смещения относительно нуля, где 1 — полное соответствие, 0 — отсутствие взаимосвязи. Для сравнения векторов “амплитудных” и “частотных” синергий использовали анализ косинусного сходства, где 1 (–1) — полное соответствие векторов (векторы коллинеарны), 0 — отсутствие соответствия (векторы ортогональны).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате разложения матрицы, содержащей данные об электроактивности мышц (амплитудные синергии), были получены четыре модуля с общей долей объясняемой дисперсии в среднем по группе 86.48 ± 1.41 , при этом отмечена низкая вариативность — не более 4.01%. Установлено, что первая мышечная синергия включает активность ряда скелетных мышц: прямой бедра правой, выпрямляющей позвоночник обеих сторон, большой ягодичной правой и дельтовидных мышц обеих сторон тела. Данные мышцы имели наибольшие весовые коэффициенты в структуре первого фактора. Например, для прямой мышцы бедра они составляли 0.72 ± 0.06 , а для дельтовидных мышц — 0.83 ± 0.04 и 0.87 ± 0.04 соответственно (рис. 2a1). В некоторых реализациях изучаемого движения весовые коэффициенты названных мышц достигали очень высоких значений — 0.96.

Следует отметить, что при многократных реализациях движения вариативность включения названных мышц в первую синергию оценивалась как низкая, CV не превышали 23.19%, а в некоторых случаях, например, для дельтовидной мышцы левой стороны она была очень низкой — 11.86%. Другие исследуемые мышцы в структуре первой мышечной синергии демонстрировали средний уровень межиндивидуальной вариативности.

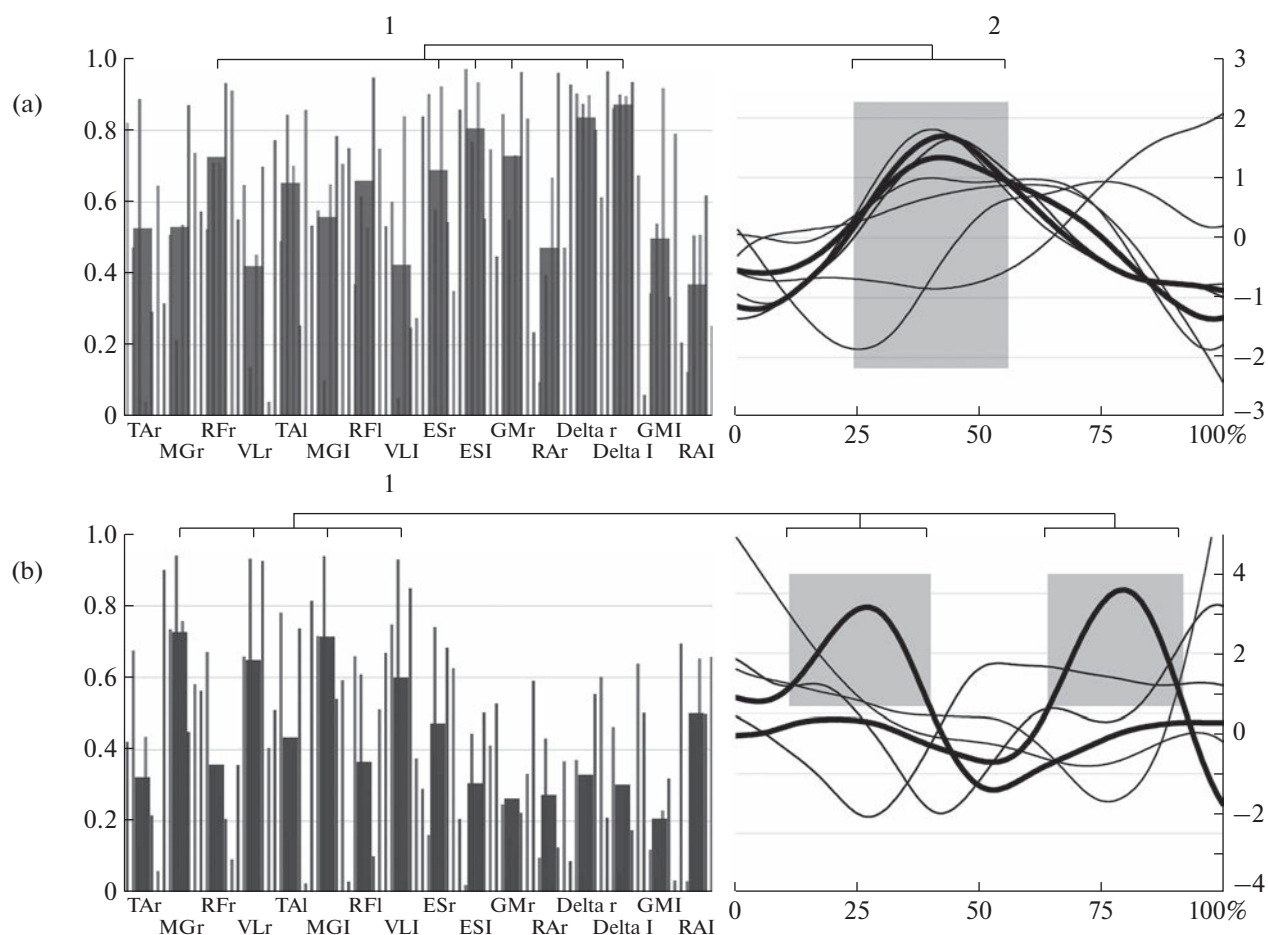


Рис. 2. Пространственно-временные характеристики извлекаемых компонент. (a) — компонент 1, (b) — компонент 2. 1 — весовые коэффициенты (по оси абсцисс — мышцы, по оси ординат — весовые коэффициенты), 2 — коэффициенты активации (по оси абсцисс — прогресс движения, по оси ординат — у.е.).

Временная структура первой мышечной синергии была представлена характерным профилем активации с выраженным пиком активности во второй четверти упражнения. Несмотря на некоторые межиндивидуальные различия были выделены два профиля активации, которые демонстрировали большинство испытуемых (рис. 2a2). Данные профили демонстрировали очень высокое соответствие — 0.92 ± 0.05 . Следует отметить, что регистрировались единичные случаи, имеющие существенно отличающиеся временные профили, с пиком активации в других периодах движения, например, на границе перехода между первой и второй четвертью. Таким образом, пространственная структура первой мышечной синергии включала активность шести скелетных мышц, демонстрирующих высокие весовые коэффициенты, низкую внутригрупповую вариативность их включения, и отмечались случаи с очень высокими коэффициентами (свыше 0.9). Временная же структура, определяемая активностью названных мышц, имела характерный пик активности, приходящийся в большинстве

случаев на вторую четверть рассматриваемого движения, однако, отмечены единичные случаи регистрации временных профилей, существенно отличающихся от внутригрупповых.

Вторая мышечная синергия включала одновременную активацию икроножной и латеральной широкой мышц обеих нижних конечностей. Эти мышцы имели наибольшие весовые коэффициенты в структуре второго выделенного фактора (рис. 2b1). Так, весовые коэффициенты икроножной медиальной мышцы правой нижней конечности составляли в среднем 0.75 ± 0.08 , а максимальные значения достигали 0.93. Для одноименной мышцы левой стороны они достигали 0.73 ± 0.06 , максимальное значение — 0.94. Вариативность включения в синергию названных мышц оценивалась как низкая и не превышала 25.55%, однако, CV мышц бедра достигали среднего уровня вариативности (более 55.55%).

Коэффициенты активации второй МС демонстрировали два различных профиля с выраженными

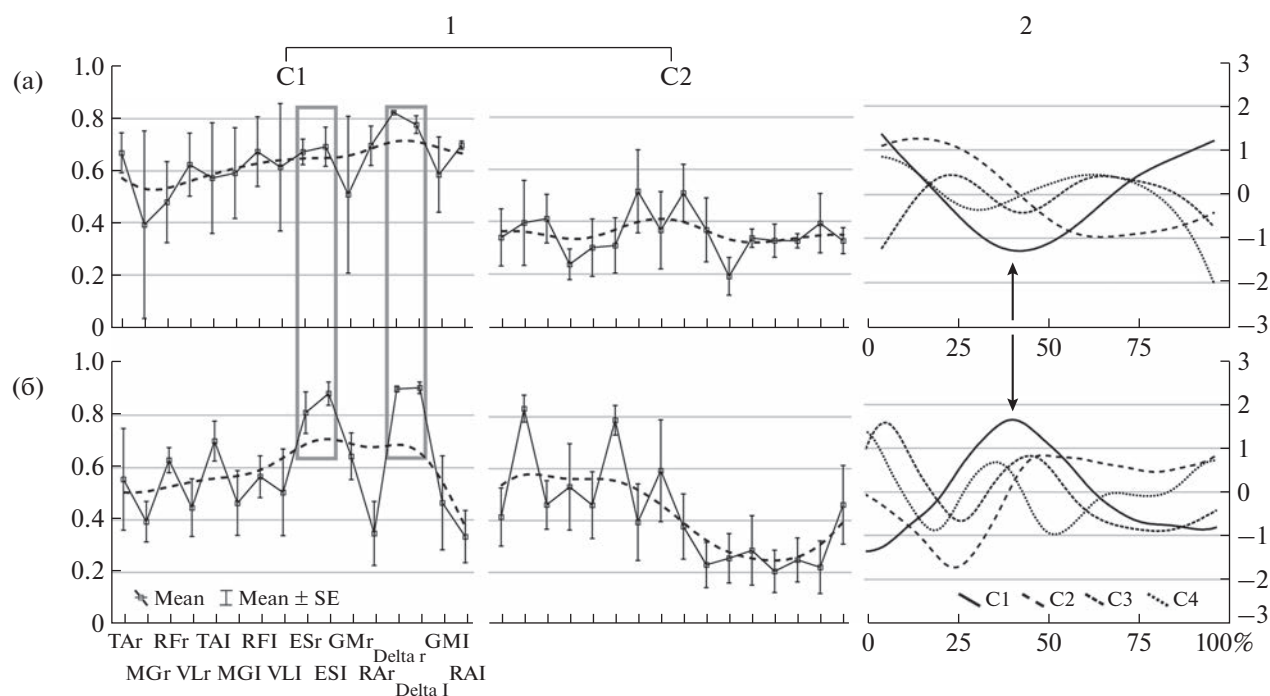


Рис. 3. Весовые коэффициенты (1) и коэффициенты активации (2) частотных (а) и амплитудных (б) мышечных синергий. C1,2,3,4 – номер компоненты (синергии). На части 1 по оси абсцисс – скелетные мышцы, по оси ординат – весовые коэффициенты. Пунктиром показаны усредненные векторы синергий. На части 2 по оси абсцисс – прогресс движения, по оси ординат – у.е.

ми пиками активности в начале второй и четвертой четвертей упражнения (рис. 2b2). Как и в первой мышечной синергии, такие профили были характерны для большинства испытуемых и при внутрииндивидуальном рассмотрении. Однако были зарегистрированы и отличающиеся профили, описываемые очень низкими коэффициентами кросскорреляционных функций – менее 0.3. Наряду с этим были выявлены временные профили, имеющие высокое соответствие, но с противоположным направлением пика активации. Коэффициенты кросскорреляционных функций при сопоставлении таковых достигали 0.91 ± 0.05 . Таким образом, временная структура второй мышечной синергии оказалась представлена двумя разными профилями активации с характерными пиками во второй и четвертой четвертях движения, обусловленная активностью икроножных и латеральных широких мышц бедра обеих нижних конечностей.

При анализе “частотных” синергий были выявлены 4.75 ± 0.47 модулей с общей долей объясняемой дисперсии $80.33 \pm 1.96\%$, что свидетельствует о высоком уровне реконструкции исходных данных. На рис. 3a1 приведены усредненные весовые коэффициенты и векторы (пунктирная линия) первых двух компонентов. Наибольшие значения данного параметра были установлены для мышц, выпрямляющих позвоночник – 0.67 ± 0.04 и 0.69 ± 0.07 , а также для дельтовидных мышц обеих сторон (0.82 ± 0.01 и 0.77 ± 0.03) и прямой живота левой – $0.69 \pm$

± 0.01 . Эти же мышцы имели низкую вариативность включения в первую синергию, CV не превышали 15.34%. Весовые коэффициенты второй синергии в большинстве случаев оказывались средними. Наибольших значений достигали прямая бедренная левая и мышца, выпрямляющая позвоночник правой стороны – 0.51 ± 0.15 и 0.50 ± 0.11 соответственно (рис. 3a1). Усредненные временные профили активации частотных синергий представлены на рис. 3a2. Первый профиль характеризовался плавным снижением активности к середине упражнения и постепенным возрастанием к его окончанию. Для второго отмечены снижение активности к середине упражнения и отсутствие изменений до конца его реализации. Третий профиль имел два характерных пика активации во второй и четвертой четвертях упражнения. Пик активации четвертого профиля совпадал с третьим.

Анализ соответствия векторов амплитудных и частотных синергий показал высокое их соответствие для первых двух выделенных компонент и среднее для остальных. Так, $\cos(\theta)$ первой синергии составлял 0.80 ± 0.02 , а второй – 0.74 ± 0.01 , CV в этих случаях были 13.09 и 8.39% соответственно. В некоторых случаях значения достигали 0.94, а для второй компоненты – 0.91. $\cos(\theta)$ третьей и четвертой синергий не превышали 0.64 ± 0.03 , а коэффициенты вариативности – не более 25.51%. Отмечены некоторые случаи, где $\cos(\theta)$ достигали 0.84. Анализ сходства коэффициентов активации

выделяемых компонент при сравнении частотных и амплитудных синергий показал очень высокое соответствие профилей первой синергии. Максимальные значения кросскорреляционных функций в этом случае составляли 0.91 ± 0.07 . Сравнение других профилей активации синергий показало среднее их сходство, $r_{\max}$ не превышали $0.50 \pm \pm 0.11$. Таким образом, отмечено высокое сходство векторов первых двух амплитудных и частотных синергий. Большинство скелетных мышц, имеющих наибольшие весовые коэффициенты в структуре первых двух амплитудных синергий, демонстрировали высокие коэффициенты при рассмотрении частотных, при этом отмечена низкая вариативность включения этих мышц в структуру выделяемых компонентов. Первый и второй профили временной активации имели высокую степень схожести при рассмотрении синергий, извлеченных из различных наборов данных ЭМГ.

Структура кинематических синергий рассматриваемого движения оказалась представлена в большинстве случаев тремя модулями (2.66 ± 0.21) с высоким уровнем VAF (94.50 ± 0.76). Поскольку первые компоненты описывали большую часть дисперсии данных, далее будет рассмотрена пространственно-временная структура двух компонент (КинС). Структура первого характеризовалась высокими весовыми коэффициентами перемещений всех антропометрических точек по вертикальной оси и верхнеберцовой, нижеберцовой, конечной по сагиттальной оси (рис. 4a1). Названные антропометрические точки имели и очень низкую вариативность включения их в первый компонент. Например, весовые коэффициенты верхнеберцовой антропометрической точки в этом направлении составляли в среднем 0.90 ± 0.01 , а CV — 4.11%. Для нижеберцовой точки эти значения при перемещении по сагиттальной оси составляли 0.69 ± 0.02 , а вариативность не превышала 6.58%. Временная структура первой кинематической синергии была представлена единым паттерном, характеризующимся плавным возрастанием активности в первых трех четвертях упражнения и выходом на пик активности в последней четверти (рис. 4a2). Коэффициенты кросскорреляционных функций при сравнении внутрииндивидуальных и межиндивидуальных паттернов в большинстве случаев превышали 0.9, что свидетельствует о высокой воспроизводимости кинематического паттерна перемещений сегментов тела.

Вторая кинематическая синергия характеризовалась наиболее высокими весовыми коэффициентами перемещений верхнеберцовых антропометрических точек по фронтальной оси — $0.47 \pm \pm 0.05$ и 0.41 ± 0.05 соответственно (рис. 4b1). По вертикальной оси наибольшие коэффициенты при рассмотрении перемещений в структуре второго компонента были получены у нижеберцовых точек — 0.59 ± 0.05 и 0.50 ± 0.03 . Конечные точки по

этой же оси демонстрировали схожие весовые коэффициенты, но не более 0.57 ± 0.04 . Коэффициенты вариативности включения названных точек во вторую кинематическую синергию оценивались как низкие и не превышали в среднем по группе 27.63%. Временные профили активации имели явный пик в середине упражнения, в некоторых случаях регистрировался пик с противоположным направлением, но в тот же временной отрезок изучаемого движения (рис. 4b2).

С целью поиска стабилизируемых переменных синергий был выполнен регрессионный анализ, где в качестве зависимых переменных выступали кинематические модули и перемещения антропометрических точек по трем направлениям. Установлено, что мышечные синергии оказывают влияние на перемещения практически всех антропометрических точек нижних конечностей. Так, коэффициенты детерминации регрессионных моделей при оценке влияния МС на кинематические модули составляли 0.78 ± 0.05 для первого и 0.85 ± 0.03 для второго (рис. 5).

Влияние МС на перемещения практически всех антропометрических точек по всем направлениям (осям) оценивалось как высокое — коэффициенты детерминации превышали 0.7. Лишь в случае рассмотрения траекторий конечной точки коэффициенты оценивались как средние — 0.69 ± 0.07 . Следует отметить низкую вариативность коэффициентов детерминации в среднем по группе и при внутрииндивидуальном рассмотрении. Наибольшие CV были отмечены при оценке влияния МС на перемещения конечных антропометрических точек по сагиттали и фронтоли — 23.46 и 22.42% соответственно. Обращает на себя внимания тенденция, заключающаяся в снижении влияния мышечных синергий на перемещения дистальных антропометрических точек и увеличении их вариативности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пространственно-временные характеристики мышечных синергий. Рассматриваемое движение представляет собой произвольный двигательный акт, выполняемый с целью остановки вертикального перемещения тела спортсмена, задаваемого амортизацией сетки батута. При достижении точки максимальной деформации сетки и начала перемещения тела в противоположном направлении спортсменов, посредством активного сгибания в суставах нижних конечностей, гасит вертикальное ускорение тела и тем самым выполняет остановку после прыжка. Управление движением в этот период может осуществляться с применением механизма образования синергий. Прежде чем перейти к рассмотрению структуры таких образований, необходимо определиться с понятием “синергия” и критериями, ее определяющими.

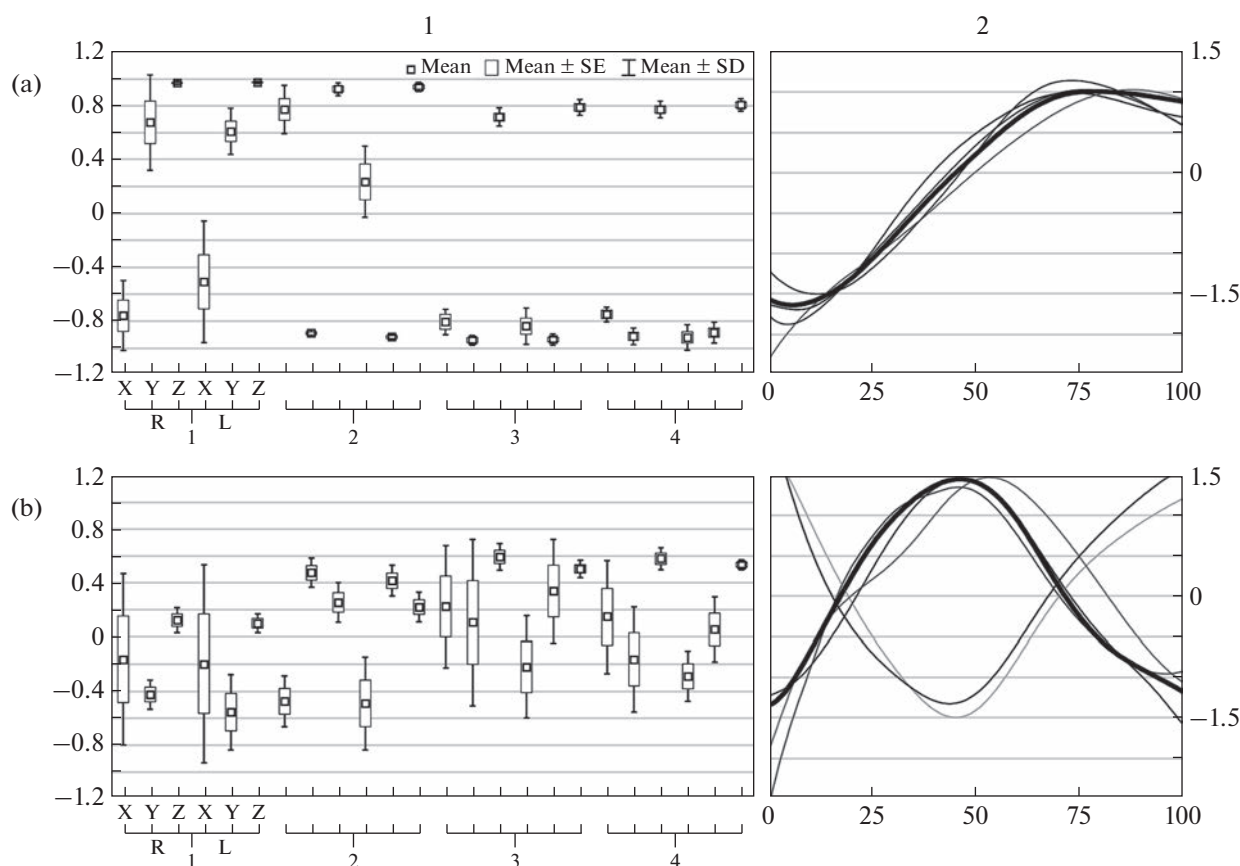


Рис. 4. Весовые коэффициенты (1) и коэффициенты активации (2) кинематических модулей, выявленных при выполнении приземления после прыжка на батуте. а – первый компонент, б – второй компонент. X, Y, Z – оси, R, L – правая, левая сторона, 1 – вертельная антропометрическая точка, 2 – верхнеберцовая, 3 – нижеберцовая, 4 – конечная. На части 1 по оси ординат – весовые коэффициенты. На части 2 по оси абсцисс – прогресс движения, по оси ординат – у.е.

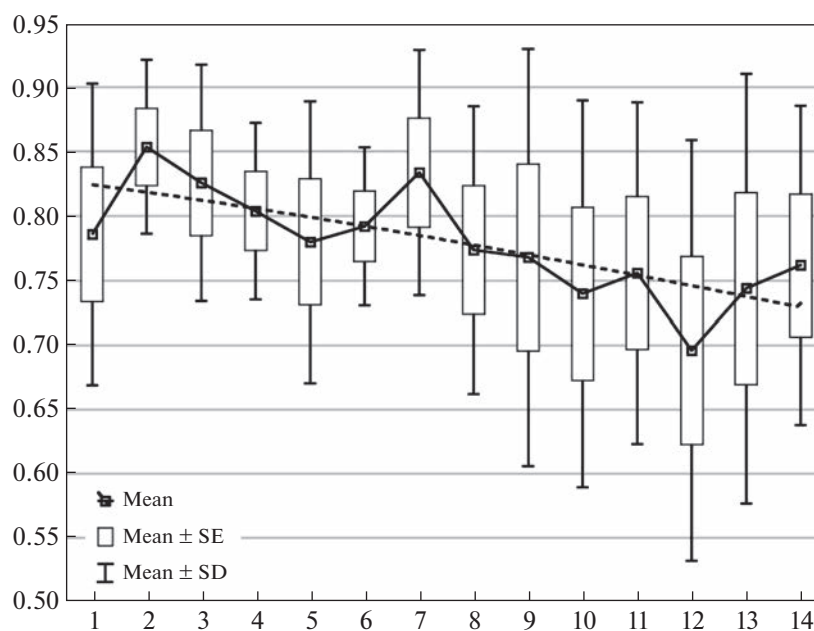


Рис. 5. Влияние мышечных синергий на стабилизацию кинематических переменных. По оси абсцисс: зависимая переменная: 1 – КинС₁, 2 – КинС₂, 3, 4, 5 – вертельная (X, Y, Z), 6, 7, 8 – верхнеберцовая (X, Y, Z), 9, 10, 11 – нижеберцовая (X, Y, Z), 12, 13, 14 – конечная (X, Y, Z). По оси ординат – коэффициенты детерминации. Пунктирной линией показана линия тренда.

В одном случае синергией обозначают отдельные периоды движения, связанные с определенными функциями, например, синергия “принятия веса”, “стабилизации”, “замаха”, “приземления” и т.п. [13, 14]. Параметры пространственно-временной структуры таких синергий указывают на временной отрезок целостного двигательного акта, в котором отмечаются совместная мышечная активность, коактивация суставных углов или другие сочетанные изменения параметров моторного выхода. Синергии в такой формулировке могут быть обнаружены методами факторизации данных в структуре любого движения независимо от его сложности. Это было показано во многих исследованиях, рассматривающих фундаментальные модели двигательного поведения человека и животных — локомоции, позной регуляции, сложных многосуставных движений [15, 16]. Такие образования в своем роде являются строительными блоками, посредством включения которых реализуется двигательная задача. Второй аспект включает рассмотрение целевых двигательных актов, в которых синергия определяется как форма взаимодействия элементов управляемой системы, направленная на компенсацию отклонений в системе, вызываемых внешними или внутренними факторами. Исследования синергий в такой трактовке не столь многочисленны и могут быть обнаружены только эмпирическим путем. Характерной их особенностью является целевая направленность, иначе говоря, они формируются и реализуются с целью достижения конкретного двигательного результата [17]. Низкоразмерные управляемые модули в данном случае являются инструментами, посредством которых решается задача. К синергии такого рода чаще применяют термин “функциональная”. Учитывая вышесказанное, рассматриваемая нами синергия может быть отнесена к “функциональной”, поскольку она имеет характерную для таких образований особенность — целевую направленность. Тем не менее, она включает низкоразмерные модули, обеспечивающие отдельные функции, например, сгибание в суставах или обеспечение динамической осанки.

В зависимости от определения понятия синергии применяют различные подходы к их изучению. Так, для выявления мышечных синергетических модулей чаще применяют методы снижения размерности данных, такие как факторный анализ, метод главных компонент, неотрицательная матричная факторизация и др. [9]. Реже применяют методы, основанные на анализе сигналов в частотной области, например, анализ межмышечной когерентности [18]. Синергия, как функциональное образование, формирующееся для обеспечения стабильности важной переменной двигательного контроля, может быть выявлено при помощи методов определения зависимостей, например, регрессионного анализа [19]. Недавно предпринята по-

пытка поиска синергетического взаимодействия отдельных двигательных единиц (ДЕ), полученных с помощью поверхностной ЭМГ и применением отводящих электродов большой плотности. Показаны синхронизация активности ДЕ в структуре одной мышцы и отсутствие характерных синергетических паттернов при рассмотрении многомышечной синергии. Такие закономерности авторы связывают с реципрокными и коактивационными командами, приводятся доказательства существования отдельных механизмов синергетического контроля, реализуемых на супраспинальном и спинальном уровнях ЦНС [20, 21].

В нашей работе применяются “стандартный” методический подход, связанный с определением синфазности основных пиков мышечной активации, и подход выделением частоты следования биопотенциалов в структуре ЭМГ. Второй отражает синхронизацию активности ДЕ, если исходить из того, что интерференционная ЭМГ является результатом суммирования колебаний потенциала многих двигательных единиц, расположенных в области отведения. Наряду с традиционными методами, выделение главных компонент и анализом их пространственно-временной структуры из вариационных рядов с данными о частоте следования биопотенциалов скелетных мышц может дать дополнительную информацию о механизмах организации элементов управляемой системы при реализации сложных целевых движений.

Мы исходили из предположения о том, что если на мышечном уровне наблюдается синфазность основных пиков активации, то и на уровне активности ДЕ она должна присутствовать, причем в сопоставимых периодах изучаемого движения. Логично было бы ожидать структурирование мышечной активности в одинаковое количество модулей при рассмотрении амплитудных и частотных данных ЭМГ. Однако нами было установлено большее их количество при рассмотрении частотных при достаточно высоком уровне реконструкции исходных данных. Такие результаты несколько неожиданны, поскольку известна прямая зависимость силы мышечного сокращения от числа активных двигательных единиц, частоты их импульсации и синхронизации импульсной активности отдельных двигательных единиц во времени [10, 22, 23]. В этой связи логично, что возрастание амплитуды электроактивности в процессе реализации движения будет сопровождаться возрастанием импульсной активности ДЕ одноименных мышц, в результате чего методы факторизации данных должны выделять равное количество факторов. Низкие коэффициенты вариативности извлечения модулей в обоих случаях свидетельствуют о том, что данные результаты не являются следствием вычислительных ошибок или особенностей алгоритмов выделения компонент. Разное количество извлекаемых синергий при использовании различных подходов

инструментальной оценки электроактивности мышц, вероятно, связано с особенностями их пространственно-временного структурирования.

Замечено, что компонентный состав мышечных синергий имеет некоторую вариативность, кроме того, отдельные мышцы в структуре одной синергии могут быть задействованы в другой [24]. Помимо этого, временные профили активации синергий при некоторых реализациях модельного движения могут иметь различия, выражающиеся либо в изменении направления основного пика активации, либо в формировании существенно отличающегося профиля [27]. Действительно, нами было обнаружено высокое сходство векторов первых двух амплитудных и частотных синергий. Большинство скелетных мышц, имеющих наибольшие весовые коэффициенты в структуре амплитудных, демонстрировали высокие коэффициенты и при рассмотрении частотных синергий. Низкая вариативность их включения свидетельствует о высокой стабильности компонентного состава выявляемых модулей, даже при межиндивидуальном рассмотрении. Первый и второй профили временной активации имели высокую степень схожести при рассмотрении компонентов, выделенных из различных наборов данных ЭМГ. Вполне вероятно, что такие закономерности обусловлены применением в ЦНС различных стратегий двигательного контроля. Их наличие было продемонстрировано при исследовании локомоторных паттернов и некоторых многосуставных движений, выполняемых лицами разных возрастных групп и различной тренированности [26–28]. Такие стратегии заключаются в модуляции продолжительности и величины мышечной синергетической активности, выборочной активации других мышечных синергий, ранее не задействованных в двигательном акте, либо в слиянии или фракционировании наиболее стабильных паттернов мышечной активации [15, 24, 29].

Мышечные синергии стабилизируют траектории перемещений основных кинематических модулей. Изначально мы предполагали, что при выполнении приземления активность синергий будет нацелена на стабилизацию траектории перемещений вертельных антропометрических точек. Однако нами было установлено их влияние на перемещения практически всех сегментов нижних конечностей, и, кроме того, на сами кинематические модули. Обращает на себя внимание тенденция, заключающаяся в снижении влияния мышечных синергий на перемещения дистальных антропометрических точек и увеличении их вариативности.

Частично такие закономерности находят объяснение в положениях теории иерархической многоуровневой организации движений, в частности при обсуждении вопроса специфической вариативности. Постулируется, что управляющая система допускает большую вариативность по отношению к

менее важным компонентам движения, нежели к тем, которые представляют большую важность для эффективной реализации двигательной задачи. Выбор важных и менее важных компонент при построении движения может быть осуществлен путем применения соответствующих тактик (стратегий), которые в данном случае сводятся к поиску рабочих параметров, позволяющих достичь наилучшего приближения к цели. Решение такой задачи возможно в случае эффективного выделения существенных переменных контроля, под которыми следует понимать небольшое число характерных для данной двигательной задачи комбинаций мышечных напряжений. Применительно к синергиям такие стратегии могут заключаться в изменении продолжительности активации мышечных модулей, в подключении ранее не задействованных мышечных модулей либо в их слиянии или фракционировании [24, 29, 31]. Возможно существование и других стратегий контроля, основанных на синергии, и их выявление представляет фундаментальную задачу физиологии движений.

Кинематические синергии как отражение процессов управления в ЦНС. Как правило, при изучении кинематических синергий рассматривают явление коактивации суставных углов, и именно такое взаимодействие определяют как синергию. При этом выделяемые компоненты (кинематические модули), отражающие временной ход и амплитуду движения, показывают соотношения между изменениями суставных углов и являются результатом центрального управления, стабилизирующего смещение центра тяжести в определенном направлении [4]. Несмотря на то что управляющая система имеет в своем распоряжении все богатство афферентации, информирующее ее о положении и движении частей тела, едва ли величины углов могут являться характеристиками, посредством вычисления которых система может направленно воздействовать на структуру движения. Вычисление угловых величин в моменты времени, равно как любых других биомеханических характеристик, не приблизят систему к эффективному реагированию системы в соответствии с быстро изменяющимися условиями реализации двигательной задачи, а лишь усугубят известную проблему избыточности элементов двигательного контроля [30, 32]. Деятельность управляющей системы направлена не на задавание определенных биомеханических параметров для сегментов тела, а скорее на организацию мышечных усилий и межмышечного взаимодействия (для этого она имеет все инструменты управления и контроля), в результате чего формируется стереотипный кинематический рисунок движения, обладающий высокой воспроизводимостью при многократных повторениях.

В этой связи выделение кинематических модулей, формирующихся по принципу объединения сегментов тела с сочетанной пространственно-вре-

менной динамикой, скорее является показателем эффективности деятельности управляющей системы. Не случайно кинематические модули, весовые коэффициенты и временные профили активации, получаемые методами факторизации, как правило, демонстрируют высокое качество реконструкции исходных данных. Наши данные демонстрировали высокие весовые коэффициенты перемещений всех антропометрических точек по вертикальной оси и верхнеберцовой, нижеберцовой, конечной по сагиттальной оси, а временные паттерны выделяемых кинематических модулей имели очень низкую межиндивидуальную и внутрииндивидуальную вариативность. По сути, эти результаты лишь описывают структуру движения, выделяя сегменты тела, проявляющие схожую динамику изменений, косвенно отражая механизм управления в ЦНС. Тем не менее, кинематические модули, наряду с кинематическими характеристиками движения, могут являться переменными, на стабилизацию которых направлена деятельность управляющей системы. Инструментами воздействия на такие переменные могут являться мышечные модули — синергии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остановка после прыжка на батуте может быть реализована с применением общих паттернов пространственно-временной активации мышечных синергий, однако, большее количество модулей при рассмотрении частоты следования биопотенциалов может быть обусловлено применением в ЦНС различных стратегий двигательного контроля. Вероятно, синергетические эффекты, получаемые с применением разных подходов инструментальной оценки электроактивности скелетных мышц, отражают различные механизмы контроля, реализуемые на разных уровнях ЦНС.

Выделяемые кинематические модули, формирующиеся по принципу объединения сегментов тела с сочетанной пространственно-временной динамикой, косвенно отражают центральные механизмы управления структурой движения. Наблюдаемый стереотипный кинематический рисунок с низкой вариативностью параметров выделяемых кинематических модулей может свидетельствовать об эффективной организации межмышечного взаимодействия.

Мышечные синергии направлены на стабилизацию перемещений отдельных антропометрических точек, а также сегментов тела, объединенных в кинематические модули. Влияние мышечных модулей на стабилизацию перемещений снижается для дистальных сегментов тела, что, вероятно, связано со степенью их значимости для управляемой системы для успешной реализации двигательной задачи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Протокол заседания локального этического комитета при ФГБОУ ВО «ВЛГАФК» № 2 от 07.02.2022.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено в рамках плановой работы ФГБОУ ВО «Великолукская государственная академия физической культуры и спорта».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.А.М. — планирование, организация и участие в проведении экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, обработка данных, подготовка текста рукописи; Е.А.М.— участие в проведении экспериментов, написание и редактирование манускрипта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта А.М. Пухову, В.В. Маркевич, С.М. Иванову за помощь в организации и проведении исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельников АА, Викулов АД, Малахов МВ (2016) Функция равновесия у спортсменов-борцов. Ярославль. ЯГПУ. [Mel'nikov AA, Vikulov AD, Malahov MV (2016) Funkciya ravnovesiya u sportsmenov-borcov. Yaroslavl'. YAGPU. (In Russ)].
2. Gurfinkel VS, Osevs M (1972) Dynamics of the vertical posture in man. Biophysics 17: 496–506.
3. Gurfinkel VS, Коц ЯМ, Шук МЛ (1965) Регуляция позы человека. М. Наука. [Gurfinkel VS, Koc YaM, Shik ML (1965) Regulaciya pozy cheloveka. M. Nauka. (In Russ)].
4. Александров А, Фролов А (2017) Биомеханический анализ координации позы и движения у стоящего человека при наклонах корпуса в сагиттальной плоскости. ЖВНД им ИП Павлова 67: 33–48. [Aleksandrov A, Frolov A (2017) Biomechanical analysis of the coordination of posture and movement in a standing per-

- son with body tilts in the sagittal plane. ZHVND im IP Pavlova 67: 33–48. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467717010038>
5. Park E, Schöner G, Scholz J (2012) Functional synergies underlying control of upright posture during changes in head orientation. PLoS One 7(8): e41583.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041583>
6. Robert T, Zatsiorsky V, Latash M (2008) Multi-muscle synergies in an unusual postural task: quick shear force production. Exp Brain Res 187(2):237–253.
<https://doi.org/10.1007/s00221-008-1299-7>
7. Altenburger K, Bumke O, Foerster O (1937) Allgemeine neurologie. Handbuch der Neurologie. Berlin.
8. Moiseev S, Pukhov A, Mikhailova E, Gorodnichev R (2022) Methodological and Computational Aspects of Extracting Extensive Muscle Synergies in Moderate-Intensity Locomotions. J Evol Biochem Physiol 58(1):88–97.
<https://doi.org/10.1134/s0022093022010094>
9. Tresch M, Cheung V, d'Avella A (2006) Matrix factorization algorithms for the identification of muscle synergies: evaluation on simulated and experimental data sets. J Neurophysiol 95(4):2199–2212.
<https://doi.org/10.1152/jn.00222.2005>
10. Персон PC (1985) Спинальные механизмы управления мышечным сокращением. М. Наука. [Person RS (1985) Spinal'nye mekhanizmy upravleniya myshechnym sokrashcheniem. M. Nauka. (In Russ)].
11. Moiseev S, Ivanov S, Gorodnichev R (2022) The Motor Synergies' Organization Features at Different Levels of Motor Control during High Coordinated Human's Movement. J Evol Biochem Physiol 58(2):610–622.
<https://doi.org/10.1134/s0022093022020272>
12. Радченко С (2011) Методология регрессионного анализа: монография. К. Корнийчук [Radchenko SG (2011) Metodologiya regressionnogo analiza: monografiya. K. Kornijchuk. (In Russ)].
13. Munoz-Martel V, Santuz A, Bohm S, Arampatzis A (2021) Proactive Modulation in the Spatiotemporal Structure of Muscle Synergies Minimizes Reactive Responses in Perturbed Landings. Front Bioeng Biotechnol 9:761766.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.761766>
14. Silva PB, Oliveira AS, Mrachacz-Kersting N, Kersting UG (2018) Effects of wobble board training on single-leg landing neuromechanics. Scand J Med Sci Sports 28(3):972–982.
<https://doi.org/10.1111/sms.13027>
15. Rabbi M, Pizzolato C, Lloyd D, Carty C, Devaprakash D, Diamond L (2020) Non-negative matrix factorization is the most appropriate method for extraction of muscle synergies in walking and running. Sci Rep 10: 8266.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65257-w>
16. Nardon M, Pascucci F, Cesari P, Bertuccio M, Latash M (2022) Synergies Stabilizing Vertical Posture in Spaces of Control Variables. Neuroscience 500:79–94.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.08.006>
17. Latash M (2010) Motor synergies and the equilibrium-point hypothesis. Motor Control 14(3):294–322.
<https://doi.org/10.1123/mcj.14.3.294>
<https://doi.org/10.1123/mcj.14.3.294>
18. De Marchis C, Severini G, Castronovo AM, Schmid M, Conforto S (2015) Intermuscular coherence contributions in synergistic muscles during pedaling. Exp Brain Res 233(6):1907–1919.
<https://doi.org/10.1007/s00221-015-4262-4>
19. Madarshahian S, Latash ML (2021) Reciprocal and co-activation commands at the level of individual motor units in an extrinsic finger flexor-extensor muscle pair. Exp Brain Res 240(1):321–340.
<https://doi.org/10.1007/s00221-021-06255-w>
20. Latash ML, Madarshahian S, Ricotta JM (2022) Intramuscle Synergies: Their Place in the Neural Control Hierarchy. Motor Control 27(2):402–441.
<https://doi.org/10.1123/mc.2022-0094>
21. Ricotta JM, Nardon M, De SD, Jiang J, Graziani W, Latash ML (2023) Motor unit-based synergies in a non-compartmentalized muscle. Exp Brain Res 241:1367–1379.
<https://doi.org/10.1007/s00221-023-06606-9>
22. Гидиков АА (1975) Теоретические основы электромиографии. Л. Наука [Gidikov AA (1975) Teoreticheskie osnovy elektromiografii. L. Nauka. (In Russ)].
23. Гурфинкель ВС, Левик ЮС (1985) Скелетная мышца: структура и функция. М. Наука. [Gurfinkel' VS, Levik YUS (1985) Skeletnaya myshca: struktura i funkciya. M. Nauka. (In Russ)].
24. Nishida K, Hagio S, Kibushi B, Moritani T, Kouzaki M (2017) Comparison of muscle synergies for running between different foot strike patterns. PLoS One 12(2): e0171535.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171535>
25. Moiseev S, Gorodnichev R (2022) Motor Synergy Structure Variability in Different Intensity Locomotions. Hum Physiol 48:370–380.
<https://doi.org/10.1134/S0362119722040089>
26. Barroso FO, Torricelli D, Moreno JC, Taylor J, Gomez-Soriano J, Bravo-Esteban E, Piazza S, Santos C, Pons JL (1984) Shared muscle synergies in human walking and cycling. J Neurophysiol. 112(8):1984.
<https://doi.org/10.1152/jn.00220.2014>
27. Bach MM, Daffertshofer A, Dominici N (2021) Muscle Synergies in Children Walking and Running on a Treadmill. Front Hum Neurosci 15:637157.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.637157>
28. Escalona MJ, Bourbonnais D, Goyette M, Le Flem D, Duclos C, Gagnon DH (2021) Effects of Varying Overground Walking Speeds on Lower-Extremity Muscle Synergies in Healthy Individuals. Motor Control 25(2):234.
<https://doi.org/10.1123/mc.2020-0008>
29. Santuz A, Ekizos A, Janshen L et al. (2018) Modular Control of Human Movement During Running: An Open Access Data Set. Front Physiol 9:1509.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01509>
30. Бернштейн НА (1990) Физиология движений и активность М. Наука. [Bernshtejn NA (1990) Fiziologiya dvizhenij i aktivnost' M. Nauka. (In Russ)].
31. Hajiloo B, Anbarian M, Esmaeili H, Mirzapour M (2020) The effects of fatigue on synergy of selected lower limb muscles during running. J Biomech 103:1.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109692>
32. Гельфанд И, Цетлин М (1962) О некоторых способах управления сложными системами. УМН 17(1):3–25. [Gel'fand I, Cetlin M (1962) O nekotoryh sposobah upravleniya slozhnymi sistemami. UMN 17(1):3–25. (In Russ)].

FUNCTIONAL SYNERGY ENSURES A TRAMPOLINE JUMP STOPPING**S. A. Moiseev^{a,#} and E. A. Mikhaylova^a**^a*Velikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia*[#]*e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru*

The paper considers the structure of intermuscular synergetic interaction that ensures the athlete's body stopping on the trampoline after a jump. We compared the spatio-temporal characteristics of muscle synergies extracted from the skeletal muscles electroactivity amplitude and frequency of biopotentials data. The objective of the study was to find out whether the extracted kinematic modules represent the central mechanisms for the movement structure controlling as well as to determine the variables which should be stabilized by muscle synergies activity. The extraction of synergies was carried out using the matrix factorization method. It has been established that trampoline jump stopping can be performed using common patterns of muscle synergies spatio-temporal activation. The synergistic effects obtained using different approaches of instrumental assessment of skeletal muscle electroactivity probably reflect different control mechanisms implemented at different levels of the central nervous system. Muscle synergies are aimed at the stabilizing of the certain anthropometric points movement, as well as body segments, combined into kinematic modules. The structure of the kinematic modules themselves indicates the effective organization of intermuscular interaction, indirectly reflecting the central control mechanisms of complex multi-joint movement.

Keywords: functional synergy, intermuscular interaction, motor control, variability, tactics of movement construction, trampoline jumping

ДИНАМИКА РАЗОБЩАЮЩЕГО БЕЛКА UCP1 В ЖИРОВЫХ ТКАНЯХ АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ICR В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. А. В. Якуненок^{1,*}, Е. И. Елсукова¹, И. О. Наточий¹

¹Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева,
Красноярск, Россия

*e-mail: avy0905@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 16.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Разобщающий белок UCP1 в митохондриях бурых и бежевых адипоцитов обеспечивает продукцию тепла за счет разобщения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования. Факты положительного влияния присутствия в жировых депо адипоцитов с экспрессией белка UCP1 на показатели метаболического здоровья организма стимулируют интерес к изучению возрастной динамики белка UCP1. Имеющиеся сведения немногочисленны, в основном получены для предрасположенной к ожирению линии мышей C57Bl/6J и охватывают либо ранний, либо поздний онтогенез. В нашей работе впервые получены данные об экспрессии белка UCP1 в жировых тканях аутбредных мышей ICR в период от окончания грудного вскармливания до старости. Пробы межлопаточной бурой жировой ткани, паховой и окологонадной белой жировой ткани получены у мышей в возрасте 20 сут, 1.5, 6 и 18 мес. Уровни экспрессии белка UCP1 оценивали с помощью вестерн-блоттинга. В паховом депо относительная экспрессия белка UCP1 снижалась в 2 раза между 20 суточным и 1.5-месячным возрастом; у мышей старше 1.5 мес полоса UCP1 на блотах не определялась. В окологонадном депо белок UCP1 обнаружен только в 30% проб 1.5- и 6-месячных мышей, величина относительной экспрессии была на порядок ниже по сравнению с паховым депо. В бурой жировой ткани статистически значимые изменения экспрессии белка UCP1 не выявлены. Обсуждается физиологическая роль популяции UCP1-экспрессирующих клеток в окологонадном депо, а также возможная связь сроков и темпов снижения экспрессии UCP1 в период роста и созревания репродуктивной функции с активацией липогенеза в паховой жировой ткани.

Ключевые слова: разобщающий белок, относительная экспрессия, онтогенез, бурая и белая жировые ткани

DOI: 10.31857/S0044452923040083, **EDN:** YYFQFT

ВВЕДЕНИЕ

Разобщающий белок 1 (uncoupling protein 1 – UCP1) во внутренней мембране митохондрий адипоцитов бурой жировой ткани (БЖТ) и бежевых адипоцитов осуществляет транспорт H^+ из межмембранного пространства в матрикс, разобщая окислительное фосфорилирование и дыхание, продуцируя тепло [1, 2]. Бурая жировая ткань – специализированный термогенный орган млекопитающих с высокой мощностью теплообразования, увеличивающейся при холодовой адаптации [1, 2]. К бежевым адипоцитам относят жировые клетки с экспрессией белка UCP1, дифференцирующиеся от клеточных предшественников, отличных от предшественников бурых адипоцитов, и локализованные вне бурого жира [3]. Сохраняющиеся в термонеutralных условиях в виде небольших клеточных вкраплений бежевые адипоциты подкожной [4, 5] и ретроперитонеальной

жировой ткани [6] при холодовой адаптации быстро увеличивают свою численность, уровни мРНК и белка UCP1. Активация бежевого адипогенеза сопровождается потемнением жировой ткани и в англоязычной литературе получило название browning. По выраженности холод-индуцированной экспрессии гена и белка UCP1 подкожную паховую жировую ткань (ПБелЖТ) иногда относят к бежевой жировой ткани, а окружающую семенники окологонадную жировую ткань (ГБелЖТ) самцов относят к типично белой жировой ткани [7]. В последние годы интерес к бежевым адипоцитам стимулируется обнаружением отрицательной связи между экспрессией UCP1 в жировых депо и накоплением в них гипертрофированных с низкой метаболической активностью жировых клеток, развитием хронического воспалительного процесса, резистентностью к инсулину, дислипидемией [8–12]. Причем, как показано в ряде работ [13–16],

частота и сроки развития этих метаболических нарушений определяются особенностями протекания раннего онтогенеза. Поэтому представляет интерес изучение динамики UCP1 в жировых тканях в широком возрастном диапазоне. Сведения об уровнях мРНК и белка UCP1 в основном получены на линии мышей C57Bl/6J. Значительное снижение мРНК UCP1 в паховом депо регистрировалось после полового созревания и затем в пожилом возрасте одновременно с появлением симптомов гипергликемии [17–19]. В межлопаточной бурой жировой ткани (БЖТ) уровни мРНК UCP1 либо не изменялись [17, 19], либо у старых животных на втором году жизни наблюдали снижение этого показателя [19, 20]. Однако изменения уровней мРНК и самого белка UCP1 не всегда однонаправлены [21, 22]. Сведения о динамике белка UCP1 в одних исследованиях приведены для раннего онтогенеза [15, 16, 18, 23]; в других работах, наоборот, экспрессию белка UCP1 изучали от зрелого до пожилого возраста [22, 24]. Хотя в целом из этих работ следует, что экспрессия белка UCP1 в паховой ЖТ и при стандартных условиях и при холодовой стимуляции снижается; сроки, темпы, масштабы этого онтогенетического снижения варьируют по данным разных авторов [15, 18, 22–24]. Еще менее однозначны сведения для БЖТ и ГБелЖТ [20, 23]. Почти нет работ, где бы одновременно фиксировалась возрастная динамика UCP1 в типичной бурой, типичной белой и бежевой жировых тканях для комплексной оценки термогенного потенциала всех трех типов жировой ткани, выявления и анализа возможных компенсаторных реакций. Ранее компенсаторную активацию бежевого адипогенеза наблюдали у мышей с генетической абляцией рецептора BMPRIA, вызывающей нарушения термогенеза в буром жире [25].

Таким образом, имеющиеся сведения о влиянии возраста на экспрессию разобщающего белка UCP1 в жировых тканях даже у мышей одной линии разрозненны и не сопоставимы. Поэтому целью нашей работы было изучение возрастной динамики белка UCP1 в бурой жировой ткани, в подкожном и абдоминальном жировых депо аутбредных мышей ICR от окончания грудного вскармливания до старости.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Исследование выполнено на самцах аутбредных мышей линии ICR (Institute of Cancer Research), полученных из питомника ГНЦ ВБ “Вектор” (Новосибирск) в возрасте 1.5 мес. Все животные находились при температуре 23–25°C и имели свободный доступ к сбалансированному гранулированному корму “БиоПро” (Новосибирск) и воде. Вывод животных из эксперимента производился путем декапитации по четырем возрастным точкам: 20 сут ($n = 18$),

1.5 мес ($n = 10$), 6 мес ($n = 7$), 18 мес ($n = 3$). 20-суточные мыши получены в лаборатории скрещиванием 2.5-месячных мышей ICR. К 20 сут все молодые мыши перешли к питанию стандартным кормом и были отсажены от самок. БЖТ, ПБелЖТ и ГБелЖТ экстирпировали сразу после декапитации животных. У 20-суточных мышей выделяли только БЖТ и ПБелЖТ, так как визуально ГБелЖТ не определялась в этом возрасте. Несколько проб бурого и подкожного белого жира 20-суточных мышей объединяли ввиду малого количества тканей для анализа. Образцы тканей хранились в жидком азоте до начала экспериментальных процедур.

Определение общего белка в пробах тканей. Ткани гомогенизировали в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl с 1 mM EDTA, pH = 7.2, с добавлением 1 mM фенилметилсульфонил фторида (PMSF, “SigmaAldrich”, США). Соотношение ткани и буфера для МБЖТ составляло 30–50 мг в 0.5 мл, для ПБелЖТ и ГБелЖТ 100–150 мг в 0.5 мл. Содержание белка в гомогенатах определяли по методу Лоури [26] после их солиubilизации добавлением до конечных концентраций 1% SDS и 0.44N NaOH. Концентрация общего белка в ткани рассчитывали в мкг/мг.

Вестерн-блоттинг. Гомогенаты тканей инкубировали с 10% SDS, центрифугировали при 9000 g $\times$ 15 мин (14°C), из супернатантов готовили пробы для электрофореза. Электрофорез в буферной системе Лэммли [27] в 12.5%-ном полиакриламидном геле проводился в камере “Mini-Protean” (“Bio-Rad”, США), нагрузка на трек составляла 20–25 мкг белка. В качестве стандартов молекулярной массы белка использовались окрашенные маркеры “Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм, “Bio-Rad”, США) проводился методом мокрого переноса в буфере, содержащем 25 mM Tris-HCl, 192 mM глицин, 10% этанола (v/v), при постоянном напряжении 30 В в течение часа. Эффективность переноса контролировалась окраской мембраны Ponceau S. После обесцвечивания мембрана блокировалась в буфере TBST, содержащем 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.05% Tween-20 и 5% БСА, pH = 7.5. Первичные антитела кролика к UCP1 (ab10983) и β -тубулину (ab6046), а также вторичные антитела козы против IgG кролика (ab6722), конъюгированные с щелочной фосфатазой, приобретены в компании “Abcam” (США). β -Тубулин использовался в качестве контроля при оценке относительной экспрессии. Разведение препаратов антител производили в соответствии с протоколами от производителя в буфере TBST с 5% БСА. Инкубацию мембран с первичными антителами производили в течение часа при комнатной температуре, затем отмывали TBST 3 $\times$ 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами делали по той же схеме. После инкубации проявление бэндов на

мембране осуществляли с помощью раствора BCIP/NBT (“SERVA Electrophoresis GmbH”, Германия). Анализ мембраны проводили в программе ImageJ 1.8.0.

Статистический анализ. Анализ и визуализация данных проведены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.2.1. Данные представлены как среднее значение $\pm$ sd. Сравнение двух средних проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Для сравнения трех и более групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, при наличии значимых различий проводился post-hoc тест Данна. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные в работе группы мышей соответствовали периодам окончания вскармливания и выходу из гнезда (20 сут), половому созреванию (1.5 мес), половозрелому возрасту (6 мес), старости (18 мес). У 20-суточных мышей межлопаточный бурый жир и паховый белый жир имели характерную для этих тканей локализацию и морфологию; абдоминальное депо жировой ткани практически отсутствовало. Все три изучаемые жировые ткани были хорошо выражены у 1.5-месячных мышей. На протяжении не менее 6 мес рост жировых депо опережал темпы роста тела, так как и абсолютная, и относительная масса жировых депо непрерывно увеличивались и достигали максимальных значений у 6-месячных мышей (рис. 1а–с, h, i). Особенно значительные темпы роста регистрировались в ГБелЖТ, вес которой от 1.5 до 6 мес возрастал более чем в 6 раз, а относительная масса в 2.8 раза ($n = 10$, $n = 7$, $p < 0.01$, post-hoc тест Данна, рис. 1с, f). В этот же период абсолютная и относительная масса ПБелЖТ увеличивалась только в 3.8 и в 1.66 раза соответственно ($p = 0.0551$ для относительной массы, тест Краскела–Уоллиса, рис. 1b, e). Рост жировых депо сопровождался снижением содержания общего белка в ткани, что указывает на активный липогенез и депонирование триглицеридов. Общий белок в ГБелЖТ у 6-месячных мышей снижался в два раза относительно 1.5-месячных ($n = 7$, $n = 10$, $p < 0.05$, post-hoc тест Данна, рис. 1i). В ПБелЖТ общий белок снижался более чем в два раза в период от 20 сут до 6 мес ($n = 5$, $n = 7$, $p < 0.01$, post-hoc тест Данна, рис. 1h). Как и ожидалось, рост БЖТ, наоборот, отставал от роста тела, по крайней мере, в первые месяцы жизни. Относительная масса БЖТ в период от 20 сут до 1.5 мес снижалась в 2 раза ($n = 18$, $n = 10$, $p < 0.0001$, post-hoc тест Данна, рис. 1d) и в дальнейшем не изменялась. Как и в депо белой жировой ткани, в БЖТ содержание общего белка у 6-мес мышей было в 2 раза ниже по сравнению с 1.5-месячными животными ($n = 7$, $n = 10$, $p < 0.01$, post-hoc тест

Данна, рис. 1g). У 18-месячных старых мышей масса тела, масса БЖТ и обоих жировых депо не отличались от 6-месячных животных (рис. 1j). В паховом депо старых мышей среднее значение тканевого белка увеличивалось на 67% по сравнению с 6-месячными мышами, но это увеличение не было статистически значимым (рис. 1h). Таким образом, динамика показателей массы тела и жировых тканей в раннем постнатальном онтогенезе близка к описанной для инбредных линий мышей [18, 24, 28].

Показатель относительной экспрессии белка UCP1 в БЖТ проявлял тенденцию к небольшому снижению в период от выхода из гнезда до 1.5-месячного возраста, затем медленно увеличивался вплоть до 18-месячного возраста, однако эти изменения не были статистически значимы. В ПБелЖТ белок UCP1 присутствовал во всех пробах 20-суточных и 1.5-месячных мышей и не был идентифицирован ни в одной из проб 6- и 18-месячных животных. Показатель относительной экспрессии UCP1 в ПБелЖТ 20-суточных животных составлял примерно 50% от значения в БЖТ. У 1.5-месячных мышей относительная экспрессия UCP1 снижалась примерно в 3 раза по сравнению с 20-суточными мышами ($n = 5$, $n = 3$, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). В ГБелЖТ выявлены следовые количества белка UCP1 в одной из трех проб у 1.5-месячных мышей и в одной из 4 проб 6-месячных мышей. Рассчитанные для этих полос значения относительной экспрессии UCP1 были на порядок ниже значений в ПБелЖТ 1.5-месячных мышей (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, для мышей ICR характерно раннее снижение экспрессии белка UCP1 в паховом депо, при этом в БЖТ уровень экспрессии UCP1 не только не снижался, а даже наблюдалась тенденция к ее увеличению. В работах с линией C57Bl/6J изменения в БЖТ и паховом депо при старении хотя и в разной степени выражены, но обычно однонаправлены [20, 24]. В ГБелЖТ наших животных белок UCP1 определялся даже у половозрелых мышей, но не во всех, а только в 25–30% проб и не детектировался у старых мышей. Разница в величине относительной экспрессии UCP1 между ПБелЖТ и пробами ГбелЖТ с UCP1 была близка к различию уровней UCP1 между этими жировыми депо у мышей линии C57Bl/6J [18]; сроки прекращения экспрессии белка UCP1 близки к данным в работе [24].

Полученным в нашей и других работах данным можно дать следующую интерпретацию. Максимальная экспрессия UCP1 и в буром, и в паховом жире мышей в ранние сроки после выхода из гнезда обеспечивает требуемый для температурного гомеостаза термогенез. Потребность в нем снижается по мере роста тела, развития шерстного покрова,

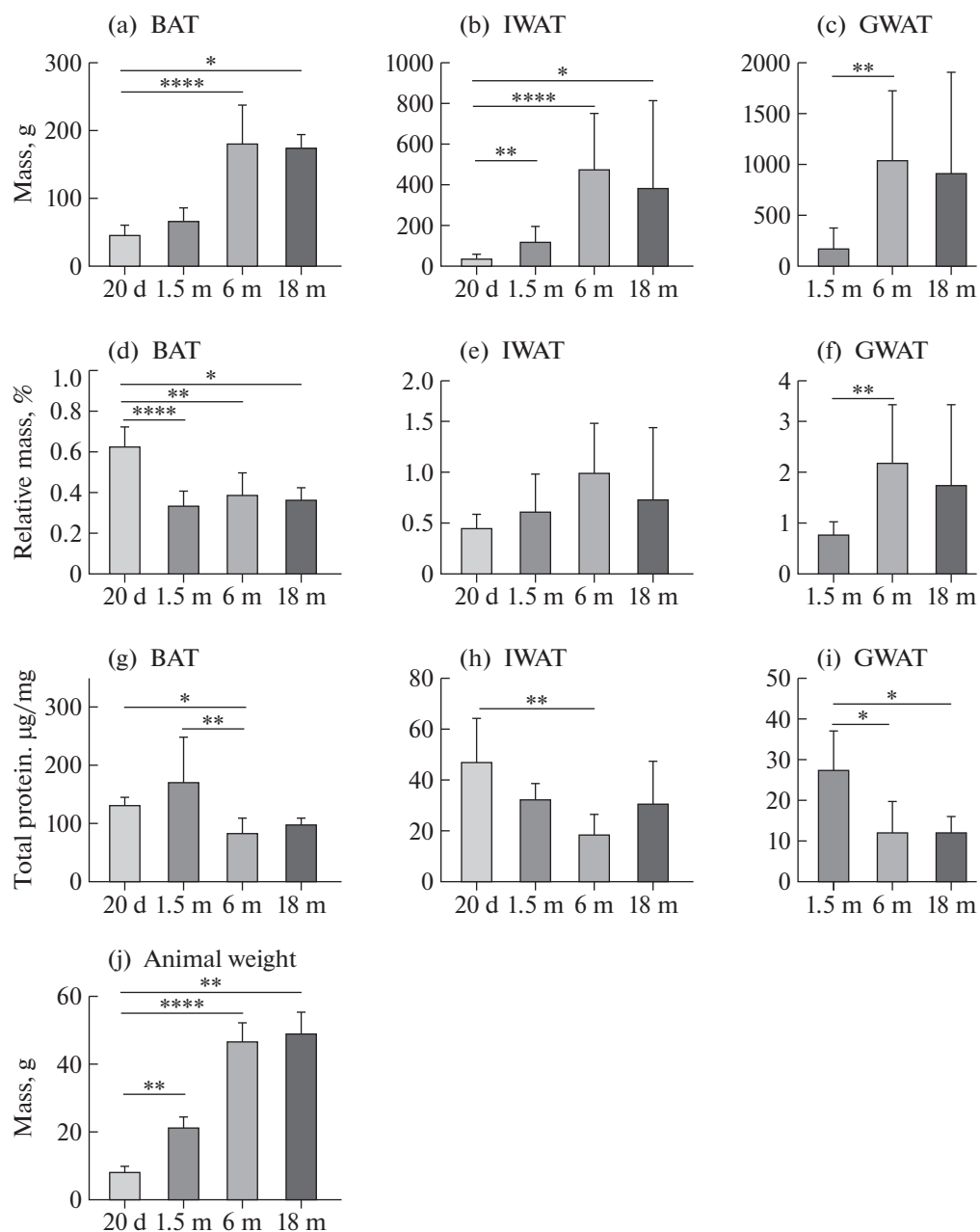


Рис. 1. Масса тела, масса основных скоплений бурой и белой жировой ткани, содержание в них общего белка. (a–c) – абсолютная масса, мг; (d–f) – относительная масса, %; (g–i) – содержание общего белка, мкг/мг; (j) – масса животных, г. BAT – БЖТ, IWAT – ПбелЖТ, GWAT – ГбелЖТ; 20 d, 1.5 m, 6, 18 m – 20 сут, 1.5, 6, 18 мес; Средние значения $\pm$ sd; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, **** – $p < 0.0001$; post-hoc тест Данна.

развития скелетной мускулатуры, роста подвижности, соответственно снижаются темпы роста бурого жира, экспрессия в нем и в ПБелЖТ UCP1, расширяются возможности больше распределить энергосубстратов на рост основных жировых депо и липогенез в них и в БЖТ. В подкожном депо прекращение экспрессии UCP1 способствует его функции долгосрочного депонирования триглицеридов. Поддерживаемая у некоторых мышей в окологонадной жировой ткани малочисленная по-

пуляция клеток с UCP1, возможно, представляет эволюционно закрепленный резерв для быстрого включения в них термогенеза, предотвращения необратимых повреждений репродуктивной функции при угрозе гипотермии и сохранении популяции животных. В связи с этим предположением отметим, что процессы трансдифференцировки белых в бежевые адипоциты с увеличением мРНК UCP1 в подкожном депо разворачиваются в течение нескольких суток [29]. Соответственно с угасанием

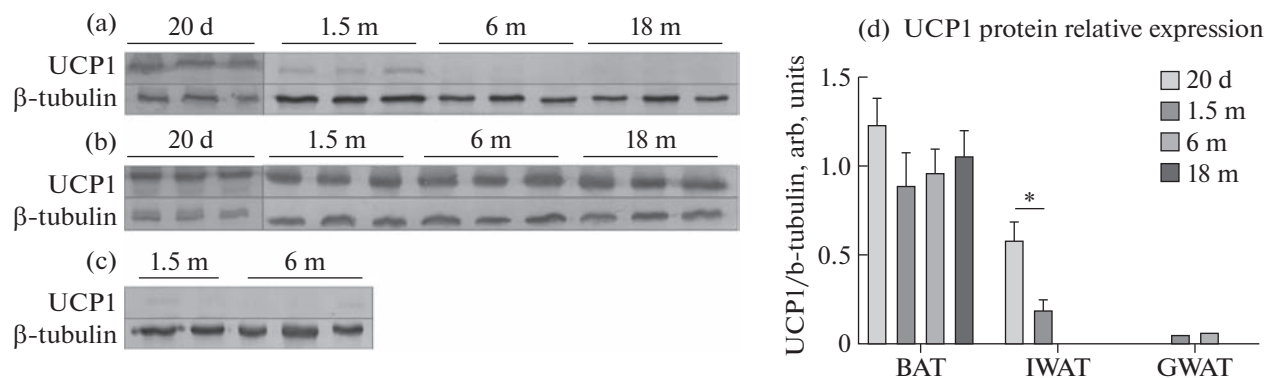


Рис. 2. Относительная экспрессия белка UCP1. (a) — репрезентативный иммуноблот IWAT/ПБелЖТ, (b) — репрезентативный иммуноблот BAT/БЖТ, (c) — репрезентативный иммуноблот GWAT/ГБелЖТ, (d) — значения относительной экспрессии, а.у./у.е.; 20 d, 1.5, 6, 18 m — 20 сут, 1.5, 6, 18 мес; средние значения $\pm$ sd; * — $p < 0.05$; критерий Манна–Уитни.

репродуктивной функции исчезает необходимость поддерживать клетки с UCP1. Присутствие белка UCP1 в ГБелЖТ не у всех животных дает возможность сопоставить в дальнейшем экспрессию UCP1 в этом депо с обменными, поведенческими и другими показателями.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования руководствовались Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Е.И.Е., А.В.Я.), планирование и проведение эксперимента (А.В.Я., И.О.Н.), сбор, обработка, анализ и визуализация данных (А.В.Я.), написание и редактирование текста (Е.И.Е., А.В.Я.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н., доценту кафедры ФЕН НГУ П.Н. Меньшанову за содержательную консультацию по вестерн-блоттингу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kajimura S, Saito M (2014) A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Ann Rev Physiol* 76:225–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170252>
- Gaspar RC, Pauli JR, Shulman GI, Muñoz VR (2021) An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings. *Am J Physiol-Endocrinol Metabol* 320: E488–E495. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00310.2020>
- Rosenwald M, Wolfrum C (2014) The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 3:4–9. <https://doi.org/10.4161/adip.26232>
- Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J (2013) UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell reports* 5:1196–1203. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044>
- Okamatsu-Ogura Y, Fukano K, Tsubota A, Uozumi A, Terao A, Kimura K, Saito M (2013) Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PloS One* 8: e84229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084229>
- Xue B, Rim J-S, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP (2007) Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res* 48:41–51. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600287-JLR200>
- Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2012) Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am J Physiol-Endocrinol Metabol* 302: E19–E31. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011>
- Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ (2014) Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156:304–316. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.021>
- Poher A-L, Veyrat-Durebex C, Altirriba J, Montet X, Colin DJ, Caillon A, Lyautey J, Rohner-Jeanrenaud F (2015) Ectopic UCP1 overexpression in white adipose tissue improves insulin sensitivity in Lou/C rats, a model of obesity resistance. *Diabetes* 64:3700–3712. <https://doi.org/10.2337/db15-0210>
- Lim J, Park HS, Kim J, Jang YJ, Kim J-H, Lee Y, Heo Y (2020) Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related

- markers. *Int J Obesity* 44:697–706.
<https://doi.org/10.1038/s41366-020-0528-4>
11. *Mishra BK, Madhu SV, Aslam M, Agarwal V, Banerjee BD* (2021) Adipose tissue expression of UCP1 and PRDM16 genes and their association with postprandial triglyceride metabolism and glucose intolerance. *Diab Res Clin Pract* 182:109115.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109115>
 12. *Yuko O-O, Saito M* (2021) Brown fat as a regulator of systemic metabolism beyond thermogenesis. *Diabet Metabol J* 45:840–852.
<https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0291>
 13. *Kozak LP, Koza RA, Anunciado-Koza R, Mendoza T, Newman S* (2012) Inherent plasticity of brown adipogenesis in white fat of mice allows for recovery from effects of post-natal malnutrition. *PLoS One* 7: e30392.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030392>
 14. *Liang X, Yang Q, Zhang L, Maricelli JW, Rodgers BD, Zhu M-J, Du M* (2016) Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Sci Rep* 6:34345.
<https://doi.org/10.1038/srep34345>
 15. *Chabowska-Kita A, Trabczynska A, Korytko A, Kaczmarek MM, Kozak LP* (2015) Low ambient temperature during early postnatal development fails to cause a permanent induction of brown adipocytes. *The FASEB J* 29:3238–3252.
<https://doi.org/10.1096/fj.15-271395>
 16. *Bruder J, Fromme T* (2022) Global adipose tissue remodeling during the first month of postnatal life in mice. *Front Endocrinol* 13:849877.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.849877>
 17. *Rogers NH, Landa A, Park S, Smith RG* (2012) Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue. *Aging Cell* 11:1074–1083.
<https://doi.org/10.1111/accel.12010>
 18. *Kodde A, Engels E, Oosting A, Van Limpt K, Van der Beek EM, Keijer J* (2019) Maturation of white adipose tissue function in C57bl/6j mice from weaning to young adulthood. *Front Physiol* 10:836.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00836>
 19. *Sellayah D, Sikder D* (2014) Orexin restores aging-related brown adipose tissue dysfunction in male mice. *Endocrinol* 155:485–501.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1629>
 20. *Pan X-X, Yao K-L, Yang Y-F, Ge Q, Zhang R, Gao P-J, Ruan C-C, Wu F* (2021) Senescent T cell induces brown adipose tissue “whitening” via secreting IFN- γ . *Front Cell Devel Biol* 9:637424.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637424>
 21. *Nedergaard J, Cannon B* (2013) UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids* 1831:943–949.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.009>
 22. *Shin W, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Tsubota A, Nio-Kobayashi J, Kimura K* (2017) Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice. *Obesity* 25:417–423.
<https://doi.org/10.1002/oby.21727>
 23. *Berry DC, Jiang Y, Arpke RW, Close EL, Uchida A, Reading D, Berglund ED, Kyba M, Graff JM* (2017) Cellular aging contributes to failure of cold-induced beige adipocyte formation in old mice and humans. *Cell Metabol* 25:166–181.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.023>
 24. *Sheng Y, Xia F, Chen L, Lv Y, Lv S, Yu J, Liu J, Ding G* (2021) Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to calorie restriction during aging. *J Gerontol: Ser A* 76:393–399.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glaa070>
 25. *Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng Y-H* (2013) Brown-fat paucity due to impaired BMP signaling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495:379–383.
<https://doi.org/10.1038/nature11943>
 26. *Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
 27. *Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK* (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252:1102–1106.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75212-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75212-0)
 28. *Negron SG, Ercan-Sencicek AG, Freed J, Walters M, Lin Z* (2020) Both proliferation and lipogenesis of brown adipocytes contribute to postnatal brown adipose tissue growth in mice. *Sci Rep* 10:1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77362-x>
 29. *Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S* (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol-Endocrinol Metabol* 298: E1244–E1253.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.200>

UNCOUPLING PROTEIN UCP1 EXPRESSION DYNAMICS IN ADIPOSE TISSUES OF THE OUTBRED ICR MICE IN POSTNATAL ONTOGENESIS

A. V. Yakunenko^{a, #}, E. I. Elsukova^a, and I. O. Natochy^a

^aKrasnoyarsk state pedagogical university named after V.P. Astafiev, Krasnoyarsk, Russia

[#]e-mail: avy0905@yandex.ru

Uncoupling protein (UCP1) uncouples mitochondrial respiration from ATP synthesis, resulting in heat production in brown and beige adipocytes. The presence of adipocytes with UCP1 expression in fat depots has been shown to promote metabolic health and provide protection against metabolic disorders. It stimulates interest in

studying the age dynamics of UCP1 expression. There are few data available, mainly obtained on the C57Bl/6J mouse line predisposed to obesity and cover either early or late ontogenesis. In our study, for the first time, the expression of the UCP1 protein in the adipose tissues of male ICR mice was studied from the weaning to old age. Interscapular brown adipose tissue (BAT), inguinal and perigonadal white adipose tissue (IWAT and GWAT) of 20-day, 1.5, 6, 18 months mice were collected. UCP1 levels were detected by western-blotting. IWAT UCP1 expression decreased by 2 times between 20 days and 1.5 months. No UCP1 bands on blots from mice older than 1.5 months were observed. In gonadal depot UCP1 was detected only in 30% of the samples from 1.5- and 6-months old mice, and UCP1 expression level was ten times lower in compare to inguinal depot. No statistically significant changes in UCP1 protein expression were detected in brown adipose tissue. The physiological role of UCP1-expressing cells in GWAT is discussed, as well as a possible relationship between the timing and rate of UCP1 expression decrease during the growth and maturation of reproductive function with the activation of lipogenesis in inguinal adipose tissue.

Keywords: uncoupling protein, relative expression, age dynamics, brown and white adipose tissues

АДАПТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПУЛОВ АМИНОКИСЛОТ В МИОКАРДЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *UROCITELLUS UNDULATUS* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГИБЕРНАЦИИ

© 2023 г. М. В. Каранова^{1,*}, Н. М. Захарова¹

¹Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пузино, Россия

*e-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2023 г.

После доработки 23.05.2023 г.

Принята к публикации 26.05.2023 г.

Состояние гибернации характеризуется повышенной устойчивостью к воздействию длительного глубокого охлаждения, гипоксии, отсутствию пищи и воды. В то же время, перестройка адаптационных механизмов животных при низких температурах даже на непродолжительное время вызывает значительные изменения метаболизма, отражающиеся в паттерне аминокислот. Изменение метаболизма свободных аминокислот миокарда во время гибернации практически не изучалось, но представление о нем необходимо для понимания механизмов гибернационного состояния, актуального для клинической медицины. В связи с этим, задача данной работы состояла в изучении изменения состава свободных аминокислот миокарда суслика *U. undulatus* на разных стадиях зимней спячки. Выявлена отрицательная взаимозависимость пулов глутаминовой кислоты и аланина на разных стадиях оцепенения. Снижение уровня глутаминовой кислоты по сравнению с летним контролем (5.08 ± 0.44 мкмоль/г сырой массы) отмечалось в начале баута спячки, продолжалось при длительном оцепенении (до 1.57 ± 0.14 мкмоль/г) и сопровождалось соответствующим увеличением пула аланина. Во время зимнего пробуждения пул глутаминовой кислоты возрастал выше летнего уровня; пул аланина падал ниже летнего, но их суммарный уровень не изменялся. Пулы аспарагиновой кислоты и глицина снижались параллельно с уменьшением пулов глутамата и аспартата, но во время зимнего пробуждения глицин даже не обнаруживался. Учитывая участие глутаминовой кислоты и аспартата в анаплеротических реакциях цикла Кребса и реципрокную связь глутаминовой кислоты и аланина, делается вывод, что изменение содержания этих метаболитов на разных стадиях баутов связано с постепенным переходом аэробного гликолиза (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование) на анаэробный, а во время эутермии, напротив, — с возвращением к аэробному.

Ключевые слова: гибернация, бауты, якутский суслик, миокард, аминокислоты, энергетический метаболизм

DOI: 10.31857/S0044452923040034, **EDN:** OTXJCS

ВВЕДЕНИЕ

Спячка гетеротермных млекопитающих (зимняя спячка, оцепенение, торпидное состояние) — это адаптивное снижение скорости метаболизма и расхода энергии до минимального уровня. Адаптация к зимней спячке выработана в ходе эволюции для выживания в периоды нехватки пищи и в неблагоприятных условиях окружающей среды, когда температура тела животных во время оцепенения падает до очень низких положительных температур, опускаясь даже ниже 0°C, когда потребление кислорода снижается более чем на порядок, скорость метаболизма падает до 1–2% от нормальных значений, а расход энергии снижается на 80–90% [1, 2]. Для проталкивания медленно теку-

щей при низкой температуре крови сердечной мышце необходимы большие усилия, поэтому вместе с увеличением силы сокращения происходит ее гипертрофия, а ее окислительная способность повышается [3].

Основные энергетические потребности сердца млекопитающих при нормальной температуре достигаются за счет аэробных процессов окислительного фосфорилирования, включающих цикл Кребса и дыхательную цепь переноса электронов [4–6]. В миокарде млекопитающих в норме в процессе аэробного окисления, в присутствии кислорода, основным энергетическим субстратом являются кетоновые тела жирных кислот. Продукт их метаболизма, ацетил-КоА, поступает в ЦТК, участни-

ком которого является и глутаминовая кислота, вступающая для пополнения α -кетоглутаровой кислоты в анаплеротическую реакцию через дезаминирование, а также анаплеротическая аспарагиновая кислота, которая превращается в важнейший ключевой субстрат ЦТК, оксалоацетат [5]. Важную роль в другом энергетическом процессе, анаэробном гликолизе, играет аланин, который наиболее активно образуется в отсутствие кислорода, приходя на смену окислительному фосфорилированию.

Стабильный баланс аминокислот во взрослом организме создает нормальный метаболический фон в тканях и органах, определяющий адаптационные возможности организма и их регуляцию [7–9]. Изменение соотношения аминокислот этого метаболического фона связано со значительными перестройками адаптационных механизмов зимне спящих животных, однако нам не удалось найти ни одной работы, посвященной изучению изменения паттерна свободных аминокислот в сердце зимне спящих во время гипометаболического состояния. В то же время представление об изменении содержания свободных аминокислот, отражающем фундаментальные события адаптации сердца во время гибернации, могло бы инициировать появление новых идей для дальнейших исследований в этом направлении, способствовать решению определенных задач в клинике сердечных патологий, созданию методов хирургии сердца при более низких, чем используемых в настоящий момент, температурах, созданию более эффективных кардиопротективных растворов. Популярным способом защиты миокарда во время операции на сегодняшний день является снижение температуры, на короткое время продлевающей период ишемии без существенных последствий. Более глубокая гипотермия позволяла бы отключать сердце от кровообращения на более длительный период, и понимание биохимических механизмов, лежащих в основе естественного гипометаболического состояния во время гибернации зимне спящих, является условием реализации этого перспективного метода.

В настоящее время получены интересные результаты изучения тонких механизмов дифференциальной экспрессии генов гибернирующих животных [10–13], однако динамика изменения тех или иных метаболитов, в зависимости от стадии гибернации, исследована весьма не полно. В частности, не изучались такие важные, многозначительные показатели, как изменение состава свободных аминокислот в миокарде зимне спящих животных во время различных стадий гипометаболического состояния, несмотря на то, что эти изменения влияют и на биосинтез, и на поддержание электрической проводимости, и на стабильность сердца во время его дисфункции.

Цель данного, впервые проводимого исследования: выявление особенностей адаптационных изменений состава свободных аминокислот в миокарде зимне спящих сусликов в раннем торпидном, глубоком торпидном и зимнем активном состоянии (межбуйном пробуждении, эутермии) в сравнении с летними активными животными.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовались взрослые самцы длиннохвостых сусликов (*U. undulatus*), с массой тела 613 ± 60 г. Животных доставляли из Якутии в г. Пушкино Московской области в конце августа. До конца октября суслики содержались индивидуально в специально оборудованном виварии при естественной для Московского региона фотопериодичности с достаточным запасом пищи и воды. В период спячки животные находились в темном помещении при температуре окружающей среды от 0° до $+2^\circ\text{C}$. Для мониторинга буйтов в гибернационный период часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ($20 \times 20 \times 25$ см), на дно которых был установлен термистор (чувствительность, 0.2°C). Во время спячки температура подстилки достигала $1\text{--}4^\circ\text{C}$, тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до 14°C .

Суслики были разделены на 4 группы:

1-я группа ($n = 6$) – перезимовывавшие в виварии Института бодрствующие активные животные в летний период (июнь), контроль;

2-я группа ($n = 6$) – торпор, 2–3 дня (начало спячки), при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C ;

3-я группа ($n = 6$) – торпор, 9–10 дней, при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C ;

4-я группа ($n = 5$) – спонтанно пробудившиеся зимой активные животные, температура тела 37.6°C .

Перед декапитацией торпидных животных взвешивали и измеряли ректальную температуру, после декапитации измеряли температуру в области сердца. После извлечения миокарда биоматериал гомогенизировали в 0.5 н холодной хлорной кислоте ($1:9$) и центрифугировали при температуре 4°C 20 мин при 20000 об/мин на центрифуге Centricon (США). Супернатант нейтрализовали 2 н КОН и снова центрифугировали. Конечный супернатант хранили для дальнейшего анализа в Криобанке ИБК РАН.

Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биоэтике (Институт биофизики клетки РАН – Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Протокол 3/092021 от 08.09.2021 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Операции для активных сусликов проводились под наркозом с Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, i.m.); были предприняты

Таблица 1. Пулы свободных аминокислот и таурина в миокарде длиннохвостого суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации (мкмоль/г сырой массы)

Аминокислота	Контроль (лето)	Торпор I (начало)	Торпор II (конец)	Зимняя активность
Таурин	7.31 ± 0.65	8.74 ± 0.67 [#]	9.64 ± 0.65	11.21 ± 0.82
Аспарагиновая кислота	1.11 ± 0.09	0.54 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.78 ± 0.06
Треонин	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Глутамин	3.54 ± 0.30	2.45 ± 0.21	1.88 ± 0.15	3.33 ± 0.28
Серин	0.26 ± 0.03	0.22 ± 0.03 [#]	0.49 ± 0.06	0.45 ± 0.03
Глутаминовая кислота	5.08 ± 0.44	3.38 ± 0.28	1.57 ± 0.14	6.12 ± 0.45
Глицин	0.45 ± 0.03	0.08 ± <0.01	0.06 ± <0.01	не обн.
Аланин	1.78 ± 0.15	3.26 ± 0.22	5.47 ± 0.42	0.53 ± 0.03
Цистин	0.28 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.01
Тирозин	0.13 ± 0.02	0.10 ± 0.02 [#]	0.15 ± 0.02 [#]	0.21 ± 0.02
Гистидин	1.00 ± 0.10	0.06 ± 0.006	0.84 ± 0.08 [#]	0.85 ± 0.07 [#]
Лизин	0.61 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.89 ± 0.08	0.10 ± 0.01
ГАМК	следы	следы	следы	следы
Аргинин	0.41 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.02

Примечание. Контроль — летние активные животные в июне ($n = 6$); торпор (начало спячки) — торпидные животные ($n = 6$), 2–3 дня от начала спячки; торпор (конец спячки), 9–10 дней спячки, ($n = 6$); Зимняя активность — кратковременное пробуждение ($n = 5$). Ректальная температура спящих сусликов от 0.2 до 0.4°C; температура сердца от +1° до +2.5°C. Температура сердца активных зимних животных (эутермия) 37.6°C. ГАМК — гамма-аминомасляная кислота. Значения представлены как $M \pm SD$.
[#]Различия по сравнению с контрольной группой (лето) статистически значимы при $p < 0.05$.

все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

Состав и количество свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [14] на модульном хроматографе Infinity LC–1260 (Agilent 1260, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трехступенчатым градиентом натрий-цитратного буфера: № 1 — 0.3 н, рН 2.98, № 2 — 0.4 н, рН 3.81, № 3 — 0.45 н, рН 9.97. Диапазон температуры от 55° до 74°C. Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послестолбчатая модификация аминокислот выполнялась с нингидрином; интенсивность окрашивания измеряли при 570 нм. Для каждой серии экспериментов делали хроматограмму стандартной смеси аминокислот; концентрация каждой из вносимых аминокислот 2.5 нмоль. Содержание свободных аминокислот выражали в виде мкмоль/г влажной массы. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 7 (GraphPad Software Inc., США). Тест Манна–Уитни *U* использовался для сравнения независимых измерений. Был проведен корреляционный анализ, оценивающий взаимосвязь между показателями содержания глутамата и аланина. Данные выражали как среднее значение параллельных данных,

собранных в ходе трех выборочных обследований; для каждого образца использовано два животных ($n = 6$). Данные представлены значениями среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные об изменении содержания свободных аминокислот в зависимости от этапа гибернации представлены в табл. 1; количественное соотношение взаимосвязи свободной глутаминовой кислоты и аланина на разных фазах гипометаболического состояния в сравнении с летним периодом — на рис. 1. Постоянство суммы глутамата и аланина в сердце гомеотермных млекопитающих, их тесная метаболическая взаимосвязь являются, вероятно, универсальным свойством сердца млекопитающих и не нарушаются даже в условиях ишемии миокарда [4, 9]. Существенное дополнение, в связи с этим, добавляют и наши данные о соотношении глутамата и аланина в миокарде зимоспящих сусликов на разных стадиях гибернации: при неизменной отрицательной корреляции динамики пулов аланина и глутамата (коэффициент корреляции составляет -0.96 ± 0.02) сумма их концентраций остается практически постоянной и одинаковой (табл. 1).

Особенностью миокарда в летний период (контроль) является почти трехкратное превышение уровня глутаминовой кислоты относительно аланина, 5.08 ± 0.44 и 1.78 ± 0.15 мкмоль/г сырой ткани (рис. 1). В начале зимней спячки (2-я колонка

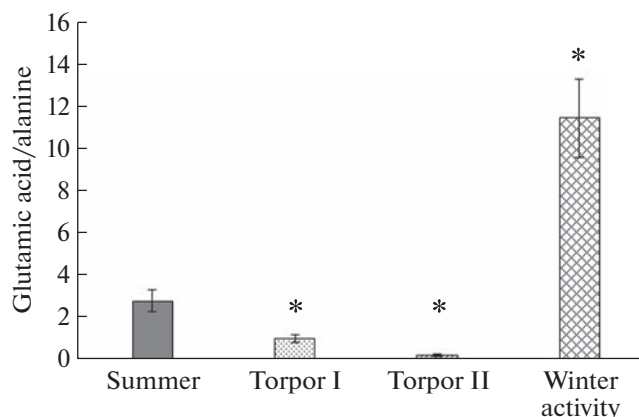


Рис. 1. Количественное соотношение глутаминовой кислоты и аланина (глутамат/аланин) в миокарде длиннохвостого суслика *U. undulatus* в период гибернации в сравнении с летним периодом (контроль) (см. табл. 1). Значения представлены как $M \pm SD$, $n = 6$; *Различия по сравнению с контрольной группой (лето) статистически значимы при $p < 0.05$.

табл., торпор I) пулы глутамата и аланина уравниваются за счет уменьшения глутамата и увеличения аланина (3.38 ± 0.28 и 3.26 ± 0.22 мкмоль/г). В середине января (торпор II, конец), т.е. после нескольких межбаутных пробуждений (эутермий) и последующего состояния глубокой торпидности в течение 9–10 дней, уровень глутамата падает еще больше, до 1.57 ± 0.14 мкмоль/г, а аланина, напротив, увеличивается почти на такую же величину, составив 5.47 ± 0.42 мкмоль/г, и превосходя пул глутамата в 3.48 раза (рис. 1).

Межбаутное пробуждение, или эутермия (в табл. 1 обозначена как “зимняя активность”), отличается высокой интенсивностью метаболизма в течение короткого срока и связано с наибольшими затратами энергии по сравнению с торпидным состоянием. Температура тела во время эутермии за несколько часов поднимается до $36\text{--}37^\circ\text{C}$, количество сокращений сердца достигает 350–400 ударов в минуту, цикл Кребса и дыхательная цепь активируются [1, 2]. В наших опытах во время эутермии (конец февраля) происходит противоположное и очень резкое изменение соотношения пулов глутамата к аланину. Интенсивность метаболизма в этой фазе отражается в том, что количество глутамата даже слегка превышает летнее, нормотермическое, достигая 6.12 ± 0.45 мкмоль/г (табл. 1, рис. 1). Уровень аланина, соответственно, понижается и становится ниже летнего (0.53 ± 0.03 мкмоль/г), в 11.5 раза меньше уровня глутамата. Особенно замечательно, что сумма концентраций обеих аминокислот даже во время эутермии, практически не изменяется, оставаясь не зависимой от температуры тела и длительности торпора.

Существенным показателем ответа на гипометаболическое состояние большинства представ-

ленных в табл. 1 протеиногенных аминокислот, за исключением аланина, является снижение их количества, т.е. уменьшение пулов. Изменение пула аспарагиновой кислоты осуществляется параллельно с изменением уровня глутаминовой, но не как отрицательное соотношение их концентраций, а как положительное. В летний период уровень аспартата в 4.6 раза ниже уровня глутамата. После длительного оцепенения в середине января пул аспарагиновой кислоты уменьшается в 3 раза по сравнению с летним и составляет всего лишь 0.35 ± 0.03 мкмоль/г, при этом соотношение с уровнем глутаминовой кислоты не изменяется (табл. 1). Это снижение может быть вызвано транспортом аспарагиновой кислоты в печень для глюконеогенеза, но, в принципе, возможны и другие реакции с ее участием, однако ее превращение в аспарагин в условиях гибернации кажется менее вероятным вследствие большей сложности и энергоемкости реакции, требующей участия АТФ.

Во время эутермии пул аспарагиновой кислоты возрастает, но в меньшей степени, чем глутамат, и не достигает летнего уровня; теперь он в 7.8 раза меньше уровня глутамата (летом — в 4.6). Поскольку аспарагиновая кислота участвует в анаплеротической реакции превращения в оксалоацетат в цикле трикарбоновых кислот, следует принимать во внимание роль в этом сложном процессе малат/аспартатного челнока, переносящего субстраты из цитозоля через мембрану в митохондрии [15]. В то же время функционирование этого челночного механизма в торпидном состоянии (сопровождающимся изменением состава мембран при низкой температуре), возможно, несколько отличается от механизма, действующего при нормальной температуре.

Вызывает большой интерес динамика изменения концентрации глицина, резко падающая в самом начале торпидного состояния (торпор I), от 0.45 до 0.08 мкмоль/г, и сохраняющая то же самое мизерное количество (0.06 мкмоль/г) в январском торпоре (торпор II, табл. 1). Особенно удивительно, что во время межбаутного пробуждения (зимняя активность, табл. 1) глицин вообще не обнаруживается. Известно, что межбаутное пробуждение сопровождается окислительным стрессом, вызванным огромным потреблением кислорода в этом статусе. В таких условиях антиоксидантная защита приобретает особое значение, и исчезновение глицина может быть обусловлено его участием в антиоксидантном механизме, обеспечивающем “безболезненный”, без окислительных повреждений тканей, переход от оцепенения к пробуждению, который сопровождается множеством реакций синтеза протеинов и метаболитов. С другой стороны, глицин является глюкостатической аминокислотой, и падение его уровня может быть вызвано превращением в глюкозу в процессе глюконеогенеза. Однако, имея в виду достаточно большое ко-

личество глюकोпластичных аминокислот и предполагаемое отсутствие их дефицита, более востребованным в данных условиях кажется участие глицина в синтезе крайне необходимого в условиях гибернации антиоксидантного трипептида глутатиона, осуществляемого из глицина, глутаминовой кислоты и цистеина.

Аналогично можно рассматривать и менее значительное, чем у глицина, снижение уровня цистина (табл. 1), который образуется во время хроматографической процедуры анализа аминокислот, вследствие соединения двух молекул цистеина. Цистеин, также являясь предшественником глутатиона и сам обладая антиоксидантными свойствами, участвует и в биосинтезе кофермента А — участника переноса ацильных групп при синтезе и окислении жирных кислот. Вероятно, цистеину отведена не единственная роль в сложных взаимодействиях свободных аминокислот в цитоплазме и компартментах миокарда; так же, как и глицин, он может быть задействован в синтезе глутатиона или других метаболитов.

Вторичный метаболит, непротеиногенная сульфаминокислота таурин, перед зимним наступлением холода в органах пойкилотермных животных, — особенно в скелетных мышцах рыб-телеостов, — многократно увеличивает свое количество [16]. В миокарде суслика уровень таурина на всех стадиях — и летом, и в гипометаболическом состоянии (при ректальной температуре в пределах 0.2–0.4°C) выше, чем у других аминокислот, и на протяжении трех месяцев гипобиоза постепенно и понемногу увеличивается (табл. 1). В летний период таурин составляет 7.31 мкмоль/г; у спящих сусликов (торпор I, декабрь, табл. 1) он повышается до 8.74 ± 0.67 мкмоль/г и продолжает немного, но достоверно, повышаться, достигнув у активных зимних (эутермия, конец февраля) 11.21 ± 0.82 мкмоль/г, т.е. в сравнении с летним периодом возрастает в 1.53 раза. Этот факт представляет особый интерес, так как у пойкилотермных животных пул метаболически малоактивного таурина обычно увеличивается очень медленно на протяжении нескольких месяцев и в процессе сезонного понижения температуры, достигая максимума при положительных температурах, близких к нулю [16]. Более того, в условиях холодового шока и наблюдения в течение четырех суток, таурин скелетных мышц прудовых рыб не увеличивает свой пул [17]. Таким образом, медленное увеличение количества таурина в миокарде сусликов в процессе зимней спячки подтверждает инертность метаболизма этой сульфаминокислоты, но, с другой стороны, обозначает его какую-то роль (вероятно, протекторную) в механизмах гибернации миокарда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Энергетический метаболизм поперечнополосатых мышц миокарда гибернирующих и гомойотермных животных имеет преимущественно аэробный характер: около 70–85% энергии образуется с участием кислорода в процессе β -окисления жирных кислот, 15–30% — за счет анаэробного гликолиза или глюконеогенеза, в котором участвуют различные субстраты, включая глюкогенные аминокислоты, лактат, пируват, кетокислоты, глицерол [18, 19]. Различные жиры, накопленные к концу лета, на протяжении зимней спячки расходуются неодинаково, и метаболизм резко замедляется из-за подавления как аэробных процессов (цикла Кребса и окислительного фосфорилирования), так и анаэробного гликолиза [18, 19]. К снижению скорости гликолиза приводит фосфорилирование протеинкиназами пируваткиназы и фосфофруктокиназы, ключевого фермента гликолиза, лимитирующего его скорость в зависимости от концентрации АТФ [20]. Подавление окисления в цикле Кребса, имеющем центральное значение не только в производстве энергии, но и в биосинтезе множества метаболитов, также достигается за счет ингибирования пируватдегидрогеназы с помощью фосфорилирования протеинкиназами [20]. Жирные кислоты, образующиеся за счет липолиза триглицеридов, — главный источник энергии во время оцепенения на начальных стадиях баута, и их использование в этот период резко возрастает [18, 19, 21]. В результате β -окисления жирных кислот в митохондриях образуется ацетилкоэнзим А, с которого начинается цикл Кребса.

Суть этих фактов согласуется с нашими данными, поскольку на разных стадиях гибернации и при межбаутном пробуждении существенно изменяется пул глутаминовой кислоты, участника анаплеротической реакции превращения в α -кетоглутарат для цикла Кребса путем обратимого дезаминирования при участии глутаматдегидрогеназы. Самый богатый пул глутамата у летнего суслика, 5.08 мкмоль/г; пул аланина в то же время почти в три раза меньше, 1.78 ± 0.15 мкмоль/г (табл. 1). Эта пропорция отражает значительное преобладание на данном этапе аэробных процессов, происходящих в митохондриях, и, соответственно, достаточно высокое содержание АТФ.

В условиях гипоксии в период гибернации происходит ослабление метаболизма миокарда. Для окисления жирных кислот, поступающих в митохондрии, кислорода не хватает, в связи с чем в кардиомиоцитах накапливаются недоокисленные активные формы жирных кислот в виде ацилкарнитина и ацилкоэнзима А, разрушающие клеточные мембраны и блокирующие доставку АТФ к органеллам клетки. Количество жирных кислот в плазме крови, скелетных мышцах, сердце и печени якутских сусликов увеличивается в сезон гиберна-

ции и растет при выходе из оцепенения [19, 20]. Резонно предположить, что уменьшение доставки АТФ находит отражение и в постепенном снижении количества анаэробных глутамата и аспартата (табл. 1).

Помимо сказанного, в процессе длительного оцепенения происходит переход от окисления жирных кислот и кетонных тел, — соответственно, от цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, — к более экономичному анаэробному окислению глюкозы. Вероятно, именно этот переход и вызывает, в зависимости от длительности торпора, соответствующие изменения соотношения глутаминовой кислоты и аланина в сторону повышения аланина и эквивалентного уменьшения глутамата (табл. 1; рис. 1). Таким образом, соотношение количества глутамата и аланина в миокарде гибернаторов может быть свидетельством преобладания или аэробного окисления (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование), или, соответственно, анаэробного гликолиза.

Ярко выраженные на стадиях гибернации reciprocal отношения между уровнем аланина и глутаминовой кислоты и неизменность их суммарного количества обеспечиваются изоферментом обратимо действующей аланинаминотрансферазы (АЛТ 1), переносящей аминокетонную группу от глутамата в пируват при участии пиридоксальфосфата, превращая в цитоплазме пируват в аланин. В митохондриях в обратном направлении действует АЛТ 2 [22]. Свойства АЛТ в разных температурных режимах в мозге гибернирующих сусликов изучены Эмирбековым и Мукайловым, определившими, что активность АЛТ при низких температурах выше, чем при нормальных [23]. При низких температурах функционирует, вероятно, изофермент АЛТ [22].

Образование аланина необходимо не только для нейтрализации пирувата, создающего опасное закисление среды, но и для последующего участия в глюконеогенезе. Для этого аланин выделяется в кровь и транспортируется в печень, где захватывается гепатоцитами и где высокая активность АЛТ 1 и, наряду с другими глюकोпластическими аминокислотами, значительное количество аланина.

Может ли повышение уровня аланина в миокарде (табл. 1) являться не результатом процессов, происходящих в энергетическом метаболизме, а следствием длительного голодания гибернирующих животных? Литературные данные предлагают целесообразность отрицательного ответа на этот вопрос, сообщая о балансе синтеза и распада белков, существующего в гипертрофированном миокарде, о том, например, что масса сердечной мышцы сусликов *Spermophilus lateralis* до зимовки и после шести месяцев спячки увеличивается на 21% [3]. Помимо этого, установлено, что фракция полисом уменьшается на стадии торпора и снова уве-

личивается при пробуждении, соответствуя активации биосинтеза белка в период выхода животного из спячки [24]. Целый ряд механизмов вносит вклад в устойчивость гибернаторов к мышечной атрофии, включая повышенный уровень антиоксидантов [25], пониженный уровень миостатина, регуляцию транскрипционных факторов, связанных с мышечной активностью [26, 27]. Таким образом, несмотря на невероятно низкий уровень метаболизма в течение оцепенения, экспрессия некоторых генов и синтез белков усиливаются, обеспечивая в каждый конкретный момент потребности организма [27].

Первичная причина снижения уровня глутамата при увеличении длительности торпора является, на наш взгляд, отражением цепи следующих событий: накопление кетонных и недоокисленных жирных кислот в виде ацилкарнитина и ацилкоэнзима А, блокирующих доставку АТФ к органеллам клетки; последующий за этим событием переход к гликолизу; накопление пирувата и его утилизация при помощи трансаминирования в аланин из “отработавшего” глутамата. Однако изменение пулов глутаминовой кислоты от снижения до возрастания на разных стадиях гибернации (табл. 1) отражает, несомненно, не только ее участие в поддержании уровня α -кетоглутарата для цикла Кребса. В сердечной мышце существует большой внутриклеточный пул глутамата — и, в меньшей степени, аспартата, — которые в нормальных условиях определяют равновесие метаболического фона [5, 7, 8]. Эти метаболиты, согласованно участвуя в важнейших анаэробных реакциях цикла Кребса, поддерживают необходимое количество субстратов; при этом между уровнем АТФ, аспартатом и глутаматом существует положительная метаболическая взаимосвязь [5, 9]. Однако, помимо энергетической роли, у этих аминокислот при нормальных температурах существует множество других функций [7, 8]. В наших опытах снижение уровня глутаминовой кислоты сопровождается снижением уровня глутамата; следовательно, ее убыль не связана с синтезом глутамата. Весьма активная в метаболизме глутаминовая кислота может участвовать во множестве других реакций, включая синтез белка, синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, синтез глутатиона и т.д. Она глюकोпластична, и не только сама превращается в глюкозу, но и ускоряет ее образование из других веществ в печени и почках (глюконеогенез), по своей способности к стимуляции глюконеогенеза уступая лишь аланину. В состоянии гибернации, возможно, реализуются не все реакции или же происходит изменение степени их участия в том или ином метаболическом процессе.

Не удивительно, что снижение уровня глутаминовой кислоты по мере увеличения длительности торпора коррелирует со снижением уровня аспарагиновой кислоты (табл. 1). Обе аминокислоты яв-

ляются участницами ключевых анаплеротических реакций и, в связи с этим, действуют солидарно. Глутамат при участии аланинаминотрансферазы отдает аминогруппу пирувату, превращаясь в альфа-кетоглутаровую кислоту, а аспартат в результате трансаминирования превращается в оксалоацетат. Так как эти ключевые реакции взаимосвязаны в цикле Кребса, уменьшение пула оксалоацетата (следовательно, и аспартата) влечет уменьшение пула альфа-кетоглутарата (следовательно, и глутамата). Обе реакции обратимы, и наличие определенного уровня этих дикарбоновых аминокислот является маркером удовлетворительного состояния миокарда.

Как следует из результатов нашей предыдущей работы, метаболизм аминокислот в скелетных поперечнополосатых мышцах гибернирующих сусликов в сравнении с миокардом отличается кардинально [28]. В отличие от миокарда, во время зимней спячки минимальные энергетические затраты скелетных мышц обеспечивает анаэробный гликолиз и, вероятно, по этой причине изменение глутамата, аланина и глицина, активно изменяющихся в миокарде, на соответствующих баутах мало заметны. В то же время аккумуляция пула аспарагиновой кислоты в мышцах выглядит феноменальной: в начале баута ее пул увеличивается более чем в 20 раз, а в конце баута — более чем в 40. В количестве, сопоставимом с пулом аспартата, на этих же стадиях торпора в скелетных мышцах аккумулируется цистин (0.45 и 0.60 мкмоль/г в начале и в конце торпора), не выявляемый в мышцах контрольных животных и имеющий тенденцию на снижение в миокарде (табл. 1). Помимо этих различий, в скелетных мышцах сусликов, в отличие от миокарда (табл. 1), в период зимней спячки пул таурина практически не изменяется [29]. Этот факт может свидетельствовать о дополнительной востребованности таурина в функционирующем, хотя и малоактивном, сердце. Таурин, не имея четко определенной функции, выполняет множество разнообразных функций: модулирует в сердце транспорт кальция, продукцию цитокинов, эйкозаноидов и т.д.; его истощение связано с развитием кардиомиопатии [29]. Между количеством таурина и частотой сердечных сокращений существует корреляция, причем самое высокое содержание таурина обнаружено у видов с самой высокой частотой сердечных сокращений [29]. Радикальные различия механизмов адаптации к экстремальному состоянию зимней спячки скелетных и сердечных мышц неизбежны и вызваны не только различием их морфологии, но и функции.

Кажется удивительным, но нет принципиальных различий метаболизма глутамата, аспартата и аланина в мозге хомяка [30] по сравнению с сердцем суслика во время торпора и эутермии (табл. 1). По данным Осборна и Хашимото [30] в тканях переднего и среднего мозга хомяков *Mesocricetus aura-*

tus оцепенение, длившееся от 29 до 62 ч при +5°C, было, как и в наших экспериментах, связано с более низким, по сравнению с эутермией, содержанием аспартата и глутамата и с соответственно более высоким уровнем аланина. Напрашивается вывод, что такое сходство обусловлено равноценными потребностями в количестве АТФ функционирующего миокарда и мозга, — несмотря на “мнимое” оцепенение, сохраняющее его активность.

Изучение ответов аминокислот миокарда зимнеспящих сусликов *U. undulatus* на разных стадиях гибернации выявило взаимосогласованные и противоположно направленные изменения пулов глутаминовой кислоты и аланина на всех стадиях гибернации, включая эутермию. Объяснение этих реципрокных и ярко выраженных изменений дается с позиций соответствующего переключения энергетических путей: с аэробного гликолиза на анаэробный и, во время эутермии, напротив, с анаэробного гликолиза на аэробный (цикл Кребса и окислительное фосфорилирование). Резкое падение содержания глицина на всех стадиях гибернации, — возможно, определяющее специфику метаболизма гибернации, — предполагает его исключительно активное участие в процессах адаптации и, возможно, этот факт следует учитывать при составлении кардиоплегических растворов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и были одобрены Комиссией по биоэтике (Институт биофизики клетки РАН — Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Протокол 3/092021 от 08.09.2021 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа выполнена в рамках Государственного задания Института биофизики клеток РАН “Механизмы естественного и искусственного гипобиоза”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.В.К.), сбор данных (М.В.К.), обработка данных (М.В.К.,

Н.М.З.), написание и редактирование манускрипта (М.В.К., Н.М.З.).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают искреннюю благодарность А.С. Аверину, который выделял биоматериал, использованный в этом исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carey HV, Andrews MT, Martin SL (2003) Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiol Rev* 83: 1153–1181.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2003>
2. Geiser F (2004) Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66: 239–274.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>
3. Wickler SJ, Hoyt DF, Breukelen F (1991) Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 261: 1214–1217.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu>
4. Pisarenko O, Solomatina E, Ivanov V, Studneva I, Kapelko V, Smirnov V (1985) On the mechanism of enhanced ATP formation in hypoxic myocardium caused by glutamic acid. *Basic Res Cardio* 180(2): 126–134.
<https://doi.org/10.1007/BF01910459>
5. Arsenian M (1998) Potential cardiovascular applications of glutamate, aspartate, and other amino acids. *Clin Cardiol* 21(9): 620–624.
<https://doi.org/10.1002/clc.4960210904>
6. Stanley W, Recchia F, Lopaschuk G (2005) Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093–1129.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00006.2004>
7. Taegtmeyer H, Harinstein ME, Gheorghiadu M (2008) More than bricks and mortar: Comments on protein and amino acid metabolism in the heart. *Am J Cardiol* 101(11): S3–S7.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.064>
8. Bröer S, Bröer A (2017) Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. *Biochem J* 474(12): 1935–1963.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160822>
9. Pisarenko O (1996) Mechanisms of myocardial protection by amino acids: Facts and hypotheses. *Clin Exp Pharm Physiol* 23: 627–633.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb01748.x>
10. Vermillion KL, Anderson KJ, Hampton M, Andrews MT (2015) Gene expression changes controlling distinct adaptations in the heart and skeletal muscle of a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 47 (8): 58–74.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00108.2014>
11. Fahlman A, Storey J, Storey K (2000) Gene Up-Regulation in Heart during Mammalian Hibernation. *Cryobiology* 40: 332–342.
<https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2254>
12. Tessier S, Storey K (2012) Myocyte enhancer factor-2 and cardiac muscle gene expression during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. *Gene* 501: 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.004>
13. Zhang Y, Aguilar OA, Storey KB (2016) Transcriptional activation of muscle atrophy promotes cardiac muscle remodeling during mammalian hibernation. *Peer J* 4: e2317.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2317>
14. Spackman D, Stein W, Moore S (1958) Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal Chem* 30: 1190–1206.
15. Ralphe JC, Bedel KI, Segar JL, Scholz TD (2005) Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and eeat1 protein expression in hyper- and hypothyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5): H2521–H2526.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00991.2004>
16. Karanova M (2018) Impact of Seasonal Temperature Decrease and Cold Shock on the Composition of Free Amino Acids and Phosphomonoesters in Various Organs of Amur Sleeper *Perccottus glenii* (Eleotridae). *J Ichthyol* 58 (4): 570–579.
<https://doi.org/10.1134/S0032945218040069>
17. Karanova M (2018) Effects of Cold Shock Responses of Phosphomonoesters and Free Amino Acids in Phospholipid-Rich Organs in the Amur Sleeper *Perccottus glenii*. *Neurosci Behav Physiol* 48(5): 528–533.
<https://doi.org/10.1007/s11055-018-0595-3>
18. Izrailova GR, Khalilov RA, Adieva AA (2014) Modern approaches to the investigation of hypothermia. *Biol Sci* 11 (5): 1046–1059.
19. Andrews M, Russeth K, Drewes L, Henry P-G (2009) Adaptive mechanisms regulate preferred utilization of ketones in the heart and brain of a hibernating mammal during arousal from torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: 383–393.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90795.2008>
20. Storey K (1997) Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. *Comp Biochem Physiol A* 118 (4): 1115–1124.
[https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(97\)00238-7](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(97)00238-7)
21. Suozzi A, Malatesta M, Zancanaro C (2009) Subcellular distribution of key enzymes of lipid metabolism during the euthermia-hibernation arousal cycle. *J Anat* 214 (6): 956–962.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01086.x>
22. Yang R-Z, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong D-W (2009) Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* 49(2): 598–607.
<https://doi.org/10.1002/hep.22657>
23. Эмирбеков ЭЗ, Мукайлов МИ (1971) Глутаминсинтетазная, глутаминазная, аспартат- и аланинаминотрансферазная активность головного мозга сусликов при зимней спячке. *Вопр биохим нерв сист* 1: 8–13. [Emirbekov EZ, Mukailov MI (1971) Glutamine synthetase, glutaminase, aspartate and alanine amino transferase activity of the brain of ground squirrels during hibernation. *Quest biochem nervn syst* 1: 8–13. (In Russ)].

24. Knight JE, Narus EN, Martin SL, Jacobson A, Barnes BM, Boyerm BB (2000) RNA stability and polysome loss in hibernating arctic ground squirrels (*Spermophilus parryi*). Mol Cell Biol 20 (17): 6374–6379.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6374-6379.2000>
25. Allan ME, Storey KB (2012) Expression of NF- κ B and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. Cell Biochem Funct 30: 166–174.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1832>
26. Brooks NE, Myburgh KH, Storey K (2011) Myostatin levels in skeletal muscle of hibernating ground squirrels. J Exp Biol 214 (15): 2522–2527.
<https://doi.org/10.1242/jeb.055764>
27. Eddy SF, Storey KB (2007) p38 MAPK regulation of transcription factor targets in muscle and heart of hibernating bats, *Myotis lucifugus*. Cell Biochem Function 25: 759–765.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1416>
28. Karanova M, Zakharova N (2022) Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocitellus undulatus* during Different Hibernation Stages. Biophysics 67(2): 288–293.
<https://doi.org/10.1134/S0006350922020105>
29. Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, Azuma J (2010) Physiological roles of taurine in heart and muscle. J Biomed Sci 17(S1): S2.
30. Osborne PG, Hashimoto M (2008) Mammalian cerebral metabolism and amino acids neurotransmission during hibernation. J Neurochem 106: 1888–1899.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05543.x>

ADAPTIVE MODIFICATION OF AMINO ACID POOLS IN THE MYOCARDIUM OF THE LONG-TAILED GROUND SQUIRREL *UROCITELLUS UNDULATUS* AT DIFFERENT STAGES OF HIBERNATION

M. V. Karanova^{a,*} and N. M. Zakharova^a

^a*Institute of Cell Biophysics, FRC PSCBR, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

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

The state of hibernation is characterized by increased resistance to the effects of prolonged deep hypothermia, hypoxia, lack of food and water. At the same time, the restructuring of the adaptive mechanisms of animals at low temperatures, even for a short time, causes significant changes in metabolism, reflected in the pattern of amino acids. The change in the metabolism of free myocardial amino acids during hibernation has not yet been studied by anyone, but the idea of it is necessary to understand the mechanisms of the hibernation state, which is relevant for clinical medicine. In this regard, the task of this work was to study the changes in the composition of free amino acids of the myocardium of the ground squirrel *U. undulatus* at different stages of hibernation. A negative interdependence of glutamic acid and alanine pools at different stages of torpor was revealed. The decrease in the level of glutamic acid compared to the summer control ($5.08 \pm 0.44 \mu\text{mole/g}$ wet weight) began in the first, December bout, continued with prolonged torpor (up to $1.57 \pm 0.14 \mu\text{mole/g}$) and was accompanied by a corresponding increase in the alanine pool. During the winter awakening, the glutamic acid pool rose above the summer level; The pool of alanine fell below the summer level, but their total level did not change. The pools of aspartic acid and glycine decreased in parallel with the decrease in pools of glutamate and aspartate, but during the winter awakening, glycine was not even detected. Taking into account the participation of glutamic acid and aspartate in the anaplerotic reactions of the Krebs cycle and the reciprocal relationship of glutamic acid and alanine, it is concluded that the change in the content of these metabolites at different stages of bouts is associated with a gradual transition of aerobic glycolysis (Krebs cycle and oxidative phosphorylation) to anaerobic, and during euthermia, on the contrary, with a return to aerobic.

Keywords: hibernation, bout, ground squirrel, myocardium, amino acids, energy metabolism

РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ ПРИ ОЖИРЕНИИ И ЕЕ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬЮ АЛКИЛРЕЗОРЦИНОЛОВ В КАЛЕ

© 2023 г. А. А. Заболотнева^{1,2,*}, А. Б. Итов^{1,3}, Т. В. Григорьева⁴, И. Ю. Васильев⁴,
С. А. Румянцев^{1,2,5}, А. М. Гапонов⁵, А. В. Шестопалов^{1,2,3}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр Детской гематологии, онкологии и иммунологии
имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁴Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

⁵Центр цифровой и трансляционной биомедицины ООО “Центр молекулярного здоровья”, Москва, Россия

*e-mail: a.zabolotneva@gmail.com

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Тело человека представляет собой суперорганизм, работа которого напрямую зависит от триллионов микробных клеток, населяющих его. Развиваясь вместе с хозяином в процессе эволюции, микробиота формировала фенотипы наших предков. Возникавшие в процессе естественного отбора мутации приводили к совместной эволюционной адаптации организма хозяина и микробных клеток к условиям окружающей среды и повышению приспособленности к этой среде. Состав и метаболическая активность микробиоты кишечника влияют на различные физиологические процессы, а также развитие патологических состояний и дисметаболических расстройств, включая ожирение. Алкилрезорцинолы (АР) — биологически активные полифенольные соединения преимущественно растительного и микробного происхождения, обладающие различными биологическими свойствами, в том числе способностью в высокой степени влиять на метаболизм хозяина и состав его микробиоты. В настоящем исследовании нами было проведено метагеномное секвенирование микробной ДНК, выделенной из 401 образца фекалий детей и взрослых с нормальным индексом массы тела (ИМТ) и с ожирением, а также определено содержание различных гомологов АР в этих образцах. На основе данных высокопроизводительного секвенирования нами была проведена реконструкция метаболического потенциала кишечной микробиоты и оценены корреляции между содержанием различных гомологов АР и представленностью бактериальных генов, кодирующих различные ферменты, заявленные в базе данных генных ортологов Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). На основании полученных результатов нами были отмечены особенности функциональных изменений кишечной микробиоты, наблюдаемые у взрослых и детей при ожирении.

Ключевые слова: алкилрезорцинолы, микробиота кишечника, реконструкция метаболической активности микробиоты, ожирение

DOI: 10.31857/S0044452923040095, **EDN:** YWRZVC

ВВЕДЕНИЕ

Тело человека представляет собой суперорганизм, населенный триллионами микробных клеток, скоординированная работа которых является обязательной и необходимой для жизни человека [1]. Наибольшей плотности популяции микробных клеток достигают в кишечнике, где они вместе образуют сложное сообщество, известное как кишечная микробиота (КМ) [2]. КМ возникает и разви-

вается в период младенчества хозяина и в дальнейшем достигает своей устойчивой взрослой формы [3]. В последние десятилетия мы видим все больше доказательств в пользу того, что эволюция звеньев суперорганизма “хозяин-микробиота” осуществлялась совместно. Развиваясь вместе с хозяином в процессе эволюции, микробиота формировала фенотипы наших предков [4]. Возникавшие в процессе естественного отбора мутации приводили к сов-

местной эволюционной адаптации организма хозяина и микробных клеток к условиям окружающей среды. Сформировавшийся в процессе эволюции симбиоз микро- и макроорганизмов привел к перераспределению метаболических функций и метаболических возможностей [5]. Можно предположить, что такие функции, как синтез короткоцепочечных жирных кислот, витаминов, ароматических аминокислот и др., утратились у организма хозяина и стали ответственностью микробиоты, в то время как функции синтеза холестерина и производных стероидных молекул, напротив, стали прерогативой клеток хозяина.

Однако в последнее столетие окружающая среда человека резко изменилась: сегодня модернизация и урбанизация, смена рациона питания в пользу высокоуглеводной/высококалорийной пищи, а также значительное снижение двигательной активности способствуют *дезадаптации* (нарушению приспособляемости организма к меняющимся условиям окружающей среды). В связи с этим мы наблюдаем разбалансировку в сложной системе “хозяин–микробиота” — так называемое явление *дисбиоза*, когда соотношение и разнообразие представителей микробиоты изменяется таким образом, что не позволяет компонентам суперорганизма реализовывать свои функции в полной мере и подстраиваться под условия среды или патологические изменения в организме хозяина. Микробиота — “двуликий Янус”: с одной стороны, она является неотъемлемой частью нашего организма, состоит из довольно устойчивых энтеротипов [6], но с другой — может быстро реагировать в физиологических, экологических и эволюционных масштабах на внешние воздействия таким образом, что это влияет на фенотип. Так, было показано, что микробиота кишечника вовлечена как в различные физиологические (контроль энергетического обмена, артериального давления, уровня глюкозы в крови, гемостаз, поведения и др.), так и патологические процессы (различные нарушения метаболизма, канцерогенез) [5]. В каждом случае существуют функциональные связи между кишечными микробами, метаболитами, которые они генерируют, и рецепторами на клетках организма-хозяина, а также ответными реакциями, влияющими на формирование фенотипа хозяина.

Алкилрезорцинолы (АР) — представляют собой липофильные полифенольные соединения, синтезируемые растениями (главным образом, злаками — рожью, пшеницей и ячменем), грибами и бактериями, и обладают многими биологическими активностями [7]. У бактерий АР могут быть ассоциированы с мембранами, что влияет на их свойства или свойства связанных с ними структур [8]. Помимо этого, показана ауторегуляторная и антимикробная роль АР. Например, 4-гексилрезорцинол в сочетании с антибиотиками резко снижает количество прорастающих спор *Bacillus cereus* как в

жидкой среде, так и на чашках с агаром по сравнению с обработкой одними антибиотиками [9]. АР проявляют антимикробную активность путем включения в клеточные стенки микроорганизмов. Биологическая активность АР, вероятно, определяется их способностью действовать в качестве структурных модификаторов биополимеров и надмолекулярных структур, таких как мембраны [10–13]. Предположительно, АР изменяют свойства мембран за счет ассоциации с липидными молекулами и макромолекулами внутри мембран, ингибируя их функциональную активность [13].

В исследованиях на животных и у человека продемонстрировано наличие сильной корреляции между изменением микробного состава в кишечнике, проявляющемся в сдвиге в сторону увеличения аккумуляции энергии, и фенотипом ожирения [14, 15]. Кроме того, увеличивающееся соотношение *Firmicutes* (таких как *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* и *Enterococcus spp.*) к *Bacteroidota* (таких как *Bacteroides spp.* и *Prevotella spp.*) в микробном сообществе кишечника связано с ожирением и нарушениями обмена веществ [16]. В исследовании Oishi и др. удалось показать, что АР, поступающие с пищей, значительно влияли на увеличение количества *Prevotella* и снижение количества *Enterococcus* в фекалиях мышей [17]. Кроме того, количество *Enterococcus* в фекалиях положительно коррелировало с массой тела и содержанием желчных кислот в кале, но отрицательно коррелировало с количеством общих липидов в кале. Было высказано предположение, что положительные метаболические изменения, продемонстрированные в этом исследовании, стимулировались потреблением АР, что указывает на их пребиотические эффекты [17]. Эти данные согласуются с результатами исследования эффектов пребиотиков против ожирения у людей и животных [18]. Также сообщается, что полифенолы из фруктов и овощей оказывают стимулирующее или ингибирующее влияние на рост бактерий в кишечнике [19].

В культуре клеток 3T3-L1 АР предотвращали накопление триглицеридов в цитоплазме, вероятно, за счет сиртуин-зависимого ингибирования синтеза триглицеридов [20]. Кроме того, было показано, что АР ингибируют липолиз, осуществляемый гормоночувствительной липазой [21], и блокируют активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, отвечающей за накопление триглицеридов [22]. Добавление АР к диете с высоким содержанием жиров и сахарозы позволило не только подавить накопление триглицеридов в печени мышей, но и преодолеть гиперинсулинемию и гиперлептинемия в данной группе животных [17]. Помимо этого, в данном эксперименте были показаны заметное АР-зависимое снижение концентрации глюкозы в крови натощак и подавление как интолерантности глюкозы, так и резистентности к инсулину, вызванных высоколипидной/высокоуглеводной диетой.

Таблица 1. Характеристики исследованных групп

Показатели	Дети (<i>n</i> = 189)		Взрослые (<i>n</i> = 212)	
	Группа 1 (без ожирения)	Группа 2 (с ожирением)	Группа 3 (без ожирения)	Группа 4 (с ожирением)
Пол женский	39 (39%)	42 (47%)	98 (84.6%)	79 (73.1%)
Пол мужской	60 (61%)	48 (53%)	16 (15.4%)	29 (26.9%)
Возраст, лет	13 ± 4.6	12 ± 5.3	47.1 ± 4.8	54.6 ± 4.7
ИМТ, кг/м ²	20.3 ± 2.6	27.7 ± 6.3	20.8 ± 2.1	33.8 ± 3.36

той. Oishi и соавт. также обнаружили, что АР значительно усиливают стимулированное инсулином фосфорилирование Akt в печени, что может быть связано с повышением экспрессии генов *IRS* в печени [17]. Таким образом, АР успешно предотвращали вызванное диетой ожирение у мышей, и это подтверждается тем фактом, что, несмотря на одинаковое суточное потребление калорий, мыши, которых содержали на высоколипидной/высокоуглеводной диете, набирали больший вес по сравнению с группой, получавшей АР вместе с высоколипидным/высокоуглеводным рационом. Согласно исследованию, АР значительно подавляли индуцированное диетой повышение концентрации лептина в плазме и сопутствующую экспрессию лептиновой мРНК в жировой ткани. Таким образом, АР могут подавлять резистентность к лептину — важнейшему фактору, сигнализирующему о насыщении [23].

Потребление АР может снизить массу тела за счет ингибирования всасывания питательных веществ. АР содержат гидрофобные алкильные цепи, способные реагировать с пищеварительными ферментами человека, такими как α -глюкозидаза, трипсин и альдозоредуктаза, влияя таким образом на переваривание углеводов [24]. Кроме того, Song и соавт. в исследованиях кинетики реакции, катализируемой α -глюкозидазой, удалось продемонстрировать потенциал 4-гексилрезорцинола как неконкурентного обратимого ингибитора фермента. Тестируемое вещество также обладало способностью вмешиваться в неферментативные реакции гликирования, тем самым снижая образование фруктозаминов и конечных продуктов гликирования (AGEs, Advanced Glycation End products) [25]. Исследования *in vitro* подтвердили ингибирующее действие АР на ферментативную активность α -глюкозидазы [26].

Однако фактические функции АР, а также механизмы их действия еще предстоит выяснить, и в настоящее время они активно исследуются.

В настоящей работе мы задались целью выяснить, существует ли корреляция между содержанием различных АР в кале метаболически здоровых (без ожирения) и страдающих ожирением детей и

взрослых и представленностью бактериальных генов, кодирующих ферменты, отвечающие за основной метаболизм, тем самым проследив функциональные изменения КМ при развитии ожирения и вовлеченность АР в этот процесс. Для реализации поставленной цели нами было проведено метагеномное секвенирование микробной ДНК, выделенной из образцов кала исследуемых индивидуумов, и с помощью подхода реконструкции ненаблюдаемых событий (“Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States”, PICRUSt2 [27]) была описана потенциальная метаболическая активность идентифицированных микробных сообществ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы исследования. Проведено одноцентровое одномоментное исследование, в которое были включены 189 детей в возрасте от 9 до 18 лет и 212 взрослых в возрасте от 42 до 60 лет, проходящие медицинский осмотр в рамках диспансерного наблюдения (табл. 1).

Критерием включения в исследование было отсутствие приема антибиотиков, про- и пребиотических препаратов в течение 3 мес до включения в исследование. Критериями исключения были тяжелые соматические заболевания (хроническая почечная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность); любые заболевания желудочно-кишечного тракта, в том числе язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона; любое острое заболевание; алкоголизм; беременность; депрессия. Для всех детей и взрослых, включенных в исследование, были проведены анкетирование и оценка антропометрических показателей. Исследование одобрено Локальным независимым этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол № 186 от 26.06.2019 г.). Все участники исследования или их законные представители подписали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в научных целях.

От всех участников исследования были получены образцы кала согласно протоколу исследова-

ния. Транспортировка и хранение образцов осуществлялись с соблюдением холодовой цепи при температуре не выше -40°C .

Количественная оценка представленности АР в кале. Количественный анализ АР в кале проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ проводили при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1200 (Agilent inc., США) с системой автоматического ввода образцов, термостатом колонки и дегазатором. Пробы кала лиофилизировали до сухого остатка, далее навеску около 5 мг экстрагировали 50%-ным метанолом в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты.

Хроматографическое разделение проводили с использованием аналитической колонки Discovery PFP HS F5 (2.1×150 мм; 3 мкм). Для детектирования использован масс-спектрометрический детектор Agilent 6460 (Agilent inc., США). Полученный сигнал обрабатывали при помощи программного обеспечения Masshunter (Agilent inc., США). Расчет концентраций метаболитов проводили методом внутреннего стандарта (2-гидроксиникотиновая кислота).

Методика была валидирована по показателям селективности, линейности, точности, воспроизводимости, матричному эффекту и стабильности анализа. Валидация проводилась в соответствии с руководством по валидации биоаналитических методик FDA (U.S. Food and Drug Administration).

Метагеномное секвенирование. Из образцов фекалий проводили выделение бактериальной ДНК с использованием наборов QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Выделенную ДНК амплифицировали с использованием праймеров, специфичных к варибельному участку v3-v4 гена 16S рРНК. После очистки смеси с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США) ПЦР-продукты индексировали с помощью уникальных коммерческих индексов-праймеров Nextera XT Index Kit (Illumina, Inc., США). По окончании амплификации ПЦР-смеси очищали с помощью магнитных частиц AMPure XP beads согласно протоколу производителя. Концентрации очищенных библиотек оценивали с помощью наборов Qubit HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen). Библиотеки смешивали в эквимольном соотношении и проводили оценку качества и размера полученного пула с помощью прибора 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). При необходимости проводили дополнительную очистку с помощью магнитных частиц AMPure XP beads согласно рекомендациям производителя. Готовый пул библиотек секвенировали на платформе MiSeq (Illumina, Inc., США) согласно протоколу производителя.

Техническая обработка результатов секвенирования. Полученные риды анализировали с помо-

щью программы QIIME v.1.9.1 (Knight and Caporaso labs., США) с использованием эталонной базы данных Greengenes v.13.8 (Second Genome, Inc., США) с порогом сходства между последовательностями 97% [28]. Относительную представленность бактериальных таксонов в общем пуле прочтений получали в пропорциях (от 0 до 1), которые рассчитывали исходя из количества картированных прочтений для каждого таксона. Для определения принадлежности ДНК, обнаруженной в фекалиях, бактериям использовались такие данные, как доля отдельных бактериальных таксонов в общем пуле ДНК (от 0 до 1), а также частота выявления таксонов у индивидуумов различных групп исследования.

Для полученных ридов был проведен контроль качества с помощью программы fastQC по следующим критериям: 1) распределение качества оснований — минимум 90% с качеством > 25 ; 2) распределение длины ридов — минимум 90% прочтений достигают длины в 300 нуклеотидов; 3) максимальный процент неопределенных оснований — 1.

Биоинформатический анализ. Первичная обработка данных секвенирования и получение списка OTUs (operating taxonomic units) осуществлялись с использованием биоинформатического инструмента с открытым исходным кодом “QIIME v.1.9.1” [28]. Далее был проведен анализ предполагаемой метаболической роли компонентов микробиоты методом реконструкции ненаблюдаемых состояний с помощью PICRUST2 — программы для оценки функционального потенциала бактериального сообщества на основе профилей секвенирования маркерных генов [27]. Необработанные метагеномные данные были переведены в ферментативное представление [29].

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc, США), а также с помощью библиотеки SciPy [30]. Для определения медианы и сигмы был проведен Т-тест. В табл. 2–5, а также в Приложении (1–4)¹, представлен ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Все обнаруженные корреляции между содержанием алкилрезорцинолов в образцах кала и представленностью генов бактериальных ферментов были ранжированы на три категории (1, 2 и 3) в соответствии со значением p -value ($p > 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ соответственно). Для дальнейшего анализа были отобраны только корреляции с уровнем значимости 3 ($p < 0.01$). Конкретные значения p -value для всех отобранных корреляций представлены в табл. 2–5, а также в Приложении (1–4).

¹ Примечание: Приложение 1–4 доступно на сайте журнала в электронном виде.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции Спирмена, рассчитанные для бактериальных генов, кодирующих ферменты (согласно результатам метагеномного секвенирования кишечного микробиома) и представленные одновременно у взрослых с нормальным ИМТ и ожирением (признак 1), и количества АР в фекалиях этих же доноров (признак 2). Статистически значимые корреляции отмечены звездочкой

Признак 1	Признак 2	Нормальный ИМТ		Ожирение	
		Корреляция Спирмена	p-value	Корреляция Спирмена	p-value
Желчная кислота-КоА гидролаза (ЕС:3.1.2.26)	C12	0.11	0.29	0.32*	0.003
4,4'-диапофитоен десатураза (4,4'-диаполикопен образующая) (ЕС:1.3.8.2)	C12	0.028	0.80	0.30*	0.01
Ликопен бета-циклаза (ЕС:5.5.1.19)	C0	0.014	0.90	0.33*	0.003
Целлюлаза (ЕС:3.2.1.4)	C0	−0.017	0.90	0.29*	0.01
3-гидроксibuтират дегидрогеназа (ЕС:1.1.1.30)	C15	−0.14	0.20	0.34*	0.002
3-оксоксилота КоА-трансфераза (ЕС:2.8.3.5)	C15	−0.065	0.55	0.39*	0.001
L-лактат дегидрогеназа (ЕС:1.1.1.27)	C3	−0.014	0.90	0.30*	0.01
3-метил-2-оксобутианоат дегидрогеназа (ЕС:1.2.4.4)	C0	−0.084	0.44	0.32*	0.004
Дигидролипоиллизин (2-метилпропаноил) трансфераза (ЕС:2.3.1.168)	C6	−0.098	0.36	0.37*	0.001
Гистонацетилтрансфераза (ЕС:2.3.1.48)	C3	−0.22*	0.04	0.31*	0.004
Моноаминоксидаза (ЕС:1.4.3.4)	C1	−0.21*	0.04	0.32*	0.003
Нитрилгидратаза (ЕС:4.2.1.84)	C15	0.0013	0.99	0.29*	0.01
Пантоат-бета-аланин лигаза (АМФ-образующая) (ЕС:6.3.2.1)	C6	0.28*	0.01	0.007	0.95

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ корреляционных связей АР с представителями микробиоты больных ожирением и здоровых взрослых и детей

После получения данных метагеномного секвенирования и определения таксономической принадлежности представителей микробиоты доноров

кала, нами был проведен корреляционный анализ между содержанием различных гомологов АР (резорцинол, C0; метилрезорцинол, C1; этилрезорцинол, C2; пропилрезорцинол, C3, пентилрезорцинол, C5; гексилрезорцинол, C6; додецилрезорцинол, C12; пентадецилрезорцинол, C15) в кале и представленностью обнаруженных микробных

Таблица 3. Коэффициенты корреляции Спирмена, рассчитанные для бактериальных генов, кодирующих ферменты (согласно результатам метагеномного секвенирования кишечного микробиома) и представленные одновременно у детей с нормальным ИМТ и ожирением (feature 1), и количества АР в фекалиях этих же доноров (feature 2). Статистически значимые корреляции отмечены звездочкой

Признак 1	Признак 2	Нормальный ИМТ		Ожирение	
		Корреляция Спирмена	p-value	Корреляция Спирмена	p-value
Тетрагидрофолатсинтаза (ЕС:6.3.2.17)	С6	0.36*	0.002	−0.14	0.24
5-формилтетрагидрофолат цикло-лигаза (ЕС:6.3.3.2)	С6	0.37*	0.002	−0.14	0.26
Формат-тетрагидрофолат лигаза (ЕС:6.3.4.3)	С6	0.36*	0.002	−0.1	0.41
Дигидрофолат редуктаза (ЕС:1.5.1.3)	С6	0.37*	0.002	−0.13	0.28
Фосфометилпиримидинкиназа (ЕС:2.7.4.7)	С6	0.37*	0.002	−0.11	0.36
Фосфопантотенат-цистеин лигаза (ЕС:6.3.2.5)	С6	0.35*	0.002	−0.14	0.24
Фосфопантотеноил-цистеин декарбоксилаза (ЕС:4.1.1.36)	С6	0.35*	0.002	−0.14	0.23
Пантетеин-фосфат аденилилтрансфераза (ЕС:2.7.7.3)	С6	0.36*	0.002	−0.14	0.25
Дефосфо-КоА киназа (ЕС:2.7.1.24)	С6	0.37*	0.002	−0.11	0.36
L-аспартат оксидаза (ЕС:1.4.3.16)	С6	0.35*	0.003	−0.14	0.26
Никотинат-нуклеотид дифосфорилаза (карбоксилирующая) (ЕС:2.4.2.19)	С6	0.36*	0.003	−0.15	0.22
Никотинат-нуклеотид аденилилтрансфераза (ЕС:2.7.7.18)	С6	0.36*	0.003	−0.14	0.26
Никотинамид-нуклеотид амидаза (ЕС:3.5.1.42)	С6	0.36*	0.002	−0.14	0.27
Биотин-[ацетил-КоА-карбоксилаза] лигаза (ЕС:6.3.4.15)	С6	0.36*	0.002	−0.14	0.26
Пиридоксаль киназа (ЕС:2.7.1.35)	С6	0.34*	0.004	−0.14	0.27
ФАД синтаза (ЕС:2.7.7.2)	С6	0.34*	0.004	−0.11	0.35
Аденозилкобинамид киназа (ЕС:2.7.1.156)	С6	0.34*	0.004	−0.14	0.27
Кобальт-прекоррин-8 метилмутаза (ЕС:5.4.99.60)	С6	0.34*	0.004	−0.09	0.49
Аденозилкобаламин/альфа-рибазол фосфатаза (ЕС:3.1.3.73)	С6	0.31*	0.01	−0.15	0.23

Таблица 3. Окончание

Признак 1	Признак 2	Нормальный ИМТ		Ожирение	
		Корреляция Спирмена	p-value	Корреляция Спирмена	p-value
Никотинат-нуклеотид—диметилбен- зимидазол фосфорибизтрансфераза (ЕС:2.4.2.21)	С6	0.34*	0.004	−0.15	0.22
Аденозилкобинамид-ГДФ риба- золтрансфераза (ЕС:2.7.8.26)	С6	0.34*	0.004	−0.13	0.28
Триацилглицерол липаза (ЕС:3.1.1.3)	С6	0.46*	8.52e−05	−0.18	0.14
Глицерол дегидрогеноза (ЕС:1.1.1.6)	С6	0.42*	0.001	−0.08	0.52
7-альфа-гидроксистероид дегидроге- наза (ЕС:1.1.1.159)	С6	0.35*	0.003	−0.05	0.67
Ацетолактат синтаза (ЕС:2.2.1.6)	С6	0.35*	0.003	−0.18	0.14
Триптофан синтаза (ЕС:4.2.1.20)	С6	0.35*	0.003	−0.15	0.19
Префенат дегидратаза (ЕС:4.2.1.51)	С6	0.36*	0.002	−0.14	0.26
7,8-диметил-8-гидрокси-5-деазари- бофлавин синтаза (ЕС:2.5.1.77)	С15	−0.12	0.3	−0.32*	0.01
5,6,7,8-тетрагидрометаноптерин гидро-лиаза (ЕС:4.2.1.147)	С15	−0.05	0.7	−0.34*	0.005
формилметанофуран—тетаргидроме- таноптерин N-формилтрансфераза (ЕС:2.3.1.101)	С15	−0.04	0.7	−0.34*	0.005
Коэнзим F420-0:L-глутамат лигаза (ЕС:6.3.2.31)	С15	0.033	0.7	−0.35*	0.004
Коэнзим F420-1:гамма-L- глутамат лигаза (ЕС:6.3.2.34)	С15	0.033	0.7	−0.35*	0.004
[Триметиламин—корриноид про- теин] Ко-метилтрансфераза (ЕС:2.1.1.250)	С3	0.09	0.5	−0.32*	0.01
Сквален синтаза (ЕС:2.5.1.21)	С6	0.22	0.07	−0.33*	0.01

таксонов. Наиболее статистически значимые корреляции представлены в Приложении 1–4. Концентрации АР в кале различных доноров были определены нами ранее и представлены в работе [31].

Положительные корреляции с АР имели представители пяти фил нормальной микробиоты кишечника: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobiota*. Наибольшее число корреляционных связей с АР имели представители

Firmicutes и *Bacteroidota*, что обусловлено их доминированием в микробном сообществе. Однако число корреляций значимо менялось в зависимости от индекса массы тела (ИМТ) исследуемого пациента. Так, у взрослых с ожирением число корреляций между представленностью фил *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* и различными АР было выше, чем у взрослых с нормальным ИМТ, в то время как у детей, напротив, для фил

Firmicutes, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* наблюдалось увеличение числа корреляций при нормальном фенотипе (без ожирения) (рис. 1). Это указывает на различия в метаболической активности микробиоты у больных ожирением и здоровых взрослых и детей и различном ответе организма хозяина на действие сигнальных молекул бактериального происхождения.

Среди представителей *Firmicutes* наибольшее количество корреляций с содержанием АР в кале у взрослых и детей без метаболических нарушений и с ожирением отмечались для бактерий классов *Clostridia*, *Bacilli*, *Negativicutes* (рис. 1).

Реконструкция потенциала метаболической активности микробиоты на основе данных высокопроизводительного секвенирования

Связанные с человеком микробные сообщества напрямую взаимодействуют с организмом хозяина посредством продуктов метаболизма, которые выступают в качестве сигнальных или иммуномодулирующих молекул [32]. Исследования человеческого микробиома показывают важность и необходимость оценки метаболического и функционального потенциала микробного сообщества и его влияния на организм человека-хозяина. На основании результатов секвенирования микробных генов, кодирующих 16S рРНК, нами была проведена реконструкция функционального потенциала микробных сообществ. Для этого полученные метагеномные данные с помощью биоинформатического инструмента PICRUSt2 были ассоциированы с базой генных ортологов KEGG для оценки представленности генов, кодирующих бактериальные ферменты. Таким образом, мы смогли рассчитать разницу в относительной представленности более 1700 микробных генов, кодирующих ферменты, участвующие в различных биохимических реакциях (рис. 2).

Затем, исходя из систематических номеров ферментов, представленных в Приложении 1–4, нами был проведен анализ по базе данных BRENDA [33], в которой было аннотировано наличие искомого фермента у тех или иных микроорганизмов, а также указаны его функции.

Далее из списка отобранных ферментов мы искали только те, которые были представлены как у здоровых, так и у больных ожирением (табл. 2 и 3) для того, чтобы оценить, изменяется ли корреляция для данного фермента (а точнее представленности кодирующего его гена) при ожирении по сравнению с нормой. В итоге была обнаружена группа генов, для которых в случае ожирения (или нормы) корреляции с АР достоверно менялись в противоположную сторону (с положительных на отрицательные) или исчезали вовсе (становились недостоверными), что и отражено в представленных табл. 2 и 3.

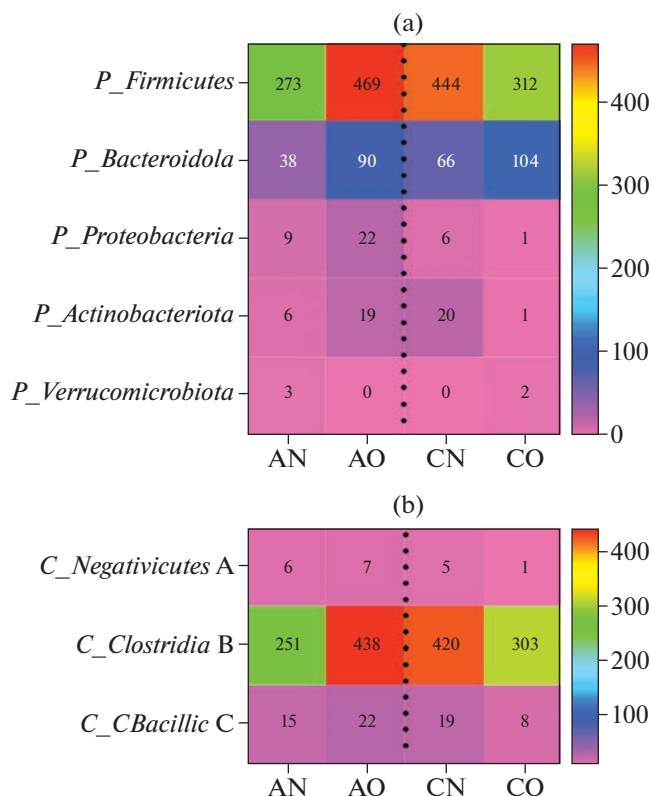


Рис. 1. Число корреляций между содержанием АР в кале и представленностью (а) — различных фил микробного сообщества у взрослых с ожирением (АО) и нормальным ИМТ (АН) и детей с ожирением (СО) и нормальным ИМТ (СН), (б) — различных классов фила *Firmicutes* у взрослых с ожирением (АО) и нормальным ИМТ (АН) и детей с ожирением (СО) и нормальным ИМТ (СН). Заметна зеркальная направленность изменений числа корреляций у детей и взрослых в зависимости от фенотипа.

Однако оказалось, что при таком “наложении” данных корреляции сохранялись только для определенных АР (см. ниже, а также табл. 4).

Анализ корреляций концентраций АР с представленностью генов, кодирующих бактериальные ферменты, участвующие в синтезе АР

Для того, чтобы оценить возможность бактериального происхождения АР, мы провели корреляционный анализ между представленностью генов, кодирующих субъединицы поликетидсинтаз различного типа (ферментов, участвующих в синтезе полифенольных молекул), и содержанием различных гомологов АР в исследуемых образцах. В результате проведенного анализа мы не обнаружили корреляций, обладающих высоким уровнем достоверности. Однако это не исключает возможности синтеза АР кишечной микробиотой, поскольку анализ проводился только по базе данных KEGG и

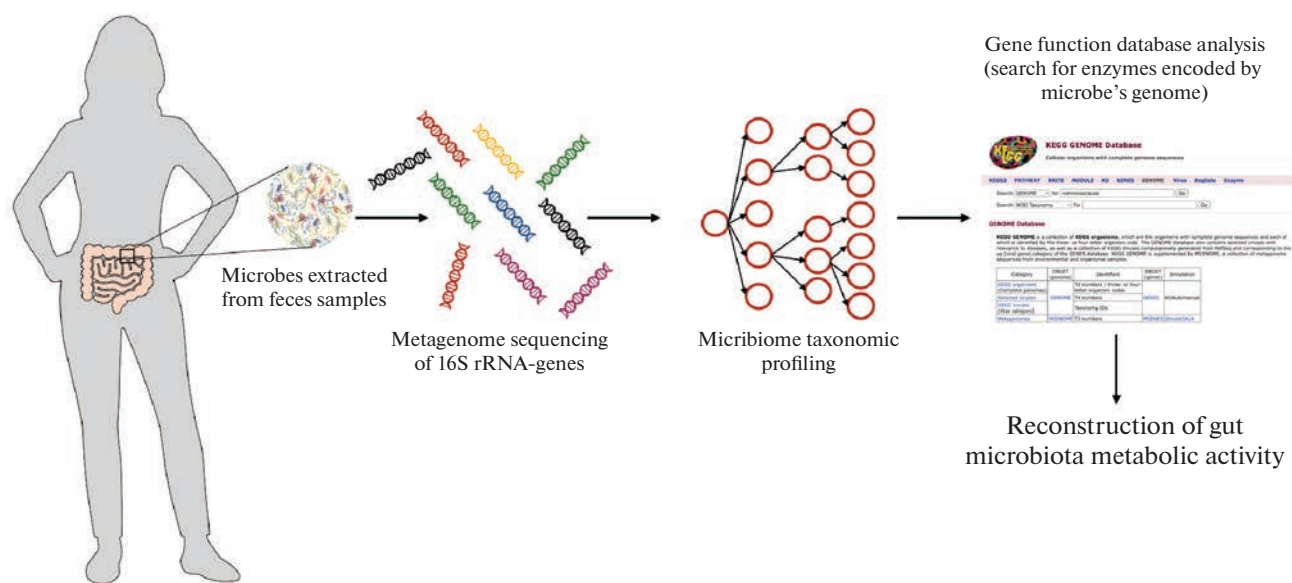


Рис. 2. Алгоритм реконструкции метаболической активности микробиоты на основе результатов метагеномного секвенирования.

включал поиск только по известным генам с описанными функциями. С другой стороны, это может говорить о влиянии пищевых АР, которые также могут выступать в качестве регуляторов микробного сообщества или регуляторов метаболизма хозяина в целом.

*Анализ корреляций концентраций АР
с представленностью бактериальных генов,
кодирующих ферменты, у здоровых и больных
ожирением взрослых*

В результате проведенного анализа нами было обнаружено, что у взрослых с ожирением алкилрезорцинолы кала были представлены резорцинолом (C0), метилрезорцинолом (C1), пропилизорцинолом (C3), гексилрезорцинолом (C6), додецилрезорцинолом (C12) и пентадецилрезорцинолом (C15). Для данных АР были выявлены наиболее сильные корреляции с представленностью бактериальных генов, кодирующих ферменты нормальной КМ, принимающими участие в жировом обмене, работе иммунной и антиоксидантной систем, обмене короткоцепочечных жирных кислот, метаболизме витаминов, белковом обмене, пролиферации и апоптозе клеток (см. Приложение 2).

Так, с представленностью бактериальных генов, кодирующих ферменты липидного обмена, наблюдалась корреляция с содержанием C12. В частности, содержание C12 в кале у больных ожирением положительно коррелировало ($r = 0.318$) с представленностью гена фермента гидролазы желчных кислот (EC 3.1.2.26), который обеспечивает $7\alpha/7\beta$ -дегидроксилирование желчных кислот, с образованием вторичных желчных кислот. Согласно литературным

данным этот фермент в основном встречается у представителей рода *Clostridium* [34]; с активностью этой гидролазы связано нарушение образования мицелл и всасывания через слизистую тонкого кишечника холестерина и липидов, что ведет к снижению уровня ЛПНП и триглицеридов в сыворотке крови. Помимо этого, с активностью данного фермента связано повышенное выведение с фекалиями вторичных желчных кислот [35]. Вторичные желчные кислоты являются важнейшими молекулами *quorum sensing* и регуляторами состояния микробиоты [36]. При этом надо учитывать, что большинство бактерий не способны синтезировать холестерин и зависят от поступления желчных кислот хозяина [37]. У взрослых с нормальным ИМТ корреляция была статистически незначимой.

Содержание C0 и C12 в кале коррелировало с представленностью генов, отвечающих за метаболизм каротиноидов, важнейшей функцией которых является защита организма от действия активных форм кислорода и регуляция генной экспрессии [38]. Так, у взрослых с ожирением содержание C12 положительно коррелировало ($r = 0.3$) с представленностью бактериальных генов, кодирующих 4,4'-диапофитоеендесатуразу (EC 1.3.8.2), которая участвует в образовании 4,4'-диаполикопена, из которого синтезируется каротиноид C30. Данный фермент встречается у представителей рода *Bacillus* (*Heliobacillus mobilis* и др.). Для C0 наблюдалась корреляция ($r = 0.326$) с ликопен-бета-циклазой (EC 5.5.1.19), катализирующей процессы образования альфа- и бета-каротинов. Фермент характерен, в основном, для цианобактерий (*Synechococcus sp.*, *Arthrospira sp.* и др.). У взрослых с нормальным

Таблица 4. Корреляционные зависимости между представленностью различных бактериальных ферментов и содержанием АР в кале детей с ожирением и нормальным ИМТ

Название фермента	Классификационный номер фермента (EC)	Представители микробиоты, продуцирующие фермент (согласно базе данных BRENDA)	Роль фермента в метаболизме (согласно базе данных BRENDA)	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у здоровых детей	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у детей с ожирением
Гексилрезорцинол (С6)					
Тетрагидрофолатсинтаза	6.3.2.17	<i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Синтез фолатов, участвующих в процессах клеточной пролиферации и дифференцировке, синтезе пуриновых и пиримидиновых оснований, регуляции экспрессии генов и т.д.	0.36	–
Дигидрофолатредуктаза	1.5.1.3	<i>Proteobacteria</i> (<i>Escherichia coli</i>), <i>Firmicutes</i> (представители семейств <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> и <i>Enterococcaceae</i>)		0.37	–
5-Формилтетрагидрофолатциклолигаза	6.3.3.2	<i>Lactobacillaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>		0.37	–
Форматетрагидрофолатлигаза	6.3.4.3	представители класса <i>Clostridia</i> – <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Clostridiaceae</i>		0.36	–
Гидроксиметилпиримидин/ фосфометилпиримидин киназа	2.7.4.7	представители семейств <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>), <i>Bacillaceae</i> (<i>Bacillus subtilis</i>)	Образование 4-амино-2метил-5-дифосфооксиметилпиримидина (токсопиримидина) – предшественника тиамина-пиррофосфата	0.36	–
Фосфопантотенат-цистеин лигаза	6.3.2.5	бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>)	Образование кофермента А из пантотеновой кислоты	0.35	–
Фосфопантотеноилцистеин декарбоксилаза	4.1.1.36			0.35	–
Пантетеинфосфат аденилтрансфераза	2.7.7.3			0.36	–
Дефосфо-Кофермент А киназа	2.7.1.24			0.37	–

Таблица 4. Продолжение

Название фермента	Классификационный номер фермента (EC)	Представители микробиоты, продуцирующие фермент (согласно базе данных BRENDA)	Роль фермента в метаболизме (согласно базе данных BRENDA)	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у здоровых детей	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у детей с ожирением
L-аспартат оксидаза	1.4.3.16	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>), <i>Bacillaceae</i> (<i>Bacillus subtilis</i>), <i>Burkholderia</i>	Синтез НАД+	0.35	—
Никотинат-нуклеотид дифосфорилаза	2.4.2.19			0.35	—
Никотинат-нуклеотид аденилтрансфераза	2.7.7.18			0.36	—
Никотинамид-нуклеотид амидаза	3.5.1.42			0.36	—
Биотин-[ацетил-КоА-карбоксилаза]-лигаза	6.3.4.15	<i>Lactobacillaceae</i> (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>), <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>), <i>Bacillaceae</i> (<i>Bacillus subtilis</i>)	Образование биотинил-5'-АМФ, необходимой для образования биотинкарбоксилазы	0.36	—
Пиридоксалькиназа	2.7.1.35	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i>	Образование коферментных форм витамина В6- пиридоксамин-5-фосфата из пиридоксальмина, пиридоксаль-5-фосфата из пиридоксала и пиридоксин-5-фосфата из пиридоксина	0.34	—
Рибофлавинкиназа	2.7.1.26	<i>Bacillus subtilis</i>	Образование флавиномононуклеотида из рибофлавина	0.34	—
ФАД-синтетаза	2.7.7.2	<i>Actinobacteria</i> (<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>), <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , некоторые археи (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)	Синтез флавинадениндинуклеотида из FMN	0.34	—

Таблица 4. Продолжение

Название фермента	Классификационный номер фермента (EC)	Представители микробы, продуцирующие фермент (согласно базе данных BRENDA)	Роль фермента в метаболизме (согласно базе данных BRENDA)	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у здоровых детей	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у детей с ожирением
Аденозилкобинамидкиназа	2.7.1.156	бактерии филума <i>Actinobacteria</i> (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>), <i>Escherichia coli</i>	Синтез активной формы витамина B12 - дезоксиаденозилкобаламина	0.34	—
Кобальт-прекоррин-8-метилмутаза	5.4.99.60	бактерии семейства <i>Bacillaceae</i> (<i>Priestia megaterium</i>)		0.34	—
Аденозилкобаламин/альфа-рибазол фосфатаза	3.1.3.73	бактерии семейства <i>Methanosarcinaceae</i>		0.31	—
Никотинат-нуклеотиддиметилбензимидазолфосфорибозилтрансфераза	2.4.2.21	бактерии филума <i>Actinobacteria</i> (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>), филума <i>Proteobacteria</i> (<i>Sinorhizobium meliloti</i>), рода <i>Geobacillus</i> (<i>Geobacillus kaustophilus</i>)		0.34	—
Аденозилкобинамид-ГДФ-рибазолтрансфераза	2.7.8.26	бактерии <i>Pseudomonas</i> (<i>Pseudomonas denitrificans</i>), некоторые археи (<i>Pyrococcus</i> sp., <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)		0.34	—
Триацилглицероллипаза	3.1.1.3	<i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Staphylococcus</i> (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>), <i>Streptomyces</i>	Гидролиз ТАГ до глицерина и жирных кислот	0.47	—
Глицеролдегидрогеназа	1.1.1.6	бактерии семейства <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>), <i>Arthrobacter</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Bacillaceae</i>	Образование из глицерола диоксиацетон, который фосфорилируется и вступает в гликолиз	0.42	—

Таблица 4. Продолжение

Название фермента	Классификационный номер фермента (EC)	Представители микробиоты, продуцирующие фермент (согласно базе данных BRENDA)	Роль фермента в метаболизме (согласно базе данных BRENDA)	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у здоровых детей	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у детей с ожирением
7-альфа-гидроксистероиддегидрогеназа	1.1.1.159	бактерии рода <i>Bacteroides</i> (<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides intestinalis</i>), <i>Acinetobacter</i> , <i>Clostridium</i> (<i>Clostridium sardinense</i>), <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>)	Синтез вторичных желчных кислот (ВЖК) - активирующих лигандов фарнезопидных рецепторов X (FXR) (повышают синтез фактора роста фибробластов (FGF) и поддерживают нормальный уровень липидов и глюкозы в крови). Также ВЖК обладают противовоспалительными свойствами (урсодезоксихолевая кислота)	0.35	–
Ацетолактатсинтаза	2.2.1.6	бактерии рода <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>), некоторые цианобактерии	Превращает пируват в ацетолактат и 2-оксобутанат в 2-ацето-2-оксипутанат, которые необходимы для синтеза незаменимых аминокислот с разветвленной цепью (лейцин, изолейцин, валин), обладающих помимо структурной функции, способностью усиливать действие инсулина, улучшать транспортировку глюкозы в ткани	0.35	–

Таблица 4. Окончание

Название фермента	Классификационный номер фермента (EC)	Представители микробиоты, продуцирующие фермент (согласно базе данных BRENDA)	Роль фермента в метаболизме (согласно базе данных BRENDA)	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у здоровых детей	Коэффициент корреляции (r) при $p < 0.01$ у детей с ожирением
Триптофансинтаза	4.2.1.20	бактерии рода <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i>	Синтез индола и глицеральдегид-3-фосфата из индол-3-глицеролфосфата и образование триптофана	0.35	—
Префенат дегидратаза	4.2.1.51		Синтез фенилаланина	0.36	—
Пентадецилрезорцинол (C15)					
7,8-лидеметил-8-гидрокси-5-деазарибофлавин синтаза	2.5.1.77	<i>Methanobacteriaceae</i>	Синтез кофермента F420 (участвует в восстановительных реакциях метанпродуцирующих бактерий)	—	—0.32
	4.2.1.147		Синтез метана из углекислого газа	—	—0.34
	2.3.1.101			—	—0.34
Кофермент F420-0: L-глутамат лигаза	6.3.2.31		Образование кофермента F420-1	—	—0.35
Кофермент F420-1: гамма-L-глутамат лигаза	6.3.2.34		Образование кофермента F420	—	—0.35

ИМТ корреляционные связи с данными ферментами были статистически незначимы.

У взрослых с ожирением наибольшие взаимосвязи наблюдались между АР и ферментами, участвующими в метаболизме короткоцепочечных жирных кислот (бутирата, пропионата, ацетата). В частности, содержание С0 коррелировало ($r = 0.3$) с представленностью гена, кодирующего целлюлазу (ЕС 3.2.1.4) — фермента, который принимает участие в метаболизме сложных углеводов (расщепляет целлюлозу путем эндогидролиза (1->4)-бета-D-гликозидных связей). Результатом расщепления и последующего окисления продуктов служит образование короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [39, 40]. У доноров с нормальным ИМТ данная связь не прослеживается ($r = -0.02$). Целлюлаза встречается у протеобактерий (*Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, *Komagataeibacter xylinus*, *Marinobacter* *sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudalteromonas haloplanktis*), бацилл (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus* *sp.*, *Paenibacillus* *sp.*, *Alicyclobacillus vulcanalis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus* *sp.*), актинобактерий (*Streptomyces* *sp.*, *Cellulomonas fimi*), фирмикут класса *Clostridia*: *Oscillospiraceae* (*Hungateiclostridium thermocellum*, *Ruminiclostridium cellulolyticum*), *Clostridiaceae* (*Clostridium cellulovorans*), *Lachnospiraceae* (*Lachnoclostridium phytofermentans*), *Ruminococcaceae* (*Ruminococcus albus*).

Согласно данным литературы [41], бутират оказывает стимулирующее влияние на выработку лептина в адипоцитах и глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), который синтезируется в эндокринных клетках тонкого кишечника. Воздействуя на рецепторы GPR41, он усиливает чувствительность к инсулину, активирует симпатическую нервную систему, что ингибирует липогенез в жировой ткани и увеличивает расход энергии в других тканях (печень и мышцы). Через GPR41 бутират также стимулирует экспрессию пептида YY (PYY), который имеет свойство снижать перистальтику желудочно-кишечного тракта и всасывание в кровь триациглицеролов и холестерина [42, 43].

С представленностью генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме бутирата, коррелирует также и содержание в кале С15. Положительные корреляции прослеживаются для 3-гидроксибутиратдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.30) ($r = 0.336$), превращающей ацетоацетат в гидроксибутират и встречающейся в основном у представителей фила *Proteobacteria*, и 3-оксокислота-КоА-трансферазы (ЕС 2.8.3.5) ($r = 0.394$), катализирующей процесс образования ацетоацетил-КоА и специфичной для бактерий филума *Proteobacteria* и филума *Firmicutes* (рода *Bacilli*). При этом опять же у взрослых с нормальным ИМТ данные корреляционные связи теряются.

С представленностью генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме пропионата,

положительную корреляцию имели С0, С3, С6 и С12. Так, С3 коррелирует с представленностью L-лактатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.27) ($r = 0.3$), катализирующей процесс образования 2-оксибутирата, из которого, в последующем, образуется пропанонат. Данный фермент содержат бактерии филума *Proteobacteria*, семейств *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*. Для С0 наблюдались корреляции с 3-метил-2-оксобутаноатдегидрогеназой (ЕС 1.2.4.4) ($r = 0.317$), участвующей в синтезе S-пропилдигидролипоамида-Е из 2-(альфа-гидроксипропил)тиаминдифосфата, а для С6 — с дигидролипоиллизин-(2-метилпропаноил)-трансферазой (ЕС 2.3.1.168) ($r = 0.368$), образующей пропаноил-КоА из S-пропилдигидролипоамида-Е. Оба фермента встречаются в основном у бактерий филума *Bacteroidota*.

Пропионат, воздействуя через рецепторы GPR43, обладает антилиполитическим эффектом за счет ослабления работы гормон-чувствительной липазы (снижает процесс ее фосфорилирования) [44]. Помимо этого, он, так же, как и бутират, повышает инсулиносенситивность и, через активацию симпатической нервной системы, предотвращает избыточное отложение триациглицеридов (ТАГ) в жировой ткани [45]. Помимо этого, пропионат и его производные оказывают противовоспалительное действие [46], вместе с бутиратом обеспечивают иммунную защиту (за счет увеличения выработки ИЛ-18), регулируют функции нейтрофилов, макрофагов, моноцитов [47], нормальное функционирование остеокластов [48].

Таким образом, у взрослых с ожирением в основном наблюдались положительные корреляции АР с представленностью генов ферментов, отвечающих за синтез КЦЖК, в то время как у детей с ожирением, равно как и у здоровых детей и взрослых, не было обнаружено статистически значимых корреляций АР с аналогичными ферментами.

У взрослых с ожирением для С3 наблюдалась положительная корреляция ($r = 0.314$) с представленностью гена, кодирующего гистонацетилтрансферазу (ЕС 2.3.1.48). Известно, что данный фермент участвует в регуляции экспрессии генов, хемотаксисе, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток и встречается у бактерий филумов *Actinobacteria* (*Actinosynnema* *sp.*), *Proteobacteria* (*Acinetobacter* *sp.*), *Firmicutes* (*Bacillus subtilis*). У взрослых с нормальным ИМТ корреляционная связь С3 с гистонацетилтрансферазой имеет отрицательное значение ($r = -0.216$).

У взрослых с ожирением С1 и С15 положительно коррелировали с представленностью генов, кодирующих ферменты, принимающие участие в аминокислотном (в частности, триптофановом) обмене. Так, для С1 наблюдалась связь ($r = 0.324$) с моноаминоксидазой (ЕС 1.4.3.4), которая принимает участие в образовании 3-индолацетальдегида (с последующим образованием 3-индолацетата) и

5-гидроксиацетальдегида (с последующим синтезом 5-гидроксииндолацетата) из триптофана [49]. Данный фермент представлен у актинобактерий (*Mycolicibacterium gilvum*, *Sphaerisporangium krabien-sis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Corynebacterium sp.*, *Rhodococcus*), протеобактерий (*Pseudomonas sp.*, *Sphingobium sp.*, *Rhizobium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Paraburkholderia sp.*), фирмикутов (*Bacillus cereus*, *Paenibacillus* и др.), цианобактерий (род *Oscillatoria*), бактерий филума *Bacteroidota*. У взрослых с нормальным ИМТ данная корреляция приобретает отрицательное значение ($r = -0.214$).

Нитрилгидратаза (ЕС 4.2.1.84), имеющая положительную корреляционную связь с С15 ($r = 0.3$), принимает участие в образовании индол-3-ацетамида, из которого, через каскад реакций, синтезируется индол-3-ацетат. У взрослых с нормальным ИМТ данная корреляция отсутствует ($r = 0.0001$). Нитрилгидратаза специфична для *Actinobacteriota* (*Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.* и др.), *Proteobacteria* (*Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Comamonas sp.*, *Alcaligenes sp.* и др.) и большинства *Bacillus*. Как известно, индол-3-ацетат ингибирует экспрессию микроРНК-181 в адипоцитах, повышая их чувствительность к инсулину [50].

Таким образом, АР в большей степени положительно коррелировали с представленностью генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в катаболизм белков/аминокислот, липидов и углеводов, что указывает на роль микробиоты в увеличении потребления энергоемких субстратов организмом хозяина, а значит — большее количество извлекаемых из пищи калорий.

У людей с нормальной конституцией С6 коррелировал с представленностью ферментов, участвующих в обмене витаминов, а именно с пантаноат-бета-аланинлигазой (АМФ-образующей) (ЕС 6.3.2.1) ($r = 0.275$), в то время как у взрослых с ожирением эта корреляционная связь исчезает (табл. 2). Данный фермент принимает участие в синтезе кофермента А, необходимого для обмена липидов, кетонных тел, ацетилирования холина, ксенобиотиков, синтеза гема [51].

Анализ корреляций концентраций АР в кале с представленностью генов, кодирующих бактериальные ферменты, у здоровых и больных ожирением детей

В отличие от взрослых у здоровых детей наибольшее число корреляций с ферментами нормальной КМ наблюдалось для С6 (табл. 3, а также Приложение 3 и 4). Спектр корреляционных связей С6 включает гены, кодирующие ферменты, участвующие в липидном, углеводном обмене, обмене аминокислот и метаболизме витаминов.

Наибольшее число корреляций для С6 обнаруживается с генами ферментов, участвующих в метаболизме водорастворимых витаминов — фолиевой кислоты, тиамина, пантотеновой кислоты, рибофлавина, никотиновой кислоты, биотина, цианкобаламина.

Так, количество С6 в кале коррелирует как с представленностью генов ферментов, участвующих в образовании активной формы фолиевой кислоты, так и в синтезе производных фолатов, необходимых для образования пуриновых и пиримидиновых оснований. Например, положительные корреляции обнаруживаются для ферментов: тетрагидрофолатсинтазы (ЕС 6.3.2.17) и ($r = 0.357$), которая встречается у бактерий семейств *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*; дигидрофолатредуктазы (ЕС 1.5.1.3) ($r = 0.371$), катализирующей процесс образования тетрагидрофолиевой кислоты и встречающейся у бактерий филлов *Proteobacteria* (*Escherichia coli*), *Firmicutes* (представителей семейств *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* и *Enterococcaceae*); 5-формилтетрагидрофолатциклолигазы (ЕС 6.3.3.2) ($r = 0.368$), необходимого для образования 5',10'-метенилтетрагидрофолата (этот фермент встречается у бактерий семейств *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae*); форматетрагидрофолатлигазой (ЕС 6.3.4.3) ($r = 0.362$), катализирующей реакцию образования 10'-формилтетрагидрофолата (фермент характерен для представителей класса *Clostridia*, семейств *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae*). У детей с ожирением все эти корреляционные связи теряются.

Помимо ферментов, участвующих в синтезе фолатов, содержание С6 в кале здоровых детей коррелировало с представленностью генов ферментов, участвующих в синтезе активной формы витамина В1 — тиаминпирофосфата; пантотената (витамина В5), необходимого для образования кофермента А; активной формы витамина В3 — никотинамидадениндинуклеотида; биотина (витамина В7); активных форм витаминов В6, В2, В12 (см. табл. 4). При этом у детей с ожирением положительные корреляции исчезали или изменялись на отрицательные.

У детей с ожирением наибольшую концентрацию в кале имел С15. При этом его статистически значимые корреляции имели отрицательный характер и, в основном, были связаны с представленностью генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе метана метанпродуцирующих микроорганизмов (табл. 4). Так, обратная корреляционная связь С15 наблюдалась по отношению к бактериям семейства *Methanobacteriaceae* ($r = -0.31$). У здоровых детей подобной статистически значимой корреляции не обнаружено. Метаногены важны для человека, потому что они отвечают за один из трех микробных механизмов удаления избытка H_2 из кишечника. Избыток H_2 ингибирует бактериаль-

ную НАДН-дегидрогеназу, что приводит к снижению продукции АТФ [52]. Поэтому удаление H_2 из кишечника является важным процессом, повышающим эффективность ферментативного брожения и позволяющим извлечь большее количество энергии из компонентов пищи. Метаногены не везде, чаще колонизируют женщин, чем мужчин, и колонизация коррелирует с возрастом — метаногены относительно редко обнаруживаются в кишечнике детей и подростков. Более того, известно, что повышенное содержание метаногенов в кишечнике хозяина ассоциировано с ожирением [53]. В этой связи полученные нами результаты представляют особый интерес: отрицательные корреляции C15 с представленностью метаногенов у детей с ожирением указывают, с одной стороны, на обогащенность микробиоты детей с ожирением метаногенами, которые увеличивают поступление энергоемких молекул в клетки хозяина, а с другой — на потерю защитных эффектов АР при таком сдвиге в микробиотическом сообществе.

Другим АР, для которого были обнаружены корреляции с представленностью ферментов, участвующих в синтезе метана, был резорцинол. Для C0 наблюдалась отрицательная связь с представленностью гена фермента триметиламинметилтрансферазой (EC 2.1.1.250) ($r = -0.315$), принимающим участие в образовании метана из триметиламина. У конституционно нормальных детей данная связь исчезает ($r = 0.06$).

У детей с ожирением прослеживается обратная связь C6 с представленностью гена скваленсинтазы (EC 2.5.1.21) ($r = -0.326$), участвующей в синтезе холестерина. Данный фермент среди представителей нормальной КМ встречается, в основном, у бактерий фила *Proteobacteria* (*Methylococcus capsulatus*). При этом у здоровых детей корреляция теряется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного анализа нами был выявлен ряд важных тенденций в изменении корреляций между содержанием различных гомологов ряда АР в кале детей и взрослых и таксономической представленностью микробиоты кишечника, а также представленностью генов, кодирующих различные микробные ферменты, в зависимости от наличия или отсутствия ожирения (рис. 3). Во-первых, нами было обнаружено изменение числа корреляционных связей между АР и различными микробными таксонами, как у детей, так и у взрослых, причем распределение корреляций между группами детей и взрослых было практически полностью противоположным. Так, для детей с ожирением мы наблюдали увеличение числа корреляций между различными гомологами АР и филами *Bacteroidota* и *Verrucomicrobia*, в то время как у детей без метаболических нарушений росло число корреляций с филами *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmic-*

utes. При этом из данных литературы известно, что у детей снижение уровня различных представителей *Bacteroidota* и, вследствие этого, снижение соотношения *Bacteroidota*/*Firmicutes* является четким индикатором ожирения [54]. Согласно результатам реконструкции метаболической активности микробиоты у детей с нормальным ИМТ АР статистически значимо коррелировали с представленностью генов, кодирующих ферменты, участвующие в анаболических процессах — синтезе витаминов, аминокислот, вторичных желчных кислот и других биомолекул, положительно влияющих на анаболические процессы в растущем детском организме и поддержании нормальной чувствительности к инсулину. В то же время у детей с ожирением различные АР в основном отрицательно коррелировали с генами, кодирующими ферменты, отвечающие за метаногенез, абсорбцию нутриентов, проницаемость кишечного барьера. Это может свидетельствовать о таких изменениях в составе микробиоты (дисбиозе), которые приводят к снижению образования АР, обладающих позитивными эффектами для метаболизма хозяина, что, в свою очередь, предотвращает сдерживание роста бактерий, вносящих вклад в развитие ожирения.

В группе исследованных взрослых мы наблюдали иную картину: у пациентов с ожирением число корреляций АР увеличивалось для таксонов *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota* и *Firmicutes*. При этом наибольшее число корреляций обнаруживалось между АР и генами, кодирующими ферменты, вовлеченные в катаболизм белков/аминокислот, липидов и углеводов, что указывает, с одной стороны, на роль микробиоты в увеличении потребления энергоемких субстратов организмом хозяина, а значит — большее количество извлекаемых из пищи калорий, а с другой — на изменение роли АР при нарушении метаболизма. Вероятно, изменение микробиоты, наблюдаемое при ожирении у взрослых, приводит к продукции таких АР, которые способствуют размножению обезогенной (способствующей развитию ожирения) микробиоты, в то время как при нормальном метаболизме продуцируемые микробиотой АР, наоборот, будут иметь протективный для организма хозяина эффект. Об этом говорит и изменение числа корреляций между отдельными представителями гомологического ряда АР и представленностью бактериальных генов, отвечающих за синтез ферментов (рис. 4). У детей с ожирением по сравнению с детьми с нормальной массой тела мы наблюдали значительное снижение числа статистически значимых корреляций для C6 (558 — в норме, 8 — при ожирении), а также для C3 и C12, в то время как число корреляций для C15, C5, C2 и C0, напротив, повысилось при ожирении. При этом у взрослых с ожирением значительно повышалось число значимых корреляций для C3 (32 — при ожирении, 2 — в

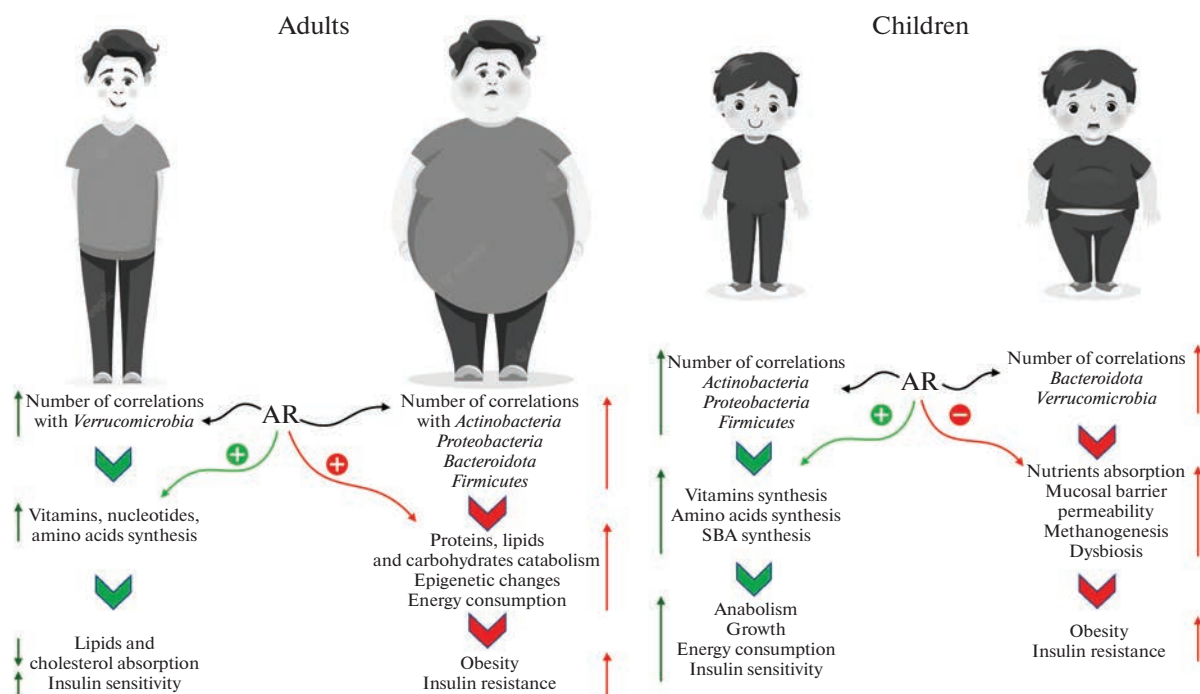


Рис. 3. Метаболические изменения, наблюдаемые у взрослых и детей с ожирением по сравнению со здоровыми индивидуумами, и коррелирующие с содержанием АР в кале, согласно реконструкции потенциальной метаболической активности микробиоты. SBA – вторичные желчные кислоты.

норме) и C0 (42 – при ожирении и 5 – в норме) и снижалось число корреляций для C5.

Такое весомое изменение числа корреляций и их направленности, с одной стороны, может быть обусловлено различиями в возрастной и половой структуре исследуемой когорты: в разные возрастные периоды микробиота имеет различный таксономический состав и, следовательно, отличается по своей функциональности [55, 56]. С другой стороны, отличия могут быть обусловлены особенно-

стями диеты различных групп испытуемых. Необходимо учитывать тот факт, что АР являются компонентами некоторых злаков и других продуктов питания, поэтому диета, содержащая цельнозерновые продукты, также будет влиять на содержание АР в кале [7].

Тем не менее очевидным является значимое изменение генной представленности кишечной микробиоты и ассоциаций с различными АР в стуле взрослых и детей. Настоящее и другие исследования показывают, что различные гомологи АР имеют регуляторный потенциал и, вероятно, вносят вклад как в состав кишечной микробиоты человека, так и развитие метаболических нарушений, в частности, ожирения. Однако механизмы действия АР требуют дальнейшего внимательного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время проблема ожирения является одним из ключевых вопросов медицины и системы здравоохранения. Патогенез ожирения сложен и зависит от множества факторов, как наследственных, так и воздействий внешней среды, включая образ жизни и особенности диеты. Особенно интересны исследования последних лет, показывающие значительный вклад метаболитов кишечной микробиоты в регуляцию энергетического обмена и иммунную функцию организма хозяина, непосредственно связанные с развитием ожирения



Рис. 4. Число корреляций между АР и представленностью бактериальных генов, кодирующих ферменты, у детей и взрослых с ожирением и нормальным ИМТ. AN – взрослые с нормальным ИМТ, АО – взрослые с ожирением, CN – дети с нормальным ИМТ, CO – дети с ожирением.

и вызванных им осложнений. Алкилрезорцинолы — липофильные молекулы растительного и микробного происхождения, поступающие с пищей и обладающие пребиотическими свойствами, направленными на предотвращение развития ожирения, как было показано в мышиных моделях. Однако, насколько нам известно, нет исследований, показывающих микробиотическое происхождение АР и их способность выступать в качестве молекул *quorum sensing*. В настоящем исследовании мы провели метагеномный анализ состава микробного сообщества кишечника и хроматографический анализ представленности различных гомологов АР, основываясь на образцах стула, полученного от более 400 детей и взрослых с нормальным ИМТ и ожирением. Определение таксономического состава микробного сообщества позволило нам провести реконструкцию метаболической активности микробиоты, в основе которой лежало определение относительной представленности бактериальных генов, кодирующих ферменты. Корреляционный анализ представленности АР и бактериальных генов выявил ряд важных тенденций:

- распределение корреляций содержания АР в кале как с представленностью различных бактериальных таксонов, так и представленностью бактериальных генов, между группами детей и взрослых было практически полностью противоположным (зеркальным);

- у взрослых с ожирением содержание АР в основном коррелировало с представленностью генов, отвечающих за катаболизм энергоемких субстратов и аккумуляцию энергии, в то время как у детей с ожирением содержание АР в кале коррелировало с такими функциями, как повышение проницаемости мукозального барьера, метаногенез и абсорбция нутриентов;

- изменялось не только число корреляций, но также и профиль коррелирующих АР — у взрослых спектр АР был значительно шире, чем у детей, что, вероятно, связано с особенностями состава микробиотического сообщества;

- обнаруженные изменения в таксономическом составе микробиоты, ее метаболической активности и направленности корреляций с АР, позволяют предположить, что АР влияют на метаболическую активность микробиоты и вовлечены в метаболические сдвиги в организме хозяина, приводящие к развитию ожирения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.Ш. и Т.В.Г.), сбор данных (И.Ю.В., А.М.Г.), обработка данных (А.А.З., А.Б.И.), написание и редактирование манускрипта (А.А.З., С.А.Р., А.В.Ш.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saad MJA, Santos A, Prada PO* (2016) Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* 31:283–293. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2015>
2. *Gomaa EZ* (2020) Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 113:2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
3. *Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, Wabitsch M* (2020) Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* 78:110812. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110812>
4. *Moeller AH, Sanders JG* (2020) Roles of the gut microbiota in the adaptive evolution of mammalian species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375:20190597. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0597>
5. *Adak A, Khan MR* (2019) An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cel Mol Life Sci* 76:473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
6. *Arumugam M, Raes J, Pelletier E, le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto J-M, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P* (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
7. *Zabolotneva AA, Shatova OP, Sadova AA, Shestopalov AV, Roumiantsev SA* (2022) An Overview of Alkylresorcinols Biological Properties and Effects. *J Nutr Metab* 2022:1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/4667607>
8. *Bitkov VV, Nenashev VA, Pridachina NN, Batrakov SG* (1992) Membrane-structuring properties of bacterial long-chain alkylresorcinols. *Biochim Biophys Acta (BBA). Biomembranes* 1108:224–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90029-L](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90029-L)
9. *Nikolaev YA, Tutel'yan AV, Loiko NG, Buck J, Sidorenko SV, Lazareva I, Gostev V, Manzen'yuk OY, Shemyakin IG, Abramovich RA, Huwyler J, El'-Registan GI* (2020) The use of 4-Hexylresorcinol as antibiotic adjuvant. *PLoS One* 15:e0239147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239147>

10. Kozubek A, Tyman JHP (1999) Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chem Rev* 99:1–26. <https://doi.org/10.1021/cr970464o>
11. Stasiuk M, Kozubek A (2010) Biological activity of phenolic lipids. *Cel Mol Life Sci* 67:841–860. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>
12. El'-Registan GI, Muliukin AL, Nikolaev IA, Suzina NE, Gal'chenko VF, Duda VI (2006) Adaptive functions of extracellular autoregulators of microorganisms. *Mikrobiologiya* 75:446–456.
13. Nikolaev IA, Muliukin AL, Stepanenko II, El'-Registan GI (2006) [Autoregulation of stress response in microorganisms]. *Mikrobiologiya* 75:489–496.
14. Cox LM, Blaser MJ (2013) Pathways in Microbe-Induced Obesity. *Cell Metab* 17:883–894. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.004>
15. Tremaroli V, Bäckhed F (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489:242–249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>
16. Kovatcheva-Datchary P, Arora T (2013) Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27:59–72. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.017>
17. Oishi K, Yamamoto S, Itoh N, Nakao R, Yasumoto Y, Tanaka K, Kikuchi Y, Fukudome S, Okita K, Takano-Ishikawa Y (2015) Wheat Alkylresorcinols Suppress High-Fat, High-Sucrose Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance by Increasing Insulin Sensitivity and Cholesterol Excretion in Male Mice. *J Nutr* 145:199–206. <https://doi.org/10.3945/jn.114.202754>
18. Costabile A, Klinder A, Fava F, Napolitano A, Fogliano V, Leonard C, Gibson GR, Tuohy KM (2008) Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Brit J Nutr* 99:110–120. <https://doi.org/10.1017/S0007114507793923>
19. Exeberria U, Fernández-Quintela A, Milagro FI, Aguirre L, Martínez JA, Portillo MP (2013) Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *J Agric Food Chem* 61:9517–9533. <https://doi.org/10.1021/jf402506c>
20. Rejman J, Kozubek A (2004) Inhibitory Effect of Natural Phenolic Lipids upon NAD-Dependent Dehydrogenases and on Triglyceride Accumulation in 3T3-L1 Cells in Culture. *J Agric Food Chem* 52:246–250. <https://doi.org/10.1021/jf034745a>
21. Andersson U, Dey ES, Holm C, Degerman E (2011) Rye bran alkylresorcinols suppress adipocyte lipolysis and hormone-sensitive lipase activity. *Mol Nutr Food Res* 55:S290–S293. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100231>
22. Rejman J, Kozubek A (1997) Long-chain orcinol homologs from cereal bran are effective inhibitors of glycerophosphate dehydrogenase. *Cel Mol Biol Let* 2:411–419.
23. Horikawa K, Hashimoto C, Kikuchi Y, Makita M, Oishi K (2022) Wheat alkylresorcinol increases fecal lipid excretion and suppresses feed efficiency in mice depending on time of supplementation. *Nutrition* 103–104:111796. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111796>
24. Ross AB, Chen Y, Frank J, Swanson JE, Parker RS, Kozubek A, Lundh T, Vessby B, Åman P, Kamal-Eldin A (2004) Cereal Alkylresorcinols Elevate γ -Tocopherol Levels in Rats and Inhibit γ -Tocopherol Metabolism In Vitro. *J Nutr* 134:506–510. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.506>
25. Song S, Liu Q, Chai W-M, Xia S-S, Yu Z-Y, Wei Q-M (2021) Inhibitory potential of 4-hexylresorcinol against α -glucosidase and non-enzymatic glycation: Activity and mechanism. *J Biosci Bioeng* 131:241–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.011>
26. Chen J, Zhu S, Zhang C, Chen H, Liu Y, Tu J (2013) Inhibition of wheat bran and its active components on α -glucosidase in vitro. *Pharmacogn Mag* 9:309. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.117826>
27. Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI (2020) PICRUST2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol* 38:685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
28. <http://qiime.org/>
29. <https://www.genome.jp/kegg/>
30. https://github.com/ivasilyev/curated_projects/blob/a2f926539c151f4dd33b1ec9f24918315607b663/ashestopalov/nutrition/obesity_metagenomes/5_count_correlations.py#L38
31. Shestopalov AV, Gaponov AM, Zabolotneva AA, Appolonova SA, Markin PA, Borisenko OV, Tutelyan AV, Rumyantsev AG, Teplyakova ED, Shin VF, Savchuk DV, Volkova NI, Ganenko LA, Makarov VV, Yudin SM, Rumyantsev SA (2022) Alkylresorcinols: New Potential Bioregulators in the Superorganism System (Human–Microbiota). *Biol Bullet* 49:150–159. <https://doi.org/10.1134/S1062359022030153>
32. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
33. <https://www.brenda-enzymes.org/>
34. Ridlon JM, Hylemon PB (2012) Identification and characterization of two bile acid coenzyme A transferases from *Clostridium* scindens, a bile acid 7 α -dehydroxylating intestinal bacterium. *J Lipid Res* 53:66–76. <https://doi.org/10.1194/jlr.M020313>
35. Wells JE, Hylemon PB (2000) Identification and Characterization of a Bile Acid 7 α -Dehydroxylation Operon in *Clostridium* sp. Strain TO-931, a Highly Active 7 α -Dehydroxylating Strain Isolated from Human Feces. *Appl Environ Microbiol* 66:1107–1113. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1107-1113.2000>
36. Vogt SL, Peña-Díaz J, Finlay BB (2015) Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34:106–115. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.002>
37. Bourgin M, Labarthe S, Kriaa A, Lhomme M, Gérard P, Lesnik P, Laroche B, Maguin E, Rhimi M (2020) Exploring the Bacterial Impact on Cholesterol Cycle: A Numerical Study. *Front Microbiol* 11:1121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01121>
38. Vachali P, Bhosale P, Bernstein PS (2012) Microbial Carotenoids. 41–59.

39. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22:495–512.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
40. Hu J, Lin S, Zheng B, Cheung PCK (2018) Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1243–1249.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1245650>
41. Karney A (2017) [Microbiota and obesity]. *Dev Period Med* 21:203–207.
<https://doi.org/10.34763/devperiod-med.20172103.203207>
42. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI (2008) Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:16767–16772.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>
43. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM (2007) Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50:2374–2383.
<https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0>
44. Hong Y-H, Nishimura Y, Hishikawa D, Tsuzuki H, Miyahara H, Gotoh C, Choi K-C, Feng DD, Chen C, Lee H-G, Katoh K, Roh S-G, Sasaki S (2005) Acetate and Propionate Short Chain Fatty Acids Stimulate Adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146:5092–5099.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-0545>
45. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG (2016) Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J Obes* 2016:1–27.
<https://doi.org/10.1155/2016/7353642>
46. Jan G, Belzacq A-S, Haouzi D, Rouault A, M  tivier D, Kroemer G, Brenner C (2002) Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ* 9:179–188.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400935>
47. Corr  a-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR (2016) Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology* 5:e73.
<https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>
48. Lucas S, Omata Y, Hofmann J, B  ttcher M, Iljazovic A, Sarter K, Albrecht O, Schulz O, Krishnacoumar B, Kr  nke G, Herrmann M, Mougiakakos D, Strowig T, Schett G, Zaiss MM (2018) Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss. *Nat Commun* 9:55.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02490-4>
49. Yagodina OV, Nikol'skaya EB, Khovanskikh AE, Kormilitsyn BN (2002) Amine Oxidases of Microorganisms. *J Evol Biochem Physiol* 38:251–258.
<https://doi.org/10.1023/A:1020714607203>
50. Lundgren P, Thaiss CA (2020) The microbiome-adipose tissue axis in systemic metabolism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 318:G717–G724.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2019>
51. Cronan JE, Littel KJ, Jackowski S (1982) Genetic and biochemical analyses of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 149:916–922.
<https://doi.org/10.1128/jb.149.3.916-922.1982>
52. Walker A (2007) Say hello to our little friends. *Nat Rev Microbiol* 5:572–573.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1720>
53. Mathur R, Barlow GM (2015) Obesity and the microbiome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9:1087–1099.
<https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1051029>
54. Indiani CM dos SP, Rizzardi KF, Castelo PM, Ferraz LFC, Darrieux M, Parisotto TM (2018) Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood Obesity* 14:501–509.
<https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>
55. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao J, Abe F, Osawa R (2016) Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol* 16:90.
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>
56. Yoon K, Kim N (2021) Roles of Sex Hormones and Gender in the Gut Microbiota. *J Neurogastroenterol Motil* 27:314–325.
<https://doi.org/10.5056/jnm20208>

Reconstruction of the Metabolic Activity of the Intestinal Microbiota in Children and Adults with Obesity and its Relationship with the Representation of Alkylresorcinols in Feces

A. A. Zabolotneva^{a,b#}, A. B. Itov^{a,c}, T. V. Grigorieva^d, I. Yu. Vasiliev^d,
S. A. Roumiantsev^{a,b,e}, A. M. Gaponov^e, and A. V. Shestopalov^{a,b,c}

^aPirogov Russian National Research Medical University, Academic Chair of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of General Medicine, Moscow, Russia,

^bNational Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Laboratory of Biochemistry of Signaling Pathways, Moscow, Russia,

^cDmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia,

^dKazan Federal University, Kazan, Russia

^eCentre for Digital and Translational BIOmedicine LLC “Centre for Molecular Health”, Moscow, Russia

[#]e-mail: a.zabolotneva@gmail.com

The human body is a superorganism that depends on the trillions of microbial cells that inhabit it. Developing along with the host during evolution, the microbiota forms the phenotypes of our ancestors. Mutations that arose in the process of natural selection led to the joint evolution of the host organism and microbial cells to environmental conditions and the development of adaptability to this environment. The composition and metabolic activity of the intestinal microbiota are found in various manifestations of processes, as well as in the development of pathological conditions and dysmetabolic diseases, including obesity. Alkylresorcinols (AR) are biologically active polyphenolic compounds of microbial origin that have the ability to highly influence host metabolism and the composition of their microbiota. In the present study, we performed metagenomic sequencing of microbial DNA isolated from the stool samples of 401 metabolically healthy and obese children and adults, and also determined the content of various AR homologues in these samples. Based on high-throughput sequencing data, we reconstructed the metabolic potential of the intestinal microbiota and assessed the correlations between the content of various AR homologues and the abundance of microbial enzymes. Based on the results obtained, we observed the features of functional changes in the intestinal microbiota observed in adults and children with obesity.

Keywords: alkylresorcinols, gut microbiota, reconstruction of microbial metabolic activity, obesity

ПОСТКОЛИТНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В НОЦИЦЕПТИВНЫХ СВОЙСТВАХ НЕЙРОНОВ БОЛЬШОГО И ДОРСАЛЬНОГО ЯДЕР ШВА КРЫСЫ

© 2023 г. Б. М. Сушкевич¹, И. Б. Сиваченко¹, О. А. Любашина^{1,*}

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

*e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Нарушениям в серотонинергической системе головного мозга отводят ведущую роль в патогенезе хронической абдоминальной боли и коморбидных ей соматических гипералгезий, которые беспокоят значительную часть пациентов с заболеваниями пищеварительного тракта, даже в состоянии ремиссии. Однако конкретные изменения в ноцицептивных свойствах серотонинергических структур, которые могут быть инициированы органической патологией и сохраняться после ее разрешения, остаются неясными. Целью проведенных нами нейрофизиологических экспериментов на анестезированных крысах, здоровых и перенесших колит, являлось выявление сохраняющихся после разрешения кишечного воспаления перестроек в нейрональных реакциях большого (БЯШ) и дорсального (ДЯШ) ядер шва на висцеральное (колоректальное растяжение) и соматическое (сдавливание хвоста) болевые раздражения. Установлено, что оба ядра содержат разные группы ноцицептивных нейронов: 1) отвечающие активацией только на колоректальное растяжение (висцеральные); 2) возбуждающиеся только при сдавливании хвоста (соматические); 3) реагирующие возбуждением на оба раздражения (общие); 4) отвечающие на любую из стимуляций торможением разрядов (тормозящиеся). По сравнению со здоровыми животными, в БЯШ крыс, перенесших колит, было повышено количество тормозящихся клеток и снижена общая доля возбуждающихся ноцицептивных нейронов. Растяжение перенесшей воспаление кишки вызывало в БЯШ усиленное нейрональное торможение, тогда как сдавливание незатронутого патологией хвоста приводило к повышенному возбуждению его селективных соматических и общих ноцицептивных клеток. В свою очередь, в ДЯШ постколитных крыс доля тормозящихся нейронов была снижена, а в возросшей популяции возбуждающихся было меньше висцеральных и больше соматических ноцицептивных клеток. Это сопровождалось усилением избирательных реакций последних на соматические болевые стимулы и возрастанием неселективного возбуждения нейронов ДЯШ в ответ на висцеральные и соматические болевые сигналы. Выявленные нейрональные перестройки могут способствовать постколитному нарушению функций изученных ядер шва в эндогенном контроле висцеральной и соматической болевых чувствительностей.

Ключевые слова: большое ядро шва, дорсальное ядро шва, нейрональная активность, абдоминальная боль, соматическая боль, постколитный период

DOI: 10.31857/S004445292304006X, **EDN:** KXJGYA

ВВЕДЕНИЕ

Абдоминальная боль является одним из ведущих симптомов достаточно распространенных в настоящее время функциональных (синдром раздраженной кишки) и воспалительных (болезнь Крона, язвенный колит) заболеваний пищеварительного тракта [1–5]. По мнению большинства специалистов ведущей причиной возникновения абдоминальной боли при этих патологиях является висцеральная гиперчувствительность, т.е. повышенная чувствительность к внутрикишечным раздражителям разного рода, вследствие которой даже нормальные, физиологические стимулы воспринимаются как болевые [1, 2, 6, 7]. Развитие этого состояния в значительной мере связывают с нару-

шением серотонин-зависимых процессов обработки болевых сигналов в системе кишка–головной мозг [8–10].

При этом имеющиеся клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о существенном вовлечении в патогенез функциональных и воспалительных заболеваний кишки серотонинергической системы головного мозга. В частности, на перестройки в данной системе указывают наблюдающиеся при этих патологиях изменения метаболизма серотонина в разных церебральных структурах. Так, в клиническом исследовании показано, что у женщин с синдромом раздраженной кишки (СРК) уровень синтеза серотонина в правой медиальной височной извилине (мультимодальная сен-

сорная ассоциативная кора) выше, чем у здоровых женщин [11]. В свою очередь, у крыс в модели СРК, развивающегося вследствие неонатального отделения от матери, было продемонстрировано более высокое по сравнению с контрольными животными соотношение 5-гидроксииндолуксусная кислота/серотонин (т.е. более активный оборот серотонина) в стволе мозга [12]. Однако указанные выше сведения были получены безотносительно их связи с изменениями в уровне висцеральной ноцицепции. Между тем другими авторами было доказано, что кишечная гиперчувствительность, наблюдающаяся у неонатально отделенных от матери животных, ассоциирована с повышенными уровнями экспрессии серотонина и триптофан-гидроксилазы, а также увеличенным количеством активирующихся в ответ на болевое колоректальное растяжение серотонинергических нейронов в дорсальном ядре шва [13, 14].

Наряду с этим при висцеральной гиперчувствительности, сопровождающей текущее кишечное воспаление у крыс, были отмечены усиленные продукции *c-fos* белков и провоспалительных цитокинов в большом и дорсальном ядрах шва [15–17], а также облегченная активация нейронов большого ядра шва висцеральными и соматическими болевыми стимулами [18]. У животных с поствоспалительной кишечной гиперчувствительностью наблюдались повышенные уровни экспрессии серотонина, его 5-HT_{2A} и 5-HT₇ рецепторов, а также снижение продукции серотонинового транспортера (SERT) в гипоталамусе [19]. Эти данные свидетельствуют о вызываемых органической патологией нейропластических перестройках в серотонинергической системе мозга, которые могут приводить к долгосрочным изменениям в процессах контроля ее структурами не только висцеральной, но и соматической болевой трансмиссии. Однако как обеспечивающие такие процессы нейрофизиологические механизмы, так и изменения в них, которые могут способствовать развитию висцеральной и соматической гиперчувствительностей, до сих пор остаются неясными.

Ключевыми серотонинергическими структурами, вовлеченными в супраспинальные механизмы болевой чувствительности, являются большое и дорсальное ядра шва [20–22]. Их прямые или опосредованные нижележащими стволовыми структурами проекции к задним рогам спинного мозга контролируют спинальную ноцицептивную трансмиссию [21–24]. С другой стороны, пути от дорсального ядра шва к таламусу, лимбическим субкортикальным и кортикальным структурам способны модулировать перцептуальный, эмоционально-аффективный и когнитивный компоненты системной реакции организма на боль [22, 25]. В свою очередь, болевая информация из разных областей тела, которая поступает в большое и дорсальное ядра шва непосредственно по

спиноретикулярному и спиноталамическому трактам, а также опосредованно через парабрахияльный комплекс моста, определяет уровень функциональной активности этих структур, необходимой для реализации их анти- или проноцицептивных влияний [26–28]. Нарушение нейрональных процессов обработки болевых сигналов в этих ядрах связывают с дисфункцией центральных механизмов контроля болевой чувствительности и считают одной из причин развития хронических болевых синдромов [28–30]. Однако степень выраженности и характер изменений в ноцицептивных свойствах нейронов большого и дорсального ядер шва, которые могут быть инициированы кишечным воспалением и сохраняться после него, являются практически неисследованными. Это существенно сдерживает разработку эффективных методов лечения хронической абдоминальной боли и коморбидных ей соматических гипералгезий, от которых страдает значительная часть пациентов с воспалительными заболеваниями кишки в стадии ремиссии и пациентов с СРК поствоспалительного генеза.

Поэтому целью проведенных нами нейрофизиологических экспериментов на анестезированных крысах являлось выявление инициированных колитом перестроек в нейрональных реакциях большого (БЯШ) и дорсального (ДЯШ) ядер шва на висцеральные и соматические болевые сигналы, которые сохраняются после разрешения кишечного воспаления.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 38 взрослых самцах крыс линии Вистар (Wistar) с массой тела от 280 до 360 г, полученных из Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эксперименты проводили на двух группах крыс: с исходно интактной толстой кишкой (здоровый контроль, 20 животных) и перенесших экспериментальный колит (18 особей). Колит инициировали по методу Morris и соавт. [31]. Для этого с использованием приемов, которые были подробно описаны ранее [32–34], в ободочную кишку животного при помощи инсулинового шприца, снабженного 7-сантиметровым полиэтиленовым катетером, трансректально вводили спиртовой раствор пикрилсульфониевой кислоты (TNBS, Sigma-Aldrich, США; 20 мг в 0.25 мл 50%-ного раствора этанола). Опыты начинали через 29–45 дней после инъекции, в период полного исчезновения внешних признаков

кишечного воспаления (плохой аппетит, размягченный или жидкий стул, потеря веса).

Животных контрольной и экспериментальной групп после 16-часовой пищевой депривации со свободным доступом к воде анестезировали внутрибрюшинным введением смеси уретана (800 мг/кг; Sigma-Aldrich, США) и альфа-хлоралозы (60 мг/кг; ICN Biomedicals, США). После достижения хирургического уровня анестезии в бедренные артерию и вену устанавливали катетеры для регистрации артериального давления с помощью полупроводникового датчика MLT0670 (ADInstruments, Великобритания) и дополнительного внутривенного введения анестезирующей смеси (в случае необходимости). Для облегчения процесса дыхания в условиях эксперимента производили трахеостомию с помощью полиэтиленовой трубки. После этого голову крысы закрепляли в стереотаксическом приборе (Медикор, Венгрия). Посредством рассечения мягких тканей обеспечивали доступ к дорсальной поверхности черепа в области брегмы, сагиттального шва и межтеменной кости. Затем с помощью портативной стоматологической бормашины (БЭБП-3, Россия) аккуратно, не задевая верхний сагиттальный и поперечный венозные синусы, просверливали отверстие в зоне проекции на кости черепа БЯШ или ДЯШ согласно стандартному атласу мозга крысы [35]. На одном животном исследовали нейрональную активность только одного ядра шва. Отверстие для доступа к БЯШ было локализовано в левой части межтеменной кости от 8.0 до 12.0 мм каудальнее брегмы и от 0.0 до 2.0 мм латеральнее средней линии. Отверстие для доступа к ДЯШ выполнялось в левой теменной кости 7.0–9.0 мм каудальнее брегмы и 0.2–2.0 мм латеральнее средней линии. Подлежащую твердую мозговую оболочку аккуратно, стараясь не повредить венозные синусы, надсекали. Открытую ткань мозга смачивали теплым физиологическим раствором. Показателем адекватности анестезии в ходе эксперимента служила стабильность уровня системного артериального давления. В случае существенных колебаний или повышения этого показателя в отсутствие каких-либо стимуляционных воздействий осуществляли дополнительное внутривенное введение анестезирующей смеси. Температуру тела животного контролировали ректально и поддерживали в пределах 37.0–38.0°C при помощи подогревающей пластины и водяного термостата (U-10, Германия).

Внеклеточную регистрацию нейрональной активности ядер шва производили вольфрамовыми микроэлектродами с диаметром кончика 1 мкм и сопротивлением в 1 МОм (World Precision Instruments, США). Стальной игольчатый индифферентный электрод закрепляли в контралатеральной височной мышце. В области БЯШ регистрирующий микроэлектрод локализовали в зоне, расположенной 9.5–11.6 мм каудальнее брегмы и 0.0–0.6 мм латеральнее средней линии на глубине 9.6–10.2 мм от

поверхности мозга. Для регистрации нейронов в области ДЯШ микроэлектрод погружали в зону, расположенную 7.6–8.7 мм каудальнее брегмы и 0.2–0.8 мм латеральнее средней линии на глубине 6.0–6.7 мм от поверхности мозга. Поиск нейронов в исследуемых структурах осуществляли посредством вертикального перемещения микроэлектрода с шагом в 4 мкм при помощи электронного погружающего устройства (МП-2, Россия). Регистрируемые сигналы импульсной активности нейронов после усиления и фильтрации в диапазоне частот 400–5000 Гц (DAM 80, WPI, США) подавали на вход звуковой карты компьютера, визуализировали и сохраняли посредством программы Audition 3 (Adobe Corp, США).

В качестве висцерального болевого раздражения применяли растяжение колоректальной области толстой кишки с помощью резинового баллона длиной 7 см, раздуваемого воздухом до давления 80 мм рт.ст. с использованием автоматического шприцевого насоса (ДШ-09, Висма-Планар, Беларусь). Соматическая болевая стимуляция заключалась в механическом сдавливании хвоста животного с помощью сенсорного пинцета (нагрузка 650–900 г), контролируемого алгезиметром BIO-RP-R (Bioseb SAS, Франция). Показателем ноцицептивного характера раздражений являлось вызываемое ими изменение уровня системного артериального давления. Запись нейрональных реакций на определенное болевое воздействие производили на трехминутном интервале: 60 с до стимуляции (фоновый показатель), 30 с во время колоректального растяжения или сдавливания хвоста и 90 с после них. Интервал между соседними раздражениями составлял не менее 3 мин. У каждого животного регистрацию производили в 7–15 точках локализации кончика микроэлектрода, отстоящих друг от друга не менее, чем на 150 мкм. Последующий анализ записей с селекцией нейрональных разрядов по форме выполняли в программе Spike 2 (CED, Великобритания). В каждой записи было выделено от 3 до 10 импульсных последовательностей. Для разных импульсных потоков определяли среднюю частоту разрядов в секунду на последовательных временных интервалах до, в период болевого раздражения и после него. Нейроны считали отвечающими на ноцицептивную стимуляцию, если частота их разрядов во время раздражения изменялась по отношению к ее фоновому уровню не менее чем на 15%.

По окончании каждого эксперимента осуществляли эвтаназию животного путем внутривенного введения трехкратной дозы анестезирующей смеси и выполняли электролитическое разрушение ткани мозга посредством пропускания через регистрирующий электрод постоянного тока отрицательной полярности силой 0.5–1.2 мА в течение 40 с. Локализацию мест регистрации производили на обработанных стандартными гистологическими

методами (метод Ниссля) срезах мозга толщиной 40 мкм с использованием атласа мозга крысы [35]. В случае локализации кончика регистрирующего микроэлектрода за пределами границ исследуемых структур результаты нейрофизиологического исследования данного животного были исключены из дальнейшего анализа. По завершении каждого опыта у здоровых крыс и животных, перенесших колит, был осуществлен забор фрагмента толстой кишки длиной 8 см от анального отверстия для визуального анализа и последующего окрашивания (эозин и гематоксилин) с целью исключения спонтанной патологии у животных, отнесенных к группе здоровых, и контроля состояния кишки у крыс постколитной группы.

Статистическую обработку, сравнение и графическое оформление результатов, полученных в разных ядрах шва у контрольных и перенесших кишечное воспаление животных, производили с помощью программных пакетов Origin 2017 (OriginLab, США) и GraphPad InStat 3.02 (GraphPad Software, США). Статистический анализ данных, характеризующих внутригрупповые изменения в нейрональной активности, осуществляли с использованием непараметрических методов для парных или независимых измерений (тест Фридмана и парный тест Вилкоксона). Для межгрупповых сравнений применяли непараметрические тесты для непарных или независимых измерений (тесты Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни–Вилкоксона). Применение непараметрических тестов было связано с отклонением анализируемых выборок от нормального распределения (тест Шапиро–Уилка). Данные представлены как медиана [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Для сравнения количественного содержания нейронов различного типа между исследуемыми ядрами шва у контрольных животных и крыс, перенесших колит, использовали критерий Хи-квадрат (для сравнения частоты признака, имеющего три и более значений) и точный тест Фишера (для сравнения частоты признака, имеющего два значения). Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 10 здоровых крыс и 9 животных, перенесших колит, нейрональная активность была зарегистрирована в левой части БЯШ (рис. 1а). У такого же количества крыс из контрольной и постколитной групп изученные нейроны были локализованы в ДЯШ, преимущественно в его левой вентролатеральной области (рис. 1б). Во время острого течения колита (на 7-й день после внутрикишечного введения спиртового раствора пикрилсульфоновой кислоты) животные экспериментальной группы демонстрировали сниженный аппетит, диарею и существенную потерю веса (на 22.2 [20.0; 27.1]% от исходного; $p < 0.001$, парный тест Вилкоксона).

Однако ко дню проведения эксперимента (29–45 дней после внутрикишечного введения) их общее состояние и вес не отличались от таковых у здоровых животных (для веса: 330 [310; 350] г, $n = 19$ vs. 318 [290; 340] г, $n = 20$; $p = 0.14$, $U = 128.5$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона). Макроскопическое и микроскопические исследования толстой кишки постколитных животных не выявили в ней визуально выраженных повреждений.

Ноцицептивная активность нейронов большого и дорсального ядер шва в норме

В группе здоровых животных была изучена активность 589 нейронов БЯШ и 1153 нейронов ДЯШ. Из них 485 (83.3%) клеток в БЯШ и 1020 (88.5%) нейронов ДЯШ демонстрировали существенное усиление или торможение своей импульсной активности (для разных реакций: $p < 0.001$, парный тест Вилкоксона) в ответ на висцеральную и/или соматическую болевые стимуляции. Остальные 104 (17.7%) клетки в БЯШ и 133 (11.5%) нейрона в ДЯШ не изменяли частоту разрядов во время применяемых болевых раздражений (во всех случаях: $p > 0.05$, парный тест Вилкоксона). Доля таких клеток в БЯШ была существенно больше, чем в ДЯШ ($p < 0.001$, точный тест Фишера). Они рассматривались как индифферентные к ноцицепции и были исключены из дальнейшего анализа.

Среди реагирующих на болевые воздействия нейронов в обоих ядрах были выделены четыре группы: 1) возбуждающиеся только при висцеральной болевой стимуляции (висцеральные ноцицептивные); 2) отвечающие усилением активности только на соматический болевой стимул (соматические ноцицептивные); 3) реагирующие возбуждением на оба болевых раздражения (общие ноцицептивные); 4) тормозящие свою импульсную активность при любом из воздействий (тормозящиеся; рис. 2).

В БЯШ частоты исходной (фоновой) импульсной активности указанных групп ноцицептивных нейронов существенно не различались ($p = 0.05$, $KW = 7.7$, тест Краскела–Уоллиса). В свою очередь, относящиеся к разным ноцицептивным группам нейроны ДЯШ характеризовались отличающимися частотами фоновых разрядов ($p < 0.001$, $KW = 58.7$). Среди них максимальной частотой фоновой активности обладали тормозящиеся нейроны (для всех сравнений с другими группами: $p = 0.0017–0.0001$, $U = 16855–32486$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона), а минимальной – общие ноцицептивные клетки (для всех сравнений: $p = 0.005–0.0001$, $U = 16855–37175$; табл. 1). При этом средняя частота фоновых разрядов всех возбуждающихся ноцицептивных нейронов в ДЯШ была ниже, чем у таковых в БЯШ (0.9 [0.6; 1.5] имп/с, $n = 422$ vs. 1.7 [1.1; 2.6] имп/с, $n = 764$; $p < 0.001$, $U = 87326$).

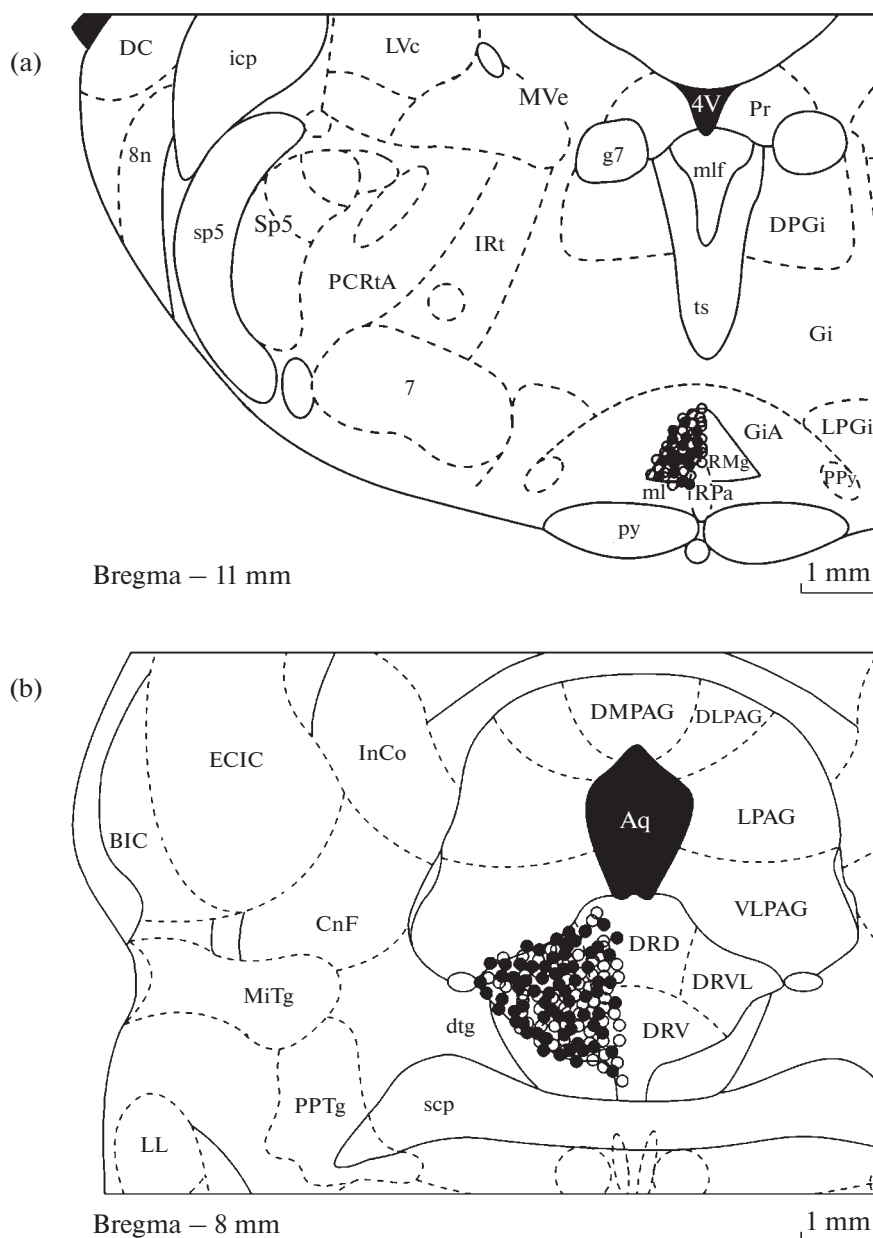


Рис. 1. Локализация мест регистрации нейронов в большом (а) и дорсальном (б) ядрах шва у здоровых (темные символы) и перенесших колит (светлые символы) крыс. Каждый символ соответствует локализации нескольких изученных нейронов. Схемы срезов адаптированы из стандартного атласа мозга крысы [35].

Обозначения на (а): 4V – IV желудочек мозга, 7 – ядро лицевого нерва, 8n – преддверно-улитковый нерв, DC – дорсальное ядро улитки, DPGi – дорсальное парагигантоклеточное ядро, g7 – колено лицевого нерва, Gi – гигантоклеточное ретикулярное ядро, GiA – часть альфа гигантоклеточного ретикулярного ядра, icp – нижняя ножка мозжечка, IRt – промежуточное ретикулярное ядро, LPGi – латеральное парагигантоклеточное ядро, LVc – латеральное вестибулярное ядро, MVe – медиальное вестибулярное ядро, PCRtA – часть альфа ретикулярного ядра, PPy – парapiрамидное ядро, Pr – предлежащее ядро, py – пирамидный тракт, RMg – большое ядро шва, RPa – бледное ядро шва, sp5 – спинальный тройничный тракт, Sp5 – спинальное ядро тройничного нерва, ts – покрывочно-спинномозговой путь. Обозначения на (б): Aq – Сильвиев водопровод, BIC – ядро плеча нижнего двухолмия, CnF – клиновидное ядро, DRD – дорсальная часть дорсального ядра шва, DRV – вентральная часть дорсального ядра шва, DRVL – вентролатеральная часть дорсального ядра шва, dtg – пучок дорсального ядра покрывки, ECIC – внешняя кора нижнего двухолмия, InCo – межколликлярное ядро, LL – латеральный лемнис, MiTg – мелкоклеточное ядро покрывки, DLPAG – дорсолатеральная колонка околводопроводного серого вещества, DMPAG – дорсомедиальная колонка околводопроводного серого вещества, LPAG – латеральная колонка околводопроводного серого вещества, VLPAG – вентролатеральная колонка околводопроводного серого вещества, PPTg – педункулопонтинное ядро покрывки, scp – верхняя ножка мозжечка.

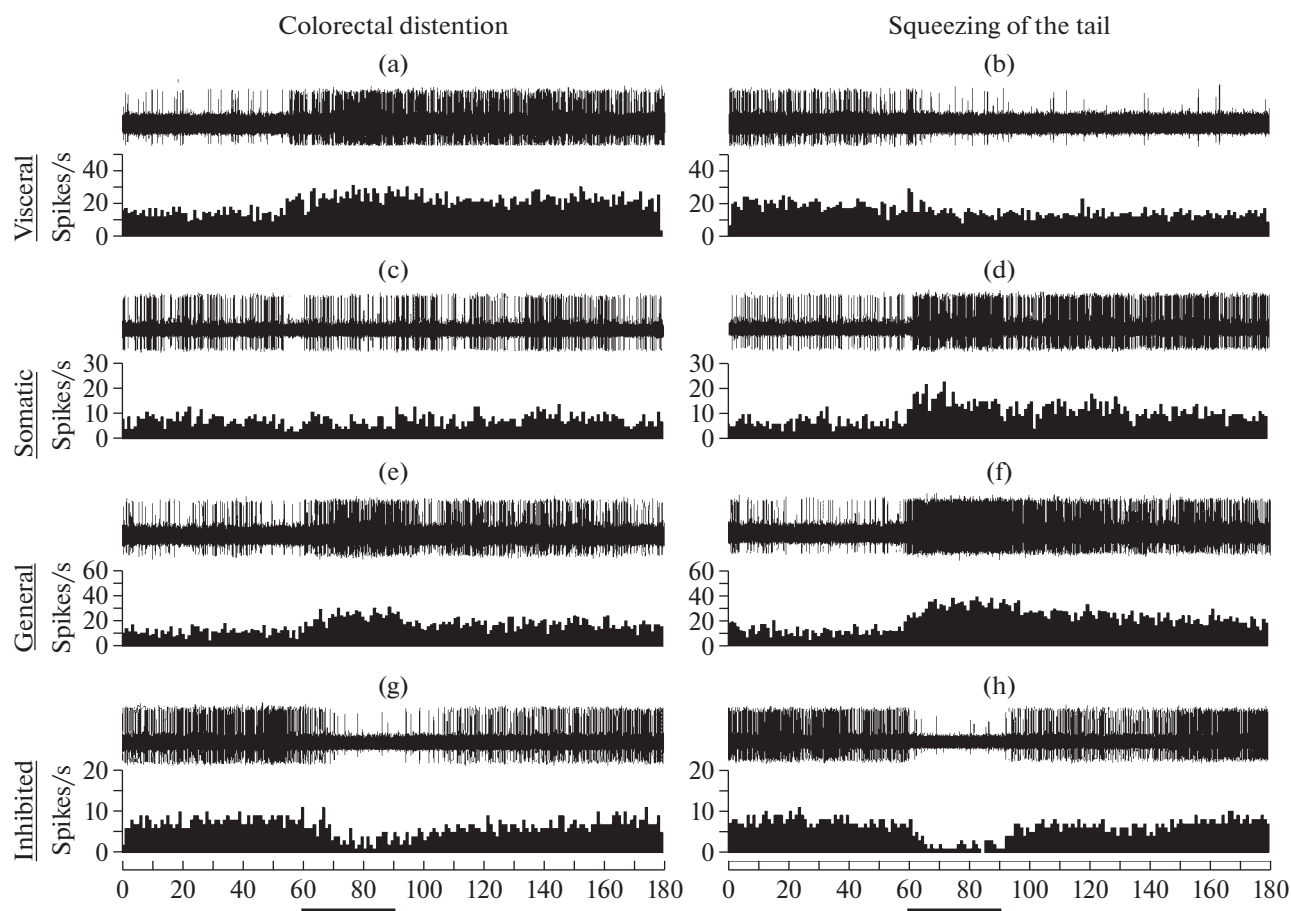


Рис. 2. Типичные примеры ноцицептивной активности нейронов большого (g–h) и дорсального (a–f) ядер шва, относящихся к различным функциональным группам. (a–h) Нативные записи импульсной активности (верхняя часть) и соответствующие частотные гистограммы (нижняя часть), демонстрирующие ответы висцерального (a, b), соматического (c, d), общего (e, f) и тормозящегося (g, h) ноцицептивных нейронов на болевое колоректальное растяжение (colorectal distension) и сдавливание хвоста (squeezing of the tail). По оси абсцисс – время в секундах, по оси ординат – частота разрядов (имп/с). Бин гистограммы – 1 с. Горизонтальные отрезки – время действия раздражения.

БЯШ и ДЯШ также отличались по процентному содержанию разных типов ноцицептивных нейронов. В частности, наблюдались статистически значимые различия между ядрами по соотношению в них тормозящихся нейронов и общего числа возбуждающихся при разных болевых воздействиях клеток ($p < 0.001$, точный тест Фишера). При этом БЯШ содержало существенно меньшую, чем в ДЯШ, долю тормозящихся нейронов при большем числе возбуждающихся (табл. 1). Однако в ДЯШ среди последних было отмечено большее, чем в БЯШ, процентное содержание висцеральных и общих ноцицептивных клеток при меньшей доле соматических ($p < 0.001$, $\chi^2 = 17.9$, критерий Хи-квадрат). Для ДЯШ также были характерны более выраженные, чем в БЯШ, реакции общих ноцицептивных нейронов на висцеральные ($p = 0.03$, $U = 15821$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона) и соматические болевые стимулы ($p = 0.02$, $U = 15588$), а также соматических и тормозящихся нейронов – на соматиче-

ское болевое раздражение (соответственно, $p < 0.01$, $U = 33764$ и $p = 0.046$, $U = 6757$; табл. 1). Селективные соматические нейроны ДЯШ по сравнению с таковыми в БЯШ также демонстрировали более выраженное торможение активности при висцеральном болевом раздражении ($p = 0.04$, $U = 34821$), тогда как тормозящиеся клетки реагировали на этот же стимул менее интенсивно ($p = 0.02$, $U = 6486$).

Ноцицептивные свойства нейронов большого и дорсального ядер шва в постколитный период

У животных, перенесших колит, было зарегистрировано 590 нейронов в области БЯШ и 821 клетка – в ДЯШ. Из них 530 (89.8%) клеток в БЯШ и 730 (88.9%) нейронов ДЯШ в ответ на висцеральное и/или соматическое болевое раздражение демонстрировали выраженные изменения импульсной активности разной направленности (для

разных ответов: $p < 0.001$, парный тест Вилкоксона). Остальные 60 (10.2%) клеток в БЯШ и 91 нейрон (11.1%) в ДЯШ были индифферентными к болевым сигналам. По сравнению со здоровыми животными, БЯШ постколитных крыс характеризовалось повышенным количеством реагирующих на болевые воздействия нейронов при сниженной доле индифферентных ($p < 0.001$, точный тест Фишера), тогда как в ДЯШ это соотношение существенно не изменялось ($p = 0.77$).

Между тем среди отвечающих на болевые стимулы нейронов БЯШ в постколитный период наблюдалось увеличение числа тормозящихся и снижение доли возбуждающихся ноцицептивных нейронов ($p < 0.01$, точный тест Фишера; рис. 3а). При этом среди последних соотношение клеток, относящихся к висцеральной, соматической или общей группам, оставалось без значимых изменений ($p = 0.16$, $\chi^2 = 3.7$, критерий Хи-квадрат; рис. 3б). Напротив, ДЯШ животных, перенесших колит, содержало меньшее, чем в норме, количество тормозящихся нейронов и большее число возбуждающихся ($p < 0.001$, точный тест Фишера; рис. 3с), превосходя по данному показателю ноцицептивной возбудимости БЯШ ($p < 0.001$, точный тест Фишера). В этих условиях было отмечено также изменение в распределении возбуждающихся ноцицептивных клеток ДЯШ по функционально различным группам ($p < 0.001$, $\chi^2 = 17.6$, критерий Хи-квадрат), которое проявлялось в существенном увеличении популяции селективных соматических нейронов при уменьшении доли висцеральных ($p < 0.001$, точный тест Фишера; рис. 3д).

Для постколитного периода было характерным снижение частоты фоновых разрядов у всех групп возбуждающихся ноцицептивных нейронов БЯШ: висцеральных ($p = 0.02$, $U = 1549$, тест Манна-Уитни-Вилкоксона), соматических ($p < 0.001$, $U = 18658$) и общих ($p < 0.001$, $U = 3783$; рис. 4а). Последнее в этих условиях проявляло минимальный уровень фоновой активности, существенно отличавшийся от такового у висцеральных ($p < 0.001$, $U = 2522$) и соматических ($p < 0.001$, $U = 8874$), а также тормозящихся клеток ($p < 0.001$, $U = 3177$). При этом по сравнению с нормой усиливалось селективное торможение нейронов БЯШ при поступлении к ним как висцеральных ($p < 0.001$, $U = 22643$; рис. 4б), так и соматических болевых сигналов ($p = 0.01$, $U = 1501$; рис. 4с). Одновременно сдавливание незатронутого патологией хвоста вызывало более выраженное, чем в норме, возбуждение селективных соматических и общих ноцицептивных клеток данного ядра (соответственно, $p < 0.001$, $U = 21677$ и $p < 0.001$, $U = 5852$; рис. 4с). Последние также демонстрировали усиление реактивности к растяжению перенесшей воспаление кишки ($p < 0.01$, $U = 5988$), в то время как реакции селективных висцеральных нейронов БЯШ на дан-

Таблица 1. Характеристики ноцицептивных нейронов большого (RMg) и дорсального (DR) ядер шва крысы в норме

Тип нейронов	Количество (процент)		Фоновая активность (имп/с)		Реакция на КРР (% от уровня фоновой активности)		Реакция на сдавливание хвоста (% от уровня фоновой активности)	
	RMg	DR	RMg	DR	RMg	DR	RMg	DR
Тормозящ.	63 (13.0%)	256 (25.1%) ^{&&&}	1.3 [0.9; 2.2]	1.3 [0.8; 2.2] ^{###}	-19.3 [-30.9; -3.8]	-14.2 [-23.5; 0.2] [*]	-19.4 [-36.7; -8.6]	-26.2 [-49.6; -11.7] [*]
Возбужд.	422 (87.0%)	764 (74.9%) ^{&&&}						
висцеральн.	56 (13.3%)	161 (21.1%) ^{&&&}	2.0 [0.9; 4.1]	1.0 [0.5; 2.0] ^{###,††}	27.0 [19.6; 38.1]	30.5 [22.6; 46.2]	-2.8 [-14.5; 5.3]	-6.3 [-24.5; 4.2]
соматич.	233 (55.2%)	333 (43.6%) ^{&&&&}	1.7 [1.2; 2.5]	0.9 [0.7; 1.5] ^{###,†††}	-1.8 [-11.7; 7.1]	-5.0 [-15.0; 4.5] [*]	41.1 [23.4; 79.5]	49.6 [28.1; 102.3] ^{**}
общие	133 (31.5%)	270 (35.3%) ^{&}	1.6 [1.0; 2.7]	0.8 [0.6; 1.3] ^{†††}	29.7 [20.4; 44.6]	36.1 [24.2; 52.4] [*]	47.6 [27.9; 95.2]	60.4 [32.7; 128.1] [*]

Примечание. Данные представлены как медиана с межквартильными интервалами (Me [Q1; Q3]). КРР – болевое колоректальное растяжение. Значимые различия между DR и RMg: [&] – $p < 0.05$, ^{&&} – $p < 0.01$, ^{&&&} – $p < 0.001$, точный тест Фишера; ^{*} – $p < 0.05$, ^{**} – $p < 0.01$, тест Манна-Уитни-Вилкоксона. Значимые различия между нейронами DR и его другими нейрональными группами: ^{##} – $p < 0.01$, ^{###} – $p < 0.001$, тест Манна-Уитни-Вилкоксона. Значимые различия между «Тормозящимися» нейронами DR и другими нейрональными группами: ^{††} – $p < 0.01$, ^{†††} – $p < 0.001$, тест Манна-Уитни-Вилкоксона.

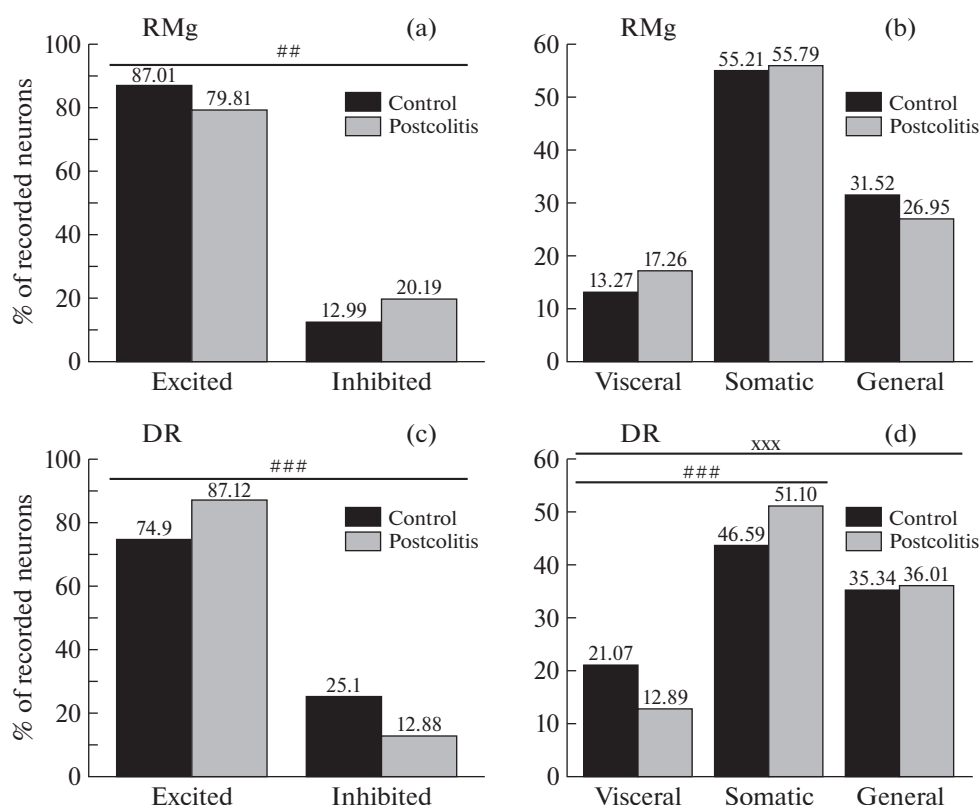


Рис. 3. Постколитные изменения в представительстве нейронов большого (RMg) и дорсального (DR) ядер шва, относящихся к разным ноцицептивным группам. (а, с) Процентное соотношение возбуждающихся (Excited) и тормозящихся (Inhibited) при болевых воздействиях клеток. По оси ординат – % от всех зарегистрированных нейронов. (b, d) Процентное представление висцеральных (Visceral), соматических (Somatic) и общих (General) ноцицептивных нейронов. По оси ординат – % от общего количества возбуждающихся нейронов. На (а, с, d), значимые различия между группами здорового контроля (Control) и перенесшей колит (Postcolitis): ^{xxx} – $p < 0.001$, тест Хи-квадрат; ^{##} – $p < 0.01$, ^{###} – $p < 0.001$, точный тест Фишера.

ную стимуляцию оставались без существенных изменений ($p = 0.24$, $U = 1799$; рис. 4b).

В свою очередь, в ДЯШ крыс, перенесших колит, сниженная по сравнению с нормой фоновая активность была отмечена у возбуждающихся висцеральных ($p < 0.01$, $U = 5155$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона) и общих ноцицептивных нейронов ($p < 0.01$, $U = 26070$), а также в группе тормозящихся клеток ($p = 0.02$, $U = 10005$; рис. 5a). Частота фоновых разрядов последних в этих условиях была существенно ниже этого показателя у тормозящихся нейронов БЯШ ($p < 0.01$, $U = 3730$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона), хотя в норме от него не отличалась. Несмотря на снижение уровня фоновой активности общих ноцицептивных нейронов ДЯШ, в постколитный период наблюдалось усиление их возбуждения в ответ как на висцеральное ($p < 0.01$, $U = 26356$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона; рис. 5b), так и соматическое ($p < 0.001$, $U = 23396$; рис. 5c) болевые воздействия. Это сопровождалось также ростом селективного возбуждения соматических клеток этого ядра при поступлении к ним болевых

сигналов от хвоста ($p < 0.001$, $U = 45289$). В свою очередь, реакции висцеральных ноцицептивных нейронов ДЯШ на растяжение перенесшей воспаления кишки, как и на сдавливание незатронутого патологией хвоста, не претерпели существенных изменений ($p = 0.22$, $U = 5958$ и $p = 0.92$, $U = 6548$ соответственно; рис. 5b, c).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе данные свидетельствуют, что реципиентами висцеральных и соматических болевых сигналов в БЯШ и ДЯШ являются отличающиеся по функциональным характеристикам популяции нейронов. Помимо общих ноцицептивных нейронов, реагирующих возбуждением на оба вида стимулов, изученные структуры серотонинергической системы содержат популяции нервных клеток, дифференцированным образом отвечающие на висцеральное и соматическое болевые воздействия (висцеральные и соматические ноцицептивные соответственно). Отдельную группу составляют нейроны, реагирующие на любой из

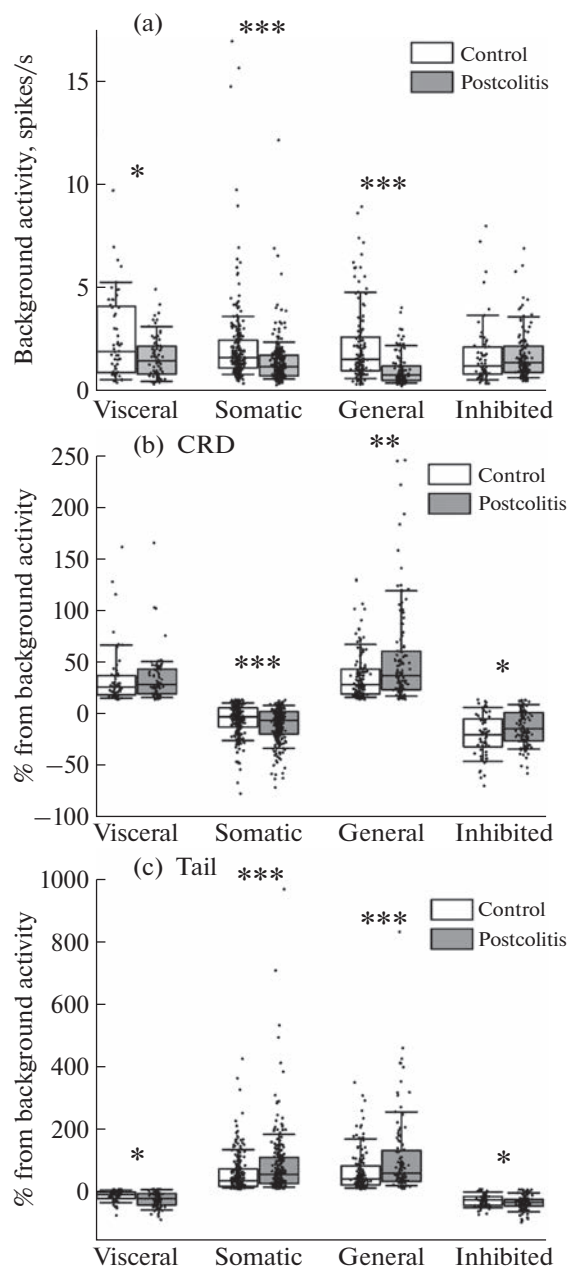


Рис. 4. Вызванные колитом изменения в фоновой и вызванной импульсных активностях ноцицептивных нейронов большого ядра шва, относящихся к висцеральной (Visceral), соматической (Somatic), общей (General) и тормозящейся (Inhibited) группам. (а) Фоновая активность. По оси ординат – частота разрядов, имп/с. (b, c) Реакции на висцеральное (b) и соматическое (c) болевые раздражения. По оси ординат – % изменения частоты импульсации от уровня фона. CRD – болевое колоректальное растяжение, Tail – сдавливание хвоста. На (а–с), верхняя и нижняя границы каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й проценти соответственно), горизонтальная линия внутри – медиана (50-й процентиль), концы отрезков – 10-й и 90-й проценти, точки – индивидуальные значения в выборке. Значимые различия между группами здорового контроля (Control) и перенесшей колит (Postcolitis): * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона.

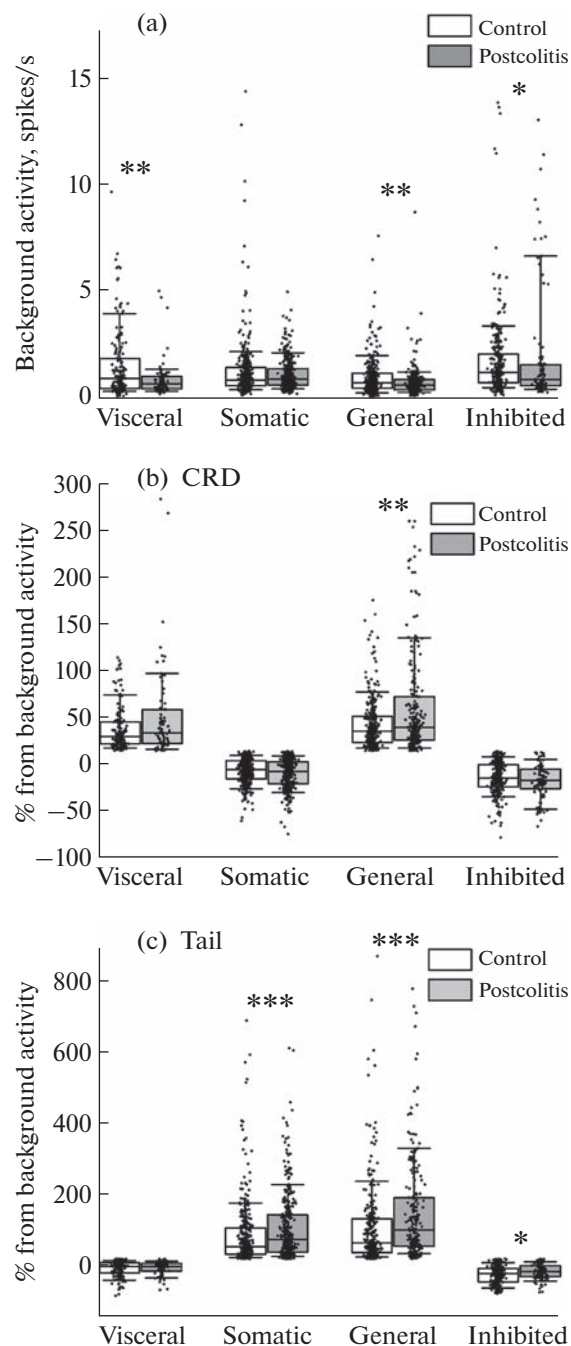


Рис. 5. Постколитные изменения в фоновой и вызванной импульсных активностях ноцицептивных нейронов дорсального ядра шва, относящихся к висцеральной (Visceral), соматической (Somatic), общей (General) и тормозящейся (Inhibited) группам. (а) Фоновая активность. По оси ординат – частота разрядов, имп/с. (b, c) Реакции на висцеральное (b) и соматическое (c) болевые раздражения. По оси ординат – % изменения частоты импульсации от уровня фона. CRD – болевое колоректальное растяжение, Tail – сдавливание хвоста. Значимые различия между группами здорового контроля (Control) и перенесшей колит (Postcolitis): * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, тест Манна–Уитни–Вилкоксона. Остальные обозначения как на рис. 4.

болевых стимулов торможением импульсной активности (тормозящиеся ноцицептивные нейроны). Впервые установлено, что следствием перенесенного кишечного воспаления является увеличение в БЯШ количества тормозящихся ноцицептивных нейронов и снижение доли клеток, возбуждающихся при действии соматических и/или висцеральных болевых раздражителей. При этом по сравнению с нормой усиливается селективное торможение нейронов БЯШ при поступлении к ним болевых сигналов разного вида, особенно исходящих от перенесшей воспаление кишки, но существенно возрастает возбуждение его селективных соматических и общих ноцицептивных клеток при сдавливании незатронутого патологией хвоста. В свою очередь, ДЯШ в постколитный период характеризуется увеличением доли в нем возбуждающихся при разных болевых воздействиях нейронов при снижении количества тормозящихся, а также сокращением представительства селективных висцеральных ноцицептивных клеток с увеличением числа соматических ноцицептивных. Это сопровождается усилением избирательных реакций последних на соматические болевые стимулы и повышением уровня недифференцированного возбуждения общих ноцицептивных нейронов ДЯШ в ответ на висцеральные и соматические болевые воздействия.

Продemonстрированные нами особенности реакций нейронов БЯШ на висцеральные и соматические болевые раздражители согласуются с данными других нейрофизиологических исследований этого ядра. Ранее в области БЯШ крысы были обнаружены клетки, которые в ответ на болевую термическую стимуляцию хвоста демонстрировали усиление или торможение импульсной активности, непосредственно предшествующие реализации ноцицептивного рефлекса его одергивания. Такие нейроны были обозначены как клетки “включения” и “выключения” (ON- и OFF-клетки) соответственно. Те нейроны БЯШ, которые не реагировали на соматическую болевую стимуляцию, были отнесены к нейтральным или NEUTRAL-клеткам [20, 36]. Было установлено, что ON-клетки ингибируются морфином, и поэтому их рассматривают в качестве элементов возбуждающей проноцицептивной системы. Тогда как OFF-клетки активируются под действием морфина и, как полагают, связаны с механизмами антиноцицепции [20, 37, 38]. В нашем исследовании были обнаружены сходные по свойствам группы нейронов БЯШ, которые отвечали однонаправленными реакциями усиления или торможения активности как на соматическое, так и висцеральное болевое раздражение, либо не реагировали ни на один из применяемых нами стимулов, позволяя рассматривать их в качестве функциональных аналогов, описанных выше ON-, OFF- и NEUTRAL-клеток соответственно. Однако, поскольку мы не могли по условиям наших экспериментов напря-

мую использовать данную функциональную классификацию, которая изначально была основана на сопоставлении реакций нейронов БЯШ на болевую термическую стимуляцию хвоста с реализацией ноцицептивной реакции его одергивания [36], мы обозначили такие зарегистрированные нами клетки, как общие возбуждающиеся и тормозящиеся ноцицептивные нейроны, либо индифферентные.

Между тем в более подробных исследованиях БЯШ рядом исследователей было показано наличие диссоциации между реакциями его клеток на соматические и висцеральные болевые стимулы, выразившейся в том, что некоторые его нейроны, которые являлись ON-клетками (т.е. возбуждались) при соматической болевой стимуляции, реагировали как OFF- или NEUTRAL-клетки (т.е. тормозили свою активность или ее не изменяли) при действии висцерального болевого раздражителя. Аналогично нейроны БЯШ, проявившие себя в отношении соматической ноцицепции как OFF-клетки, могли являться ON- или NEUTRAL-клетками для висцеральной болевой трансмиссии [39–41]. В нашем исследовании также были зарегистрированы нейроны БЯШ, демонстрирующие дифференцированные реакции на разные виды боли. Такие нейроны были впервые выделены нами в отдельные функциональные группы. Те из них, что проявляли возбуждающие (т.е. ON-подобные) реакции только лишь при поступлении соматического болевого сигнала, были отнесены к соматическим ноцицептивным клеткам БЯШ, а те, которые избирательно активировались только лишь при висцеральной болевой стимуляции, — к висцеральным ноцицептивным.

Аналогичные указанным выше популяции общих возбуждающихся или тормозящихся, а также селективных соматических и висцеральных ноцицептивных нейронов были впервые обнаружены нами в ДЯШ. Реакции клеток последнего на разные виды болевых сигналов на данный момент мало изучены. В доступной литературе имеются доказательства активации c-fos-позитивных клеток ДЯШ при действии как соматических, так и висцеральных стимулов различной природы (механических, химических, термических) [13, 42–44], а также данные о генерации его нейронами возбуждающих и тормозящих импульсных реакций на соматические болевые воздействия [45, 46]. Однако сравнительное изучение нейрональных ответов в ДЯШ на разные виды боли до настоящего времени никем не проводилось, поэтому полученные нами данные об особенностях импульсных реакций его клеток на висцеральные и соматические болевые сигналы являются новыми.

Ранее нейроны, демонстрирующие недифференцированные и селективные ответы на висцеральное (колоректальное растяжение) и соматиче-

ское (сдавливание хвоста) болевые раздражения, были продемонстрированы нами в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга крысы [47], которая представляет собой первое супраспинальное образование, осуществляющее обработку ноцицептивных сигналов от разных областей тела, поступающих в головной мозг по вентролатеральным спинальным путям [26, 27]. Сходные по свойствам популяции нервных клеток были показаны в этой области также другими исследователями [48, 49]. Кроме того, нейроны с селективными возбуждающими или тормозными ответами на активацию висцерального или соматического болевых входов были обнаружены ранее в дорсальном роге спинного мозга [50, 51], а также в переднем гипоталамусе [52], вентральном заднелатеральном и вентромедиальном ядрах таламуса [53–55]. В своей совокупности эти данные свидетельствуют о существовании на разных уровнях центральной нервной системы, вплоть до таламуса, специфических нейрональных популяций, обеспечивающих общий или селективный контроль висцеральных и соматических болевых сигналов. Продemonстрированные в нашем исследовании группы общих и селективных ноцицептивных нейронов БЯШ и ДЯШ могут являться частью таких нейрональных систем.

Нейрохимические характеристики зарегистрированных нами ноцицептивных клеток в ядрах шва на данном этапе остаются неясными. Как известно, БЯШ и ДЯШ нейрохимически являются очень гетерогенными структурами и, помимо серотонинергических нейронов, содержат клетки, синтезирующие глутамат, гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), окись азота, норадреналин, дофамин и энкефалин, которые могут сочетаться с такими нейропептидами, как вещество Р, энкефалины, соматостатин, холецистокинин, кортикотропин-рилизинг-гормон, нейропептид Y и др. [20, 22, 56–59]. При этом в разных исследованиях установлено, что в обоих ядрах серотонинергические нейроны составляют меньшую часть активирующихся при разных видах ноцицепции клеток, тогда как большинство нейронов этих структур, усиливающих (ON-подобных) или снижающих свою активность (OFF-подобных) в ответ на соматические и висцеральные болевые воздействия, не синтезируют серотонин [22, 40, 42, 43, 57, 60, 61]. Согласно имеющимся данным, кандидатами в несеротонинергические нейроны БЯШ, которые активируются при поступлении соматической болевой информации (относятся к ON-подобным), являются глутамат- и ГАМКергические клетки [62, 63]; часть последних также может синтезировать энкефалин [64]. Однако нейроны БЯШ со свойствами OFF-подобных клеток, т.е. тормозящиеся при поступлении соматических болевых сигналов, как установлено, также могут содержать ГАМК [57, 63, 65]. Что касается несеротониновых нейронов ядер шва,

которые являются реактивными к висцеральной боли, то сведения по этому поводу единичны и касаются лишь вовлечения в процессы кишечной ноцицепции нитроергических клеток в ДЯШ [66]. Очевидно, что рассмотренные выше данные являются недостаточными для высказывания однозначного предположения о нейрохимических характеристиках тех групп ноцицептивных нейронов БЯШ и ДЯШ, которые продемонстрированы в нашей работе. Предположительно, они могут включать как серотонинергические, так и глутамат-, ГАМК- и/или энкефалин-, а также нитроергические клетки в различных комбинациях. Мы не можем исключить, что часть из них также может синтезировать различные нейропептиды. Несомненно, данный аспект нуждается в дальнейшем специальном исследовании.

Как впервые показали проведенные нами эксперименты, на протяжении месяца после перенесенного кишечного воспаления наблюдается уменьшение количества нейронов БЯШ, активирующихся при висцеральных и/или соматических болевых воздействиях, с увеличением в нем доли тормозящихся при разных видах ноцицепции нейронов. В совокупности с наблюдающимся в этот период снижением фоновой активности всех групп возбуждающихся ноцицептивных клеток в этом ядре, отмеченные изменения свидетельствуют об общем усилении в нем тормозных процессов. Как установлено, нейрональное торможение в БЯШ избирательно еще более усугубляется при поступлении болевых сигналов от постколитной кишки или, в меньшей степени, от незатронутого патологией хвоста. При этом раздражение последнего вызывает более выраженное, чем в норме, возбуждение у селективных соматических и общих ноцицептивных клеток БЯШ. Такие изменения могут приводить к нарушению функций БЯШ в эндогенной системе контроля болевой чувствительности, способствуя тем самым висцеральной и соматической гипералгезиям, которые были отмечены в ранний постколитный период в наших поведенческих экспериментах [67], а также в работах других авторов [68–70].

Косвенным подтверждением могут служить результаты предыдущего исследования, в котором при острой висцеральной гипералгезии, вызванной внутрикишечным введением капсаицина, в области БЯШ было отмечено сходное описанному нами усиление тормозных (OFF-подобных) нейрональных реакций на болевые кишечную и кожную стимуляции, а наблюдавшаяся в этих условиях соматическая гиперчувствительность была ассоциирована с возрастанием возбуждающих (ON-подобных) ответов нейронов на термическое и механическое раздражения задних конечностей и хвоста [18]. Последнее было подобно сенситизации таких клеток, возникающей при непосредственном химическом раздражении кожи лап или перифериче-

ской нейропатии [71–73]. Следует отметить, что в работе Sanoja и соавт. [18] ON-подобные клетки были общими для соматической и висцеральной ноцицепции и, помимо сенситизации к кожным стимулам, также проявляли усиление реакций на болевое растяжение кишки. Аналогами таких клеток в нашем исследовании являлись общие ноцицептивные нейроны БЯШ, которые в постколитный период также проявляли усиление реактивности не только к соматическим, но, хотя и в меньшей степени, также к висцеральным болевым сигналам, позволяя предполагать однонаправленный механизм их вовлечения в сочетанное развитие висцеральной и соматической гипералгезий. В свою очередь, участие в этом процессе впервые продемонстрированных нами селективных висцеральных и соматических ноцицептивных нейронов БЯШ, по всей вероятности, обеспечивается различными механизмами, поскольку в первых из них после колита происходит усиление лишь тормозных ноцицептивных феноменов, тогда как в последних усиливаются торможение при висцеральной и возбуждение — при соматической ноцицепции. Это является дополнительным свидетельством функциональной разнородности этих нейрональных групп.

В основе выявленных нами постколитных нейрональных перестроек в БЯШ может лежать усиление в нем серотонинергической трансмиссии. Хотя прямые доказательства в пользу такого предположения на данный момент отсутствуют, хорошо известны данные о повышении уровня синтеза серотонина и усилении активности серотонинергических клеток в области этого ядра при моделировании персистирующих воспалительной и невропатической соматических болей [74–76]. При этом специальными исследованиями установлено, что селективная активация ON-подобной популяции серотонин-синтезирующих нейронов в области БЯШ способствует развитию механической и температурной гипералгезии в соматических тканях задней части тела [77, 78], в частности, за счет усиления возбуждающих серотонинергических влияний этой структуры на спинальную болевую трансмиссию [74, 77, 79]. Если кишечное воспаление способно вызвать в БЯШ сходные процессы, то они, по крайней мере, частично могут быть связаны с наблюдавшимися нами в постколитный период усилением селективного и неселективного возбуждения его нейронов при болевом сжатии хвоста. Определенный вклад в этот процесс могут вносить также локальные глутамат-зависимые механизмы, которые, как показано ранее, вовлечены в усиление ноцицептивной возбудимости клеток в области БЯШ при кишечной патологии [18].

С другой стороны, поствоспалительное повышение уровня активности серотонинергических клеток в БЯШ может также способствовать отмеченному нами усилению в нем локальной тормозной нейротрансмиссии, в том числе ноцицептив-

ной, поскольку хорошо известно тормозное действие серотонина на серотонинергические и несеротонинергические, в частности, глутамат- и ГАМК-синтезирующие, клетки данного ядра через 5-HT_{1A} ауто- и гетерорецепторы соответственно [80–83]. Одним из следствий активации локальных 5-HT_{1A} ауторецепторов может быть подавление тех серотонинергических элементов БЯШ (OFF-подобных), которые обеспечивают инициируемую им эндогенную антиноцицепцию [20, 84]. Кроме того, одной из клеточных популяций данного ядра, испытывающих в этих условиях серотонин-вызванное торможение активности, могут являться проецирующиеся к спинному мозгу ГАМКергические нейроны, которые также вовлечены в нисходящий тормозный контроль спинальной ноцицепции [57, 64]. Между тем мы не можем исключить также непосредственный вклад в постколитное усиление нейронального торможения в БЯШ, потенциально способное привести к ослаблению его антиноцицептивной функций, внутриядерных ГАМКергических механизмов, в свою очередь оказывающих тормозные влияния на серотонинергические нейроны БЯШ [80, 85, 86]. Продемонстрированные нами разнонаправленные изменения в активности выявленных групп ноцицептивных нейронов БЯШ дают основание предполагать различный вклад рассмотренных выше механизмов в постколитные перестройки каждой из них. Несомненно, данное предположение нуждается в специальном исследовании.

Как свидетельствуют результаты наших экспериментов, постколитные нейрональные изменения в ДЯШ носят противоположный характер по сравнению с таковыми в БЯШ. После перенесенного кишечного воспаления в ДЯШ наблюдаются увеличение числа возбуждающихся при разных болевых воздействиях нейронов при сокращении представительства тормозящихся ноцицептивных клеток, а также уменьшение доли селективных висцеральных ноцицептивных клеток с увеличением количества соматических ноцицептивных. Это сопровождается усилением избирательных реакций последних на соматические болевые стимулы и повышением уровня неселективного возбуждения общих ноцицептивных нейронов в ответ на висцеральные и соматические болевые воздействия. В целом эти изменения могут свидетельствовать о постколитном подъеме общего уровня реактивности (сенситизации) данного ядра к ноцицептивным сигналам разного рода, включая таковые от незатронутого патологией хвоста. Учитывая эфферентные связи ДЯШ, такая сенситизация может приводить к неадекватному текущим периферическим событиям усилению передачи им как висцеральной, так и соматической болевой информации к таким важным для контроля болевой чувствительности структурам переднего мозга, как парафасцикулярное, вентральное заднелатеральное и

центральное латеральное ядра таламуса, центральное ядро амигдалы, а также первичная соматосенсорная и медиальная префронтальная кортикальные области [22, 56, 87]. Как результат, это может способствовать недифференцированному усилению обеспечиваемых этими структурами перцептуальных, эмоционально-аффективных и когнитивных компонентов реакции на разные виды боли, усугубляя состояние сочетанных висцеральной и соматической гипералгезий, наблюдающееся после перенесенной кишечной патологии [69, 70].

Несомненно, одним из первых кандидатов в нейротрансмиттеры, участвующие в постколитных перестройках в ДЯШ, которые способствуют висцеральной и соматической гипералгезиям, является серотонин. Ранее было установлено, что проявление кишечной гиперчувствительности у неонатально отделенных от матери (неонатально стрессированных) крыс ассоциировано с повышенными уровнями экспрессии в ДЯШ серотонина и триптофан-гидроксилазы, а также с увеличенным количеством в нем реагирующих на болевое колоректальное растяжение серотонинергических нейронов [13, 14]. При этом фармакологическое или акупунктурное подавление серотонин-синтезирующей функции ДЯШ у таких животных способствовало уменьшению висцеральной болевой чувствительности [14, 88]. С этими данными согласуется демонстрация кишечной гипералгезии у мышей с нокаутом гена серотонинового транспортера, характеризующихся усиленными эффектами серотонина в мозге [89]. Между тем при развитии соматической гипералгезии воспалительного генеза (инъекция формалина в заднюю лапу) у таких же неонатально отделенных от матери крыс, наоборот, наблюдалось снижение *c-fos*-позитивной активности серотонинергических клеток ДЯШ [44], что соответствует имеющимся сведениям о важной роли последних в соматической антиноцицепции, а также о развитии соматической гипералгезии при их дисфункции [22, 90, 91]. Несмотря на то что эти данные были получены на отличной от нашей экспериментальной модели, они показывают, что серотонин-зависимые процессы в ДЯШ могут быть по-разному вовлечены в нарушения висцеральной и соматической болевых чувствительностей. Основой для таких различий могут являться гетерогенные по своим электрофизиологическим, молекулярным и проекционным характеристикам популяции серотонин-синтезирующих нейронов, которые способны противоположным образом изменять свою активность в условиях патологии [56, 92]. На основании совокупности изложенных выше сведений мы можем предположить, что наблюдавшиеся нами в постколитный период усиление ноцицептивной активности нейронов ДЯШ, относящихся к популяциям с разными реакциями на висцеральные и соматические болевые стимулы, может являться результатом разнонаправленных изменений серо-

тонинергической трансмиссии в каждой из них, которые еще предстоит исследовать.

Еще одним нейротрансмиттером, который может способствовать усилению проноцицептивной функции ДЯШ после перенесенного колита, является ГАМК. Ранее было показано, что стимуляция ГАМКергических процессов в этом ядре усиливает соматическую болевую чувствительность, а микроинъекции в него антагонистов ГАМК, наоборот, усиливают анальгезию [22, 93]. Учитывая способность ГАМК-синтезирующих элементов в ДЯШ подавлять как его серотонинергические клетки, так и локальные ГАМКергические интернейроны [22], мы полагаем, что постколитное усиление ГАМКергической нейротрансмиссии в этом ядре может не только приводить к снижению его серотонин-зависимой антиноцицептивной активности, но и вызывать “растормаживание” подавленных в норме реакций его клеток на те или иные болевые сигналы. Одним из следствий таких перестроек может являться наблюдавшееся нами после колита повышение доли в этом ядре активирующихся при ноцицепции нейронов. Результатом усиления ГАМК-зависимых механизмов в ДЯШ также может быть ослабление в нем дофаминергической нейрональной активности, что может приводить к дефициту дофамин-зависимого тормозного контроля соматической болевой чувствительности со стороны этого ядра [59, 94–96]. В свою очередь, активирующиеся при кишечном воспалении локальные нитроергические механизмы [66] могут вносить свой вклад в постколитное усиление реактивности общих ноцицептивных нейронов ДЯШ к колоректальному растяжению, способствуя тем самым развитию висцеральной гипералгезии. Несомненно, что для проверки справедливости этих предположений и определения конкретной роли каждого из перечисленных выше процессов в продемонстрированных нами перестройках активности разных популяций ноцицептивных нейронов в ДЯШ необходимы специальные исследования.

Таким образом, проведенное нами исследование впервые показало, что следствием кишечного воспаления (колита), сохраняющимся, как минимум, в течение месяца после его разрешения, являются перестройки в ноцицептивной активности большого и дорсального ядер шва. Эти перестройки по-разному проявляются в функционально различающихся нейрональных популяциях этих структур и, в целом, для большого и дорсального ядер носят разнонаправленный характер. Наблюдающееся в постколитный период нарастание тормозных процессов в большом ядре шва, еще более усугубляющихся при поступлении болевых сигналов от перенесшей воспаление кишки, может приводить к общему ослаблению инициируемых этой структурой нисходящих антиноцицептивных влияний. Тогда как избирательно возросшая в этих

условиях активация его клеток соматическими болевыми стимулами может способствовать неадекватному усилению болевой сигнализации от незатронутых патологией наружных тканей тела. В свою очередь, постколитное повышение общего уровня ноцицептивного возбуждения дорсального ядра шва, сохраняющего и усиливающего при этом свою селективность в отношении соматической боли, но снижающего способность дифференцировать от нее висцеральную, может приводить к возросшей и неадекватной действующему периферическому раздражителю стимуляции этим ядром боль-реактивных структур переднего мозга. Следствием этого может являться усиленная инициация последними недифференцированных по отношению к разным видам боли эмоционально-аффективных и когнитивных реакций. В своей совокупности отмеченные постколитные функциональные изменения в ядрах шва могут вносить существенный вклад в супраспинальные механизмы патогенеза поствоспалительной хронической абдоминальной боли и коморбидных ей соматических гипералгезий. Дальнейшее изучение лежащих в основе этих перестроек нейрохимических и молекулярных процессов будет способствовать разработке более эффективных методов лечения указанных патологий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00151, <https://rscf.ru/project/23-25-00151/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаус ОВ, Ливзан МА (2020) Фундаментальные основы формирования абдоминальной боли у пациентов с синдромом раздраженного кишечника. Эффект фармакотерапии 16(15): 102–111. [Gaus OV, Livzan MA (2020) Fundamentals of abdominal pain formation in IBS patients. Effect pharmacotherapy 16(15): 102–111. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2020-16-15-102-111>
2. Агафонова НА, Яковенко ЭП, Иванов АН, Яковенко АВ (2018) Абдоминальная боль и висцеральная гиперчувствительность — две грани одной реальности для пациентов с СРК. Эффект фармакотерапии 32: 26–33. [Agafonova NA, Yakovenko EP, Ivanov AN, Yakovenko AV (2018) Abdominal pain and visceral hypersensitivity like two sides of the same reality for IBS patients. Effect pharmacotherapy 32: 26–33. (In Russ)].
3. Bielefeldt K, Davis B, Binion DG. (2009) Pain and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 15(5):778–788. <https://doi.org/10.1002/ibd.20848>
4. Vergnolle N (2022) Abdominal pain in irritable bowel syndrome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 19:350. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00599-6>
5. Wils P, Caron B, D'Amico F, Danese S, Peyrin-Biroulet L. (2022) Abdominal Pain in Inflammatory Bowel Diseases: A Clinical Challenge. J Clin Med 11(15):4269. <https://doi.org/10.3390/jcm11154269>
6. Ceuleers H, Van Spaendonck H, Hanning N, Heirbaut J, Lambeir AM, Joossens J, Augustyns K, De Man JG, De Meester I, De Winter BY (2016) Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome: The role of proteases. World J Gastroenterol 22(47):10275–10286. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i47>
7. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, Rahimi R (2016) The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. J Neurogastroenterol Motil 22(4):558–574. <https://doi.org/10.5056/jnm16001>
8. Crowell MD (2004) Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. Br J Pharmacol 141(8):1285–1293. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705762>
9. Gros M, Gros B, Mesonero JE, Latorre E (2021) Neurotransmitter Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome: Emerging Approaches for Management. J Clin Med 10(15):3429. <https://doi.org/10.3390/jcm10153429>
10. Takahashi K, Khwaja IG, Schreyer JR, Bulmer D, Peiris M, Terai S, Aziz Q (2021) Post-inflammatory Abdominal Pain in Patients with Inflammatory Bowel Disease During Remission: A Comprehensive Review. Crohn's & Colitis 360 3:4:otab073. <https://doi.org/10.1093/crocol/otab073>
11. Nakai A, Kumakura Y, Boivin M, Rosa P, Diksic M, D'Souza D, Kersey K (2003) Sex differences of brain serotonin synthesis in patients with irritable bowel syndrome using alpha-[11C]methyl-L-tryptophan, positron emission tomography and statistical parametric mapping. Can J Gastroenterol 17(3):191–196. <https://doi.org/10.1155/2003/572127>
12. O'Mahony S, Chua AS, Quigley EM, Clarke G, Shanahan F, Keeling PW, Dinan TG (2008) Evidence of an enhanced central 5HT response in irritable bowel syndrome and in the rat maternal separation model. Neurogastroenterol Motil 20(6):680–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.01065.x>
13. Ren TH, Wu J, Yew D, Ziea E, Lao L, Leung WK, Berman B, Hu PJ, Sung JJ (2007) Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292(3):G849–G856. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00400.2006>

14. Zhang HA, Sang N, Ge X, Huang Q, Li XL, Sha J (2018) Nesfatin-1 in the dorsal raphe nucleus influences visceral sensitivity via 5-HT neurons in male maternally separated rats. *Sci Rep* 8:9334. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27592-x>
15. Goehler LE, Gaykema RP, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M (2005) Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain Behav Immun* 19(4):334–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002>
16. Lu Y, Westlund KN (2001) Effects of baclofen on colon inflammation-induced Fos, CGRP and SP expression in spinal cord and brainstem. *Brain Res* 889:118–130. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03124-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03124-3)
17. Wan J, Ding Y, Tahir AH, Shah MK, Janyaro H, Li X, Zhong J, Vodyanov V, Ding M (2017) Electroacupuncture attenuates visceral hypersensitivity by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway in the descending pain modulation system. *Front Neurosci* 11:644. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00644>
18. Sanoja R, Tortorici V, Fernandez C, Price TJ, Cervero F (2010) Role of RVM neurons in capsaicin-evoked visceral nociception and referred hyperalgesia. *Eur J Pain* 14(2):120.e1–e9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.04.006>
19. Chen MX, Chen Y, Fu R, Liu SY, Yang QQ, Shen TB (2016) Activation of 5-HT and NR2B contributes to visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome in rats. *Am J Transl Res* 8(12):5580–5590.
20. Martins I, Tavares I (2017) Reticular Formation and Pain: The Past and the Future. *Front Neuroanat* 11:51. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00051>
21. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120(11):3779–3787. <https://doi.org/10.1172/JCI43766>
22. Wang Q-P, Nakai Y (1994) The dorsal raphe: An important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull* 34(6):575–585. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90143-0)
23. Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355–474. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00009-6)
24. Wei F, Gu M, Chu YX (2012) New tricks for an old slug: descending serotonergic system in pain. *Sheng Li Xue Bao* 64(5):520–530.
25. Mercer Lindsay N, Chen C, Gilam G, Mackey S, Scherrer G (2021) Brain circuits for pain and its treatment. *Sci Transl Med* 13(619):eabj7360. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7360>
26. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000(1–2):40–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>
27. Almeida A, Leite-Almeida H, Tavares I (2006) Medullary control of nociceptive transmission: Reciprocal dual communication with the spinal cord. *Drug Discov Today Dis Mech* 3(3):305–312. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2006.09.001>
28. Chen Q, Heinricher MM (2022) Shifting the Balance: How Top-Down and Bottom-Up Input Modulate Pain via the Rostral Ventromedial Medulla. *Front Pain Res (Lausanne)* 3:932476. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.932476>
29. Cleary DR, Heinricher MM (2013) Adaptations in responsiveness of brainstem pain-modulating neurons in acute compared with chronic inflammation. *Pain* 154(6):845–855. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.02.019>
30. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25(6):319–325. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02157-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02157-4)
31. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szweczek MR, Wallace JL (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96(3):795–803.
32. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II, Panteleev SS (2018) Colitis-induced alterations in response properties of visceral nociceptive neurons in the rat caudal medulla oblongata and their modulation by 5-HT₃ receptor blockade. *Brain Res Bull* 142:183–196. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.07.013>
33. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Busygina II (2021) Amygdalofugal Modulation of Visceral Nociceptive Transmission in the Rat Caudal Ventrolateral Medulla under Normal Conditions and Intestinal Inflammation. *J Evol Biochem Physiol* 57:5:1150–1162. <https://doi.org/10.1134/S0022093021050161>
34. Lyubashina OA, Sivachenko IB, Mikhalkin AA (2022) Impaired visceral pain-related functions of the mid-brain periaqueductal gray in rats with colitis. *Brain Res Bull* 182:12–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.02.002>
35. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed London Acad Press.
36. Fields HL, Bry J, Hentall I, Zorman G (1983) The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 3(12):2545–2552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-12-02545.1983>
37. Heinricher MM (2016) Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain. *Adv Exp Med Biol* 904:105–115. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7537-3_8
38. Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL (1992) Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 48(3):533–543. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90400-v](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90400-v)
39. Brink TS, Hellman KM, Lambert AM, Mason P (2006) Raphe magnus neurons help protect reactions to visceral pain from interruption by cutaneous pain. *J Neurophysiol* 96(6):3423–3432. <https://doi.org/10.1152/jn.00793.2006>
40. Brink TS, Mason P (2003) Raphe magnus neurons respond to noxious colorectal distension. *J Neurophysiol* 89(5):2506–2515. <https://doi.org/10.1152/jn.00825.2002>
41. Sikandar S, Dickenson AH (2011) Pregabalin modulation of spinal and brainstem visceral nociceptive processing. *Pain* 152(10):2312–2322. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.020>

42. *Chen T, Dong YX, Li YQ* (2003) Fos expression in serotonergic neurons in the rat brainstem following noxious stimuli: an immunohistochemical double-labelling study. *J Anat* 203(6):579–588.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00242.x>
43. *Dong YX, Han ZA, Xiong KH, Rao ZR* (1997) Fos expression in serotonergic midbrain neurons projecting to the paraventricular nucleus of hypothalamus after noxious stimulation of the stomach: a triple labeling study in the rat. *Neurosci Res* 27(2):155–160.
[https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01143-1](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01143-1)
44. *Vilela FC, Vieira JS, Vitor-Vieira F, Kalil-Cutti B, da Silva JRT, Giusti-Paiva A, da Silva ML* (2021) Maternal separation increases pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and noradrenergic neurons in locus coeruleus. *Neurosci Lett* 748:135734.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135734>
45. *Montagne-Clavel J, Oliveras JL, Martin G* (1995) Single-unit recordings at dorsal raphe nucleus in the awake-anesthetized rat: spontaneous activity and responses to cutaneous innocuous and noxious stimulations. *Pain* 60(3):303–310.
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00129-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00129-3)
46. *Shima K, Nakahama H, Yamamoto M* (1986) Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleep-waking cycle and their responses to sensory stimuli. *Brain Res* 399(2):317–326.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91522-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91522-2)
47. *Lyubashina OA, Sivachenko IB, Sokolov AY* (2019) Differential responses of neurons in the rat caudal ventrolateral medulla to visceral and somatic noxious stimuli and their alterations in colitis. *Brain Res Bull* 152:299–310.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.030>
48. *Ness TJ, Follett KA, Piper J, Dirks BA* (1998) Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. *Brain Res* 802(1–2):163–174.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00608-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00608-8)
49. *Pinto-Ribeiro F, Ansah OB, Almeida A, Pertovaara A* (2011) Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CvLM) in monoarthritic and healthy control rats: modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 86(1–2):82–90.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.014>
50. *Luz LL, Fernandes EC, Sivado M, Kokai E, Szucs P, Safonov BV* (2015) Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I: a substrate for referred pain. *Pain* 156(10):2042–2051.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000267>
51. *Qin C, Farber JP, Linderorth B, Shahid A, Foreman RD* (2008) Neuromodulation of thoracic intraspinal visceroreceptive transmission by electrical stimulation of spinal dorsal column and somatic afferents in rats. *J Pain* 9(1):71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.08.007>
52. *Snowball RK, Semenenko FM, Lumb BM* (2000) Visceral inputs to neurons in the anterior hypothalamus including those that project to the periaqueductal gray: a functional anatomical and electrophysiological study. *Neuroscience* 99(2):351–361.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00203-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00203-7)
53. *Monconduit L, Bourgeois L, Bernard JF, Villanueva L* (2003) Convergence of cutaneous, muscular and visceral noxious inputs onto ventromedial thalamic neurons in the rat. *Pain* 103(1–2):83–91.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00418-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00418-9)
54. *Zhang HQ, Al-Chaer ED, Willis WD* (2002) Effect of tactile inputs on thalamic responses to noxious colorectal distension in rat. *J Neurophysiol* 88(3):1185–1196.
<https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1185>
55. *Zhang HQ, Rong PJ, Zhang SP, Al-Chaer ED, Willis WD* (2003) Noxious visceral inputs enhance cutaneous tactile response in rat thalamus. *Neurosci Lett* 336(2):109–112.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01243-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01243-0)
56. *Huang KW, Ochandarena NE, Philson AC, Hyun M, Birnbaum JE, Cicconet M, Sabatini BL* (2019) Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife* 8:e46464.
<https://doi.org/10.7554/eLife.46464>
57. *Nguyen E, Smith KM, Cramer N, Holland RA, Bleimeister IH, Flores-Felix K, Silberberg H, Keller A, Le Pichon CE, Ross SE* (2022) Medullary kappa-opioid receptor neurons inhibit pain and itch through a descending circuit. *Brain* 145(7):2586–2601.
<https://doi.org/10.1093/brain/awac189>
58. *Soiza-Reilly M, Commons KG* (2014) Unraveling the architecture of the dorsal raphe synaptic neuropil using high-resolution neuroanatomy. *Front Neural Circuits* 8:105.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00105>
59. *Zhao Q, Ito T, Soko C, Hori Y, Furuyama T, Hioki H, Konno K, Yamasaki M, Watanabe M, Ohtsuka S, Ono M, Kato N, Yamamoto R* (2022) Histochemical Characterization of the Dorsal Raphe-Periaqueductal Grey Dopamine Transporter Neurons Projecting to the Extended Amygdala. *eNeuro* 9(3):ENEURO.0121-22.2022.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0121-22.2022>
60. *Gau R, Sévoz-Couche C, Hamon M, Bernard JF* (2013) Noxious stimulation excites serotonergic neurons: a comparison between the lateral paragigantocellular reticular and the raphe magnus nuclei. *Pain* 154(5):647–659.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.09.012>
61. *Gao K, Mason P* (2000) Serotonergic Raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not ON or OFF cells. *J Neurophysiol* 84(4):1719–1725.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.4.1719>
62. *Radhakrishnan R, Sluka KA* (2009) Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. *Neurosci Lett* 457(3):141–145.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.086>
63. *Winkler CW, Hermes SM, Chavkin CI, Drake CT, Morri-son SF, Aicher SA* (2006) Kappa opioid receptor (KOR) and GAD67 immunoreactivity are found in OFF and NEUTRAL cells in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 96(6):3465–3473.
<https://doi.org/10.1152/jn.00676.2006>
64. *Zhang Y, Zhao S, Rodriguez E, Takatoh J, Han BX, Zhou X, Wang F* (2015) Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons. *J Clin Invest* 125(10):3782–

3794.
<https://doi.org/10.1172/JCI81156>
65. Pedersen NP, Vaughan CW, Christie MJ (2011) Opioid receptor modulation of GABAergic and serotonergic spinally projecting neurons of the rostral ventromedial medulla in mice. *J Neurophysiol* 106(2):731–740.
<https://doi.org/10.1152/jn.01062.2010>
 66. Yang B, Zhang LC, Zeng YM (2003) [Microinjection of L-NAME into dorsal raphe nucleus inhibits nociceptive response in sigmoid pain model of rats. Sheng Li Xue Bao 55(5):577–582. (In Chinese)].
 67. Lyubashina O, Busygina I, Sivachenko I, Panteleev S (2021) 5-HT_{1A} Receptor Activation by Buspirone Facilitates Post-Inflammatory Intestinal Hypersensitivity in a Rat Model. *FASEB J* 35(S1):02269.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.02269>
 68. Deiteren A, van der Linden L, de Wit A, Ceuleers H, Buckinx R, Timmermans JP, Moreels TG, Pelckmans PA, De Man JG, De Winter BY (2015) P2X₃ receptors mediate visceral hypersensitivity during acute chemically-induced colitis and in the post-inflammatory phase via different mechanisms of sensitization. *PLoS One* 10(4):e0123810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123810>
 69. Eijkelkamp N, Kavelaars A, Elsenbruch S, Schedlowski M, Holtmann G, Heijnen CJ (2007) Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(4):G749–G757.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00114.2007>
 70. Zhou Q, Price DD, Caudle RM, Verne GN (2008) Visceral and somatic hypersensitivity in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 53(2):429–435.
<https://doi.org/10.1007/s10620-007-9881-6>
 71. Carlson JD, Maire JJ, Martenson ME, Heinricher MM (2007) Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 27(48):13222–13231.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3715-07.2007>
 72. Gonçalves L, Almeida A, Pertovaara A (2007) Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 26(8):2188–2195.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05832.x>
 73. Kincaid W, Neubert MJ, Xu M, Kim CJ, Heinricher MM (2006) Role for medullary pain facilitating neurons in secondary thermal hyperalgesia. *J Neurophysiol* 95(1):33–41.
<https://doi.org/10.1152/jn.00449.2005>
 74. Costa-Pereira JT, Serrão P, Martins I, Tavares I (2020) Serotonergic pain modulation from the rostral ventromedial medulla (RVM) in chemotherapy-induced neuropathy: The role of spinal 5-HT₃ receptors. *Eur J Neurosci* 51(8):1756–1769.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14614>
 75. Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W (2010) Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci* 30:8624–8636.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5389-09.2010>
 76. Zhang L, Hammond DL (2010) Cellular basis for opioid potentiation in the rostral ventromedial medulla of rats with persistent inflammatory nociception. *Pain* 149(1):107–116.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.01.017>
 77. Aby F, Lorenzo LE, Grivet Z, Bouali-Benazzouz R, Martin H, Valerio S, Whitestone S, Isabel D, Idi W, Bouchatta O, De Deurwaerdere P, Godin AG, Herry C, Fioramonti X, Landry M, De Koninck Y, Fossat P (2022) Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. *Sci Adv* 8(30):eabo0689.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abo0689>
 78. Cai Y-Q, Wang W, Hou Y-Y, Pan ZZ (2014) Optogenetic Activation of Brainstem Serotonergic Neurons Induces Persistent Pain Sensitization. *Molec Pain* 10.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-70>
 79. Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 25(12):613–617.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.002>
 80. Bagdy E, Kiraly I, Harsing LG (2000) Reciprocal Innervation between Serotonergic and GABAergic Neurons in Raphe Nuclei of the Rat. *Neurochem* 25:1465–1473.
<https://doi.org/10.1023/A:1007672008297>
 81. Bliercrow P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C (1998) Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 861:204–216.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10192.x>
 82. Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116(3):669–683.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00584-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00584-5)
 83. Lemos JC, Pan YZ, Ma X, Lamy C, Akanwa AC, Beck SG (2006) Selective 5-HT receptor inhibition of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the rat dorsal and median raphe. *Eur J Neurosci* 24(12):3415–3430.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05222.x>
 84. Ganley RP, de Sousa MM, Werder K, Öztürk T, Mendes R, Ranucci M, Wildner H, Zeilhofer HU (2023) Targeted anatomical and functional identification of antinociceptive and pronociceptive serotonergic neurons that project to the spinal dorsal horn. *Elife* 12:e78689.
<https://doi.org/10.7554/eLife.78689>
 85. Inyushkin AN, Merkulova NA, Orlova AO, Inyushkina EM (2010) Local GABAergic modulation of the activity of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus. *Neurosci Behav Physiol* 40(8):885–893.
<https://doi.org/10.1007/s11055-010-9337-x>
 86. Li MH, Suchland KL, Ingram SL (2015) GABAergic transmission and enhanced modulation by opioids and endocannabinoids in adult rat rostral ventromedial medulla. *J Physiol* 593(1):217–230.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275701>
 87. Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA (2004) Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1018:46–57.
<https://doi.org/10.1196/annals.1296.005>
 88. Wu JC, Ziea ET, Lao L, Lam EF, Chan CS, Liang AY, Chu SL, Yew DT, Berman BM, Sung JJ (2010) Effect of electroacupuncture on visceral hyperalgesia, serotonin

- and fos expression in an animal model of irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 16(3):306–314. <https://doi.org/10.5056/jnm.2010.16.3.306>
89. Bi Z, Zhang S, Meng Y, Feng Y, Wang Y, Wang E, Pan X, Zhu R, Fan H, Pang S, Zhu L, Yuan J (2021) Female serotonin transporter-knockout rat: A potential model of irritable bowel syndrome. *FASEB J* 35(7):e21701. <https://doi.org/10.1096/fj.202000007RRR>
 90. Andersen E, Dafny N (1983) An ascending serotonergic pain modulation pathway from the dorsal raphe nucleus to the parafascicular nucleus of the thalamus. *Brain Res* 269(1):57–67. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90962-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90962-9)
 91. Dugué GP, Lörincz ML, Lottem E, Audero E, Matias S, Correia PA, Léna C, Mainen ZF (2014) Optogenetic recruitment of dorsal raphe serotonergic neurons acutely decreases mechanosensory responsivity in behaving mice. *PLoS One* 9(8):e105941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105941>
 92. Marinelli S, Schnell SA, Hack SP, Christie MJ, Wessendorf MW, Vaughan CW (2004) Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *J Neurophysiol* 92(6):3532–3537. <https://doi.org/10.1152/jn.00437.2004>
 93. Xie L, Wu H, Chen Q, Xu F, Li H, Xu Q, Jiao C, Sun L, Ullah R, Chen X (2022) Divergent modulation of pain and anxiety by GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and dorsal raphe. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01520-0>
 94. Liu X, He J, Jiang W, Wen S, Xiao Z (2023) The roles of periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus dopaminergic systems in the mechanisms of thermal hypersensitivity and depression in mice. *J Pain* S1526–5900(23):00037–00038. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.02.004>
 95. Li C, Sugam JA, Lowery-Gionta EG, McElligott ZA, McCall NM, Lopez AJ, McKlveen JM, Pleil KE, Kash TL (2016) Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. *Neuropsychopharmacology* 41(8):2122–2132. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.12>
 96. Yu W, Pati D, Pina MM, Schmidt KT, Boyt KM, Hunker AC, Zweifel LS, McElligott ZA, Kash TL (2021) Periaqueductal gray/dorsal raphe dopamine neurons contribute to sex differences in pain-related behaviors. *Neuron* 109(8):1365–1380.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.001>

POSTCOLITIS ALTERATIONS IN NOCICEPTIVE PROPERTIES OF NEURONS IN THE RAT RAPHE MAGNUS AND DORSAL RAPHE NUCLEI

B. M. Sushkevich^a, I. B. Sivachenko^a, and O. A. Lyubashina^{a, #}

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

[#]*e-mail: lyubashinaoa@infran.ru*

Dysfunction of the brain serotonergic system is thought to play a leading role in the pathogenesis of chronic abdominal pain and comorbid somatic hyperalgesia, which disturb a significant proportion of patients with digestive tract diseases, even in remission. However, the specific changes in the serotonergic structures nociceptive properties that can be initiated by organic pathology and persist after its resolution remain unclear. The aim of our neurophysiological study on anesthetized rats – healthy and recovered from colitis – was to identify the alterations in the raphe magnus (RMg) and dorsal raphe (DR) nuclei neuronal responses to visceral (colorectal distension) and somatic (squeezing of the tail) noxious stimulations that persist after resolution of intestinal inflammation. It has been shown that both nuclei contain different groups of nociceptive neurons: 1) responding with activation only to colorectal distension (visceral); 2) excited only by tail squeezing (somatic); 3) reacting with excitation to the both irritations (general); 4) responding with discharge inhibition to any of the stimulations (inhibited). Compared with healthy animals, in RMg of colitis-exposed rats the number of the inhibited cells was increased and the total proportion of excited nociceptive neurons was reduced. Distension of the inflammation-undergone intestine caused enhanced RMg neuronal inhibition, whereas squeezing of the pathology-unaffected tail led to increased excitation of the RMg selective somatic and general nociceptive cells. In turn, in the DR of postcolitis rats the inhibited neuron proportion was reduced, while the increased population of excited neurons included fewer visceral and more somatic selective cells. This was accompanied by an increase in the selective reactions of the latter to somatic pain stimuli and by an increase in non-selective DR neuron excitation by visceral and somatic pain signals. The identified neuronal alterations can contribute to the postcolitis impairment of the studied raphe nuclei functions in the endogenous control of visceral and somatic pain sensitivity.

Keywords: nucleus raphe magnus, dorsal raphe nucleus, neuronal activity, abdominal pain, somatic pain, post-colitis period

КАЛЬЦИЙ-АККУМУЛИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

© 2023 г. С. И. Хизриева¹, Р. А. Халилов¹, А. М. Джафарова^{1,*}, В. Р. Абдуллаев¹

¹Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

*e-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 18.06.2023 г.

Кальций является одним из важнейших внутриклеточных мессенджеров, регулирующих физиологические и биохимические процессы в клетке. Митохондрии способны депонировать ионы кальция и участвуют в регуляции кальциевого сигнала. Гипотермические состояния у гомеотермных животных могут привести к нарушению этой важнейшей функции митохондрий и патологическим последствиям. Целью данного исследования является изучение эффектов умеренной (30°C) гипотермии различной длительности на кальций-аккумулирующую способность митохондрий печени крыс. Опыты проводились на крысах-самцах Вистар. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. Выделение митохондрий из печени декапированных крыс производили методом дифференциального центрифугирования. Кальций-аккумулирующую способность митохондрий оценивали по кинетике кальций-индуцированного набухания митохондрий и их кальциевой емкости. Исследование кинетики кальций-индуцированного набухания митохондрий показало, что при кратковременной умеренной (30°C) гипотермии скорость набухания митохондрий снижается, пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует дальнейшему снижению скорости набухания, а до 3 ч – ее нормализации. Между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий выявлена положительная корреляционная связь ($r = 0.79$). Таким образом, при длительном воздействии холодового фактора у крыс происходит активация ряда компенсаторно-приспособительных реакций. Снижение скорости Ca^{2+} – индуцированного набухания и кальциевой емкости митохондрий на начальных этапах гипотермии, возможно, связано с образованием митохондриальных пор и носит обратимый характер.

Ключевые слова: крысы, гипотермия, митохондрий, Ca^{2+} – индуцированное набухание митохондрий, кальциевая емкость

DOI: 10.31857/S0044452923040046, **EDN:** YXUJTY

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что митохондрии способны поглощать и удерживать ионы кальция, регулируя клеточные кальциевые сигналы, и одновременно выступать в качестве Ca^{2+} буфера и депо наряду с эндоплазматическим ретикуломом [1]. Поступление в митохондрии Ca^{2+} зависит от электрохимического протонного градиента ($\Delta\mu\text{H}^+$), концентрации Ca^{2+} в матриксе и цитозоле. Захват кальция энерги-

зованными митохондриями связан с метаболизмом, пролиферацией и многими специфическими функциями клеток [2]. Различные патологические и стрессовые состояния организма могут быть связаны с нарушениями митохондриальных структур и функций, участвующих в транспорте и аккумуляции ионов кальция или участвующих в регуляции кальциевого гомеостаза клетки.

Гипотермия – это патологическое состояние гомеотермного животного, развивающееся при снижении температуры тела. Случайная (акцидентальная) гипотермия имеет место у животных, обитающих в регионах со значительными колебаниями температурного режима. Риск развития такой гипотермии подвергаются люди, жизнь или профессиональная деятельность которых связана с длительным пребыванием в условиях низких температур. У здорового человека под воздействием холода наступает первичная случайная гипотермия,

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; Р/О – коэффициент окислительного фосфорилирования; МРТР – митохондриальная Ca^{2+} – зависимая пора; ОМБ – окислительная модификация белков; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал; ANT – адениннуклеотид-транслоказа; CyP-D – циклофилин-D; PiC – митохондриальный переносчик фосфата; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; NADPH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный.

тогда как вторичная случайная гипотермия вызвана обычно болезнью, интоксикацией или травмой [3–6].

В последние годы искусственную гипотермию активно применяют в медицине, например, при инфаркте миокарда и инсульте, для защиты клеток от ишемических и реперфузионных повреждений [7–10]. Протективные механизмы гипотермии связаны со снижением скорости метаболизма, уменьшением воспаления и образования активных форм кислорода (АФК), ингибированием эксайтотоксичности и апоптоза [4]. Однако, несмотря на множество позитивных терапевтических эффектов, сама гипотермия, особенно начальные ее этапы, может иметь множество нежелательных последствий для организма. В связи с этим исследование механизмов и путей влияния умеренной гипотермии различной длительности на организм гомеотермных животных является актуальным и представляет несомненный интерес.

Известно, что начальные этапы снижения температуры тела у гомеотермных животных сопровождаются значительными физиологическими и биохимическими изменениями в организме: активизируется мышечный тонус, дрожь и холодовой диурез, происходит выброс катехоламинов и тиреоидных гормонов, наступает вазоконстрикция для снижения теплообмена [5, 6, 11]. Все это, в совокупности, способствует интенсификации процессов генерации АФК и последующему истощению компонентов антиоксидантной системы [12, 13]. В исследованиях, проведенных ранее, было показано, что кратковременная и пролонгированная одночасовая гипотермия приводят к образованию интермедиатов окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях печени крыс, а также к снижению содержания восстановленного глутатиона, α -токоферола и падению активности антиоксидантных ферментов [14, 15]. При исследовании респираторных характеристик при гипотермии различной глубины и длительности установлено падение дыхательного контроля и коэффициента окислительного фосфорилирования (Р/О) [16], это может привести к снижению электрохимического протонного градиента и, как следствие, способствовать нарушению кальций-депонирующей способности митохондрий и образованию митохондриальных пор. Другой причиной нарушения кальций-депонирующей способности может стать избыточная проницаемость мембран митохондрий в результате окислительных повреждений [17]. Известно, что образование митохондриальных пор вызывает проникновение в митохондрии молекул воды, набухание митохондрий и выход митохондриальных компонентов в цитоплазму [18], что инициирует апоптоз.

Целью данной работы является исследование кальций-аккумулирующей способности митохон-

дрий печени крыс при умеренной гипотермии. Кальций-аккумулирующую способность митохондрий оценивали по кинетике набухания митохондрий, инкубированных в среде с ионами кальция, и их кальциевой емкости.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар 3.5-месячного возраста, с массой тела 200–220 г, полученных из питомника филиал “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл., Чеховский р-н) и содержащихся в стандартных условиях (средняя температура воздуха – 26°C, влажность воздуха – 40–60%) вивария Дагестанского государственного университета. Во избежание возрастных и суточных колебаний на результаты экспериментов, опыты проводили в одно и то же время дня (с 9 до 11 ч). Животных делили на 4–5 групп по 8 в каждой – контрольную (температура тела 38°C) и 3–4 группы – животных, подвергнутых гипотермии. Доступ к пище и воде был круглосуточный.

Моделирование гипотермических состояний

Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0.28°C/мин до 30°C в течение 30 мин (кратковременная умеренная гипотермия). Достигнутый уровень гипотермии поддерживали в течение 1 ч и 3 ч (пролонгированная гипотермия). Контролем служили интактные животные с температурой тела 38.4°C. Состояние глубокой гипотермии достигалось за 60 мин (0.3°C/мин). Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501.

Были исследованы следующие состояния животных:

1. Контроль.
2. Кратковременная умеренная гипотермия (30°C, 30 мин).
3. Умеренная гипотермия, пролонгированная до 1 ч (30°C, 1 ч).
4. Умеренная гипотермия, пролонгированная до 3 ч (30°C, 3 ч).

Препаративные методы исследования

Выделение интактных митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [19]. Все процедуры выполнялись на холоде при температуре 2–4°C. После декапитации крыс в течение 60 с выделяли печень и промывали ледяной средой выделения (1°C) в течение 5 мин. Печень измель-

чали, пропускали через пресс и готовили 10%-ный гомогенат в среде выделения, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g на центрифуге MPW-360 (ротор CM-110, Россия). Супернатант отделяли и центрифугировали на центрифуге (Thermo scientific MR 23i, угловой ротор AM 10.17) в течение 15 мин при 20000 g. Полученный осадок суспендировали в 0.25 М сахарозе, приготовленной на среде промывки. Суспензия митохондрий наплаивалась на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы, содержащий 3.5 мл — 1.1 М; 7.5 мл — 0.8 М; 7.5 мл — 0.5 М и 5 мл — 0.3 М сахарозы, далее центрифугировали (Eppendorf 5702 R, ротор KL 11A) в течение 45 мин при 3500 об/мин. Градиенты сахарозы готовились на среде промывки.

Полученную фракцию митохондрий (на границе 0.5 М–0.8 М) центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин 20000 g (Centrifuge Thermo scientific MR 23i, ротор AM 10.17). Осадок ресуспендировали в среде промывки, центрифугировали 10 мин при 20000 g (Centrifuge Thermo scientific MR 23i, ротор AM 10.17). Митохондрии хранили на льду в среде инкубации.

Среда выделения: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, 0.1% BSA (pH = 7.4).

Среда промывки: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА (pH = 7.4).

Среда инкубации: 0.3 М сахароза, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, 13 мМ KCl (pH = 7.4). 5l

Белок в митохондриях определяли по Лоури [20].

Определение кинетики и скорости набухания митохондрий при добавлении в среду ионов кальция

Кинетику набухания митохондрий можно оценить по снижению оптической плотности инкубационной среды, содержащей митохондрии. В суспензию митохондрий (0.5 мг белка) добавляли в 1 мл среды, содержащей (мМ): KCl 120, KH₂PO₄ 3, сукцинат калия 5 и трис-HCl 25, pH 7.4. Стимуляцию открытия поры производили добавлением в среду CaCl₂ (420 мМ). Скорость набухания митохондрий ($\Delta D_{540}/\text{мин} \times \text{мг белка}$) определяли как изменение оптической плотности суспензии в течение первой минуты набухания [21].

Измерение кальциевой емкости митохондрий

Кальциевую емкость изолированных митохондрий печени крыс определяли полярографическим методом. В полярографическую ячейку, содержащую среду инкубации с митохондриями (0.5 мг белка/мл), субстрат окисления сукцинат (5 мМ) и K₂HPO₄ (1 мМ), добавляли раствор CaCl₂ (0.1 мМ) несколько раз до получения необратимой стимуляции дыхания. Величину кальциевой емкости вычисляли как количество CaCl₂, вызвавшее необра-

тимую стимуляцию дыхания, в расчете на 1 мг митохондриального белка.

Статистическая обработка

Обработка данных произведена с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0. Нормальность распределения и однородность дисперсии экспериментальных данных оценивали с помощью W критерия (Шапиро–Уилка), критериев Левеня и Уэлча. Для множественных сравнений независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ и критерий Краскела–Уоллиса (H-test). При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна–Уитни с новым критическим уровнем значимости, учитывающим количество сравниваемых групп. Для оценки взаимосвязи использовали корреляционный анализ Спирмена. Данные в таблицах приведены в виде среднее $\pm$ ошибка среднего. Каждая кривая на графиках — среднее 8 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Способность митохондрий к аккумуляции ионов кальция определяется множеством факторов и механизмов. Известно, что кальций быстро входит в митохондрии по градиенту электрохимического потенциала с помощью Ca²⁺-унипортера и выходит медленно через антипортеры (Ca²⁺/Na⁺ и Ca²⁺/H⁺), либо быстро через митохондриальные поры [22–24].

Одним из способов оценки способности митохондрий к депонированию ионов кальция является исследование кинетики их кальций-индуцированного набухания. Известно, что добавление ионов Ca²⁺ в среду инкубации энергизованных митохондрий способствует их аккумуляции в матриксе до тех пор, пока уровень ионов не достигнет предельных критических значений, вызывающих стимуляцию митохондриальной Ca²⁺-зависимой поры (MPTP) и пермеабиллизацию митохондриальных мембран.

Активация неспецифической проницаемости приводит к проникновению в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления и набухание митохондрии [18]. Скорость кальций-индуцированного набухания является не только маркером чувствительности митохондрий к ионам кальция, но и показателем функционального состояния Ca²⁺-зависимых митохондриальных пор.

Кинетику кальций-индуцированного набухания можно оценить, регистрируя снижение светопоглощения инкубационной среды при 540 нм. На рис. 1 представлены кинетические кривые

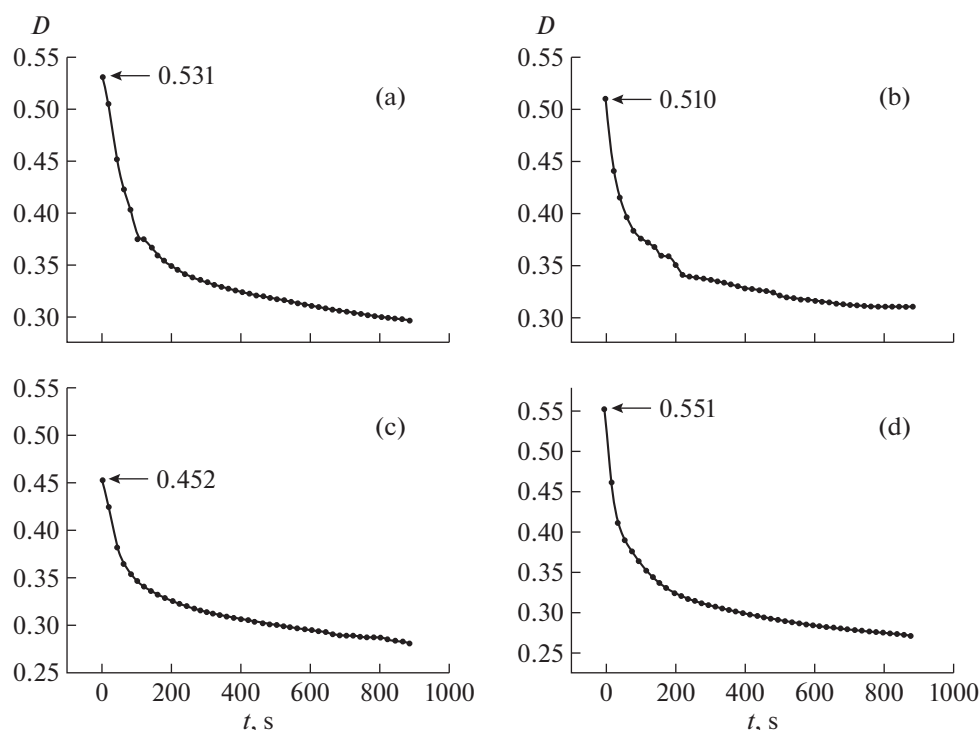


Рис. 1. Кинетика Ca^{2+} – индуцированного набухания митохондрий печени крыс: (а) – контроль; (б) – гипотермия 30°C , 0.5 ч; (с) – гипотермия 30°C , 1 ч; (д) – гипотермия 30°C , 3 ч.

кальций-индуцированного набухания митохондрий крыс в норме и при гипотермии различной длительности. Видно, что все кинетические кривые имеют нелинейный характер, свидетельствующий о наличии двух ясно различимых стадий набухания митохондрий: быстрой и медленной. Медленная фаза набухания регистрировалась до стационарных значений оптической плотности. В контроле быстрая стадия имеет более выраженный характер (оптическая плотность резко снижается в течение первых 160 сек), а постоянное значение светопоглощения достигается после 650–700 с инкубации митохондрий (рис. 1а). Кратковременная гипотермия существенно изменяет кинетику Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий: удлиняется период быстрой фазы (200 с), характер ее становится менее выраженным по сравнению с контролем, а медленная стадия достигает стационарных значений уже через 500 с (с. 1б).

Исследование кинетики набухания митохондрий крыс при пролонгированной (1 ч) гипотермии показало, что динамика набухания их в целом схожа с таковой у крыс, подверженных кратковременной гипотермии. При этом характер снижения оптической плотности митохондрий на быстрой стадии набухания становится менее выраженным, а переход быстрой фазы в медленную фазу – более плавным, что свидетельствует о существенном

снижении чувствительности митохондрий к ионам кальция (рис. 1с).

Дальнейшее пролонгирование гипотермии (до 3 ч) приводит к тому, что кинетические кривые нормализуются и их характер становится схожим с таковым контрольных крыс (рис. 1д). Время быстрой фазы и перехода ее в медленную значительно сокращается по сравнению с крысами, подверженными 1-часовой гипотермией. При этом стационарные значения оптических плотностей достигаются на 600-й с.

Следует обратить внимание на тот факт, что начальные значения оптической плотности (D_0) митохондрий печени крыс, находящихся в различных физиологических состояниях, значительно отличаются. Так, значение D_0 у контрольных крыс составляет 0.528 ± 0.027 , при кратковременной гипотермии – 0.515 ± 0.011 , при пролонгированной 1-часовой гипотермии – 0.456 ± 0.029 , а при более пролонгированной 3-часовой гипотермии – 0.550 ± 0.034 . Таким образом, гипотермия длительностью 1 ч существенно отражается на осмотическом состоянии митохондрий.

По наклонам кинетических кривых были рассчитаны скорости кальций-индуцированного набухания митохондрий (dD/dt). На рис. 2 показано, что при кратковременном снижении температуры тела dD/dt митохондрий уменьшается на 36.4% относительно контроля. Пролонгирование гипотер-

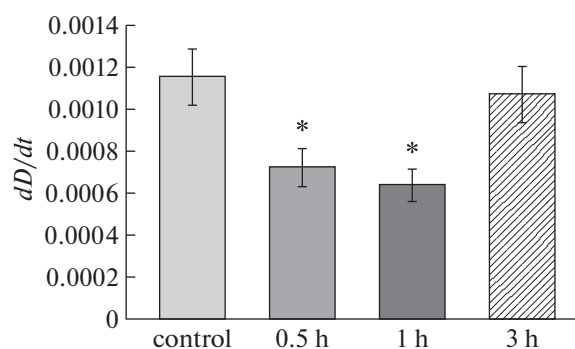


Рис. 2. Скорость набухания (dD/dt) митохондрий печени крыс в норме (control) и при умеренной кратковременной гипотермии (0.5 h), пролонгированной 1-часовой гипотермии (1 h), пролонгированной 3-часовой умеренной гипотермии (3 h) ($M \pm m$, $n = 8$). $p < 0.05$: * — относительно контроля.

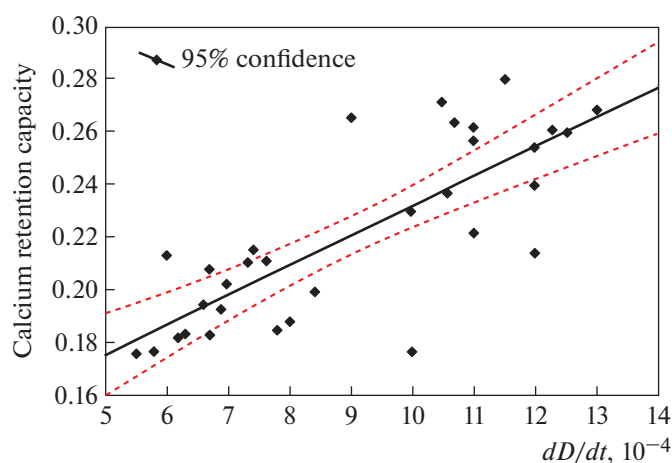


Рис. 3. Корреляционные связи между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий ($r = 0.79$, $p < 0.05$).

мического состояния до 1 ч способствует дальнейшему снижению скорости набухания, оно становится на 45.5% меньше контроля. Дальнейшее пролонгирование гипотермии способствует повышению значений dD/dt до уровня контрольных животных.

Еще одной из важнейших характеристик кальций-аккумулирующей способности митохондрий является кальциевая емкость. Под кальциевой емкостью понимается максимальное количество кальция, которое можно закачать в митохондрию, прежде чем в ней образуется митохондриальная пора. В первую очередь вход кальция управляется градиентом электрохимического протонного потенциала митохондрий. Вход в митохондрии положительно заряженных ионов кальция по градиенту электрохимического потенциала ($\Delta\mu$) способствует снижению $\Delta\mu$, стимулируя дыхание митохондрий.

Полярнографический метод определения кальциевой емкости основан на том, что последовательное добавление небольшого количества ионов кальция к суспензии митохондрий, содержащей избыток субстратов дыхания, обратимо стимулирует скорость потребления кислорода, пока очередная добавка Ca^{2+} приведет к необратимой стимуляции дыхания. Предельная концентрация Ca^{2+} будет отражать кальциевую емкость митохондрий.

Результаты нашего исследования позволили обнаружить, что у контрольных крыс она составляет 0.254 ± 0.021 мкмоль/мг белка. Кратковременная гипотермия способствует ее снижению на 19%, а ее пролонгирование до 1 ч — на 26% относительно контроля. Однако в течение 3 ч гипотермии кальциевая емкость, так же как и скорость кальций-индуцированного набухания, нормализуется и становится на 28% выше уровня часовой гипотермии (табл. 1).

Корреляционный анализ показал, что между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий имеется тесная взаимосвязь ($r = 0.79$, $p < 0.05$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипотермия — это состояние гомеотермного животного с пониженной температурой тела. Начальные этапы снижения температуры тела сопровождаются развитием стрессорной реакции, частью которой является генерация АФК [11]. Митохондрии являются одним из источников образования АФК, однако они также подвержены действию оксидантов. В исследованиях, проведенных ранее, было показано, что кратковременная и пролонгированная однократная гипотермия приводит к образованию интермедиатов ОМБ и ПОЛ в митохондриях печени крыс, а также к снижению содержания восстановленного глутатиона, α -токоферола и падению активности антиоксидантных ферментов [14, 15]. Вместе с тем в данной работе показано, что умеренная гипотермия на начальных этапах приводит к снижению чувствительности

Таблица 1. Кальциевая емкость митохондрий печени крыс (мкмоль CaCl_2 /мг белка) в норме и при гипотермии ($M \pm m$, $n = 8$)

Состояния животных	Кальциевая емкость (мкмоль/мг белка)
Контроль	0.254 ± 0.021
Гипотермия 30°C, 30 мин	$0.201 \pm 0.012^*$
Гипотермия 30°C, 1 ч	$0.188 \pm 0.013^*$
Гипотермия 30°C, 3 ч	0.241 ± 0.031

Примечания: $p < 0.05$: * — отличия относительно контроля.

митохондрий к ионам кальция, оцениваемое по кинетике набухания митохондрий и падению кальциевой емкости. Что послужило причиной данных изменений на начальных этапах гипотермии?

Скорость набухания митохондрий является маркером их высокой чувствительности к ионам кальция. Исследование показало, что начальные значения оптической плотности митохондрий печени крыс (до добавления в среду ионов кальция) при кратковременной гипотермии, а особенно при пролонгированной одночасовой гипотермии, — меньше таковых контроля. Это может свидетельствовать о том, что при этих состояниях *in vivo* уже произошли изменения проницаемости митохондрий, отражающиеся на степени их исходного набухания. Это дает основание предполагать, что на начальных этапах гипотермии увеличивается количество митохондриальных пор. В то же время при 3-часовой гипотермии проницаемость мембран нормализуется.

Известно, что в митохондриях может образовываться циклоспорин-А- (ЦсА-) чувствительная кальций-индуцируемая неспецифическая белковая пора (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) [25] и ЦсА-нечувствительная липидная пора, индуцируемая жирными кислотами и ионами Ca^{2+} [26]. Пальмитиновая кислота, связываясь с ионами кальция, приводит к открытию митохондриальной Ca^{2+} -зависимой ЦсА-нечувствительной поры, что обуславливает неспецифическую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны, особенно когда это сопровождается оксидативным стрессом, повышением концентрации фосфора (Pi) и истощением адениннуклеотидов [27].

Свойства МРТР хорошо известны, но ее точный молекулярный состав остается неопределенным. Нокаут-исследования исключили важную роль потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) и адениннуклеотид-транслоказы (ANT), хотя регуляторная роль ANT была подтверждена: исследования Хельстрапа свидетельствуют об участии митохондриального переносчика фосфата (PiC) в формировании МРТР [28]. Нокаут-исследования подтвердили роль циклофилина-D (CyP-D). CyP-D способствует конформационным изменениям PiC, вызываемым кальцием, в конечном итоге стимулируя открытие поры. Потеря CyP-D приводит к значительному увеличению пороговой концентрации Ca^{2+} для открытия поры, однако не к устранению самого открытия. Наиболее часто используемый экзогенный ингибитор МРТР — циклоспорин А — связывается с CyP-D в митохондриальном матриксе, блокируя связывание CyP-D с каналом VDAC [29, 30].

Одна из причин образования поры — окисление тиоловых групп белков митохондрий. Считается, что открытие поры вызвано снижением восстано-

вительных эквивалентов. Окисление NADPH в большей степени способствовало появлению поры, чем окисление NADH, так как NADPH играет центральную роль в защите митохондрий от оксидативного стресса [17].

Увеличение Ca^{2+} в среде инкубации до 300 нмоль/л, содержащей 1 мг белка митохондрий, способно привести к открытию поры, если митохондрии были подвергнуты оксидативным модификациям [28, 30]. Специфическое конформационное изменение комплекса I, которое приводит к увеличению продукции H_2O_2 при окислении субстратов, также может привести к открытию МРТР [31]. Открытие поры способствует снижению Ca^{2+} -емкости митохондрий и потере матричных компонентов с последующим набуханием митохондрий [17].

В наших исследованиях показано, что дыхательный контроль восстанавливается при 3-часовой гипотермии до уровня кратковременной гипотермии, а не до уровня контрольных значений, т.е. митохондрии были разобщенными, хотя и незначительно, при данном состоянии, а показатели кальциевого гомеостаза достигли уровня контроля. В то же время при 3-часовой гипотермии происходит восстановление до контрольных значений маркеров ОМБ, таких как тиоловые и карбонильные группы. Полученные результаты позволяют предполагать, что существенную роль в индукции проницаемости митохондрий печени крыс на начальных этапах при умеренной гипотермии вносят оксидативные повреждения мембран митохондрий. Это подтверждается данными других исследователей. Так, например, окисление SH-групп Cys-57 ANT приводит к конформационным изменениям транслоказы, что в свою очередь может влиять на чувствительность CyP-D к ионам кальция, стимулируя открытие МРТР [32]. Результаты скорости кальций-индуцированного набухания сходны с результатами содержания SH-групп мембран митохондрий печени крыс [14]. В соответствии с результатами проведенного нами корреляционного анализа между кальциевой емкостью митохондрий и скоростью их кальций-индуцированного набухания имеется положительная корреляция ($r = 0.79$; $p \leq 0.05$). Это означает, что кальций-аккумулирующая способность митохондрий зависит от состояния митохондриальных пор. Если на кальций-аккумулирующих свойствах митохондрий печени крыс существенное влияние оказывает окислительные модификации мембранных митохондриальных структур, то каким образом нивелировались эффекты повреждений? Результаты исследования влияния умеренной гипотермии на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс показали, что пролонгированная 3-часовая гипотермия приводит к повышению активности ферментов антиоксидантной системы и уровня восстановленного глутатиона [15]. Возможно, что ключевую роль в нормализации

параметров кальций-аккумулирующей системы митохондрий играет активация антиоксидантной системы митохондрий. Существуют немногочисленные данные, которые указывают на развитие адаптивных изменений при гипотермии. Подобная толерантная температурная стратегия встречается у млекопитающих, ярким примером ее является спячка.

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что на начальных этапах гипотермии происходит снижение кальций-аккумулирующей способности митохондрий печени крыс и повышение проницаемости митохондрий для ионов кальция. Это снижение, скорее всего, связано с образованием митохондриальных пор. Пермеабилзация митохондриальных мембран при низких температурах тела гомойотермных животных носит обратимый характер, поскольку пролонгирование гипотермического состояния до 3 ч способствует нормализации исследуемых параметров. Отсюда следует, что при длительном воздействии холодового фактора у крыс происходит активация ряда компенсаторно-приспособительных реакций, о чем свидетельствуют не только результаты данно-го, но и предыдущих наших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, с соблюдением Приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. (“Правила надлежащей лабораторной практики”).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Госзадания FZNZ-2020-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.И.Х. — получение экспериментальных данных статьи, описание результатов; Р.А.Х. — постановка проблемы, разработка концепции статьи и дизайн исследования; А.М.Д. — статистическая обработка экспериментальных данных и их интерпретация; В.Р.А. — критический анализ литературы и формирование выводов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vasington FD, and Murphy JV* (1962) Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem* 237:2670–2677. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)73805-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)73805-8)
2. *Denton RM* (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta Bioenergy* 1787(11):1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
3. *Polderman KH* (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Med* 37 (7):186–202. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
4. *Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li G-Y* (2019) Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00586>
5. *Paal P, Brugger H, Strapazzon G* (2018) Accidental hypothermia. *Handbook of Clinical Neurology*. 157:547–563. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64074-1.00>
6. *Paal P, Pasquier M, Darocha T, Lechner R, Kosinski S, Wallner B, Zafren K, Brugger H* (2022) Accidental Hypothermia: 2021 Update. *Int J Environ Res Public Heal* 19:501. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010501>
7. *Soreide K* (2014) Clinical and translational aspects of hypothermia in major trauma patients: from pathophysiology to prevention, prognosis and potential preservation. *Injury* 45(4):647–654. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.12.027>
8. *Hakim SM, Ammar MA, Reyad MS* (2018) Effect of therapeutic hypothermia on survival and neurological outcome in adults suffering cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Minerva Anestesiol* 84(6):720–730. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.18.12164-X>
9. *Yamada KP, Kariya T, Aikawa T, Ishikawa K* (2021) Effects of Therapeutic Hypothermia on Normal and Ischemic Heart. *Front Cardiovasc Med* 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.642843>
10. *Onose G, Anghelescu A, Blendea D, Ciobanu V, Daia C, Firan FC, Oprea M, Spinu A, Popescu C, Ionescu A, Busnatiu S, Munteanu C* (2022) Cellular and Molecular Targets for Non-Invasive, Non-Pharmacological Therapeutic/Rehabilitative Interventions in Acute Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 23:(907). <https://doi.org/10.3390/ijms23020907>
11. *Кличханов НК, Исмаилова ЖГ, Астаева МД* (2016) Интенсивность свободнорадикальных процессов в крови крыс при глубокой гипотермии и в ходе самонагрева. *Бюл ВСНЦ СО РАМН* 1(5):104–109. [*Klichkhanov NK, Ismailova ZG, Astaeva MD*. Intensity of free radical processes in rats' blood while deep hypothermia and self-warming. *Acta Biomed Sci* 1(5):104–109. (In Russ)]. <https://doi.org/10.12737/23402>
12. *Alva N, Palomeque J, Carbonell T* (2013) Oxidative Stress and Antioxidant Activity in Hypothermia and rewarming: can RONS Modulate the Beneficial Effects of Therapeutic Hypothermia. *Oxidative Med Cel Longevit* 2013:20–28. <https://doi.org/10.1155/2013/957054>

13. Schaible N, Han YS, Tveita T, Siecka GC (2018) Role of Superoxide Ion Formation in Hypothermia/Rewarming Induced Contractile Dysfunction in Cardiomyocytes. *Cryobiology* 81:57–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.010>
14. Khalilov RA, Dzhafarova AM, Khizrieva SI, Abdullaev VR (2019) The Intensity of Free Radical Processes on Rat Liver Mitochondria under Moderate Hypothermia of Various Duration. *Cell Tissue Biol* 13:446–456.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X1906004X>
15. Khizrieva SI, Khalilov RA, Dzhafarova AM, Abdullaev VR (2022) Antioxidant Status of Rat Liver Mitochondria under Conditions of Moderate Hypothermia of Different Duration. *Bull Exp Biol Med* 172(3):305–309.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05382-w>
16. Khalilov RA, Khizrieva SI, Dzhafarova AM, Abdullaev VR (2020) The Bioenergetic characteristics of mitochondria of the rat liver at low body temperatures. *Probl Biol Med Pharmaceut Chem* 22(5):35–41.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-07>
17. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495(1–2):12–15.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02316-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02316-X)
18. Baranov SV, Stavrovskaya IG, Brown AM, Tyryshkin AM, Kristal BS (2008) Kinetic Model for Ca^{2+} -induced Permeability Transition in Energized Liver Mitochondria Discriminates between Inhibitor Mechanisms. *J Biol Chem* 283(2):665–676.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M703484200>
19. Рыбальченко ВК, Коганов ММ (1998) Структура и функции мембран. — Киев: ВШ. 312 с. [Rybalchenko VK, Koganov MM (1998) Membrane structure and functions. Kiev: VSh. 312 p. (In Russ)].
20. Lowry DH (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
21. Brookes PS, Darley-Usmar VM (2004) Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:39–46.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00742.2003>
22. Marinelli F, Almagor L, Hiller R, Giladi M, Khanashvili D, Faraldo-Gómez J, Kaback HR (2014) Sodium recognition by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the outward facing conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:5354–5362.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1415751111>
23. Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller CJ (2014) Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter Letm1. *Gen Physiol* 143(1): 67–73.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201311096>
24. Belosludtsev KN, Dubinin MV, Belosludtseva NV, Mironova GD (2019) Mitochondrial Ca^{2+} Transport: Mechanisms, Molecular Structures, and Role in Cells. *Biochemistry (Moscow)* 84(6):593–607.
<https://doi.org/10.1134/s0006297919060026>
25. Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R, Bernardi P (1993) Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem* 268(29):21939–21945.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)80631-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)80631-0)
26. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Mironova GD (2005) Possible mechanism for formation and regulation of the palmitate-induced cyclosporin A-insensitive mitochondrial pore. *Biochemistry (Moscow)* 70(7):987–994.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)80631-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)80631-0)
27. Zoratti M, Szabb I (1995) The mitochondrial permeability transitions. *Biochim Biophys Acta* 1241(2):139–176.
[https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-a](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-a)
28. Halestrap AP (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46:821–831.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>
29. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Letters* 567(1):96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.071>
30. Bernardi P, Di Lisa F (2014) The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 78:100–106.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023>
31. Batandier CC, Leverve X, Fontaine E (2004) Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *J Biol Chem* 279(17):17197–17204.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m310329200>
32. McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367:541–548.
<https://doi.org/10.1042/BJ20011672>

CALCIUM-ACCUMULATING ABILITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA DURING HYPOTHERMIA OF VARIOUS DURATIONS

S. I. Khizrieva^a, R. A. Khalilov^a, A. M. Dzhafarova^{a, #}, and V. R. Abdullaev^a

^aDagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

[#]e-mail: albina19764@mail.ru

Calcium is one of the most important intracellular messengers that regulate physiological and biochemical processes in the cell. Mitochondria are able to deposit calcium ions and are involved in the regulation of the calcium signal. Hypothermic conditions in homoiothermic animals can lead to disruption of this important function of mitochondria and pathological consequences. The aim of this study is to study the effects of moderate (30°C)

hypothermia of varying duration on the calcium-accumulating capacity of rat liver mitochondria. The experiments were carried out on male rats Wistar. Hypothermia was induced by external cooling of the animals in Plexiglas chambers with a jacket through which cold water circulated. Mitochondria were isolated from the liver of decapitated rats by differential centrifugation. The calcium-accumulating capacity of mitochondria was assessed by the kinetics of calcium-induced swelling of mitochondria and their calcium capacity. A study of the kinetics of calcium-induced swelling of mitochondria showed that during short-term moderate (30°C) hypothermia, the rate of swelling of mitochondria decreases, prolongation of hypothermia to 1 h contributes to a further decrease in the swelling rate, and to 3 h, its normalization. A positive correlation was found between the rate of calcium-induced swelling and the calcium capacity of mitochondria ($r = 0.79$). Thus, with prolonged exposure to the cold factor in rats, a number of compensatory-adaptive reactions are activated. The decrease in the rate of Ca^{2+} – induced swelling and calcium capacity of mitochondria at the initial stages of hypothermia may be associated with the formation of mitochondrial pores and is reversible.

Keywords: rats, hypothermia, mitochondria, Ca^{2+} – induced swelling of mitochondria, calcium capacity

ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙРОГЕННОЙ НИШЕ ГИППОКАМПА КРЫС ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

© 2023 г. Е. Н. Федорова^{1,2,*}, Д. Н. Воронков¹, А. В. Егорова^{1,2}, Т. И. Баранич^{1,2}, В. В. Глинкина²,
Э. Л. Германова³, Л. Д. Лукьянова³, В. С. Сухоруков^{1,2}

¹Научный центр неврологии, Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: ewgenia.feodorowa2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Одной из наиболее уязвимых к гипоксии структур мозга является гиппокамп. Поддержание пула клеток нейрогенной ниши в субгранулярной зоне гиппокампа (SGZ) обеспечивается адаптационными механизмами, среди которых — изменение функционирования комплексов дыхательной цепи митохондрий и реакция астроглии, обеспечивающей метаболическую поддержку нейронов. С целью изучения динамики адаптационных изменений нейронов и глии в зубчатой извилине гиппокампа в условиях гипоксии на модели периодической гипобарической гипоксии (5000 м, эквивалентно 10.5% O₂), при однократном (60 мин) и многократном (8 и 20 эпизодов) воздействии у низкоустойчивых крыс иммуноморфологическими методами выявляли особенности локализации и содержания комплекса IV дыхательной цепи митохондрий (MTCO1), маркерных астроцитарных белков: глутаминсинтетазы (GS) и GFAP, а также даблкортина (DCX) — маркера незрелых нейронов. При однократной гипоксии значительно повышалось содержание MTCO1 в нейронах, а при восьмикратном воздействии увеличивалось количество глутаминсинтетазы (GS) в астроцитах зубчатой извилины гиппокампа. Изменения содержания GS были наиболее выражены в отростках астроцитов, что говорит о перераспределении GS при гипоксии. Количество DCX+ нейронов в SGZ значительно снижалось после 20 эпизодов гипоксии, при этом в полиморфном слое обнаруживались DCX+ клетки глиальной морфологии, а окрашивание на GFAP показало увеличение количества астроцитов в полиморфном слое, что может быть связано в том числе со смещением направления дифференцировки клеток нейрогенной ниши. Таким образом, при гипоксии в SGZ гиппокампа на начальном этапе происходит интенсификация работы дыхательной цепи нейронов зернистого слоя с последующей активацией астроцитов, модулирующих обмен глутамата. Наличие взаимосвязи между динамикой адаптационных реакций энергообмена в нейронах и глии и изменениями нейрогенеза после 20 эпизодов гипоксии позволяет предположить, что при многократной гипоксии происходит сдвиг дифференцировки нейральных предшественников SGZ в направлении астроглии, однако, этот вопрос требует дальнейшего изучения для более точного определения природы DCX+ клеток.

Ключевые слова: гипобарическая гипоксия, цитохромоксидаза, глутаминсинтетаза, нейрогенез, гиппокамп

DOI: 10.31857/S0044452923040022, **EDN:** OTWETL

ВВЕДЕНИЕ

Чувствительность нервной ткани к гипоксическому воздействию обусловлена ее высокой энергозависимостью. При этом одной из наиболее уязвимых к гипоксии структур мозга является гиппокамп [1]. Последний играет ключевую роль в когнитивных процессах и проявляет высокую способность к адаптации и динамической структурной реорганизации нейронных сетей, в том числе, благодаря нейрогенезу, протекающему в зубчатой извилине [2].

Нейрогенная ниша субгранулярной зоны гиппокампа отличается особенностями нейроглиальных и нейроваскулярных взаимодействий [3, 4], определяющими специфичность микроокружения нейрональных предшественников. *In vitro* было показано, что поддержание нервных стволовых клеток (NSC) в недифференцированном состоянии обеспечивается сниженной оксигенацией [5], что делает изучение регуляторных механизмов в нише нейрональных предшественников актуальным как в нормальных условиях, так и при стрессовых воздействиях и, прежде всего, при гипоксии. Эффек-

ты экзогенной гипоксии на дифференцировку и созревание NSC разнообразны и зависят от тяжести гипоксического воздействия. Основным путем, реализующим адаптационный ответ клеток на гипоксию, служит увеличение экспрессии транскрипционных факторов HIF1-2, регулирующих синтез ростовых факторов (VEGF, TGFb), митохондриальный метаболизм и митохондриальную динамику [6]. Активность митохондрий имеет решающее значение для контроля пролиферации и дифференцировки нейрональных предшественников. В частности, пролиферация NSC как в эмбриональном, так и во взрослом периоде связана с высокой активностью гликолиза, в то время как дифференцировка NSC сопряжена с усилением реакций окислительного фосфорилирования [7]. Такое метаболическое переключение обеспечивает не только увеличение производства энергии, но и рассматривается как триггер, определяющий судьбу NSC.

Несмотря на значительное число исследований, проводимых на моделях экзогенной гипобарической гипоксии, работ, посвященных анализу клеточных реакций в гиппокампе, немного. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о значительном повышении устойчивости животных и человека к гипоксии при пребывании в условиях среднегорья, что обусловило развитие гипокситерапии в качестве самостоятельного лечебного фактора, применяемого в медицинской практике. Показано, что оптимальные условия, не вызывающие повреждающих эффектов и максимально способствующие формированию адаптационных реакций у грызунов, реализуются при содержании во вдыхаемом воздухе 10–12% кислорода, что эквивалентно высоте 5000 м [8]. При этом было установлено [8], что срочная адаптация к указанным условиям гипоксии (умеренная гипобарическая гипоксия, содержание кислорода во вдыхаемом воздухе 10.5% O₂) в коре головного мозга формируется за счет репрограммирования работы дыхательной цепи с переключением на сукцинат-оксидазный путь окисления. При многократных же воздействиях переключение на уровне субстратного звена наблюдалось только при первых 8 эпизодах одночасового применения гипоксии, создавая предпосылки для последующего восстановления НАД-зависимого окисления, приводя к появлению изоформ I митохондриального ферментного комплекса с новыми кинетическими свойствами [8]. Таким образом, компенсаторно-регуляторная смена метаболических путей окисления энергетических субстратов способствовала сохранению высокой активности электрон-транспортной функции цитохромного участка дыхательной цепи, обеспечивая высокую эффективность реакций окислительного фосфорилирования.

Цитохромоксидаза (МТСО) — терминальный фермент митохондриальной дыхательной цепи, состоящий из 13 субъединиц, в котором “катали-

ческие” субъединицы 1–3 кодируются митохондриальной ДНК, а “дополнительные” субъединицы 4–13 контролируются ядерным геномом [9]. Такая сложная структурная организация МТСО обуславливает наличие в том числе дополнительных регуляторных механизмов контроля активности фермента за счет тканеспецифической экспрессии изоформ МТСО и путем аллостерической регуляции активности субъединиц [9]. МТСО1 — основной компонент IV митохондриального ферментного комплекса, представляющий собой каталитическую субъединицу цитохром-с-оксидазы, кодируемую митохондриальной ДНК. При этом субъединица МТСО1 является ключевой, поскольку именно в ней локализируются гем- и медь-содержащие домены — активные сайты, обеспечивающие взаимодействие между восстановлением кислорода и переносом протонов в межмембранное пространство. Перечисленные характеристики IV митохондриального комплекса определяют его уникальность и объясняют выбор данного фермента в качестве маркера метаболической активности нейронов при формировании адаптации к гипоксии.

Интересно, что для клеток с высокой пролиферативной активностью, а именно для раковых и эмбриональных стволовых клеток, еще одним метаболическим путем, определяющим направление дифференцировки, является глутаминолиз [10]. Глутаминолиз обеспечивает образование метаболитов цикла Кребса независимо от гликолиза благодаря превращению глутамин в глутамат с последующим образованием α-кетоглутарата. Показано участие глутаминолиза в поддержании пролиферации NSC в неокортексе [11], что указывает на возможность влияния ферментов, участвующих в глутаматном медиаторном обмене, на процесс нейрогенеза.

Известно, что нейроны и глия характеризуются разной чувствительностью к повреждающему действию гипоксии. При этом астроциты менее чувствительны к недостатку кислорода, так как осуществляют синтез АТФ преимущественно за счет реакций гликолиза, в то время как для нейронов характерна высокая активность процессов окислительного фосфорилирования. [12]. Существенными компонентами в реакции нервной ткани на гипоксию являются регуляция захвата и утилизации глутамата астроцитами. Астроциты, являясь полноправными участниками глутаматергической нейромедиации, активно контролируют уровень глутамата в синаптической щели. В астроцитах глутамат либо амидируется до глутамина через глутаминсинтетазу, а затем возвращается обратно в нейроны (цикл глутамат-глутамин), либо метаболизм глутамата становится энергопродуцирующим и из глутамата образуется один из метаболитов цикла Кребса — α-кетоглутарат (цикл Робертса, ГАМК шунт) [13]. При этом, захватывая умеренную кон-

центрацию глутамата (0.01–0.1 мМ), астроциты метаболизируют его до глутамина, тогда как высокие концентрации (0.2–0.5 мМ) утилизируются в цикле Кребса [14].

Глутаминсинтетаза (GS) представляет собой цитоплазматический фермент, который экспрессируется преимущественно астроцитами и катализирует АТФ-зависимый синтез глутамина из глутамата и аммиака, участвуя, таким образом, в метаболизме нейромедиаторов и в детоксикации ионов аммония. Нарушения активности GS вовлечены в патогенез печеночной энцефалопатии, ишемии, эпилепсии, черепно-мозговой травмы и нейродегенеративных заболеваний [15]. Продемонстрирована роль GS в функционировании гиппокампа. Так, отмечено, что ингибирование GS приводит к нарушениям памяти у однодневных цыплят [16], а системное введение ингибитора GS – метионин-сульфоксимида (MSO) новорожденным мышам вызывает снижение экспрессии GS и GFAP в СА3 области гиппокампа, приводя к нарушениям пространственной памяти во взрослом возрасте [17]. Снижение активности GS при гипоксии может вызывать повреждение нейронов различными механизмами: как путем развития глутаматной эксайтотоксичности, обусловленной гиперстимуляцией глутаматных рецепторов с последующим накоплением внутриклеточного кальция и развитием митохондриальной дисфункции, так и за счет интоксикации азотистыми соединениями.

Таким образом, для нейронов гиппокампа важны механизмы адаптации, среди которых – изменение функционального состояния комплексов дыхательной цепи митохондрий и реакция астроглии, обеспечивающей метаболическую поддержку нейронов, в том числе, с помощью глутамин-глутаматного пути, связанного как с обменом медиаторов, так и с энергетическим метаболизмом. Морфологический подход к изучению изменений клеточных популяций в нейрогенных нишах на хорошо охарактеризованной модели периодической гипобарической гипоксии [8] позволяет дифференцированно оценить адаптационные изменения глутаматного обмена и функционирования дыхательной цепи митохондрий в системе нейрон-астроцит, расширить представление об альтернативных путях получения энергии при гипоксии и влиянии гипоксии на процесс нейрогенеза. Оценка нейрогенеза при адаптационных изменениях энергообмена особенно актуальна, поскольку для клеток нейрогенных ниш изначально характерно нахождение в условиях сниженной оксигенации [5], что определяет гипоксию как важный регуляторный фактор [7], исследование которого может иметь значение, в том числе, при разработке методов клеточной терапии с использованием нейральных стволовых клеток. Таким образом, исследование адаптационных изменений при гипоксии может открывать новые пути для разработки эффектив-

ных стратегий нейропротекции и нейрорегенерации.

Цель исследования: оценить динамику адаптационных изменений нейронов и глии зубчатой извилины гиппокампа крыс при остром и многократном гипоксическом воздействии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах (самцы $n = 20$, массой тела 200–250 г), выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии” при свободном доступе к воде и пище, естественном чередовании суточной освещенности.

Моделирование гипоксии. Для моделирования экзогенной гипоксии использовалась барокамера проточного типа. Крыс предварительно (за 4 нед до экспериментов) тестировали по их чувствительности к острой гипобарической гипоксии (подъем на высоту 11.5 тыс. м; атм. давление 180 мм рт. ст.; содержание кислорода 3% O_2), и ранжировали на высоко- и низкоустойчивых [8]. В нашем эксперименте были использованы низкоустойчивые крысы, имеющие индекс резистентности не более 2 мин. Эффект однократного и повторного гипоксического воздействия оценивался при давлении 380 мм рт. ст. (эквивалентном подъему на высоту 5000 м; содержание кислорода во вдыхаемом воздухе – 10.5%; гипоксия средней тяжести). Длительность однократного воздействия составляла 60 мин. Многократное воздействие включало в себя 8 и 20 эпизодов гипоксии по 60 мин, один раз в сутки. Группа интактных животных содержалась в тех же условиях, что и включенные в эксперимент животные. Таким образом, были сформированы 4 экспериментальные группы: однократное воздействие 60 мин, 8 воздействий по 60 мин, 20 воздействий по 60 мин и группа интактного контроля.

Иммуноморфологическое исследование. Сразу после извлечения из барокамеры крыс декапитировали, их мозг фиксировали 24 ч в 4%-ном нейтральном формалине (HistoLine, Россия), заключали в парафиновые блоки и готовили фронтальные срезы толщиной 7 мкм на микротоме Thermo Fisher (США). Для исследования была взята роstralная часть гиппокампа (уровень от брегмы от –3 до –4.5 мм), уровень срезов определяли по атласу мозга крысы Paxinos. Для демаскировки антигенов при иммунофлуоресценции срезы нагревали в пароварке, 15 мин в ЭДТА-буфере (EnVision Flex pH=9, Dako, Дания), далее их промывали в PBS с 0.1% Triton X-100 (Acros-Organics, Бельгия) и инкубировали 18 ч при комнатной температуре с первичными антителами. Использовали кроличьи или мышинные антитела к белкам астроцитов – глиофибрилярному белку (GFAP, 1:200, ab279290, Abcam, Великобритания) и глутаминсинтетазе (GS, 1:400,

G2781, Merck-Sigma, Германия), а также к маркеру незрелых нейронов — даблкортину (DCX, 1:100, ab18723, Abcam, Великобритания) и субъединице I митохондриального комплекса IV (цитохромоксидаза, MTCO1, 1:100, 106E1A8, Invitrogen, США). Для выявления связывания антител срезы инкубировали 4 часа с соответствующими вторичными антителами против IgG мыши или кролика (Sigma, Германия), конъюгированными с флуорохромами CF488 или CF555. Ядра докрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Merck-Sigma, Германия) и заключали срезы в среду FluoroShield (Merck-Sigma, Германия).

Иммуногистохимическим пероксидазным методом, следуя протоколу производителя антител, выявляли MTCO1. Демаскировку антигенов производили при нагревании в пароварке, 20 мин в цитратном буфере (EnVision Flex pH = 6, Dako, Дания). Срезы с антителами инкубировали при 4°C 18 ч, для визуализации использовали полимерную пероксидазную систему детекции (Novolink, Leica, Германия) с 3,3'-диаминобензидином в качестве хромогена. Ядра докрашивали гематоксилином и заключали срезы в водорастворимую среду Immuno-Mount (Thermo Scientific, США).

Морфометрия и статистическая обработка. Изучение и морфометрия срезов проводились с помощью микроскопов Leica DMLB (США) или Nikon Eclipse NiU (Япония), оснащенных цифровыми камерами и системами анализа изображений. Для захвата всей зубчатой извилины требовалось несколько изображений. Морфометрический анализ выполняли на 4–6 срезах, взятых от каждого животного, в области зубчатой извилины гиппокампа (в его роstralной части) в обоих полушариях. Исследовали не менее 10–15 полей зрения при увеличении объектива $\times 20$ и $\times 40$. Слой зернистых клеток визуализировали по ядрам нейронов. Субгранулярную зону (SGZ) определяли по методике, описанной ранее [18] как область толщиной до трех клеток, расположенную между зернистым и полиморфным слоями. С помощью программ Leica QWin и ImageJ оценивали плотность клеток и интенсивность окрашивания. Все измерения производили на изображениях, полученных с одинаковыми настройками микроскопа.

Количество DCX+ клеток определяли на единицу длины зубчатой извилины. Для оценки распределения MTCO1, на микрофотографиях препаратов окрашенных иммунопероксидазным методом, соматическим нейронам выделяли в программе Leica Qwin вручную и оценивали интенсивность окрашивания (8 бит, 256 градаций серого) с коррекцией на фоновое значение. Интенсивность окрашивания для иммунопероксидазных препаратов определяли как разность максимального значения яркости (255) и средней яркости пикселей в выделенной области, таким образом, меньшее значение

интенсивности соответствовало более светлому окрашиванию на препаратах. Для оценки локализации GS в отростках и телах глиальных клеток, в программе ImageJ была реализована следующая процедура: 1) автоматически сегментировали ядра клеток, окрашенные DAPI; 2) полученную маску расширяли до границ тела клетки, вычитали область ядра и оценивали среднюю яркость в этой зоне; 3) при помощи алгоритма сегментации с адаптивным порогом по Otsu [19] выделяли только отростки клеток, результаты выделения корректировали вручную и так же оценивали среднюю яркость. Учитывая данные, демонстрирующие формирование астроцитами гиппокампа индивидуальных областей (доменов) [20], этот метод позволяет определить интенсивность окрашивания в отростках отдельных клеток астроглии, за исключением их наиболее тонких, дистальных отделов. Также оценивали среднюю интенсивность флуоресценции при окрашивании на GS на поле зрения в соответствующих слоях зубчатой извилины.

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism. Данные, полученные от каждого животного, усредняли. Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее, SD — среднеквадратичное отклонение. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Локализация исследуемых белков в гиппокампе интактных крыс

Использование антител к MTCO1 выявило окрашивание клеток полиморфного (хилуса), зернистого слоев и SGZ зубчатой извилины гиппокампа с преимущественной локализацией маркера в соматическом нейроне (рис. 1а, 1б, рис. 2д). Окрашивание на MTCO1 в виде пунктата (гранул разных размеров) выявляли как в телах нейронов и глии, так и в окружающем их нейропиле (рис. 1а). Клеток, где окрашивание полностью отсутствовало, мы не наблюдали, что подтверждает облигатный характер экспрессии MTCO1. Характер распределения и размеры гранул в клетках различаются, что, возможно, связано с изменениями размеров митохондрий из-за перестройки динамических процессов слияния и деления, и требует дальнейшего анализа на ультраструктурном уровне. Среди клеток SGZ и полиморфного слоев обнаруживали как интенсивно, так и слабо окрашенные нейроны, тогда как в зернистом слое распределение окрашивания в клетках было более равномерным (рис. 1а, рис. 2д). Наибольшее количество интенсивно окрашенных клеток наблюдали в SGZ, клетки полиморфного слоя варьировали по размеру и степени окрашивания.

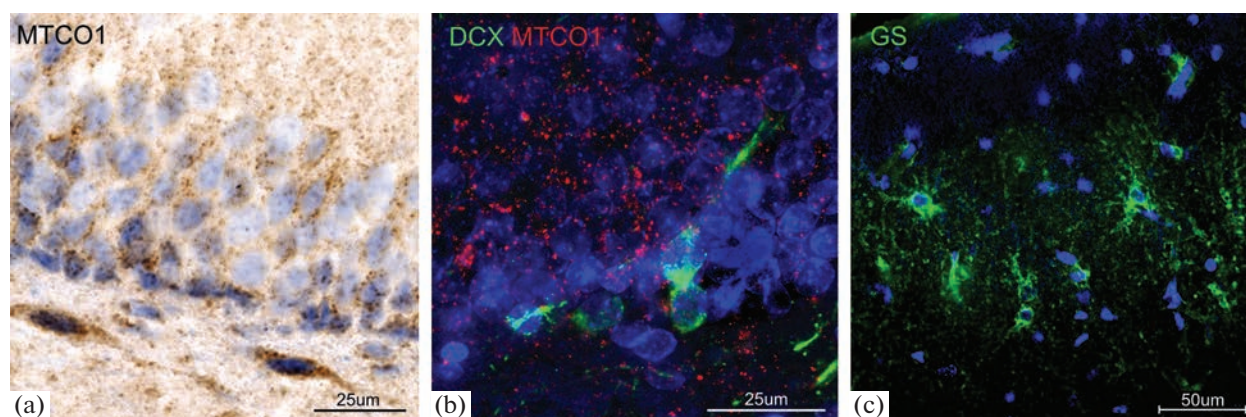


Рис. 1. Распределение субъединицы I цитохромоксидазы (MTCO1), даблкортина (DCX) и глутаминсинтетазы (GS) в клеточных элементах зубчатой извилины гиппокампа интактных крыс.

(a) — Выявление MTCO1 иммунопероксидазным методом. (b) — Выявление DCX (зеленый канал) и MTCO1 (красный канал) в клетках зернистого слоя и субгранулярной зоны. Знаком “*” — помечены DCX-позитивные незрелые нейроны, с низким содержанием MTCO1. Ядра окрашены DAPI (синий). Изображение получено из 10 фокальных планов методом проекции максимальной интенсивности (maximum intensity projection) при увеличении объектива $\times 100$. (c) — Локализация глутаминсинтетазы (зеленый канал) в астроцитах молекулярного слоя.

Локализация DCX — маркера незрелых нейронов, выявлялась большей частью в нейрональных предшественниках в SGZ (рис. 1b, рис. 4c, e), а также в отдельных клетках полиморфного слоя, имеющих глиальную морфологию. Незрелые нейроны были распределены неравномерно — их плотность в передней и средней трети зубчатой извилины была выше, чем в задней трети. Двойное окрашивание на MTCO1 и DCX показало, что DCX+ клетки SGZ характеризуются низким содержанием цитохромоксидазы (рис. 1b), в отличие от зрелых нейронов зернистого слоя.

Астроциты выявляли как с помощью антител к GFAP, так и к GS. В зубчатой извилине обнаруживали преимущественно GS-позитивные астроциты (рис. 1c), при этом GS-позитивных глиальных клеток, лишенных отростков и характерных для других структур мозга, в особенности — белого вещества [21] не было обнаружено. Наибольшая плотность астроглии отмечалась в полиморфном и молекулярном слоях зубчатой извилины.

Изменения исследуемых белков при гипоксии

Выявили значимые различия интенсивности окрашивания MTCO1 в исследуемых структурах в зависимости от количества эпизодов гипоксии (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, $F_{(6, 48)} = 10.7$, $p < 0.001$). Оценка распределения MTCO1 в зубчатой извилине показала, что средняя интенсивность окрашивания при однократном воздействии значимо повышалась в цитоплазме нейронов полиморфного (контроль: 12.83 ± 2.069 , острая гипоксия: 43.65 ± 6.397 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2a, e) и зернистого слоев (контроль: 16.7 ± 3.03 , острая гипоксия: 43.7 ± 7.68 , тест Тьюки,

$p < 0.001$), (рис. 2b, e). При этом изменения в SGZ были наиболее выраженными и характеризовались повышением MTCO1 как при однократном (контроль: 26.7 ± 2.951 , острая гипоксия: 65.47 ± 15.84 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2c, e), так и при восьмикратном воздействии (контроль: 26.7 ± 2.951 , 8 эпизодов гипоксии: 58.49 ± 7.13 , тест Тьюки, $p < 0.001$), (рис. 2c, f), что говорит об активации электрон-транспортной функции цитохромоксидазы. Аналогичные данные ранее были получены в коре головного мозга [8]. Хотя в полиморфном и зернистом слоях при длительном воздействии средние значения интенсивности окрашивания снижались, однако эти изменения не были статистически значимыми, и только в SGZ было отмечено значимое (острая гипоксия: 65.47 ± 15.84 , 20 эпизодов гипоксии: 16.46 ± 5.05 , $p < 0.001$) снижение интенсивности MTCO1 в группе после 20 эпизодов гипоксии (рис. 2c, g), по сравнению с группой после острого воздействия, обусловленное, вероятно, необходимостью экономизации энергетического обмена в рамках формирования долгосрочной адаптации к гипоксии. Таким образом, наиболее выраженными были колебания содержания MTCO1 в субгранулярной зоне, что может указывать на высокую чувствительность этой структуры к гипоксии. Выявленное на ранних сроках увеличение содержания MTCO1 отражает краткосрочную компенсаторную активацию метаболизма в зубчатой извилине в целом, и в субгранулярной зоне, необходимую, в том числе, для поддержания дифференцировки нейрональных предшественников в условиях сниженной оксигенации.

Значимое снижение плотности DCX+ нейронов в SGZ отмечалось после 20 эпизодов гипоксии (на 70% по сравнению с контролем, ANOVA $F_{(3, 16)} =$

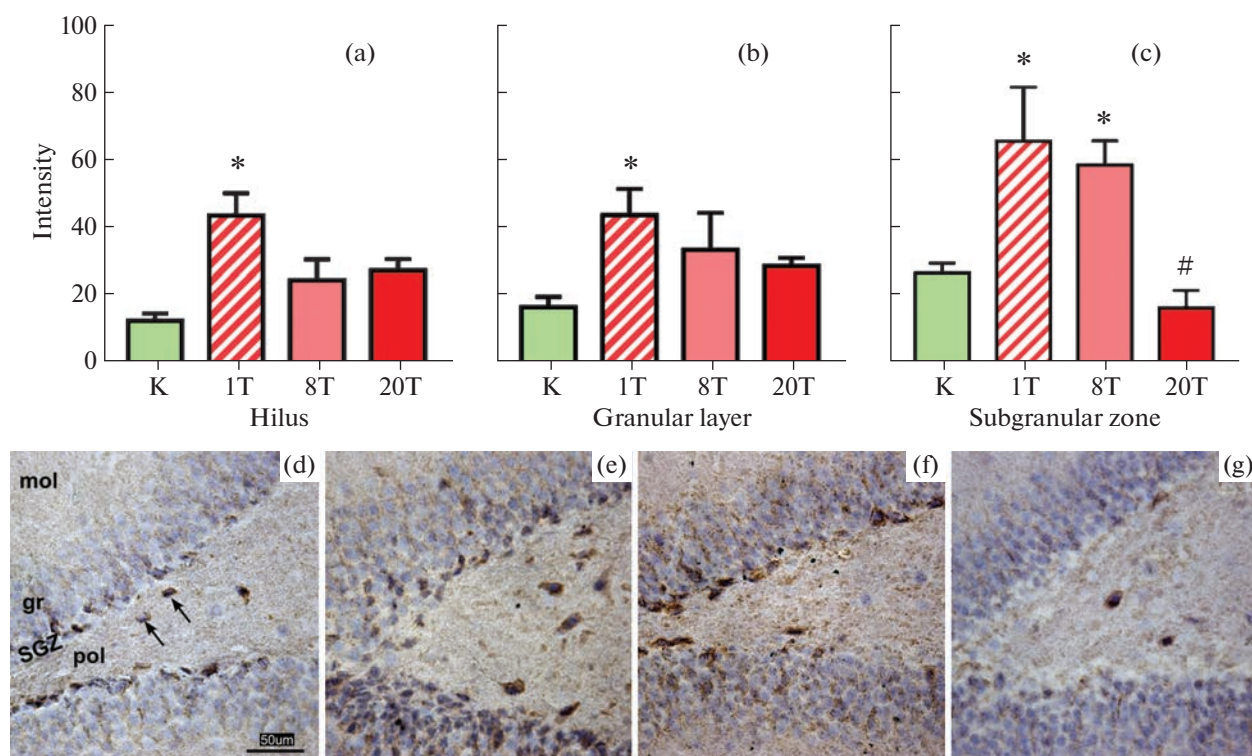


Рис. 2. Средняя интенсивность окрашивания на субъединицу I цитохромоксидазы (MTCO1), в нейронах слоев зубчатой извилины гиппокампа при остром (60 мин, 5000 м) и многократном гипоксическом воздействии (повторные эпизоды, один раз в сутки): (a) – нейроны полиморфного слоя; (b) – нейроны зернистого слоя; (c) – нейроны субгранулярной зоны. К – контрольная группа, 1Т – однократное гипоксическое воздействие; 8Т – восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Выявление MTCO1 иммунопероксидазным методом: (d) – контрольная группа, (e) – однократное гипоксическое воздействие; (f) – восьмикратное гипоксическое воздействие; (g) – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; стрелки указывают на нейроны субгранулярной зоны и полиморфного слоя с интенсивным окрашиванием на цитохромоксидазу; докрасивание гематоксилином. mol – молекулярный слой, gr – зернистый слой, SGZ – субгранулярная зона гиппокампа, pol – полиморфный слой.

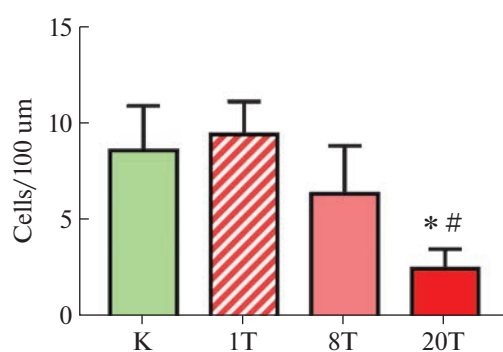


Рис. 3. Плотность DCX-позитивных нейрональных предшественников в субгранулярной зоне (число клеток на длину зубчатой извилины). К – контрольная группа, 1Т – однократное гипоксическое воздействие; 8Т – восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т – двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

= 12.65, тест Тьюки, $p < 0.001$), однако, количество DCX+ незрелых нейронов (рис. 3а) в SGZ зубчатой извилины гиппокампа не отличалось от контроля при остром и восьмикратном гипоксическом воздействии.

Полученные данные демонстрируют изменения процесса созревания клеток и дифференцировки нейрональных предшественников при многократном гипоксическом воздействии. Кроме того, в полиморфном слое зубчатой извилины гиппокампа также выявили увеличение количества DCX+ клеток глиальной морфологии, что, может быть, обусловлено сдвигом дифференцировки нейрональных предшественников в направлении астроглии (рис. 4с–f). Последнее косвенно согласуется с выявленным при окрашивании на GFAP (рис. 4а, b) увеличением количества астроцитов в полиморфном слое. Однако эти изменения могут быть связаны как с дифференцировкой нейрональных предшественников в астроциты, так и с их пролиферацией или увеличением экспрессии GFAP, поскольку не все

астроциты содержат определяемые количества этого белка.

Кроме того, астроциты реагировали на гипоксию изменениями локализации и экспрессии GS. Средняя интенсивность иммуноокрашивания на GS значительно изменялась в зависимости от количества эпизодов гипоксии (влияние фактора “группа”, ANOVA $F_{(3, 32)} = 8.012$, $p < 0.001$). Этот показатель увеличивался после 8 эпизодов как в полиморфном ($p < 0.05$, на 30% по сравнению с контролем), так и в молекулярном ($p < 0.05$, на 37% по сравнению с контролем) слоях, а при 20 эпизодах снижался, достигая контрольных значений. Повышение GS после 8 эпизодов гипоксии может привести к увеличению продукции глутамина, который затем будет захвачен нейронами и использован для получения метаболитов цикла Кребса, в частности сукцината, коррелируя, таким образом, с динамическим переключением митохондриальных ферментных комплексов субстратного звена дыхательной цепи, необходимым для поддержания потока электронов через цитохромоксидазу [8]. Односторонние изменения интенсивности окрашивания GS и MTCO1 при 8 и 20 эпизодах гипоксического воздействия в виде повышения с последующим снижением до уровня контрольных значений могут указывать на возможное сопряжение глутаматного обмена в астроцитах и потока электронов через цитохромный участок дыхательной цепи в нейронах при адаптации к гипоксии.

Более того, гипоксия приводила к значимым (ANOVA $F_{(3, 796)} = 26.93$, $p < 0.001$) изменениям соотношения содержания GS в соме (перинуклеарном компартменте) и отростках астроцитов молекулярного слоя (рис. 5а, б). Хотя в отростках окрашивание на GS было ниже по сравнению с телами клеток, в то же время изменения в содержании белка были наиболее выражены в отростках. Значимое повышение интенсивности окрашивания в отростках выявляли уже при однократном воздействии гипоксии ($p < 0.001$, на 22% по сравнению с контролем), а при многократном воздействии она оставалась повышенной. Эти данные свидетельствуют о перераспределении фермента в астроцитах в зависимости от их функционального состояния.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитохромоксидаза — универсальный маркер метаболической активности нейронов, изменения экспрессии которого продемонстрированы на разных моделях гипоксии. Например, при хронической внутриутробной гипоксии наблюдалось снижение активности МТСО в переднем мозге плодов морских свинок. Несмотря на вариабельность реакции остальных комплексов дыхательной цепи, активность МТСО значительно снижалась как при ранней (начиная с 28-го дня), так и при поздней

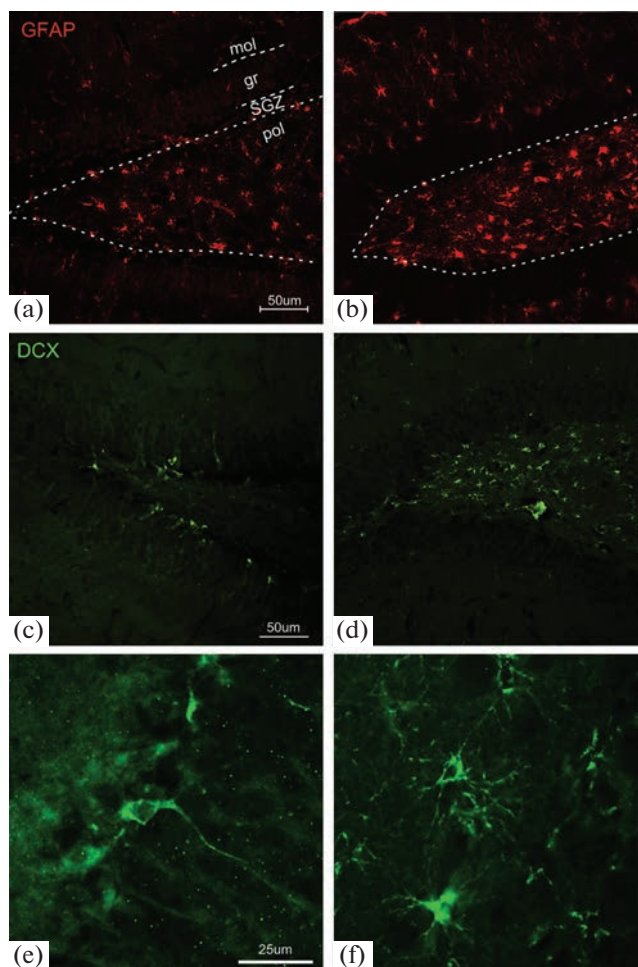


Рис. 4. Увеличение содержания GFAP (а, б) и изменения локализации DCX (с, d, е, ф) в глиальных клетках зубчатой извилины гиппокампа после 20-кратного гипоксического воздействия (контроль — слева, гипоксия — справа). mol — молекулярный слой, gr — зернистый слой, SGZ — субгранулярная зона гиппокампа, pol — полиморфный слой.

(начиная с 50-го дня) интранатальной гипоксии [22], что подчеркивает универсальность этого показателя.

В нашей работе оценка содержания цитохромоксидазы в клетках гиппокампа была исследована при воздействии однократной и многократной гипоксии. Было выявлено значимое повышение МТСО1 в телах как зрелых, так и незрелых нейронов при однократной гипоксии с последующим снижением при многократных воздействиях. Наши результаты согласуются с экспериментом [23], в котором гипобарическая гипоксия (высота 5000 м) вначале повышала (2-й и 5-й дни воздействия), а затем снижала (15-й и 30-й день) экспрессию мРНК МТСО1 в коре головного мозга. В другой работе показано, что при острой гипоксии повышается активность цитохромоксидазы в дендритах нейронов комплекса Бетцингера (в продол-

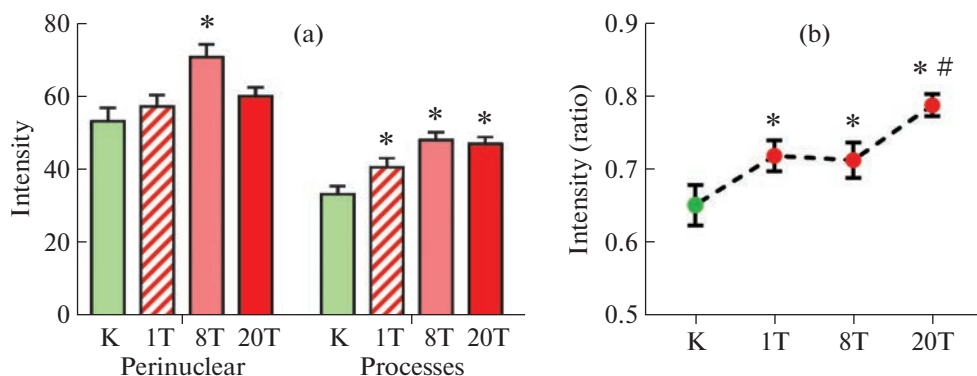


Рис. 5. Средние значения интенсивности окрашивания на глутаминсинтетазу в соме и отростках астроцитов молекулярного слоя (а) и их соотношение (б). К — контрольная группа, 1Т — однократное гипоксическое воздействие; 8Т — восьмикратное гипоксическое воздействие; 20Т — двадцатикратное ежедневное гипоксическое воздействие; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # — $p < 0.05$ по сравнению с предыдущей группой; ANOVA, апостериорный тест Тьюки. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

говатом мозге) и увеличивается количество темно-реактивных митохондрий при электронно-микроскопическом исследовании [24]. И наоборот, хроническая периодическая гипоксия приводила к снижению активности цитохромоксидазы в дендритных митохондриях и ослаблению локальной биоэнергетики [25].

В нашем исследовании наиболее выраженные изменения в интенсивности иммуноокрашивания на МТСО1 были отмечены в SGZ зоне зубчатой извилины гиппокампа, что говорит об изменении метаболизма в нейрогенной нише при гипоксическом воздействии. Повышение активности МТСО1 при однократном эпизоде гипоксии с последующим снижением при многократных воздействиях может быть связано с кратковременной активацией метаболизма для поддержания пула нейрональных предшественников. Двойное окрашивание не показало высокого содержания МТСО1 в DCX+ клетках, поэтому повышение интенсивности МТСО1 в SGZ при острой гипоксии в 8 эпизодах очевидно, обусловлено активацией метаболизма в незрелых нейронах, находящихся на поздних стадиях дифференцировки.

Известно, что в процессе дифференцировки NSC происходит переключение метаболизма на окислительное фосфорилирование в связи с возрастающими энергетическими потребностями нейронов [7], в связи с чем митохондриальная дисфункция в первую очередь должна нарушать дифференцировку и созревание взрослых нейронов в зубчатой извилине, однако, тяжелые нарушения митохондриальной биоэнергетики также ухудшают пролиферацию и выживаемость NSC [26]. По-видимому, HIF1 α , управляя функциями митохондрий в условиях гипоксии, обеспечивает сдвиг пролиферации и дифференцировки NSC. Так, гиперэкспрессия HIF1 α значимо увеличивала гликолитическую активность в индуцированных плю-

рипотентных стволовых клетках *in vitro*, тогда как его нокдаун повышал окислительное фосфорилирование и усиливал дифференцировку NSC [27]. В то же время другие авторы выявили, что в условиях умеренной гипоксии пролиферация и выживаемость NSC увеличиваются [28].

Проведенная нами оценка количества DCX+ клеток в SGZ зубчатой извилины гиппокампа выявила значимое снижение DCX+ нейронов после 20 эпизодов гипоксии. Сходные изменения были показаны [29] при 30-дневной периодической гипоксии как для ранних, так и для поздних стадий нейрогенеза и характеризовались увеличением количества пролиферирующих Sox2-позитивных нейрональных предшественников и уменьшением числа DCX+ нейронов.

Кроме того, в условиях двадцатикратного воздействия в полиморфном слое зубчатой извилины нами были обнаружены DCX+ клетки глиальной морфологии. Сходным образом, в недавнем исследовании на трансгенных мышах Nestin-CreERT2/Ai27D [29], экспрессирующих маркер нейрональных прогениторных клеток предшественник — нестин — показано, что 30-дневная перемежающаяся гипоксия увеличивает количество GFAP+/Nestin+ клеток с радиальной глиальной морфологией. При этом доля новообразованных нейронов гранулярного слоя была уменьшена, что соответствовало снижению количества DCX+ нейронов в условиях гипоксии.

Выявленные нами DCX+ клетки в хилусе могут иметь различную природу. В патологических условиях возможна миграция нейронов из субгранулярной зоны в хилус. Например, в ряде работ [30, 31] показано, что в результате нарушения миграции нейрональных предшественников на моделях эпилепсии эктопические гранулярные нейроны обнаруживаются в полиморфном слое.

Кроме того, DCX может также колокализироваться с маркерами астроглии. Так, при ишемическом повреждении коры у мышей в перинфарктной зоне были выявлены разные типы DCX+ клеток, в том числе — звездчатой морфологии, экспрессирующие глиальные маркеры GFAP и S100B [32], что согласуется с нашим исследованием.

Мы предполагаем, что длительный режим гипоксии в нашем эксперименте мог изменить направление дифференцировки клеток, что в том числе может быть обусловлено перестройкой глутаматергической нейромедиации. Так, снижение количества DCX+ клеток в SGZ при 20 эпизодах гипоксии и появление клеток глиальной морфологии в полиморфном слое коррелировали с уменьшением активности GS при двадцатикратном воздействии, что могло привести к повышению внеклеточного пула глутамата. Ранее [33] было показано, что односторонняя внутригиппокампальная инъекция каиново́й кислоты, являющейся агонистом ионотропных каинатных рецепторов глутамата, вызывает выраженный сдвиг линии DCX+ клеток в сторону генерации астроцитов. Авторы объясняют полученный результат способностью DCX+ клеток предшественниц реагировать на электрические и химические сигналы и регрессировать до более ранних стадий с восстановлением астроглиогенного потенциала.

В нашем эксперименте появление DCX+ клеток в полиморфном слое при двадцатикратном воздействии сочеталось с увеличением количества GFAP+ астроцитов. Полученный результат может быть связан как с делением зрелых астроцитов, так и с изменением направления дифференцировки клеток предшественниц. Реактивные астроциты продуцируют нейротрофные и ростовые факторы, в том числе BDNF и TGF β , цитокины и хемокины. Во время воспаления или повреждения ЦНС экспрессия лигандов и рецепторов TGF β в астроцитах быстро повышается, что является характерным признаком развития глиоза [34]. Показана связь HIF1 α и TGF β [6], а также увеличение TGF β как в сыворотке крови крыс [35], так и в лизатах ткани мозга [36] после гипоксического воздействия. При этом астроциты являются основными источниками эндогенной продукции TGF β в ЦНС. TGF β контролирует широкий спектр функций, включая процессы нейро- и ангиогенеза, ремоделирования и репарации, а также воспалительные и иммунные реакции [37]. Было показано, что внутримозговая инфузия TGF- β ингибировала пролиферацию NSC у крыс [38]. Помимо блокирования пролиферации NSC и поддержания пула клеток нейрогенной ниши в состоянии покоя, введение TGF- β также способствовало дифференцировке и выживанию нейронов с увеличением количества DCX+ клеток [39]. Было установлено, что в астроцитах TGF- β регулирует дифференцировку радиальной глии и образование астроцитов во время развития,

а передача сигналов TGF- β является одним из основных путей, регулирующих активность промотора GFAP — белка промежуточных филаментов и маркера зрелых астроцитов [37]. Описанный механизм участия TGF- β в реакциях воспаления и нейрогенеза также может объяснить наблюдаемое нами увеличение количества GFAP+ и DCX+ клеток глиальной морфологии при 20 эпизодах гипоксии.

Ранее было отмечено, что гипоксия не только влияет на нейрональные предшественники, но и ускоряет созревание астроцитов. У детенышей крыс при трехчасовой системной гипоксии (8% O₂) усиливалась дифференцировка астроцитов неокортекса и повышалось содержание GFAP и белков, участвующих в обмене глутамата (GS и транспортера глутамата GLAST). Кроме того, повышение GLAST сочеталось с увеличением уровня GFAP, взаимодействующего с GLAST [40]. Эти данные указывают на связь экспрессии GFAP и белков системы захвата и утилизации внеклеточного глутамата, позволяя предположить адаптивное значение активации астроцитов, наблюдаемой в нашем эксперименте.

В нашем исследовании было обнаружено значимое повышение содержания GS при восьми эпизодах гипоксии, что может быть обусловлено энергопродуцирующей ролью глутамата, используемого в нейронах для получения сукцината, который затем будет окисляться в цикле Кребса. Снижение интенсивности окрашивания GS после 20 эпизодов до уровня контрольных значений коррелирует при этом со снижением активации MTCO1 в нейронах, и может быть связано с уменьшением энергетической роли глутамата и продукции сукцината из-за восстановления функции НАД-зависимого окисления [8], также приводя к увеличению внеклеточного пула глутамата. Так, на модели ишемии было показано, что в этих условиях наблюдаются срыв адаптации, снижение захвата глутамата и потеря GS астроцитами коры [41]. При этом GS содержащие астроциты в зубчатой извилине демонстрировали большую устойчивость на ишемической модели, по сравнению с астроцитами неокортекса [41].

Интересно, что при определении соотношения количества GS в перинуклеарном компартменте и отростках астроцитов молекулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа нами было выявлено перераспределение фермента. Обратные изменения — перемещение GS из тонких дистальных отростков в более толстые проксимальные отделы отростков астроцитов в CA1 и CA3 областях гиппокампа были качественно показаны на модели хронической височной эпилепсии [42]. Неравномерность распределения GS с преимущественной локализацией фермента в начальных сегментах отростков астроцитов обнаруживалась и в периферической зоне ишемического инфаркта мозга у крыс [43]. Эти данные в сопоставлении указывают

на возможность тонкой регуляции глутаматного обмена путем перераспределения GS в отростках астроцитов.

Ряд работ посвящен роли глутаминсинтетазы (GS) в процессах обучения и в формировании памяти, подчеркивающих значение этого фермента в функционировании нейронных сетей в гиппокампе. У мышей с селективной делецией GS в неокортексе и гиппокампе наблюдали нейродегенерацию и спонтанные судороги [44]. Кроме того, ранее было отмечено [16], что ингибирование GS нарушает консолидацию памяти у цыплят, причем амнестический эффект устраняется смесью из α -кетоглутарата и аланина, что, по мнению авторов, обусловлено использованием α -кетоглутарата в качестве субстрата для глутаматдегидрогеназы, являющейся поставщиком глутамата в нейронах в условиях его нарушенной конверсии из астроцитарного глутамината. Участие метаболитов цикла Кребса в поддержании реакций глутамин-глутаматного обмена подчеркивает важность энергопродуцирующей роли глутамата и глио-нейрональных взаимодействий при гипоксии в нервной ткани, что требует дальнейших исследований.

Таким образом, проведенная работа демонстрирует адаптивный характер изменений энергетического обмена в нейрогенной нише гиппокампа и подчеркивает взаимосвязь митохондриальных изменений, дифференцировки нейрональных предшественников и реакции астроглии в ответ на курсовое воздействие гипобарической гипоксии. При гипоксическом воздействии наблюдали фазные изменения исследуемых маркерных белков — цитохромоксидазы (MTCO) в нейронах и глутаминсинтетазы (GS) в астроцитах. Выявленные иммуногистохимические особенности свидетельствуют о том, что срочная адаптация к гипоксии обусловлена репрограммированием работы дыхательной цепи нейронов. При этом адаптационные механизмы при многократном воздействии связаны с реакцией астроглии и модуляцией глутаматергического обмена, характеризующихся повышением содержания GS после 8 эпизодов гипоксии и выраженным перераспределением фермента в отростках астроцитов как при остром, так и при многократном воздействии. Высокая активность глутаматных реакций в астроцитах в первые 8 дней гипоксического воздействия и последующее снижение после 20 эпизодов гипоксии подтверждаются сопряженной регуляцией активности MTCO1 в нейронах, отражая тем самым динамику репрограммирования работы дыхательной цепи. Снижение работы цитохромного участка в нейронах после 20 эпизодов гипоксии может быть обусловлено переходом на новый уровень регуляции фермента, необходимым для экономизации процесса энергообразования, являясь, таким образом, маркером завершения формирования адаптации к гипоксии. Изменение адаптационных реакций при двадцати-

кратном воздействии привело к снижению количества DCX+ нейронов и появлению DCX+ клеток глиальной морфологии, влияя, вероятно, на дифференцировку нейрональных и глиальных предшественников в гиппокампе и требуя дальнейшего изучения для более точного определения природы DCX+ клеток. Понимание механизмов воздействия периодической гипоксии на процесс нейрогенеза поможет в разработке таргетной терапии, корректирующей когнитивные нарушения при заболеваниях с гипоксической компонентой.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета ФГБНУ Научный центр неврологии (Протокол № 10 – 7/20 от 27.11.2020 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е., Э.Л.Г.), сбор, обработка и анализ данных (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е.), написание и редактирование текста (Е.Н.Ф., Д.Н.В., А.В.Е., Т.И.Б., В.В.Г., Л.Д.Л., В.С.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang H, Roman RJ, Fan F (2022) Hippocampus is more susceptible to hypoxic injury: has the Rosetta Stone of regional variation in neurovascular coupling been deciphered? *GeroScience* 44(1):127–130. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00449-4>
2. Abbott LC, Nigussie F (2020) Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol* 49(1):3–16. <https://doi.org/10.1111/ahe.12496>
3. Morgun AV, Osipova ED, Boytsova EB, Shuvaev AN, Komleva YK, Trufanova LV, Vais EF, Salmina AB (2019) Astroglia-mediated regulation of cell development in the model of neurogenic niche in vitro treated with A β 1-42. *Biomed Khim* 65(5):366–373. <https://doi.org/10.18097/PBMC20196505366>

4. Egorova A, Baranich T, Brydun A, Glinkina V, Sukhorukov V (2022) Morphological and Histophysiological Features of the Brain Capillary Endothelium. *J Evol Biochem Physiol* 58:755–768.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022030115>
5. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7(2):150–161.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>
6. Chen H, Ma D, Yue F, Qi Y, Dou M, Cui L, Xing Y (2022) The Potential Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in the Progression and Therapy of Central Nervous System Diseases. *Cur Neuroparmacol* 20(9):1651–1666.
<https://doi.org/10.2174/1570159X19666210729123137>
7. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage FH, Hunter T (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife* 5:e13374.
<https://doi.org/10.7554/eLife.13374>
8. Lukyanova L, Germanova E, Khmil N, Pavlik L, Mikheeva I, Shigaeva M, Mironova G (2021) Signaling Role of Mitochondrial Enzymes and Ultrastructure in the Formation of Molecular Mechanisms of Adaptation to Hypoxia. *Int J Mol Sci* 22(16):8636.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168636>
9. Arnold S (2012) Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 748:305–339.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_13
10. Yang L, Venneti S, Nagrath D (2017) Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Ann Rev Biomed Engineer* 19:163–194.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
11. Namba T, Dóczy J, Pinson A, Xing L, Kalebic N, Wilsch-Bräuninger M, Long KR, Vaid S, Lauer J, Bogdanova A, Borgonovo B, Shevchenko A, Keller P, Drechsel D, Kurzchalia T, Wimberger P, Chinopoulos C, Huttner WB (2020) Human-Specific ARHGAP11B Acts in Mitochondria to Expand Neocortical Progenitors by Glutaminolysis. *Neuron* 105(5):867–881.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.027>
12. Turner DA, Adamson DC (2011) Neuronal-astrocyte metabolic interactions: understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(3):167–176.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31820e1152>
13. Schousboe A (2019) Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci Lett* 689:11–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.038>
14. Sonnewald U, Qu H, Aschner M (2002) Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *J Pharmacol Exp Ther* 301(1):1–6.
<https://doi.org/10.1124/jpet.301.1.1>
15. Jayakumar AR, Norenberg MD (2016) Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. *Adv Neurobiol* 13:327–350.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_13
16. Gibbs ME, O'Dowd BS, Hertz L, Robinson SR, Sedman GL, Ng KT (1996) Inhibition of glutamine synthetase activity prevents memory consolidation. *Brain research. Cogn Brain Res* 4(1):57–64.
[https://doi.org/10.1016/0926-6410\(96\)00020-1](https://doi.org/10.1016/0926-6410(96)00020-1)
17. Son H, Kim S, Jung DH, Baek JH, Lee DH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Lee DK, Kim HJ (2019) Insufficient glutamine synthetase activity during synaptogenesis causes spatial memory impairment in adult mice. *Sci Rep* 9(1):252.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36619-2>
18. Miller JA, Nathanson J, Franjic D, Shim S, Dalley RA, Shapouri S, Smith KA, Sunkin SM, Bernard A, Bennett JL, Lee CK, Hawrylycz MJ, Jones AR, Amaral DG, Šestan N, Gage FH, Lein ES (2013) Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development (Cambridge, England)* 140(22):4633–4644.
<https://doi.org/10.1242/dev.097212>
19. Goh TY, Basah SN, Yazid H, Safar MJA, Saad FSA (2018) Performance Analysis of Image Thresholding: Otsu Technique. *Measurement* 114:298–307.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.09.052>
20. Refaeli R, Doron A, Benmelech-Chovav A, Groysman M, Kreisel T, Loewenstein Y, Goshen I (2021) Features of hippocampal astrocytic domains and their spatial relation to excitatory and inhibitory neurons. *Glia* 69(10):2378–2390.
<https://doi.org/10.1002/glia.24044>
21. Anlauf E, Derouiche A (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol* 4:144.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>
22. Quebedeaux TM, Song H, Giwa-Otusaio J, Thompson LP (2022) Chronic Hypoxia Inhibits Respiratory Complex IV Activity and Disrupts Mitochondrial Dynamics in the Fetal Guinea Pig Forebrain. *Reproduct Sci (Thousand Oaks, Calif.)* 29(1):184–192.
<https://doi.org/10.1007/s43032-021-00779-w>
23. Tan XL, Liu JZ, Cao LF, Deng ZC, Li YH (2002) Effects of hypoxic exposure on coordinative expression of cytochrome oxidase subunits I and IV in rat cerebral cortex. *Sheng Li Xue Bao* 54(6):519–524.
24. Kang JJ, Guo B, Liang WH, Lam CS, Wu SX, Huang XF, Wong-Riley MTT, Fung ML, Liu YY (2019) Daily acute intermittent hypoxia induced dynamic changes in dendritic mitochondrial ultrastructure and cytochrome oxidase activity in the pre-Bötzing complex of rats. *Exp Neurol* 313:124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.12.008>
25. Kang JJ, Fung ML, Zhang K, Lam CS, Wu SX, Huang XF, Yang SJ, Wong-Riley MTT, Liu YY (2020) Chronic intermittent hypoxia alters the dendritic mitochondrial structure and activity in the pre-Bötzing complex of rats. *FASEB J: Official Publ Federat Am Society Exp Biol* 34(11):14588–14601.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902141R>
26. Lisowski P, Kannan P, Mlody B, Prigione A (2018) Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. *EMBO Reports* 19(5):e45432.
<https://doi.org/10.15252/embr.201745432>
27. Cui, P, Zhang P, Yuan L, Wang L, Guo X, Cui G, Zhang Y, Li M, Zhang X, Li X, Yin Y, Yu Z (2021) HIF-1 α Affects the Neural Stem Cell Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells via MFN2-Mediated Wnt/ β -

- Catenin Signaling. *Front Cell Devel Biol* 9:671704. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.671704>
28. *Chen HL, Pistollato F, Hoepfner DJ, Ni HT, McKay RD, Panchision DM* (2007) Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 25(9):2291–2301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0609>
 29. *Khuu MA, Pagan CM, Nallamothu T, Hevner RF, Hodge RD, Ramirez JM, Garcia AJ 3rd* (2019) Intermittent Hypoxia Disrupts Adult Neurogenesis and Synaptic Plasticity in the Dentate Gyrus. *J Neurosci: Official J Society Neurosci* 39(7):1320–1331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1359-18.2018>
 30. *Kasahara Y, Nakashima H, Nakashima K* (2023) Seizure-induced hilar ectopic granule cells in the adult dentate gyrus. *Front Neurosci* 17:1150283. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1150283>
 31. *Cameron MC, Zhan RZ, Nadler JV* (2011) Morphologic integration of hilar ectopic granule cells into dentate gyrus circuitry in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 519(11):2175–2192. <https://doi.org/10.1002/cne.22623>
 32. *Kunze A, Achilles A, Keiner S, Witte OW, Redecker C* (2015) Two distinct populations of doublecortin-positive cells in the perilesional zone of cortical infarcts. *BMC Neurosci* 16:20. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0160-8>
 33. *Moura DMS, Brandão JA, Lentini C, Heinrich C, Queiroz CM, Costa MR* (2020) Evidence of Progenitor Cell Lineage Rerouting in the Adult Mouse Hippocampus After Status Epilepticus. *Front Neurosci* 14:571315. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.571315>
 34. *Schlecht A, Vallon M, Wagner N, Ergün S, Braunger BM* (2021) TGFβ-Neurotrophin Interactions in Heart, Retina, and Brain. *Biomolecules* 11(9):1360. <https://doi.org/10.3390/biom11091360>
 35. *Dzhalilova DS, Diatropov ME, Tsvetkov IS, Makarova OV, Kuznetsov SL* (2018) Expression of Hif-1α, Nf-κb, and Vegf Genes in the Liver and Blood Serum Levels of HIF-1α, Erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-Isoprostane, and Corticosterone in Wistar Rats with High and Low Resistance to Hypoxia. *Bull Exp Biol Med* 165(6):781–785. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4264-x>
 36. *Baumann J, Tsao CC, Patkar S, Huang SF, Francia S, Magnussen SN, Gassmann M, Vogel J, Köster-Hegmann C, Ogunshola OO* (2022) Pericyte, but not astrocyte, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) drives hypoxia-induced vascular permeability in vivo. *Fluids Barriers CNS* 19(1):6. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00302-y>
 37. *Luo J* (2022) TGF-β as a Key Modulator of Astrocyte Reactivity: Disease Relevance and Therapeutic Implications. *Biomedicines* 10(5):1206. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051206>
 38. *Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L* (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(4):358–370. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218444.53405.f0>
 39. *Mathieu P, Piantanida AP, Pitossi F* (2010) Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation* 17(3):200–201. <https://doi.org/10.1159/000258723>
 40. *Sen E, Basu A, Willing LB, Uliasz TF, Myrkalo JL, Vanucci SJ, Hewett SJ, Levison SW* (2011) Pre-conditioning induces the precocious differentiation of neonatal astrocytes to enhance their neuroprotective properties. *ASN neuro* 3(3):e00062. <https://doi.org/10.1042/AN20100029>
 41. *Lee A, Lingwood BE, Bjorkman ST, Miller SM, Poronnik P, Barnett NL, Colditz P, Pow DV* (2010) Rapid loss of glutamine synthetase from astrocytes in response to hypoxia: implications for excitotoxicity. *J Chem Neuroanatomy* 39(3):211–220. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2009.12.002>
 42. *Papageorgiou IE, Gabriel S, Fetani AF, Kann O, Heilmann U* (2011) Redistribution of astrocytic glutamine synthetase in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Glia* 59(11):1706–1718. <https://doi.org/10.1002/glia.21217>
 43. *Воронков, ДН, Сальникова ОВ, Худоерков РМ* (2017) Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта мозга. *Анналы клин и экспериментальной неврологии* 11(1):40–46. [Voronkov DN, Salnikova OV, Khudoerkov RM (2017) Immunocytochemical and morphometric changes in astroglial cells in the perifocal zone of the cerebral infarction model. *Annals Clin Exp Neurol* 11(1):40–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18454/ACEN.2017.1.6158>
 44. *Zhou Y, Dhafer R, Parent M, Hu QX, Hassel B, Yee SP, Hyder F, Gruenbaum SE, Eid T, Danbolt NC* (2019) Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem Internat* 123:22–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.009>

CHANGES IN THE NEUROGENIC NICHE OF THE RAT HIPPOCAMPUS UNDER HYPOXIC EXPOSURE

E. N. Fedorova^{a,b,#}, D. N. Voronkov^a, A. V. Egorova^{a,b}, T. I. Baranich^{a,b}, V. V. Glinkina^b, E. L. Germanova^c,
L. D. Lukyanova^c, and V. S. Sukhorukov^{a,b}

^aResearch Center of Neurology, Moscow, Russia

^bPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^cInstitute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

[#]e-mail: ewgenia.feodorowa2011@yandex.ru

One of the most vulnerable brain structures to hypoxia is the hippocampus. Maintenance of the neurogenic niche cell pool in the subgranular zone of the hippocampus (SGZ) is provided by adaptive mechanisms. Among them are changes in the functional activity of mitochondrial respiratory chain complexes and the reaction of astroglia, which provides metabolic support for neurons. In order to study the dynamics of adaptive changes in neurons and glia in the dentate gyrus of the hippocampus under hypoxic conditions on a model of intermittent hypobaric hypoxia (5000 m, equivalent to 10.5% O₂), with a single (60 min) and multiple (8 and 20 episodes) exposure in low-resistant rats, immunomorphological methods revealed the features of localization and content in the neurons of complex IV mitochondrial respiratory chain (MTCO1), astrocyte marker proteins glutamine synthetase (GS) and GFAP, and doublecortin (DCX) in immature neurons. With a single hypoxia, the content of MTCO1 in neurons significantly increased, and after eight exposures, the amount of glutamine synthetase (GS) in astrocytes of the dentate gyrus of the hippocampus increased. Changes in the content of GS were most pronounced in the processes of astrocytes, which indicates a redistribution of GS. The number of DCX+ neurons in the SGZ significantly decreased after 20 episodes of hypoxia. At the same time, DCX+ cells of glial morphology were found in the polymorphic layer, and staining for GFAP showed an increase in the number of astrocytes. This may be due to a shift in the direction of cell differentiation in the neurogenic niche. Thus, in hypoxia, at the initial stage, a functional restructuring of the respiratory chain of neurons of the granular layer occurs. Subsequently, it is noted by the activation of astrocytes that modulate glutamate metabolism. The presence of a relationship between the dynamics of adaptive reactions of energy exchange in neurons and glia and changes in neurogenesis during 20 episodes of hypoxia suggests that during long-term hypoxia, the differentiation of neural precursors of SGZ in the direction of astroglia occurs, however, this issue requires further study in order to more accurately determine the nature of DCX+ cells.

Keywords: hypobaric hypoxia, cytochrome oxidase, glutamine synthetase, neurogenesis, hippocampus

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ПАРВАЛЬБУМИН-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НЕЙРОНОВ В СЕГМЕНТАХ ШЕЙНОГО И ПОЯСНИЧНОГО ОТДЕЛОВ СПИННОГО МОЗГА КОШКИ

© 2023 г. А. А. Вещицкий¹, П. Е. Мусиенко¹, Н. С. Меркулева^{1,*}

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

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

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 19.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Парвальбумин — классический маркер интернейронных популяций центральной нервной системы. При анализе шейных и поясничных отделов спинного мозга кошки (*Felis catus*) в большинстве пластин серого вещества были выявлены как единичные парвальбумин-иммунопозитивные нейроны, так и целые популяции, имеющие строгую ламинарную/ядерную локализацию. Наиболее выраженные скопления нейронов локализованы в медиальной части пластин V–VI и в пластине VII сегментов шейного и поясничного утолщения. Полагаем, что первое скопление в сегментах C4–C8 и L4–L7 участвует в механизмах модуляции локомоторной активности посредством конвергенции кожной и проприоцептивной афферентации от конечностей. Скопления нейронов в пластине VII представляют собой Ia-интернейроны и интернейроны Реншоу, участвующие в процессах торможения мотонейронов. Менее выраженными популяциями парвальбумин-иммунопозитивных нейронов являются: скопления в пластине III, предположительно связанные с регуляцией кожной чувствительности; скопления в пластине VIII, локализация и морфология которых сходны с нейронами, формирующими комиссуральные и проприоспинальные связи и участвующие в модуляции активности мотонейронов. Иммунопозитивные нейроны также выявлены в прецеребеллярных ядрах: центральном цервикальном и ядре Кларка; в отличие от доминирующих популяций проекционных клеток этих ядер, выявленные нейроны предположительно относятся к интернейронам. Единичные клетки представлены в пластине I сегментов L6–L7, а также в пластинах II, IV, X всех исследованных сегментов. На настоящий момент это самое полное описание популяций парвальбумин-иммунопозитивных нейронов спинного мозга хищных.

Ключевые слова: кальций-связывающий белок, парвальбумин, спинной мозг, шейное и поясничное утолщение, кошка

DOI: 10.31857/S0044452923040071, **EDN:** XZPDBL

ВВЕДЕНИЕ

Кальций-связывающие белки представляют собой группу гомологичных цитозольных белков, обеспечивающих захват свободного Ca^{2+} [1], внутриклеточные избытки которого могут приводить к апоптозу [2], что проявляется в ходе многих нейродегенеративных заболеваний [3]. Одним из наиболее изученных кальций-связывающих белков является парвальбумин (PV), сначала выявленный в мышечных волокнах примитивных позвоночных [4], а затем и в нейронах центральной нервной системы млекопитающих [5].

В головном мозге PV маркирует специфические популяции интернейронов, характеризующиеся высокой частотой разрядки, и формирующих функциональные системы в пределах сенсорных [6], моторных [7] и интегративных структур [8]. На спинальном уровне данный белок ассоциируют

преимущественно с проприоцептивной системой, в пределах которой он экспрессируется в первичных афферентных нейронах дорзальных ганглиев [9], иннервирующих проприорецепторы мышц, и образуемых ими волокнах в белом [10] и сером веществе спинного мозга [11]. В сером веществе спинного мозга грызунов выявлено несколько типов парвальбумин-иммунопозитивных (PV+) нейронов. В дорзальных рогах тормозные PV+ интернейроны принимают участие в модуляции кожной чувствительности [12]. В медиальной части промежуточного серого вещества, на уровне спинальных утолщений, PV+ нейроны, ответственные за конвергенцию информации кожной и проприоцептивной модальностей, поступающей от конечностей, модулируют локомоторную активность [13]. Кроме того, PV экспрессируется Ia-интернейронами и клетками Реншоу, являющимися элементами локомоторных сетей [14].

При этом информация о паттерне распределения нейронов, экспрессирующих PV, в спинном мозге иных животных моделей крайне скудна. Например, для кошки — классической модели для изучения сенсомоторной системы, подробное морфологическое описание представлено лишь в одной работе на единственном поясничном сегменте [15], что, очевидно, существенно сужает возможность интерпретации получаемых на этой модели данных. Ранее нами был опубликован нейрoхимический атлас спинного мозга кошки [16], в котором представлены изображения срезов всех спинальных сегментов с выявленными с помощью иммуногистохимического метода разнообразными нейрональными популяциями, в том числе — популяциями PV+ нейронов. Целью настоящего исследования было морфологическое описание выявленных популяций PV+ нейронов спинного мозга кошки. Областью интереса являлись шейное и поясничное утолщения, содержащие наибольший объем спинальных нейрональных сетей, ответственных за контроль моторики передних и задних конечностей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на девяти нормально пигментированных взрослых кошках обоего пола (*Felis catus*) массой тела 2.5–3.5 кг. Использованы образцы первого-восьмого (C1–C8) шейных и первого-седьмого (L1–L7) поясничных сегментов спинного мозга. Согласно принципу “3R” образцы головного мозга некоторых животных были ранее использованы для нейроморфологического анализа зрительных структур [17–19].

Подготовка гистологического материала. Под глубоким наркозом (ингаляционным: 5%-ном изофлюраном или внутримышечным: смесью золептила (Virbac, France; 20 мг/кг) и ксилазина (Interchemie werken “De Adelaar” BV, Netherlands; 2 мг/кг)) проводили транскардиальную перфузию. Для предупреждения свертываемости крови и образования тромбов за 10 мин до начала перфузии внутримышечно вводили гепарин (0.5 мл/кг). Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0.9%-ный раствор натрия хлорида, 700–800 мл/кг, pH 7.4, 25°C), фиксацию тканей — 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4, 600–700 мл/кг, 25°C). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночного канала и последовательно выдерживали в 10-, 20- и 30-ном% растворах сахарозы до полного погружения. Деление спинного мозга на сегменты проводили, ориентируясь на дорзальные корешки [20]. На замораживающем микротоме (Reichert, Австрия) изготавливали поперечные срезы толщиной 50 мкм.

Иммуногистохимия. Выявление антигена PV проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на свободно плавающих срезах. В начале выполнения протокола и между всеми

ключевыми этапами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов проводили в 1%-ном NaBH_4 в течение 15 мин. Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем получасовой инкубации в 0.3%-ной H_2O_2 . Неспецифическую реакцию антигенов подавляли 3%-ной нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) в течение 90 мин. Затем, не промывая, срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C в растворе первичных поликлональных антител кролика к PV (ab11427, Abcam, Кембридж, Великобритания, разведение 1:10000), 3%-ной нормальной сыворотки козы и консерванта 0.1%-ного NaN_3 . Затем срезы инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител анти-кролик (1:600, Vector Laboratories, Великобритания) в течение 24 ч. К раствору вторичных антител добавляли 3%-ную нормальную сыворотку козы. Затем срезы инкубировали в авидин-биотин-комплекс с пероксидазой (ABC Elite system, Vector Labs, Великобритания) в течение 1 ч. Визуализацию пероксидазной реакции осуществляли с помощью раствора, содержащего 1% DAB (хромоген 3,3'-диаминобензидин), 10% NiNH_4SO_4 и 0.03% H_2O_2 . После промывки в дистиллированной воде срезы монтировали на желатинизированные предметные стекла, высушивали, подвергали обезвоживанию в спиртах восходящей концентрации ($2 \times 70\%$, $2 \times 96\%$, $2 \times 100\%$) и просветлению в ксилоле, после чего заключали в монтирующую среду (Bio Mount NM, Италия).

Цифровая обработка и анализ гистологического материала. Получение цифровых изображений срезов с выявленными антигенами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония; увеличение объектива $\times 10$), свободно распространяемым программным комплексом digiCamControl и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation, Япония). Для каждого животного в анализ взято по 5 срезов от каждого из сегментов.

В зависимости от формы сомы и от типа отхождения иммунопозитивных отростков были определены три морфотипа иммунопозитивных клеток — овальные (без иммунопозитивных отростков), веретеновидные (клетки с двумя полярными PV+ отростками) и мультиполярные (клетки с тремя и более PV+ отростками). К нейронам мелкого размера относили клетки с площадью сомы до 200 μm^2 , среднего — 200–450 μm^2 , крупного — более 450 μm^2 в соответствии с делением, представленным в работе [15]. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В сером веществе шейного и поясничного отделов спинного мозга кошки выявлено два типа PV мечения: клеточное (сoma нейронов и иногда их

Таблица 1. Типы парвальбумин-иммунопозитивных нейронов спинного мозга кошки

Пластины	Сегменты	Особенности локализации	Тип	Площадь, мкм ²	Рисунок
I	L6–L7	—	мелкие овальные	41 ± 14	1a
II–III	C1–C8 L1–L7	преимущественно в пластине III	мелкие овальные	39 ± 14	1b
V–VI	C4–C8	медиальная область пластин V–VI	мелкие овальные	100 ± 44	1c
			средние мультиполярные	276 ± 92	
			крупные мультиполярные	582 ± 93	
	L5–L7	медиальная область пластин V–VI	мелкие овальные	93 ± 40	1d
			средние мультиполярные	283 ± 91	
VII	C1–C4	центральное цервикальное ядро	мелкие овальные и средние мультиполярные	233 ± 139	1e
	C5–C6	медиальная область пластин VI–VII			
	L1–L4	ядро Кларка	мелкие овальные	66 ± 33	1f
	C6–C7 L5–L7	дорзально относительно мотонейронных пулов	крупные мультиполярные	689 ± 227	1g
		вентральная зона между пластинами VIII и IX	средние овальные или мультиполярные	354 ± 102	1h
VIII	C1–C8 L1–L7	латеральная часть пластины VIII	средние и крупные веретеновидные	469 ± 207	1i
		—	средние мультиполярные	409 ± 165	
		центральная часть пластины VIII	крупные мультиполярные	911 ± 304	

проксимальные отростки) и нейропилия. Иммунопозитивные клетки и нейропиле имеют четкую локализацию и могут быть описаны по пластинам и ядрам серого вещества (табл. 1 и рис. 1).

Пластина I

В пластине I выявлены единичные мелкие PV+ нейроны, имеющие овальную соматическую площадь 41 ± 14 мкм²; отростки этих нейронов являются иммунонегативными (рис. 1a). Данные нейроны были обнаружены только в сегментах L6–L7 у 5 из 9 исследованных животных.

Пластины II–III

В пластине III и, реже, в пластине II, выявлены мелкие овальные нейроны площадью 39 ± 14 мкм² (рис. 1b). Данные клетки лишены иммунопозитивных отростков.

Пластины V–VI

Латеральная половина пластин V–VI во всех исследованных сегментах практически лишена PV+ нейронов, и содержит лишь единичные клетки овальной или мультиполярной формы. В медиаль-

ной половине пластин V–VI, на уровне шейного и поясничного утолщений, обнаружена популяция PV+ нейронов, окруженная слабопозитивным нейропилем. В шейном отделе этот иммунопозитивный кластер наиболее выражен в сегментах C5–C8 и содержит мелкие овальные (100 ± 44 мкм²), средние (276 ± 92 мкм²) и крупные (582 ± 93 мкм²) мультиполярные PV+ нейроны (рис. 1c). В поясничном отделе иммунопозитивный кластер локализован в сегментах L5–L7 и представлен множеством мелких овальных (93 ± 40 мкм²) и средних мультиполярных (283 ± 91 мкм²) PV+ клеток (рис. 1d).

Пластина VII

Паттерн распределения PV+ нейронов в пластине VII зависит от сегмента. В ростральных шейных сегментах (C1–C4) в основании дорзальных рогов на уровне центрального канала локализуется центральное цервикальное ядро (CCN). В зависимости от сегмента, оно или полностью залегает в пластине VII, на границе с пластинами V–VI (сегменты C1–C3), или, как в сегменте C4, наполовину заходит в медиальную часть пластины VI [16]. CCN содержит ярко выраженный PV+ нейропиле, а также мелкие и средние мультиполярные нейроны

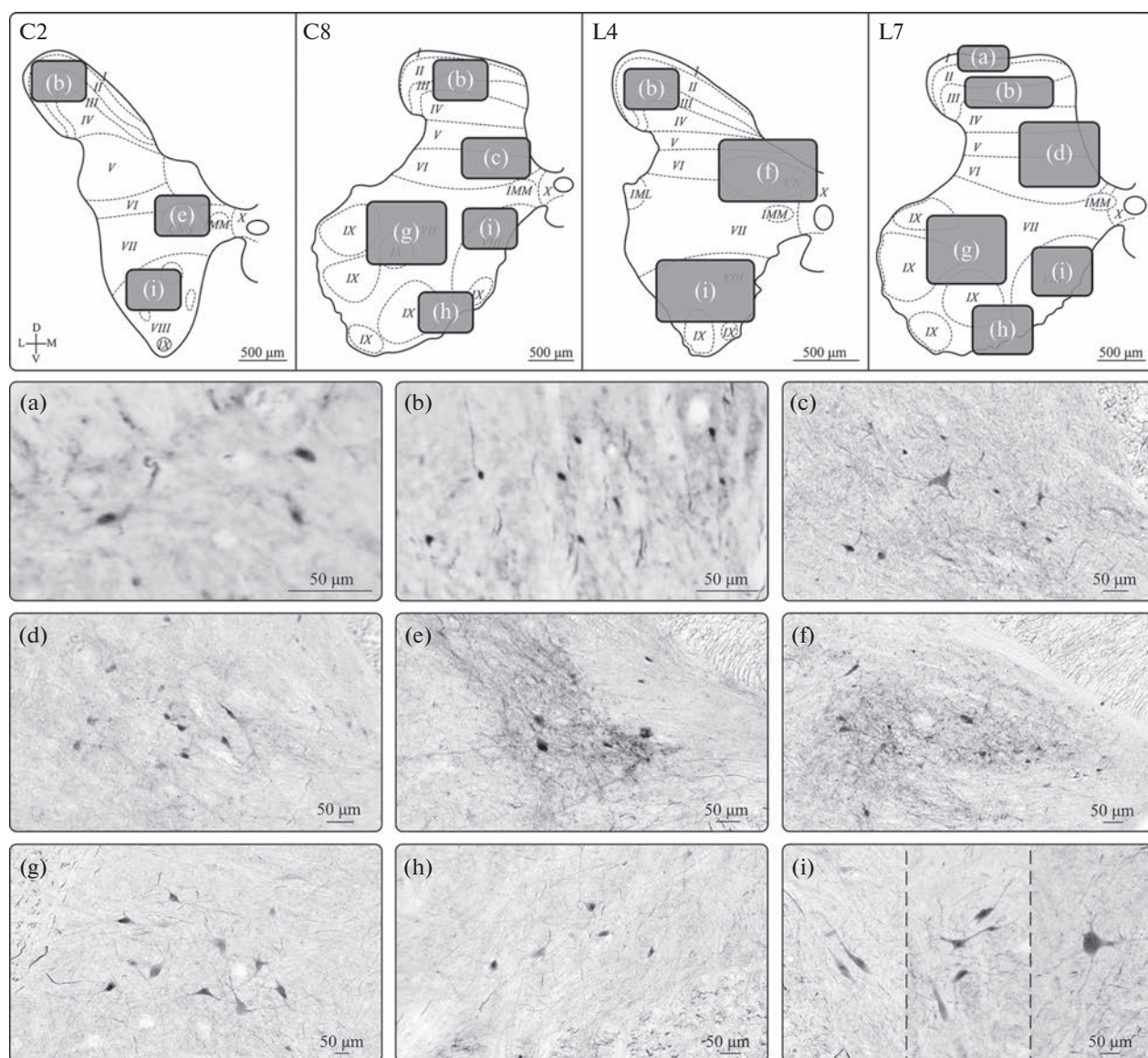


Рис. 1. Распределение парвальбумин-иммунопозитивных нейронов в сером веществе шейных (на примере C2 и C8) и поясничных (на примере L4 и L7) сегментов спинного мозга кошки. (a) – PV+ нейроны пластины I, (b) – PV+ нейроны пластин II–III, (c) – PV+ нейроны медиальной части пластин V–VI в сегментах C4–C8, (d) – PV+ нейроны медиальной части пластин V–VI в сегментах L5–L7, (e) – PV+ нейроны центрального цервикального ядра, (f) – PV+ нейроны ядра Кларка, (g) – PV+ нейроны пластины VII (на границе с мотонейронными пулами), (h) – PV+ нейроны пластины VII (вентральная зона между пластинами VIII и IX), (i) – PV+ нейроны пластины VIII. I–X – номера пластин серого вещества, CCN – центральное цервикальное ядро, CN – ядро Кларка, IML – интермедиолатеральное ядро, IMM – интермедиомедиальное ядро.

(233 ± 139 мкм²) (рис. 1e). Несмотря на то что анатомически, согласно [21], каудальная граница CCN проходит в сегменте C4, сходный паттерн распределения PV наблюдается в аналогичной зоне вплоть до сегмента C6. При этом площадь иммунопозитивного нейропиля градуально уменьшается в каудальном направлении и исчезает в конце сегмента C6.

В вентролатеральной части основания дорзальных рогов первых поясничных сегментов (L1–L4) локализуется ядро Кларка (CN). В сегментах L1–L2 CN располагается в пластине VII и лишь грани-

чит с пластинами V–VI, тогда как в сегментах L3–L4 практически полностью смещается в медиальную часть пластин V–VI [16]. CN характеризуются ярко выраженным PV+ нейропилем, а также немногочисленной популяцией мелких овальных нейронов (66 ± 33 мкм²) (рис. 1f).

Помимо описанных выше ядер, в пластине VII сегментов C6–C8 и L5–L7 выявлено две популяции PV+ нейронов: (1) мультиполярные клетки крупного размера (689 ± 227 мкм²), локализованные дорсальнее мотонейронных пулов (рис. 1g);

(2) овальные или мультиполярные клетки среднего размера (354 ± 102 мкм²), локализованные в вентромедиальной области на границе пластин VIII и IX (рис. 1h). Помимо перечисленных, единичные разноразмерные мультиполярные PV+ клетки пластины VII разбросаны по остальным сегментам.

Пластина VIII

Во всех исследованных сегментах в пластине VIII выявлены три типа единичных PV+ нейронов: (1) средние или крупные (469 ± 207 мкм²) веретеновидные; (2) средние (409 ± 165 мкм²) мультиполярные; (3) крупные (911 ± 304 мкм²) мультиполярные (рис. 1i). Веретеновидные клетки предпочтительно локализируются в латеральной части пластины VIII, преимущественно в шейных сегментах, крупные мультиполярные — в центральной области пластины VIII, преимущественно в первых шейных и поясничных сегментах, и средние мультиполярные — по всему объему пластины VIII, во всех сегментах.

В пластинах IV, IX и X и в преганглионарных симпатических ядрах: интермедиолатеральном (IML) и интермедиомедиальном (IMM), PV+ нейронов или нейропиля не обнаружено, за исключением случайных единичных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможное функциональное значение выявленных популяций PV+ нейронов косвенно следует из анализа морфологических и физиологических свойств нейронов соответствующих пластин и ядер.

Пластина I

Нейроны пластины I связаны с обработкой и передачей болевой и температурной чувствительности [22]. В большинстве известных работ отмечено полное отсутствие экспрессии PV в нейронах пластины I лабораторных животных (мышей: [23]; крыс: [11, 24]; кроликов: [25]; обезьян: [26]). Однако есть и указание на единичные PV+ клетки этой пластины в сегментах поясничного расширения у мышей [27] и крыс [28]. В проведенном исследовании мы также обнаружили редкие PV+ нейроны в пластине I у 5 из 9 кошек; все эти нейроны располагались только в наиболее крупных сегментах поясничного расширения — L6 и L7, но не в шейных сегментах. Эти данные свидетельствуют о крайней малочисленности популяции PV+ нейронов пластины I и о ее привязанности к конкретным сегментам спинного мозга. Мы не можем отнести выявленные нами PV+ нейроны ни к одному из 4 известных морфотипов пластины I, выявленных у грызунов [22]. Полагаем, что для полного описания элементов этой популяции необходимо ис-

пользовать непрерывную серию срезов и множественное иммуномечение.

Пластины II–III

Нейроны пластин II–III участвуют в передаче и обработке механо- и ноцицептивной информации на уровне спинного мозга [29]. Распределение PV+ клеток в данных пластинах наиболее полно изучено на грызунах. Мелкие по размеру PV+ нейроны локализируются главным образом во внутренней части пластины II (Pi) и по всей пластине III [11, 27, 30–32]. В этой зоне дорзальных рогов в зависимости от локализации, формы и размера сомы, типа ветвления и направления волокон, выделяют 4 типа PV+ нейронов [24, 30, 33]. Помимо иммунопозитивных нейронов, авторы также отмечают наличие в пластинах II–III PV+ нейропиля, четко очерчивающего границы подпластины Pi и пластины III [24, 33].

Паттерн иммуномечения, выявленный нами в пластинах II–III спинного мозга кошки, существенно отличается от такового у грызунов: (1) все PV+ нейроны имеют овальную сому, (2) все отростки нейронов являются иммунонегативными, (3) большая часть клеток обнаруживается в пластине III, и только единичные — в пластине II, (4) полоска иммунопозитивного нейропиля отсутствует. Подобное описание распределения PV в пластинах II–III известно у кролика [25, 34], обезьяны [35] и человека [36]. В единственной известной нам работе на кошке, в которой был проанализирован только сегмент L7, в принципе не выделяют PV+ нейроны в пластине II, определяя принадлежность мелких иммунопозитивных клеток дорзальных рогов к единой популяции нейронов пластин III–IV [15]. Таким образом, очевидно, что распределение иммунопозитивной реакции в пластинах II–III у грызунов и не-грызунов значительно отличается, что следует иметь в виду при проведении сравнительных исследований функций спинного мозга и трансляции данных, получаемых на грызунах, в клиническую практику.

Известно, что большинство PV+ нейронов пластин II–III являются тормозными, составляя 60–75% от общей популяции нейронов пластин II–III — у крыс [28, 33] и 47–64% — у мышей [37, 38]. На этих животных моделях показано, что PV+ нейроны контролируют возбудимость нейронов, отвечающих за обработку тактильной информации [39]. Ко-экспрессия некоторым числом PV+ нейронов ноцицептивных маркеров [40–42] также указывает на их связь с ноцицепцией.

Пластины V–VI

Нейроны пластин V–VI участвуют в интеграции разномодальной афферентной информации [43]. Эти пластины анатомически подразделяют на медиальную и латеральную (ретикулярную) зоны

[21]. В медиальной части пластин V–VI в обоих расширениях спинного мозга кошки нами выявлено 2 популяции PV+ нейронов, окруженных слабоиммунопозитивным нейропилем: мелкие овальные и средние мультиполярные. Выявленные морфотипы соответствуют таковым в медиальной зоне пластин V–VI спинного мозга крысы [11, 24], однако в этих работах данные по размерам соммы нейронов отсутствуют. В недавней работе на трансгенных мышцах было выявлено, что в каудальной части поясничного отдела (сегменты L4–L6) PV+ нейроны медиальной части основания дорзальных рогов участвуют в конвергенции кожной и проприоцептивной афферентации от задних конечностей, что является одним из механизмов модуляции локомоторной активности [13]. Мы не нашли данных по функциям PV+ нейронов, расположенных в медиальной части пластин V–VI шейных сегментов спинного мозга. Однако, учитывая морфологическое и пространственное сходство между популяциями клеток медиальной зоны пластин V–VI, расположенными в шейном и поясничном отделах, мы предполагаем и сходство их функций: модуляцию моторной активности. Отдельно отметим, что в шейных сегментах мы выявили популяцию крупных мультиполярных нейронов, отсутствующих в поясничных сегментах. Возможной ролью этих клеток полагаем контроль за моторикой передних конечностей, которая в ряде задач отлична от моторики задних конечностей. Отметим, что ранее в медиальной зоне пластин V–VI у кошки были выявлены только мелкие округлые клетки с множеством отростков [15], однако, как мы уже писали выше, в этой работе проанализирован лишь один сегмент, что не позволяет делать полноценные выводы о структуре популяции PV+ нейронов.

В латеральной части пластин V–VI нами выявлены лишь единичные овальные или мультиполярные PV+ нейроны, однако, в большинстве случаев данная область полностью лишена иммунопозитивного мечения. В спинном мозге крысы в этой области также выявлены редкие иммунопозитивные клетки [24], имеющие, однако, иную форму соммы: треугольную или прямоугольную, определяемую числомходящих отростков. До сих пор функции данной малочисленной популяции не известны.

Пластина VII

В дорзомедиальной части пластины VII шейного и поясничного отделов локализуется два элемента системы прецеребеллярных ядер: CCN и CN [44]. Нейроны CCN формируют особую часть восходящих проекций спинного мозга – CCN-спинно-мозжечковый путь [45, 46], а также спинно-вестибулярный тракт [47], передающие афферентную информацию от проприорецепторов мышц шеи и рецепторов лабиринта в мозжечок и вестибулярные ядра продолговатого мозга соответственно [48]. По-

ясничная часть CN является основным источником дорзального спинно-мозжечкового тракта, несущего информацию от проприорецепторов нижней части туловища и нижних конечностей в мозжечок [49]. Известно, что в CCN мышей 74% нейронов, имеющих связи с мозжечком, являются PV+ [44]. Как и в исследованиях на крысах [11, 24] и приматах [35, 36], мы показали, что оба ядра характеризуются ярко выраженным PV+ нейропилем, который представляет собой множественные окончания аксонов проприоцептивных нейронов дорзальных ганглиев [24]. Помимо PV+ нейропиля, в обоих ядрах выявлены иммунопозитивные нейроны.

В CCN мы обнаружили PV+ нейропиле и нейроны не только в пределах анатомических границ ядра – сегментах C1–C4, но и в более каудальных сегментах C5–C6. Мы также выявили негативный ростокаудальный градиент площади иммунопозитивного нейропиля и числа PV+ клеток. Отметим, что при трейсировании большое скопление клеток, иницирующих связи с мозжечком, выявлено у кошки не только в самом CCN, но и в аналогичной области серого вещества сегмента C5 [50]. Также у кошки активность нейронов вестибулярных ядер регистрировали при стимуляции не только CCN, но и аналогичной зоны в сегменте C5 [48]. Таким образом, полагаем, что CCN охватывает и сегменты C5–C6, в которых оно постепенно теряет свою ядерную структуру и значительно уменьшается в размерах. Как итог, при использовании классических методов анализа цитоархитектоники серого вещества: окрашивании по методу Ниссля или Гольджи, оно перестает визуально отделяться от прилегающих популяций нейронов. В связи с чем PV может выступать полезным инструментом для точного определения локализации определенных популяций нейронов CCN. Ранее PV+ нейроны и нейропиле в CCN упоминались в работах на крысах [11, 51], однако подробных данных о морфологических особенностях таких клеток и их посегментном распределении в этих работах не представлено.

Исследований с упоминанием PV в CN значительно больше, чем для CCN. Группы иммунопозитивных клеток в данном ядре описаны у мышей [44], крыс [51, 52], собак [10], приматов [26, 35, 36, 53]. Известно, что CN содержит гетерогенную популяцию нейронов, различающихся по размеру соммы и числу отростков [54, 55]. Также, в CN выявлена зависимость между морфотипом нейрона и выполняемой им функцией: популяцию крупных и средних клеток отнесли к проекционным, а мелких – к интернейронам с локальными связями [56]. В настоящем исследовании в CN спинного мозга кошки были выявлены нейроны исключительно мелкого размера, что позволяет отнести их к интернейронам, но не к клеткам, организующим связи с супраспинальными структурами. Однако в работе на мышцах было показано, что среди нейронов, формирующих проекции к мозжечку, 77% являют-

ся PV+ [44]. Возможно, полученные отличия отражают видовые особенности организации ядра.

В пластине VII сегментов C6–C8 и L5–L7, близости от дорзальной границы мотонейронных пулов, выявлена популяция мультиполярных клеток крупного размера. Эти данные соответствуют другой работе, проведенной на L7 сегменте спинного мозга кошки, в которой в вентральной области пластины VII также описаны подобного рода PV+ нейроны [15]. Сходные скопления PV+ нейронов также известны у мышей и крыс [24, 51, 57]. Исследования эмбриональных классов нейронов спинного мозга позволили выявить принадлежность данной популяции PV+ клеток к Ia тормозным интернейронам [14, 58] – группе премоторных нейронов, обеспечивающих торможение мотонейронов антагонистических мышц [59].

Другой обособленной популяцией PV+ нейронов в сегментах C6–C8 и L5–L7 является скопление округлых или мультиполярных клеток среднего размера, локализованное в вентромедиальной области на границе пластин VIII и IX. Такие же группы клеток были показаны в работе [15] на кошке и в ряде исследований на крысах [24, 51, 60]. Авторы онтогенетических исследований спинного мозга мыши полагают, что PV+ клетки данной области являются интернейронами Реншоу [14, 58, 61], обеспечивающие механизм возвратного торможения α -мотонейронов [62].

Пластина VIII

Нейроны пластины VIII относятся преимущественно к типу проприоспинальных клеток, координирующих деятельность нейронных сетей разных уровней [49]. Во всех исследуемых сегментах в пластине VIII нами выявлены немногочисленные нейроны трех морфотипов, имеющие характерные особенности локализации в пределах пластины. Веретеновидные нейроны имеют сому среднего размера и локализуются преимущественно в латеральной части пластины. Сомы этих нейронов вытянута либо вдоль границы вентрального рога, т.е. дорзовентрально, либо медиолатерально – в случае залегания клетки на границе с белым веществом. Веретеновидные PV+ клетки ранее были описаны в работе на крысах [24]. По всей видимости отростки таких нейронов выходят в белое вещество вентрального канатика и формируют комиссуральные связи и восходящие тракты [63]. Другие 2 типа PV+ нейронов – разноразмерные мультиполярные клетки, ранее также описанные у кошки [15]. Имеются свидетельства, что PV+ нейроны такого типа, получая нисходящие импульсы от ствола мозга, могут участвовать в торможении спинальных мотонейронов во время парадоксальной фазы сна [49, 64].

PV+ нейроны полностью отсутствуют в пластине IX, представленной мотонейронными пулами, и в симпатических преганглионарных ядрах IML и IMM. Известно, что у грызунов на некоторых эта-

пах эмбриогенеза временная экспрессия PV может наблюдаться в мотонейронах [65]. Однако для взрослых особей экспрессия PV мотонейронами не свойственна [66, 67]. Среди работ, посвященных распределению PV+ нейронов в спинном мозге разных видов млекопитающих, нами не было выявлено упоминаний об экспрессии PV в каких-либо висцеральных ядрах, включая IML и IMM.

Таким образом, PV может рассматриваться как маркер не только проприоцептивной системы и связанных с ней прецереbellарных ядер, но и десятка иных функциональных групп спинальных нейронов. Для более полного понимания их роли необходимы сравнительные исследования в ряду млекопитающих.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 30/01/2020).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-15-00235).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С.М. и А.А.В.; подготовка гистологического материала: Н.С.М. и А.А.В.; сбор и обработка данных: А.А.В.; написание и редактирование манускрипта А.А.В., Н.С.М., П.Е.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andressen C, Blümcke I, Celio MR* (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271:181–208. <https://doi.org/10.1007/BF00318606>
2. *Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C* (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281–309. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00024-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00024-0)
3. *Leist M, Nicotera P* (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239:183–201. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.4026>

4. *Deuticke HJ* (1934) Über die sedimentationskonstante von muskelpoteinen. Hoppe-Seyler's Z Für Physiol Chem 224:216–228.
<https://doi.org/10.1515/bchm2.1934.224.5-6.216>
5. *Celio MR, Heizmann CW* (1981) Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. Nature 293:300–302.
<https://doi.org/10.1038/293300a0>
6. *Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M* (2012) Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. Neuron 73:159–170.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.013>
7. *Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW, Baimbridge KG* (1993) Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. Neuropathol Appl Neurobiol 19:291–299.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1993.tb00443.x>
8. *Jones EG* (2009) Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex. Ann N Y Acad Sci 1157:10–23.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04534.x>
9. *Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM* (2000) ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. Cell 101:485–498.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80859-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80859-4)
10. *Marsala J, Lukáčová N, Kolesár D, Sulla I, Gálik J, Marsala M* (2007) The distribution of primary nitric oxide synthase- and parvalbumin- immunoreactive afferents in the dorsal funiculus of the lumbosacral spinal cord in a dog. Cell Mol Neurobiol 27:475–504.
<https://doi.org/10.1007/s10571-007-9140-6>
11. *Ren K, Ruda MA* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. Brain Res Brain Res Rev 19:163–179.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
12. *Ganugula R, Deng M, Arora M, Pan H-L, Kumar MNVR* (2019) Polyester nanoparticle encapsulation mitigates paclitaxel-induced peripheral neuropathy. ACS Chem Neurosci 10:1801–1812.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00703>
13. *Ozeri-Engelhard N, Gradwell MA, Laflamme OD, Upadhyay A, Aoki A, Shrier T, Gandhi M, Gonzalez M, Eisdorfer JT, Abbas-Zadeh G, Yusuf N, Imtiaz Z, Alomary SA, Katz J, Haas M, Hernandez Y, Akay T, Abaira V* (2022) Sensory convergence and inhibitory divergence: deep dorsal horn inhibitory interneurons modulate the timing and magnitude of limb coordination during locomotion. Neuroscience.
14. *Alvarez FJ, Jonas PC, Sapir T, Hartley R, Berrocal MC, Geiman EJ, Todd AJ, Goulding M* (2005) Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. J Comp Neurol 493:177–192.
<https://doi.org/10.1002/cne.20711>
15. *Anelli R, Heckman CJ* (2005) The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. J Neurocytol 34:369–385.
<https://doi.org/10.1007/s11068-006-8724-2>
16. *Veshchitskii A, Shkorbatova P, Merkulyeva N* (2022) Neurochemical atlas of the cat spinal cord. Front Neuroanat 16:1034395.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1034395>
17. *Merkulyeva N, Mikhalkin A, Zykin P* (2018) Early postnatal development of the lamination in the lateral geniculate nucleus A-layers in cats. Cell Mol Neurobiol 38:1137–1143.
<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0585-6>
18. *Merkulyeva NS, Mikhalkin AA, Nikitina NI* (2020) Characteristics of the neurochemical state of neurons in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in cats. Neurosci Behav Physiol 50:511–515.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00927-w>
19. *Mikhalkin AA, Merkulyeva NS* (2021) Peculiarities of age-related dynamics of neurons in the cat lateral geniculate nucleus as revealed in frontal versus sagittal slices. J Evol Biochem Physiol 57:1001–1007.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050021>
20. *Shkorbatova PY, Lyakhovetskii VA, Merkulyeva NS, Veshchitskii AA, Bazhenova EY, Laurens J, Pavlova NV, Musienko PE* (2019) Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. Anat Rec Hoboken NJ 2007 302:1628–1637.
<https://doi.org/10.1002/ar.24054>
21. *Rexed B* (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. J Comp Neurol 100:297–379.
<https://doi.org/10.1002/cne.901000205>
22. *Craig AD, Krout K, Andrew D* (2001) Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. J Neurophysiol 86:1459–1480.
<https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.3.1459>
23. *Porseva VV, Emanuilov AI, Maslyukov PM* (2020) Subpopulations of calbindin-, calretinin-, and parvalbumin-immunoreactive interneurons in the dorsal horn of the spinal cord in female C57BL/6 mice. Neurosci Behav Physiol 50:961–965.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00991-2>
24. *Antal M, Freund TF, Polgár E* (1990) Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. J Comp Neurol 295:467–484.
<https://doi.org/10.1002/cne.902950310>
25. *Lukáčová N, Kisucká A, Pavel J, Hricová L, Kucharíková A, Gálik J, Maršala M, Langfort J, Chalimoniuk M* (2012) Spinal cord transection modifies neuronal nitric oxide synthase expression in medullar reticular nuclei and in the spinal cord and increases parvalbumin immunopositivity in motoneurons below the site of injury in experimental rabbits. Acta Histochem 114:518–524.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.09.007>
26. *Torres-da-Silva KR, Da Silva AV, Barioni NO, Tessarin GWL, De Oliveira JA, Ervolino E, Horta-Junior J a. C, Casatti CA* (2016) Neurochemistry study of spinal cord in non-human primate (Sapajus spp.). Eur J Histochem EJH 60:2623.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2623>
27. *Hughes DI, Sikander S, Kinnon CM, Boyle KA, Watanabe M, Callister RJ, Graham BA* (2012) Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. J Physiol 590:3927–3951.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235655>
28. *Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, Schmidt HH* (1994) Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I–III

- of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61:123–132.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90065-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90065-5)
29. *Stachowski NJ, Dougherty KJ* (2021) Spinal inhibitory interneurons: gatekeepers of sensorimotor pathways. *Int J Mol Sci* 22:2667.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052667>
 30. *Yamamoto T, Carr PA, Bainbridge KG, Nagy JI* (1989) Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the superficial layers of the spinal cord dorsal horn of rat. *Brain Res Bull* 23:493–508.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90195-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90195-0)
 31. *Tiong SYX, Polgár E, van Kralingen JC, Watanabe M, Todd AJ* (2011) Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I–III of the rat spinal cord. *Mol Pain* 7:36.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-36>
 32. *Molgaard S, Ulrichsen M, Boggild S, Holm M-L, Vaegter C, Nyengaard J, Glerup S* (2014) Immunofluorescent visualization of mouse interneuron subtypes. *F1000Res* 3:242.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.5349.2>
 33. *Antal M, Polgár E, Chalmers J, Minson JB, Llewellyn-Smith I, Heizmann CW, Somogyi P* (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 314:114–124.
<https://doi.org/10.1002/cne.903140111>
 34. *Kim YJ, Moon DE, Kim OS, Lee YK* (1995) Morphology and topographic distribution of calbindinergic and parvalbuminergic neurons in the rabbit cervical cord. *Korean J Anesthesiol* 29:329.
<https://doi.org/10.4097/kjae.1995.29.3.329>
 35. *Rausell E, Bae CS, Viñuela A, Huntley GW, Jones EG* (1992) Calbindin and parvalbumin cells in monkey VPL thalamic nucleus: distribution, laminar cortical projections, and relations to spinothalamic terminations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12:4088–4111.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-10-04088.1992>
 36. *Satoh J, Tabira T, Sano M, Nakayama H, Tateishi J* (1991) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 81:388–395.
<https://doi.org/10.1007/BF00293459>
 37. *Dougherty KJ, Sawchuk MA, Hochman S* (2009) Phenotypic diversity and expression of GABAergic inhibitory interneurons during postnatal development in lumbar spinal cord of glutamic acid decarboxylase 67-green fluorescent protein mice. *Neuroscience* 163:909–919.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.055>
 38. *Gradwell MA, Boyle KA, Browne TJ, Bell AM, Leonardo J, Peralta Reyes FS, Dickie AC, Smith KM, Callister RJ, Dayas CV, Hughes DI, Graham BA* (2022) Diversity of inhibitory and excitatory parvalbumin interneuron circuits in the dorsal horn. *Pain* 163:e432–e452.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002422>
 39. *Petitjean H, Pawlowski SA, Fraine SL, Sharif B, Hamad D, Fatima T, Berg J, Brown CM, Jan L-Y, Ribeiro-da-Silva A, Braz JM, Basbaum AI, Sharif-Naeini R* (2015) Dorsal horn parvalbumin neurons are gate-keepers of touch-evoked pain after nerve injury. *Cell Rep* 13:1246–1257.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.080>
 40. *Cui L, Miao X, Liang L, Abdus-Saboor I, Olson W, Fleming MS, Ma M, Tao Y-X, Luo W* (2016) Identification of early RET+ deep dorsal spinal cord interneurons in gating pain. *Neuron* 91:1413.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.010>
 41. *Huang J, Chen J, Wang W, Wang W, Koshimizu Y, Wei Y-Y, Kaneko T, Li Y-Q, Wu S-X* (2010) Neurochemical properties of enkephalinergic neurons in lumbar spinal dorsal horn revealed by preproenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice. *J Neurochem* 113:1555–1564.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06715.x>
 42. *Stewart W, Maxwell DJ* (2003) Distribution of and organization of dorsal horn neuronal cell bodies that possess the muscarinic m2 acetylcholine receptor. *Neuroscience* 119:121–135.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00116-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00116-7)
 43. *Ritz LA, Greenspan JD* (1985) Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *J Comp Neurol* 238:440–452.
<https://doi.org/10.1002/cne.902380408>
 44. *Fu Y, Sengul G, Paxinos G, Watson C* (2012) The spinal precerebellar nuclei: calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neurosci Lett* 518:161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002>
 45. *Hirai N, Hongo T, Sasaki S, Yoshida K* (1979) The neck and labyrinthine influences on cervical spinocerebellar tract neurones of the central cervical nucleus in the cat. *Prog Brain Res* 50:529–536.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60851-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60851-1)
 46. *Matsushita M, Hosoya Y, Ikeda M* (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 184:81–106.
<https://doi.org/10.1002/cne.901840106>
 47. *McKelvey-Briggs DK, Saint-Cyr JA, Spence SJ, Partlow GD* (1989) A reinvestigation of the spinovestibular projection in the cat using axonal transport techniques. *Anat Embryol (Berl)* 180:281–291.
<https://doi.org/10.1007/BF00315886>
 48. *Sato H, Ohkawa T, Uchino Y, Wilson VJ* (1997) Excitatory connections between neurons of the central cervical nucleus and vestibular neurons in the cat. *Exp Brain Res* 115:381–386.
<https://doi.org/10.1007/pl00005708>
 49. *Tan S, Faull RLM, Curtis MA* (2023) The tracts, cytoarchitecture, and neurochemistry of the spinal cord. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007 306:777–819.
<https://doi.org/10.1002/ar.25079>
 50. *Verburgh CA, Kuypers HG, Voogd J, Stevens HP* (1989) Spinocerebellar neurons and propriospinal neurons in the cervical spinal cord: a fluorescent double-labeling study in the rat and the cat. *Exp Brain Res* 75:73–82.
<https://doi.org/10.1007/BF00248532>
 51. *Celio MR* (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375–475.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h)
 52. *Chen S, Yang G, Zhu Y, Liu Z, Wang W, Wei J, Li K, Wu J, Chen Z, Li Y, Mu S, OuYang L, Lei W* (2016) A comparative study of three interneuron types in the rat spinal cord. *PLoS One* 11:e0162969.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162969>

53. Fahandejsaadi A, Leung E, Rahaii R, Bu J, Geula C (2004) Calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in primate lower motor neurons. *Neuroreport* 15:443–448. <https://doi.org/10.1097/00001756-200403010-00012>
54. Boehme CC (1968) The neural structure of Clarke's nucleus of the spinal cord. *J Comp Neurol* 132:445–461. <https://doi.org/10.1002/cne.901320306>
55. Loewy AD (1970) A study of neuronal types in Clarke's nucleus of the adult cat. *J Comp Neurol* 139:53–79. <https://doi.org/10.1002/cne.901390104>
56. Snyder RL, Faull RL, Mehler WR (1978) A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181:833–852. <https://doi.org/10.1002/cne.901810409>
57. Han Q, Feng J, Qu Y, Ding Y, Wang M, So K-F, Wu W, Zhou L (2013) Spinal cord maturation and locomotion in mice with an isolated cortex. *Neuroscience* 253:235–244. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.057>
58. Benito-Gonzalez A, Alvarez FJ (2012) Renshaw cells and Ia inhibitory interneurons are generated at different times from p1 progenitors and differentiate shortly after exiting the cell cycle. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32:1156–1170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3630-12.2012>
59. Jankowska E (2013) Spinal Interneurons. In: Pfaff DW (ed) *Neuroscience in the 21st Century*. Springer New York, New York, NY, pp 1063–1099.
60. Hughes DI, Boyle KA, Kinnon CM, Bilsland C, Quayle JA, Callister RJ, Graham BA (2013) HCN4 subunit expression in fast-spiking interneurons of the rat spinal cord and hippocampus. *Neuroscience* 237:7–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.028>
61. Siembab VC, Smith CA, Zagoraïou L, Berrocal MC, Mentis GZ, Alvarez FJ (2010) Target selection of proprioceptive and motor axon synapses on neonatal V1-derived Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells. *J Comp Neurol* 518:4675–4701. <https://doi.org/10.1002/cne.22441>
62. Renshaw B (1946) Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *J Neurophysiol* 9:191–204. <https://doi.org/10.1152/jn.1946.9.3.191>
63. Matsuyama K, Kobayashi S, Aoki M (2006) Projection patterns of lamina VIII commissural neurons in the lumbar spinal cord of the adult cat: an anterograde neural tracing study. *Neuroscience* 140:203–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.005>
64. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589–594. <https://doi.org/10.1038/nature04767>
65. Zhang JH, Morita Y, Hironaka T, Emson PC, Tohyama M (1990) Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 302:715–728. <https://doi.org/10.1002/cne.903020404>
66. Kucharíková A, Schreiberová A, Závodská M, Gedrová Š, Hricová L, Pavel J, Gálik J, Maršala M, Lukáčová N (2014) Repeated Baclofen treatment ameliorates motor dysfunction, suppresses reflex activity and decreases the expression of signaling proteins in reticular nuclei and lumbar motoneurons after spinal trauma in rats. *Acta Histochem* 116:344–353. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.08.012>
67. Solbach S, Celio MR (1991) Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl)* 184:103–124. <https://doi.org/10.1007/BF00942742>

DISTRIBUTION OF PARVALBUMIN-EXPRESSING NEURONAL POPULATIONS IN THE CAT CERVICAL AND LUMBAR SPINAL CORD GRAY MATTER

A. A. Veshchitskii^a, P. E. Musienko^a, and N. S. Merkulyeva^{a, #}

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

[#] *e-mail: mer-natalia@yandex.ru*

Parvalbumin is a classical marker of interneuronal populations in the central nervous system. Analyzing the cervical and lumbar spinal cord segments of cats (*Felis catus*), both individual cells and entire populations of neurons expressing parvalbumin were identified in most of the gray matter laminae. These populations have strict laminar and nuclear localization. Numerous neuronal clusters are located in the medial part of lamina V–VI and in laminae VII of cervical and lumbar enlargements. We believe that the first one located in segments C4–C8 and L4–L7 may participate in the modulatory mechanisms of locomotor activity via the convergence of cutaneous and proprioceptive afferentation from the limbs. Neuronal populations in lamina VII consist of Ia interneurons and Renshaw interneurons that participate in the motoneuron inhibition. Less numerous populations of parvalbumin-immunopositive cells found in laminae III possibly participated in the regulation of cutaneous sensitivity. Another population located in lamina VIII possibly forms commissural and propriospinal connections and participates in modulating the activity of motoneurons. Immunopositive interneurons also revealed in the precerebellar nuclei: central cervical nucleus and Clarke's nucleus; unlike the general population of these nuclei, neurons revealed are interneurons. Scarce immunopositive cells are found in lamina I of L6–L7 segments, as well as in laminae II, IV, and X of all segments investigated.

Keywords: calcium-binding protein, parvalbumin, spinal cord, cervical and lumbar enlargement, cat