

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 10
сентябрь
2023



СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Тромбин — связующее звено между гемостазом и воспалением <i>Э. А. Старикова, Дж. Т. Маммедова, О. Я. Порембская</i>	1297
Молекулярные механизмы действия вальпроевой кислоты на сигнальные системы и функционирование мозга <i>А. Н. Турсунов, Д. С. Васильев, Н. Н. Наливаева</i>	1331
Органофосфат-индуцированная патология: механизмы развития, принципы терапии и особенности экспериментальных исследований <i>Н. В. Гончаров, Д. А. Белинская, П. В. Авдонин</i>	1349

Экспериментальные статьи

Влияние гепарина на формирование и заживление язв желудка, индуцированных аппликацией уксусной кислоты на его слизистую оболочку у крыс <i>А. Л. Ефимов, Д. С. Сахно, Б. В. Сигуа, Н. И. Ярушкина, Л. П. Филаретова</i>	1398
Стероидогенный эффект агонистов рецептора лютеинизирующего гормона и метформина у самцов крыс с андрогенным дефицитом, обусловленным диета-индуцированным ожирением <i>А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, И. А. Лебедев, В. Н. Сорокоумов, А. О. Шнаков</i>	1414
Влияние спонтанной нервно-мышечной активности на развитие атрофии камбаловидной мышцы в условиях функциональной разгрузки <i>К. В. Сергеева, К. А. Шарло, В. Е. Калашиников, О. В. Туртикова, С. А. Тыганов, Б. С. Шенкман</i>	1430
Реактивность ЭЭГ во время слухового восприятия слов у детей дошкольного и младшего школьного возраста <i>М. А. Начарова, Д. В. Начаров, В. Б. Павленко</i>	1443
Сравнение влияния содержания крыс в горах и на равнине на развитие стрептозотоцин-индуцированного диабета и язвообразование в желудке <i>Т. Т. Подвигина, О. П. Комкова, О. В. Ветровой, Н. И. Ярушкина, Л. П. Филаретова</i>	1457
Влияние активации иммунной системы в раннем онтогенезе на агрессивность и сексуальную мотивацию у взрослых крыс Вистар <i>И. В. Павлова, Н. Д. Брошевицкая</i>	1476
Анализ фазы расслабления сердца у крыс <i>В. И. Капелько, А. А. Абрамов, В. Л. Лакомкин</i>	1489
Легочная артериальная гипертензия ослабляет вазоконстрикторные реакции, вызванные активацией альфа-1-адренорецепторов в большом круге кровообращения <i>А. А. Абрамов, В. Л. Лакомкин, Е. В. Лукошкова, А. В. Просвирнин, В. И. Капелько, В. С. Кузьмин</i>	1498

CONTENTS

Reviews

Thrombin in the Crossroad Hemostasis and Inflammation <i>E. A. Starikova, J. T. Mammedova, and O. Ya. Porembskaya</i>	1297
Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions <i>A. N. Tursunov, D. S. Vasilyev, and N. N. Nalivaeva</i>	1331
Organophosphate-Induced Pathology: Mechanisms of Development, Principles of Therapy and Features of Experimental Studies <i>N. V. Goncharov, D. A. Belinskaya, and P. V. Avdonin</i>	1349

Experimental Articles

Effect of Heparin on the Formation and Healing of Gastric Ulcers Induced by Acetic Acid Application on the Gastric Mucosa in Rats <i>A. L. Efimov, D. S. Sakhno, B. V. Sigua, N. I. Yarushkina, and L. P. Filaretova</i>	1398
Steroidogenic Effect of Luteinizing Hormone Receptor Agonists and Metformin in Male Rats with Androgenic Deficiency Caused by Diet-Induced Obesity <i>A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, I. A. Lebedev, V. N. Sorokoumov, and A. O. Shpakov</i>	1414
The Effect of Spontaneous Neuromuscular Activity on the Development of Atrophy of the Functionally Unloaded <i>m. soleus</i> <i>K. V. Sergeeva, K. A. Sharlo, V. E. Kalashnikov, O. V. Turtikova, S. A. Tyganov, and B. S. Shenkman</i>	1430
Words Listening Related Electroencephalography Reactivity in Children of Preschool and Primary School Age <i>M. A. Nacharova, D. V. Nacharov, and V. B. Pavlenko</i>	1443
Comparison of the Effect of Keeping Rats in the Mountains and on the Plain on the Development of Streptozotocin-Induced Diabetes and Gastric Ulceration <i>T. T. Podvigina, O. P. Komkova, O. V. Vetrovov, N. I. Yarushkina, and L. P. Filaretova</i>	1457
Influence of Immune System Activation in Early Ontogenesis on Aggressiveness and Sexual Motivation in Adult Wistar Rats <i>I. V. Pavlova and N. D. Broshevitskaya</i>	1476
Analysis of Relaxation Phase in the Rat Heart <i>V. I. Kapelko, A. A. Abramov, and V. L. Lakomkin</i>	1489
Pulmonary Arterial Hypertension Attenuates Vasoconstrictor Responses Caused by Activation of Alpha-1-Adrenoreceptors in the Systemic Circulation <i>A. A. Abramov, V. L. Lakomkin, E. V. Lukoshkova, A. V. Prosvirnin, V. I. Kapelko, and V. S. Kuzmin</i>	1498

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ТРОМБИН – СВЯЗУЮЩЕЕ ЗВЕНО
МЕЖДУ ГЕМОСТАЗОМ И ВОСПАЛЕНИЕМ

© 2023 г. Э. А. Старикова^{1, 2, 3, *}, Дж. Т. Маммедова¹, О. Я. Порембская^{1, 4}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Северо-Западный государственный университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: Starickova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.08.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Гемостаз и реакции иммунитета представляют собой эволюционно и функционально связанные системы, от скоординированной работы которых зависят жизненно важные процессы — защита от кровопотери и патогенов. Тромбин — центральный фермент системы коагуляции, который обладает выраженной провоспалительной активностью и играет важную роль в патогенезе широкого спектра заболеваний инфекционной и неинфекционной природы. Многие гуморальные факторы иммунитета, регулирующие воспаление (IL-1 α , компоненты комплемента) и миграцию клеток в очаг повреждения (остеопонтин, химерин), могут активироваться в результате протеолитического расщепления тромбином. Основные рецепторы тромбина — протеаза-активируемые рецепторы (PARs), экспрессируются на многих клетках иммунной системы и рассматриваются как неклассические паттерн-распознающие рецепторы (PRRs). Действие тромбина на клетки врожденного иммунитета может быть не связано с его ферментативными эффектами. Последние исследования показывают, что тромбин может действовать как алармин, стимулировать созревание дендритных клеток и реакции адаптивного иммунитета. Продукция этого фактора также влияет на поляризацию Т-хелперов, определяющую выбор стратегии защитных реакций. Исследование иммунных функций компонентов системы коагуляции раскрывает новые патогенетические механизмы развития стерильного воспаления и расширяет возможности терапии аллергических, аутоиммунных и нейровоспалительных заболеваний.

Ключевые слова: тромбин, гемостаз, протеаза-активируемый рецептор, воспаление, врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет

DOI: 10.31857/S0869813923100114, EDN: CSGJUG

ВВЕДЕНИЕ

Эволюция многоклеточных организмов сопровождалась развитием сложных механизмов защиты, позволяющих противостоять угрозам окружающей среды, связанными с повреждением тканей, кровотечением и инвазией патогенов. В то время как в ходе развития беспозвоночных реализовалась стратегия, при которой

защиту от кровопотери и защиту от инфекции обеспечивает гемолимфа, у позвоночных для решения этих задач сформировались две различные системы защиты: система гемостаза и иммунная система [1]. Неудивительно поэтому, что ферментативные каскады системы коагуляции и различные компоненты иммунитета (система комплемента, система цитокинов, лейкоциты) высоко интегрированы и взаимно регулируются. От скоординированной работы этих процессов зависит выживание организмов. Дисбалансы, которые выражаются в избыточной, стойкой активации системы гемостаза и/или иммунной системы, приводят к дисфункции органов, возникающей при атеросклерозе, инсульте, ишемической болезни сердца, метаболическом синдроме, сепсисе, аутоиммунных/воспалительных нарушениях (артрите, воспалительном заболевании кишечника) и ряде васкулопатических и нейродегенеративных синдромов [2]. Несмотря на очевидную тесную взаимосвязь, реакции гемостаза и иммунные реакции долгое время изучаются как совершенно отдельные защитные системы.

Бесспорно, основной целью гемостаза является остановка кровотечения из поврежденного кровеносного сосуда. Не менее важно, что локальный тромбоз ограничивает возможное распространение микробных патогенов путем создания “механического” барьера [3, 4], поэтому продуцируемые в ходе развития инфекции факторы врожденного иммунитета способны активировать систему гемостаза. Например, компонент лектинового пути каскада комплемента, сериновая протеаза — MASP2 превращает протромбин в тромбин на поверхности бактериальной клетки, что приводит к локальной выработке фибриноген-пептидов [5, 6]. Необходимый для сшивки нитей фибрина фактор XIIIa генерируется в результате тромбиновой активации фактора XIII, и такой же активностью обладает компонент комплемента MASP1 [6, 7]. Комплекс C5b-9 может катализировать превращение протромбина

Список сокращений: ЛПС — липополисахарид; ADP — аденозиндифосфат (adenosine diphosphate); aPC — активированный протеин С (activated protein C); Bcl10 — B-cell lymphoma/leukemia 10; CLR — лектиноподобные рецепторы C-типа (C-type lectin-like receptors); CX3CL1 — фракталкин (fractalkin); DAG — диацилглицерол (diacylglycerol); DAMP — признак повреждения своего (Damage-Associated Molecular Patterns); EPCR — рецептор протеина С эндотелиальных клеток (Endothelial cell protein C receptor); Erk — extracellular signal-regulated kinases; FPR2 — N-formyl peptide receptor 2; GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony stimulating factor); GTP — гуанозинтрифосфат (guanosine triphosphate); ICAM-1 — межклеточная молекула адгезии 1 (intercellular adhesion molecule 1); IFN γ — интерферон γ (interferon γ); IL — интерлейкин (interleukin); iNOS — индуцибельная синтаза оксида азота (Inducible Nitric Oxide Synthase); IP-10 — Interferon gamma-induced protein 10; JNK — c-Jun N-terminal kinases; MALT1 — Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1; MAPK — mitogen activated kinase; MASP1–2 — mannose-binding protein-associated serine protease 1, 2; MCP-1 — Monocyte Chemoattractant Protein 1; MCSF — макрофагальный колониестимулирующий фактор (Macrophage colony-stimulating factor); МНСII — главный комплекс гистосовместимости II (main histocompatibility complex II); MIF — фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (macrophage migration inhibitory factor); MIP-2 — Macrophage inflammatory protein; MMP-9 — Matrix metalloproteinase 9; MyD88 — Myeloid differentiation primary response gene (88); NET — внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular nets); NLR — NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors); NF- κ B — ядерный фактор κ — усилитель легкой цепи активированных В клеток (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); OPN — остеопонтин (osteonectin); PAMP — молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенностью (Pathogen Associated Molecular Patterns); PAR — рецептор, активируемый протеазой (protease-activating receptor); PDGF — Platelet-derived growth factor; PI3K — фосфоинозитид-3-киназа; PKC — Protein kinase C; PLC — фосфолипаза C (Phospholipase C); PRR — рецептор распознавания образов патогенности (pattern recognizing receptor); Ras — Rat sarcoma virus; RhoA — Ras homolog family member A; SMOG1 — Inactivation of secreted modular Ca²⁺-binding protein 1; S1P — сфингозин 1 фосфат (sphingosine 1 phosphate); SphK1 — сфингозинкиназа 1 (sphingosine kinase 1); S1PR — рецептор сфингозин 1 фосфата (sphingosine 1 phosphate receptor); TAFI — активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (thrombin induced fibrinolysis factor); TF — тканевой фактор (tissue factor); TGF- β 1 — Transforming growth factor β 1; Th — Т-хелпер (T helper cell); Th0 — “наивный” Т-хелпер (naïve T helper cell); Th1-OPN — остеопонтин, расщепляемый тромбином (thrombin-cleaved osteonectin); TIL — инфильтрирующие опухоль лимфоциты (Tumor-infiltrating lymphocytes); TLR — толл-подобный рецептор (toll like receptor), TNF α — фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α); Treg — регуляторный Т-хелпер (regulatory T helper, suppressor T helper cell); TRIF — Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β ; TxA2 — тромбоксан A2 (thromboxane A2); VCAM-1 — эндотелиальная молекула адгезии 1 (vascular cell adhesion molecule 1); vWF — фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor).

в тромбин [8]. Накапливается все больше данных, которые демонстрируют обратный процесс, когда активные компоненты системы коагуляции запускают воспаление.

Тромбин является центральным ферментом свертывания крови, который инициирует так называемый вторичный гемостаз – превращение фибриногена в фибрин и образование сгустков фибрина. В настоящее время описано 13 функций тромбина в гемостазе [9]. Однако многие биологические процессы, не связанные с коагуляцией, также в значительной степени регулируются с участием этой сериновой протеазы [10]. Тромбин индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов эндотелиальными [11, 12], гладкомышечными клетками, перитцитами [13], эпителиальными клетками [14], адипоцитами [15] и иммунными клетками [16–18]. Он оказывает хемотаксическое действие на лейкоциты, индуцирует экспрессию на этих клетках молекул адгезии [19] и способствует высвобождению биологически активных субстанций из тромбоцитов [20]. Тромбин активирует комплемент [21], привлекая иммунные клетки [22, 23] в участки повреждения для быстрого и локализованного воспалительного и прокоагулянтного ответа, модулирует проницаемость сосудов [24–26]. Нарастает количество исследований, в которых зарегистрировано повышение концентрации тромбина при различных хронических заболеваниях [27–30]. С каждым годом появляется все больше данных, подтверждающих важную роль тромбина в патогенезе неинфекционных воспалительных заболеваний – аллергических [31], аутоиммунных [32], нейровоспаления [33] и др. Новый виток интереса к изучению этой протеазы был спровоцирован появлением коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19), впервые зарегистрированной в Ухане (Китай) декабре 2019 г. [34]. 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения охарактеризовала чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения, связанную с COVID-19, как пандемию [34]. У пациентов с COVID-19 было описано серьезное нарушение регуляции гемостаза, повышение различных параметров свертывания крови, таких как D-димеры, протромбиновое время, фибриноген и продукты его распада [34–38].

В обзоре проводится обобщение и анализ данных о роли тромбина в регуляции реакций иммунитета.

РОЛЬ ТРОМБИНА В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА

Физиологическая инициация каскада свертывания (так называемый внешний путь) реализуется при повреждении сосуда, когда субэндотелиальный тканевой фактор (TF) на поверхности активированных лейкоцитов взаимодействует с фактором VIIa (FVIIa) (рис. 1). В дальнейшем комплекс FVIIa/TF – “внешняя теназа” активирует фактор X (FX). Образовавшийся FXa формирует на фосфолипидной мембране тромбоцитов комплекс “протромбиназы” – FXa/FVa/Ca²⁺, который расщепляет протромбин до тромбина [39, 40].

Внутренний путь коагуляции запускает активация так называемой “контактной системы плазмы”, в состав которой входит две протеазы, фактор Хагемана (FXII) и прекалликреин плазмы, а также неферментативный кофактор – высокомолекулярный кининоген. Эти факторы спонтанно активируются в присутствии отрицательно заряженных поверхностей, которые могут быть неприродного (полимерные поверхности для катетеризации, диализа, сердечно-легочном шунтировании, искусственные клапаны сердца) или природного происхождения (ДНК, РНК, денатурированные белки (например, β-амилоид), открытый коллаген стенки сосуда, полифосфат тромбоцитов, нейтрофильные внеклеточные ловушки) [41–43]. Связывание FXII с такими поверхностями сопровождается конформационными изменениями, приводящими к активации фермента. Кининоген плазмы также обладает

FVIII и FXI, которые участвуют в формировании комплекса “альтернативной или внутренней теназы” (VIIIa и IXa). “Внутренняя теназа” поддерживает и усиливает формирование “протромбиназы” и тромбина [39, 40].

Процесс образования кровяного сгустка из активированных тромбоцитов и ковалентно связанного фибрина может запускать накапливающиеся при воспалении и/или повреждении ткани растворимые активаторы тромбоцитов, такие как тромбосан A2 (TxA2), аденозиндифосфат (ADP) и тромбин [45]. Повреждение эндотелия сосудов тоже приводит к попаданию TF и коллагена из субэндотелиальной ткани в кровь и высвобождению преформированных в тельцах Вейбеля–Паладе фактора фон Виллебранда (vWF) и Р-селектина. Под воздействием TF, коллагена и vWF тромбоциты активируются и дополнительно усиливают гемостаз, секретируя преформированные в гранулах TxA2, ADP, фибриноген, а также FV. Даже небольшие количества тромбина могут вызвать свертывание крови и активацию тромбоцитов, которые все вместе образуют гемостатическую пробку [10, 46].

Активность тромбина в крови жестко регулируется. Существуют множественные механизмы ингибирования гемостаза по механизму обратной отрицательной связи, которые локализуют и ограничивают каскад коагуляции и рост тромба. В частности, связывание с тромбомодулином, интегральным мембранным белком, экспрессируемым на эндотелии сосудов, увеличивает сродство тромбина к протеину C и активирует его (aPC). aPC ингибирует протромбиназный комплекс (FXa + FVa) [47]. Для предотвращения случайных, спонтанных или избыточных тромбин-зависимых процессов в организме постоянно продуцируются естественный ингибитор тромбина – антитромбин-III. Свободно циркулирующий тромбин блокируется этим ингибитором. При этом генерация протромбина находится в обратной зависимости от активности антитромбина-III [48].

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ТРОМБИНА

Образование тромбина происходит в результате протеолитического расщепления его ферментативно неактивной формы – протромбина. Хотя в организме взрослого человека протромбин в основном синтезируется в гепатоцитах, в меньшем количестве он также образуется в тканях головного мозга [49], в нейронах после церебральной ишемии [50], в эмбриональных тканях [30, 49]. Продукция протромбина усиливается при различных острых и хронических воспалительных процессах [29, 30, 51, 52].

Протеолитическое расщепление протромбина катализируется фактором системы коагуляции FXa и контролируется различными механизмами отрицательной обратной связи (см. выше). Тем не менее мутации, которые просто увеличивают экспрессию протромбина (например, F2 20210 G > A), могут нарушать хорошо сбалансированное равновесие в системе гемостаза [53, 54]. Даже незначительное (в 1.5–1.7 раза) увеличение экспрессии гена протромбина [54, 55] может привести к клинически значимой тромбофилии [56, 57]. Это показывает, что экспрессия протромбина тоже нуждается в жестком контроле, однако лежащие в основе этого процесса молекулярные механизмы слабо изучены.

Вероятными триггерами экспрессии протромбина являются воспалительные процессы [28, 29, 58–62]. В частности внеклеточные стимулы индуцируют экспрессию гена протромбина через активацию p38 MAPK. p38 MAPK фосфорилирует регуляторные белки, которые катализируют ремоделирование стимулирующих рибонуклеопротеиновых комплексов и повышают эффективность процессинга 3'-конца мРНК протромбина. Этот механизм позволяет контролировать количество вырабатываемого белка и играет важную роль в патофизиологических процессах [60].

Решающая роль тромбина при ангиогенезе [63], гиперэкспрессия в ответ на ишемию [50] или в опухолевом микроокружении [60] предполагает, что регуляция экспрессии этой сериновой протеазы может находиться под контролем факторов гипоксии HIF.

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ ТРОМБИНА

Тромбин рассматривается как мощный провоспалительный фактор, многие его эффекты схожи с эффектами провоспалительных цитокинов. Однако действие тромбина на клетки реализуется с помощью принципиально отличных механизмов, которые, главным образом, связаны с его ферментативной активностью. Тромбин может оказывать прямое действие на клетки посредством необратимого сайт-специфического протеолитического расщепления N-концевого внеклеточного участка рецепторов, известных как протеаза-активируемые рецепторы (PARs) [64, 65]. PARs принадлежат к уникальному семейству рецепторов, связанных с G-белками [66]. Протеолитическое расщепление приводит к изменению конформации PARs, после чего они приобретают способность активировать опосредованные G-белками внутриклеточные сигнальные каскады [63, 67, 68].

G-белки подразделяются на четыре семейства в соответствии со структурой их α -субъединицы — $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q/11$ и $G\alpha_{12/13}$. Субъединица $G\alpha_q$, в свою очередь, существует в четырех вариантах — $G\alpha_q$, $G\alpha_q/11$, $G\alpha_q/14$ и $G\alpha_q/15/16$, каждый из которых контролирует различные внутриклеточные сигнальные пути. Так, $G\alpha_s$ и $G\alpha_i$ регулируют активность аденилатциклазы, в то время как $G\alpha_q$ активирует сигнальный путь фосфолипазы C- β (PLC- β), а $G\alpha_{12/13}$ — белки семейства каскад малых Rho GTPase [69].

Трансдукцию сигналов от PARs опосредуют $G\alpha_q/11$, $G\alpha_i$ или $G\alpha_{12/13}$ субъединицы. На сегодняшний день описаны четыре PARs (PAR1–PAR4), которые экспрессируются на разных типах клеток, включая тромбоциты, эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры сосудов, фибробласты, гепатоциты, Т-лимфоциты и моноциты. PAR1 и PAR3 являются высокоаффинными рецепторами тромбина и могут активироваться при низких (<5 нМ) концентрациях тромбина, тогда как низкоаффинный рецептор тромбина PAR4 активируется при более высоких концентрациях фермента [64]. PAR2 — единственный рецептор, который непосредственно не активируется тромбином, но способен к трансактивации под влиянием PAR1 [64, 70]. Термин “трансактивация” используется для описания феномена, при котором активации одного G-protein-coupled receptor (GPCR), быстро и в отсутствие синтеза белка *de novo* приводит к немедленной цитозольной генерации нисходящего сигнала от другого рецептора на поверхности клетки [71].

Внутриклеточные домены неактивных PARs связаны с $G\alpha$ и $G\beta\gamma$ субъединицами G-белков. При активации рецепторов замена GTP на GDP в составе $G\alpha$ -субъединицы приводит к диссоциации комплекса $G\alpha$ и $G\beta\gamma$ [72]. В зависимости от условий, таких как продолжительность активации, концентрация лиганда, а также наличие корецепторов, происходит активация одного из множества вариантов внутриклеточных $G\alpha$ субъединиц (см. выше), что определяет дальнейший внутриклеточный сигнал и клеточный ответ [73]. Так, $G\alpha_q/11$ преимущественно активирует сигнальные пути PLC–PKC–Ras–Erk и IP3–DAG–PKC, регулирующие активацию, пролиферацию и жизнеспособность клеток. Активация $G\alpha_i$ приводит к ингибированию внутриклеточных путей аденилатциклазы, которые модулируют реакции тромбоцитов, барьерные функции эндотелия [63, 74], а также играют важную роль в регуляции воспаления [64]. Активация $G\alpha_{12/13}$ преимущественно индуцирует MAPK–RhoA GTPase сигнальные каскады, которые регулируют перестройки ци-

тоскелета [75, 76] и связанные с этим проницаемость эндотелия сосудов и миграцию клеток [77, 78]. Активированные PARs быстро интернализуются и подвергаются лизосомальной деградации, что служит механизмом ограничения их функции [9].

В зависимости от условий, тромбин может оказывать разнонаправленное действие на клетки. Он способствует как противо- так и провоспалительным процессам, как усиливает проницаемость, так и повышает барьерные функции эндотелия, может вызывать как расширение, так и сужение сосудов [30, 79, 80].

Одним из факторов, который определяет разнообразие эффектов тромбина является его концентрация [81]. Например, низкие концентрации (20–75 пкМ) усиливают барьерную функцию эндотелия [82, 83], тогда как более высокие концентрации (>100 пкМ) повышают проницаемость эндотелиального барьера [25]. Разные концентрации тромбина посредством активации одного и того же рецептора – PAR1 могут как повышать жизнеспособность клеток, так и индуцировать их гибель [25]. Предполагают, что проапоптотические и антиапоптотические эффекты тромбина регулируют одни и те же внутриклеточные сигнальные пути (RhoA GTPase и PKC) [78, 84]. Частично это объясняется различной скоростью передачи внутриклеточного сигнала в ответ на высокие и низкие концентрации агониста. При относительно высоких концентрациях тромбина (>500 нМ), которые приводят к апоптозу, активность RhoA в клетке возрастает в течение нескольких минут. При низких уровнях тромбина (1–100 мкМ) происходит небольшое, постепенное увеличение активности RhoA, что оказывает протективное действие на клетки [25, 78]. Кроме того, высокие концентрации тромбина действуют на клетки через другой, низкоаффинный рецептор – PAR4 [24].

Другим возможным объяснением разнонаправленных эффектов тромбина может быть способность PARs образовывать гомо-, гетеродимеры и олигомеры между собой и другими рецепторами [85]. Состав димера влияет на структуру внутриклеточного сигнального каскада [86]. Описаны гомодимеры PAR1–PAR1, PAR2–PAR2 и PAR4–PAR4, а также гетеродимеры PAR1–PAR2, PAR1–PAR3 и PAR1–PAR4 [87]. Считается, что PAR1–PAR3 регулируют клеточные процессы в физиологических условиях [86]. PAR1 образует гетеродимеры с PAR3 так же легко, как и гомодимеры [86]. Если передача сигналов от PAR1 индуцирует активацию $G\alpha_q$ и $G\alpha_{12/13}$ субъединиц, гетеродимер PAR1–PAR3 активирует только $G\alpha_{12/13}$ [64, 88]. Под действием высоких концентраций тромбина (>10 нМ), которые в основном регистрируются при патофизиологических состояниях (на ранней стадии сепсиса, повреждении эндотелия, опухолевом росте), активируется рецептор PAR4, а также его гетеродимеры с PAR1 [86, 89]. Гетеродимер PAR1–PAR4 обеспечивает сигнальный путь активации клеток, отличный от PAR1 и PAR1–PAR3 [86]. Хотя специфическое картирование субъединицы Ga гетеродимера PAR1–PAR4 еще не проводили, известно, что этот комплекс может играть роль при воспалении, диабетической васкулопатии и раке [90–92].

PAR2 – единственный рецептор из четырех других PARs, который не может быть непосредственно активирован тромбином. Однако PAR2 может быть трансактивирован под действием PAR1 [93]. Трансактивация PAR2 вовлечена в развитие системного воспаления и гиперактивации системы свертывания крови, как это происходит при сепсисе [94]. Гетеродимер PAR1–PAR2 играет ключевую роль на поздней стадии сепсиса, в гиперпластических реакциях на повреждение артерий и в цитопротекторных процессах [86, 94]. Гетеродимер PAR1–PAR2 регулирует субъединицу $G\alpha_i$, Ras1 сигнальный путь и отвечает за усиление барьерных функций эндотелия [82, 94]. Опосредованная PAR1 трансактивация PAR2 приводит к ингибированию системы комплемента [95]. Альтернативным вариантам внутриклеточной передачи сигнала от тромбина способствуют разные механизмы интернализации гомо- и гетеродимеров PARs [86, 96–99].

Считается, что даже незначительное количество тромбина (в диапазоне от 0.51 до 2 нМ), которое образуется во время фазы инициации свертывания крови, достаточно для быстрой активации PAR1 и PAR4, а также факторов коагуляции FVIII и FV. В дальнейшем вырабатывается дополнительное количество фермента, способствующее образованию фибрина. Большая часть тромбина (>95%), образующегося после формирования тромба, нейтрализуется высокоаффинным связыванием с рецептором тромбомодулина на поверхности неповрежденной стенки сосуда и эффективно ограничивает дальнейшее распространение тромба [100]. Предполагают, что низкие концентрации тромбина необходимы и достаточны для активации коагуляции, а высокие концентрации тромбина стимулируют клетки иммунной системы и воспалительные реакции [101].

В зависимости от концентрации регуляцию эффектов тромбина, кроме PARs, вовлекаются также другие рецепторы. Низкие концентрации тромбина связываются тромбомодулином, что индуцирует формирование комплекса aPC–Endothelial cell protein C receptor (EPCR). aPC–EPCR, взаимодействуя с PAR1, инициирует Gαi/Rac1-опосредованные цитопротекторные реакции на эндотелии [24, 83, 102, 103]. При повышении концентрации свободный тромбин вытесняет комплекс APC–EPCR с рецептора PAR1 и запускает сигнальные каскады Gαq, Gα12/13 и RhoA, усиливающие проницаемость эндотелия, апоптоз и прочие, связанные с воспалением, изменения [83, 102, 104]. Таким образом, повышение концентрации тромбина отменяет цитопротекторное действие APC–EPCR в отношении эндотелия сосудов и вызывает разрушение эндотелиального барьера [24].

Было установлено также, что дивергентное взаимодействие PAR1 с рецепторами сфингозин-1-фосфата – S1PR также влияет на результат активации клеток [10, 72]. Внутриклеточный сигнал от PAR1 при его активации тромбином запускает продукцию S1P, который, в свою очередь, может подавлять разрушительные эффекты тромбина в отношении эндотелиального барьера. Значительную роль в регуляции этих взаимодействий играет соотношение концентраций тромбина и S1P, которые динамически изменяются при активации гемостаза и воспаления [105].

Помимо концентрации, время воздействия тромбина тоже может влиять на вариабельность клеточного ответа. Так, воздействие высоких концентраций тромбина в течение 16 ч приводит к необратимой гибели клеток [84], а кратковременное воздействие низких концентраций тромбина, напротив, защищает клетки от гибели. Эти данные показывают, что в случаях быстрой и интенсивной повышении концентрации тромбина (например, при травме или инсульте), может существовать временной диапазон, по истечении которого защитные реакции гемостаза переключаются на запуск воспаления, апоптоза и нарушение эндотелиального барьера [9].

Недавно было показано, что первоначально идентифицированные как эндосомальные посредники b-аррестины работают как каркасные белки во время активации рецепторов, связанных с G-белками [106, 107]. На сегодняшний день известно, что b-аррестины 1 и 2 участвуют в активации PARs. В зависимости от концентрации тромбина, b-аррестины способны работать в синергии или в антагонизме с G-белками, активируя или ингибируя нижестоящие сигнальные каскады PI3K и RhoA [108–110].

Предполагают, что активация PARs тромбином может приводить к 2224 различным вариантам фосфорилирования сигнальных мишеней в клетке [73]. Такая сложная регуляция клеточной активности, вероятно, придает этой системе значительную гибкость и многовариантность, но осложняет ее исследование и делает трудновыполнимой задачу терапевтической коррекции процессов гемостаза и воспаления.

Было установлено, что часть эффектов тромбина не связана с его ферментативной активностью. Так, блокада активного центра тромбина диизопропилфторфосфатом не влияла на его хемотаксическую активность в отношении лейкоцитов. Ферментативно-неактивный тромбин стимулировал пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, аналогично нативному тромбину [111]. Также сообщалось, что ферментативно-неактивный тромбин индуцирует секрецию ростового фактора GM-CSF в гладкомышечных клетках и обладает не прямой митогенной активностью. А термически денатурированный тромбин индуцирует продукцию провоспалительных факторов макрофагами [111]. Эти эффекты предполагают наличие других, пока еще не определенных рецепторов тромбина, не зависящих от ферментативной активности протеазы [112].

Действие тромбина на клетки может быть связано с его способностью активировать белки системы комплемента. Различные типы клеток, лейкоциты, тромбоциты и эндотелиальные клетки имеют рецепторы к C3a и C5a компонентам комплемента [6, 40]. Продукты расщепления фибриногена, которые генерируются при образовании тромбина, способны активировать клетки врожденного иммунитета через TLR4 [31], и это может служить дополнительным механизмом запуска и амплификации воспаления под действием тромбина.

Учитывая широкую представленность рецепторов тромбина на клетках, неудивительно, что они участвуют в самых разных физиологических (ангиогенез [12, 113, 114], заживление ран [115–117] и воспаление [118–122]), а также патофизиологических (атеросклероз [123, 124], сепсис [125], рак [126–128] и невропатология [33, 129]) процессах.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТРОМБИНА

Гуморальные факторы врожденного иммунитета

Тромбин является одной из наиболее хорошо охарактеризованных сериновых протеаз. Его классические субстраты, связанные с коагуляцией, включают факторы свертывания V, VIII, XI, XIII, фибриноген и протеин C [130]. Этот список продолжает неуклонно расширяться. Почти все сериновые протеазы в системе свертывания крови регулируют систему комплемента и наоборот, протеолитические компоненты комплемента действуют на систему свертывания крови [40, 131]. Тромбин тоже является частью этой сложной сети “коагуло-комплемента”. Активный тромбин, особенно в высоких концентрациях, непосредственно осуществляет протеолиз C3 и C5 компонентов комплемента [6, 40] (рис. 2). Эти реакции рассматривают как 4-й путь активации каскада комплемента [6].

Одной из интересных находок стало открытие ферментативной роли тромбина в продукции IL-1 α . Ключевой провоспалительный цитокин IL-1 α участвует в запуске и прогрессировании целого ряда тяжелых заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания, воспалительные заболевания кишечника, нейровоспаление, атеросклероз и рак. IL-1 α часто обозначается как “алармин” – сигнал тревоги для иммунной системы [132]. IL-1 α конститутивно экспрессируется в проформе (про-IL-1 α) многими клетками гемопоэтического и негемопоэтического ряда, но при накоплении молекул, которые высвобождаются из своих собственных разрушенных клеток (DAMPs), эволюционно консервативных структур патогенов (PAMPs), под влиянием окислительного стресса, ишемии–реперфузии, радиации и других факторов, связанных с повреждением клеток, происходит активация внутриклеточных каспаз, которые переводят про-IL-1 α в его активную форму. Было установлено, что тромбин тоже расщепляет про-IL-1 α до активной формы цитокина. Важная роль тромбина в регуляции продукции активного IL-1 α была подтверждена в

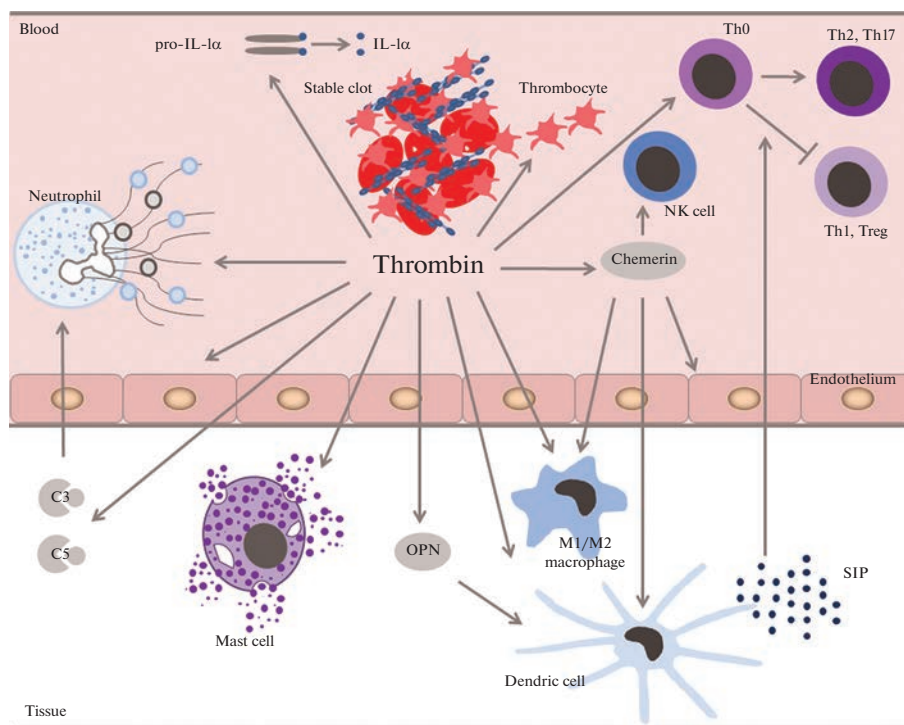


Рис. 2. Механизмы регуляции иммунных реакций под влиянием тромбина.

Активный тромбин осуществляет протеолиз C3 и C5 компонентов комплемента с последующим высвобождением анафилотоксинов C3a, C5a, которые привлекают и активируют нейтрофилы. Тромбин осуществляет протеолиз про-IL-1 α до активной формы провоспалительного цитокина IL-1 α . Тромбин обладает протеолитическим действием в отношении химерина, который обеспечивает мобилизацию макрофагов, дендритных клеток и натуральных киллеров в места повреждения и активнует эндотелий сосудов. Тромбин вызывает активацию тромбоцитов, высвобождение медиаторов воспаления, индуцирует экспрессию на этих клетках TLR4,9. Тромбин напрямую активирует эндотелиальные клетки, повышает экспрессию адгезионных молекул и продукцию хемокинов и провоспалительных цитокинов, модулирует барьерную функцию эндотелия. Тромбин является хемоаттрактантом для нейтрофилов, изменяет состав нейтрофильных внеклеточных ловушек, снижает содержание гистонов, нейтрофильной эластазы, дефензинов и азурицидина. Тромбин модулирует поляризацию макрофагов и продукцию этими клетками медиаторов воспаления. Тромбин вызывает дегрануляцию тучных клеток и усиливает продукцию медиаторов воспаления. Тромбин стимулирует адаптивные реакции иммунитета, созревание дендритных клеток, повышает экспрессию молекул MHCII, коstimуляторных молекул, продукцию медиаторов воспаления и хемоаттрактантов (CCL18, MCP-1, SIP), привлекающих незрелые дендритные клетки и лимфоциты в участок повреждения. Тромбин осуществляет протеолитическое расщепление остеопоитина (OPN), что усиливает хемокин-индуцированную миграцию DC. Тромбин способствует поляризации “наивных” Т клеток (Th0) в Th17, Th2 и подавляет поляризацию Th1 и Treg.

исследованиях *in vivo* с использованием трансгенных мышей (ТМ IL-1 α) с мутацией тромбина, которая ослабляла опосредованное тромбином расщепление про-IL-1 α . У мышей-мутантов (ТМ IL-1 α) наблюдалась заметно сниженная локальная генерация зрелого IL-1 α , замедленное заживление кожных ран, снижение миграции нейтрофилов и моноцитов по сравнению с соответствующими параметрами у мышей дикого типа. Авторы также подтвердили, что p18 – расщепленный тромбином фрагмент IL-1 α , концентрация которого повышается у септических мышей дикого

типа и у людей с сепсисом, не удалось обнаружить в циркуляции септических ТМ IL-1 α мышей [130]. Следует подчеркнуть, что IL-1 α стимулирует свертывание крови, и эти двунаправленные взаимодействия IL-1 α с тромбином взаимно поддерживаются и взаимно усиливаются [133].

Сериновые протеазы участвуют в регуляции вездесущего хемоаттрактанта плазмы, химерина. Химерин – это небольшой (18 кДа) белок, который регулирует многочисленные биологические процессы, такие как адипогенез, гомеостаз глюкозы, опухолеобразование, воспаление, ангиогенез, миогенез и миграцию иммунных клеток [134, 135]. Химерин вырабатывается печенью и выделяется в кровоток в качестве предшественника. Он также экспрессируется в некоторых тканях, где может быть активирован локально. Сериновые протеазы (фактор XIIa и плазмин коагуляционного и фибринолитического каскадов, эластазы и катепсин G), высвобождаемые из активированных гранул нейтрофилов, а также триптаза тучных клеток, являются мощными активаторами химерина. Тромбин способен расщеплять прохимерин с образованием активных форм химерина [136]. Как правило, у людей циркулирующая форма химерина не является биологически активной. В ходе протеолиза белка-предшественника из 163 аминокислот с С-концевым доменом, чувствительным к протеолизу, могут образовываться изоформы с более короткой аминокислотной последовательностью – химерины 125, 152, 154, 155, 156, 157 и 158 [137, 138]. В результате расщепления лабильного карбоксильного конца в любом из нескольких различных участков каскадами сериновых протеаз, белок приобретает хемотаксическую активность и запускает быстрые защитные реакции в стерильных участках повреждения тканей, а также местах инфекционного и аллергического воспаления [139]. Было установлено, что тромбин в диапазоне концентраций 0–100 нМ обладал дозозависимым протеолитическим действием в отношении 15-мерного фрагмента химерина (YFPGQFAFSKALPR). При более длительном времени инкубации обнаруживался 10-мерный фрагмент (YFPGQFAFSK). Если 15-мерный фрагмент был практически инертен в анализе хемотаксиса, то расщепленные тромбином 14-мерный и 10-мерный фрагменты вызывали миграцию клеток с трансфицированным рецептором химерина – CMKLR1. Полноразмерный прохимерин также активировался тромбином в концентрации 100 нМ [136]. Хемоаттракция – важная роль химерина, которая обеспечивает мобилизацию макрофагов, дендритных клеток и натуральных киллеров в места повреждения [140–142]. Под воздействием химерина на эндотелиальных клетках повышается экспрессия медиаторов воспаления (IL-6, TNF α и С-реактивного белка), что приводит к повышению адгезивности эндотелия для лейкоцитов [143–147]. Химерин также вызывает избыточную продукцию АФК [144], подавляет вызванную оксидом азота релаксацию сосудов и образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [148, 149]. Все это может способствовать опосредованной химерином эндотелиальной дисфункции [148, 150].

Используя подход “бактериофаговых индикаторов” (“phage display approach”), Gallwitz и соавт. в протеоме человека было идентифицировано еще 73 потенциальных субстрата тромбина, большинство из которых регулируют клеточную адгезию, развитие/дифференцировку, работу нервной и кровеносной системы [151].

КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Тромбоциты

Учитывая малый размер и безъядерный статус тромбоцитов, представления об их активности долгое время были связаны исключительно с кратковременным участием в гемостазе и заживлении ран [152, 153]. Однако дальнейшие исследования показали, что тромбоциты являются важными эффекторами врожденного и адап-

тивного иммунитета благодаря реакциям, которые индуцируются и развиваются в течение нескольких часов после гемостатических реакций [154]. Тромбоциты активируются после взаимодействия с белками внеклеточного матрикса, которые обнажаются при повреждении сосудов или воспалении [155]. Адгезия к эндотелию способствует высвобождению тромбоцитами преформированных медиаторов, факторов свертывания, ростовых факторов, цитокинов — из α -гранул или серотонина и нуклеотидов — из плотных гранул, а также запускает синтез эйкозаноидов, в частности, ТхА₂. Эти медиаторы аутокринно усиливают активацию тромбоцитов и реакции гемостаза [156, 157], а также их адгезию посредством интегринов и селективных [158, 159].

Тромбин является наиболее эффективным агонистом активации тромбоцитов и многие, регулирующие воспаления эффекты тромбина опосредованы активацией этих клеток. Тромбин вызывает PAR1/PLC-зависимую дегрануляцию тромбоцитов, в результате чего происходит высвобождение из этих клеток упоминавшихся выше биологически активных субстанций. Кроме того, под действием тромбина на поверхности тромбоцитов происходит повышение экспрессии рецептора фибриногена GPIIb-IIIa, P-селектина и костимуляторной молекулы CD40L. Первые два усиливают агрегацию тромбоцитов [160] и опосредуют адгезивность лейкоцитов к эндотелию [161]. CD40L индуцирует секрецию эндотелиальными клетками хемокинов и экспрессию адгезионных молекул, усиливая сигналы для рекрутирования и экстравазации лейкоцитов [162]. В цитоплазме тромбоцитов содержатся молекулы РНК и сохраняются зависимые от активации посттранскрипционные механизмы, обеспечивающие синтез иммунорегуляторных белков (IL-1 β) и антимикробных пептидов (b-дефензины) [163–165]. Тромбоциты обнаруживаются вне сосудов в тканях и могут запускать местные иммунные реакции [166–168] в синовиальной оболочке при ревматоидном артрите [169, 170], в легких при гриппе [167] и в тканях солидных опухолей при раке [171].

Тромбоциты экспрессируют рецепторы распознавания образов патогенности (PRRs), поэтому способны активироваться под влиянием DAMPs, а также PAMPs, инициируя воспалительные и иммунные реакции [172–174]. Toll-подобные рецепторы (TLRs) играют решающую роль в активации иммунной системы. В 2004 г. впервые было показано, что мышинные и человеческие тромбоциты экспрессируют функциональные TLR [175]. В настоящее время установлено, что кроме TLR, тромбоциты экспрессируют NOD-подобные рецепторы (NLR) и лектиноподобные рецепторы C-типа (CLR) [172–174, 176]. Среди TLR, которые экспрессируют тромбоциты (TLR1, 2, 4 и 6 на поверхности, и TLR3, 7 и 9 в эндосомах) [173, 177–179] лучше всего охарактеризован TLR4 [180–185]. TLR4 содержатся преформированными в составе α -гранул. При активации тромбином, в результате дегрануляции, TLR4 выносятся на поверхность клеточной мембраны тромбоцитов [175]. Под действием агонистов TLR4 в тромбоцитах происходит активация MyD88 или TRIF-зависимых сигнальных путей и транскрипционного ядерного фактора κ B (NF- κ B) [182, 183], который выполняет не связанные с транскрипционной активностью функции [186–189].

В отличие от других ядросодержащих клеток, которые экспрессируют TLR9 исключительно внутри эндосом, тромбоциты при активации могут транслоцировать TLR9 на поверхность [190]. Тромбин так же, как и другие классические агонисты активации тромбоцитов может индуцировать поверхностную транслокацию этого рецептора [191]. Стимуляция тромбоцитов через TLR9 запускает их дегрануляцию [192], активацию и агрегацию [193].

Эндотелиальные клетки

Тромбин индуцирует широкий спектр воспалительных реакций эндотелия сосудов, усиливает его проницаемость, адгезивность и способствует рекрутированию лейкоцитов в очаг воспаления [122]. В частности, под влиянием этого фактора индуцируется выработка фактора активации тромбоцитов (platelet-activating factor), эндотелина, фактора фон Виллебранда, активатора плазминогена и его ингибитора. В ответ на тромбин культивируемые эндотелиальные клетки секретируют повышенные уровни PDGF, который является мощным митогеном и хемоаттрактантом для гладкомышечных клеток сосудов [194, 195]. Тромбин усиливает выработку эндотелиальными клетками цитокинов острой фазы воспаления – IL-6 [196] и MIF [23], а также продукцию IL-8, который является хемоаттрактантом нейтрофилов и моноцитов [22]. Экспрессия молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1, E- и P-селектина) и связанная с этим миграция лейкоцитов в ткани также усиливаются на под влиянием тромбина [197]. В исследованиях *in vitro* было установлено, что индуцированная тромбином повышенная экспрессия фракталкина (CX3CL1) и продукция MCP-1 эндотелиальными клетками, способствуют привлечению моноцитов в участки воспаления [197].

Провоспалительное действие тромбина в отношении эндотелия было подтверждено на мышинной модели перитонита. Введение ингибитора тромбина, гирудина, подавляло стимулированную адгезию макрофагов к эндотелию [198] и, напротив, введение очищенного тромбина стимулировало адгезию макрофагов и повышенную экспрессию IL-6 и MCP-1 [198]. Роль тромбина в регуляции сосудистого эндотелия также была продемонстрирована на модели ксенотрансплантации сердца мыши крысе. В этих экспериментах рекрутирование моноцитов и NK-клеток в трансплантат было вызвано опосредованной тромбином активацией PAR1 и локальной генерацией MCP-1 эндотелиальными клетками [199].

Тромбин играет важную роль в регуляции проницаемости эндотелия сосудов как в физиологических, так и в патологических условиях. Тромбин-зависимые клеточные реакции вызывают нарушения барьерной функции эндотелия при острых (травма или сепсис) или хронических (например, атеросклероз) состояниях. Эти процессы преимущественно опосредуют PAR1, PAR4 [82] и сигнальные пути $G\alpha_{12/13}/RhoA/MLC$ [122]. PAR1, рецептор тромбина, также индуцирует разрушение эндотелиального барьера посредством митоген-активируемого протеинкиназозависимого пути p38, который не интегрирован в путь $RhoA/MLC$. Сигнальные пути PAR1-p38, которые способствуют эндотелиальной дисфункции, остаются плохо изученными. С использованием мультиплексной количественной масс-спектрометрии в культивируемых эндотелиальных клетках человека были идентифицированы 5491 уникальных фосфопептидов, 2317 фосфопротеинов и четыре различных динамических фосфопротеомных профиля которые, как предполагается, регулируют p38-зависимую передачу сигналов тромбина. Ингибирование активности p38 и направленное siRNA-истощение изоформы p38-альфа приводило к усилению PAR1-зависимого фосфорилирования Erk1/2. Роль p38 в фосфорилировании α -катенина, компонента адгезивных соединений, рассматривается как важный механизм тромбин-индуцированной эндотелиальной дисфункции [122].

На поздней стадии сепсиса, характеризующейся системным воспалением, повышенной активацией системы коагуляции и продукцией высоких концентраций тромбина, длительная активация PAR1 вызывает трансактивацию PAR2 и включает внутриклеточный сигнал на $G\alpha_i/Rac1$, что приводит к усилению барьерной функции эндотелия [6].

Другой механизм регуляции проницаемости эндотелия связан с продукцией гепатоцитами природного ингибитора тромбина – тромбомодулина. В физиологических условиях комплекс тромбин-тромбомодулин осуществляет протеолиз и акти-

вацию протеина С. Активированный протеин С связывается со своим рецептором (EPCR) и PAR-1. Этот комплекс активирует S1PR1, поддерживающий барьерные функции эндотелия через внутриклеточные сигнальные пути G α i, аденилатциклазы, АКТ и Rac1. Активация классического рецептора тромбина PAR1 также регулирует целостность эндотелиального барьера через aPC и его рецептор EPCR, индуцируя экспрессию сфингозинкиназы 1 (SphK1) тромбоцитов и эндотелиальных клеток. Вызванное этими эффектами увеличение выработки S1P, в свою очередь, активирует S1PR1/Rac1 сигнальный путь, что повышает барьерные функции, ограничивая индуцированное тромбином повреждение эндотелия [105, 200]. При активации системы гемостаза избыточный свободный тромбин напрямую связывается с PAR1, что способствует его ассоциации с S1PR3. Внутриклеточный сигнал S1PR3 связан с Gq/11/PLC- и G12/13/RhoA-каскадами, которые нарушают барьерную функцию эндотелия и усиливают его проницаемость [26].

Таким образом, активируемый тромбином PAR1, с одной стороны, нарушает целостность эндотелиального барьера посредством сигнального пути Rho, с другой стороны, тромбин индуцирует экспрессию SphK1, увеличивает выработку S1P, что, в свою очередь, трансативирует S1PR1, приводя к активации защитного сигнального пути Rac1 [201].

Было показано, что СВМ сигналосома — сигнальный белковый комплекс, состоящий из каркасного белка CARMA3, линкерного белка (Bcl10) и эффекторного белка (MALT1), является неотъемлемой частью тромбин-зависимого NF- κ B внутриклеточного сигнального каскада в эндотелиальных клетках. Недавно СВМ сигналосома была идентифицирована как связующее звено между РКС и комплексом IKK [202]. Нарушение СВМ ингибирует способность тромбина индуцировать экспрессию молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также снижает тромбинзависимую адгезию из моноцитов к эндотелию [26].

Разнообразные реакции, запускаемые тромбином на эндотелии, могут поддерживать воспалительные процессы при атеросклерозе, массивном тромбозе, васкулитах [65, 93, 197, 203], аутоиммунных [32] и аллергических заболеваниях [31, 204].

Нейтрофилы

Нейтрофилы являются самой многочисленной популяцией лейкоцитов крови. Во время инфекции нейтрофилы первыми мигрируют в очаг воспаления и участвуют в элиминации патогена [205]. Благодаря разнообразному набору защитных механизмов [205] нейтрофилы, помимо непосредственного уничтожения микробов, влияют на образование тромбов [37]. При активации нейтрофилов образование внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET) способствует агрегации тромбоцитов [205, 206]. Считается, что нейтрофилы не экспрессируют TF и не могут самостоятельно запускать внутренний путь коагуляции [206]. В то же время продукция NET рассматривается как ключевой фактор, который обеспечивает адгезию, активацию тромбоцитов и таким образом способствует тромбовоспалению. Ведущая роль NET в тромбовоспалении при сепсисе, тромбозе глубоких вен и злокачественных новообразованиях была доказана с использованием как *in vitro*, так и *ex vivo* моделей [37, 207, 208]. Присутствие NET в тромбах было описано в экспериментах на мышинной модели тромбоза глубоких вен [207].

Крайне слабо исследованы рецепторы тромбина на нейтрофилах. В работе Kahn и соавт. было установлено, что по сравнению с тромбоцитами и мононуклеарными лейкоцитами, нейтрофилы имеют высокий уровень экспрессии mRNA PAR2, сопоставимый уровень mRNA PAR3 и значительно более низкий уровень mRNA PAR1 и PAR4 [209]. В другом, более позднем исследовании было показано, что интактные нейтрофилы конститутивно экспрессируют mPDK PAR-2 и PAR-3, но не

PAR-1 или PAR-4. Стимуляция клеток опсонизированными бактериями специфически повышает экспрессию белка PAR-2, что не зависит от транскрипции или синтеза белка *de novo*. Первичные гранулы нейтрофилов являются источником преформированных PAR-2, который может быть быстро мобилизован на поверхность клетки при дегрануляции [210]. Принимая во внимание, что PAR 2 не является самостоятельным рецептором тромбина, а только способен к трансактивации другими PARs, вопрос, может ли, и если может, то как, тромбин регулировать активность нейтрофилов, остается нерешенным.

Несмотря на тесную связь между активацией нейтрофилов и системой гемостаза, исследований, доказывающих их взаимодействия с тромбином, поразительно мало. Ранние работы показывают, что α -тромбин оказывает хемотаксическое действие на нейтрофилы, сравнимое по величине с эффектом бактериального хемотаксического пептида formyl-Met-Leu-Phe. Действие протеазы не зависит от ее ферментативной активности и не связано с рецепторами PARs [211].

В одном из исследований было показано, что тромбин изменяет состав NET. Исследования протеома NET после обработки тромбином показало сниженные уровни гистонов, которые, как было установлено ранее, обладают антимикробными свойствами [212] и способствуют антимикробной активности NET [213]. Связанные с NET или свободные гистоны являются цитотоксичными. Помимо этого, ДНК и/или гистоны стимулируют выработку тромбина и вызывают тромбоз *in vivo* как независимым от тромбоцитов, так и зависимым от них образом [214–216]. Кроме того, гистоны могут стабилизировать тромбы, повышая устойчивость фибрина к фибринолизу [217]. Обработка тромбином также модулировала уровни других антимикробных белков, связанных с NET, таких как дефензины и азуроцидин [218]. Уровень NET-ассоциированной нейтрофильной эластазы также снижался в присутствии тромбина. Авторы предполагают, что экзогенные протеазы, такие как тромбин, могут модулировать интегральные функции NET в различных физиологических контекстах [218].

Макрофаги

Клетки моноцитарно-макрофагального ряда являются основными индукторами внутреннего пути коагуляции за счет того, что при активации повышают уровень экспрессии тканевого фактора. Макрофаги считаются центральными регуляторами защитных реакций иммунитета и последующих процессов репарации. Это пластичные и гетерогенные клетки, которые в ответ на различные стимулы микроокружения могут претерпевать фенотипические изменения. При воздействии цитокинов, таких как интерферон γ (IFN- γ) или микробных агонистов, включая липополисахарид, макрофаги принимают M1-фенотип, для которого характерна продукция медиаторов воспаления – активных форм кислорода, оксида азота, фактора некроза опухоли α (TNF α), IL-1, IL-12. Под влиянием цитокинов 2-го типа воспаления макрофаги продуцируют IL-4, IL-13, IL-10 и TGF β , которые считаются маркерами M2-противовоспалительного фенотипа и способствуют регенерации тканей и продукции коллагена за счет экспрессии аргиназы 1 [219].

Было установлено, что тромбин может направлять поляризацию макрофагов – производных моноцитов костного мозга мышей – в M1-подобный воспалительный фенотип, что подтверждается усилением экспрессии iNOS. Кроме того, тромбин усиливает экспрессию в макрофагах провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF α) и хемокинов (IP-10) [16]. Эти данные подтверждаются исследованиями, проведенными с использованием модели ишемии–реперфузии у мышей, в ходе которых было установлено, что введение цитотоксического ингибитора тромбина PTL060 усиливало инфильтрацию тканей M2-макрофагами [220]. Предполагают также, что тромбин

в концентрации, которая индуцирует воспалительную реакцию (30 Ед/мл), может контролировать функциональное программирование макрофагов, что выражается в сниженной выработке цитокинов при рестимуляции лирополисахарида [16]. Однако эти исследования требуют подтверждения соответствующими экспериментами *in vivo*. При стимуляции тромбином макрофагов и клеток линии THP-1 продукция IL-8 индуцируется Rho/JNK-зависимым образом, при этом NF-κB является ключевым регулятором транскрипции гена IL-8 [194]. Продукцию TNFα макрофагами, стимулированными тромбином, по-видимому, опосредует сигнальный путь PI3K/AKT [16, 194].

В другом исследовании на макрофагах, полученных из моноцитов костного мозга мышей, были найдены противоположные результаты. Основываясь на экспрессии генов и секреции цитокинов, было показано, что поляризация тромбином индуцирует противовоспалительный, M2-подобный фенотип макрофагов (CCL22, CD36, MMP9), профиль экспрессируемых генов которых соответствовал промежуточному состоянию между M2a и M2c и проявлял как сходства, так и различия с классической M2a поляризацией. Действие тромбина усиливало фагоцитоз окисленного липопротеина низкой плотности макрофагами, а кондиционированная среда из тех же клеток увеличивала пролиферацию эндотелиальных клеток. Действие протеазы на клетки было опосредовано секретируемым модульным Ca^{2+} -связывающим белком 1 [16]. В целом результаты исследований влияния тромбина на макрофаги носят противоречивый характер и требуют дальнейшего изучения.

Многие реакции макрофагов на тромбин опосредованы PAR1, но не исключается также участие PAR3, поскольку он может функционировать как кофактор PAR1 [16, 194, 221]. Это значит, что для активации макрофагов необходима ферментативная активность протеазы. Однако тромбин, по-видимому, может модулировать функции макрофагов, независимо от своих ферментативных или прокоагулянтных активностей [16]. Было показано, что денатурированный термической обработкой тромбин был способен индуцировать секрецию медиаторов воспаления в макрофагах в меньшей (TNFα, M-CSF и MCP-1), аналогичной (MIP2) или даже большей (RANTES и CXCL10) степени, чем нативный α-тромбин. Тромбин, обработанный гирудином, индуцировал такие же уровни RANTES и IP-10, как термически обработанный [16]. Авторы не исключают, что в этом случае, провоспалительная активность тромбина в отношении макрофагов могла быть реализована независимо от PARs, через активацию PRRs – рецепторов врожденного иммунитета.

Тучные клетки

Дегрануляция и секреция различных вазоактивных и провоспалительных медиаторов тучными клетками лежат в основе патогенеза аллергических и воспалительных заболеваний [1]. Этот процесс может быть вызван целым рядом факторов, включая антигены (аллергены), анафилатоксины и даже физические раздражители [222]. Некоторые заболевания, такие как воспалительное заболевание кишечника [119, 223] и хроническая спонтанная крапивница [224], в патогенез которых вовлечены тучные клетки, сопровождаются значительной активацией системы коагуляции. Было обнаружено, что тромбин может вызывать быструю, зависимую от кальция, дегрануляцию тучных клеток [17]. Тромбин индуцировал секрецию IL-6, но не TNFα из тучных клеток мыши посредством активации рецептора тромбина и сигнального пути FcεRI [225]. В исследованиях на тучных клетках мыши P815 также было установлено, что воздействие различных концентраций тромбина в течение 16 ч повышало экспрессию PAR1, PAR2, PAR3 и PAR4, а также секрецию этими клетками VEGF, TNFα, IL-6, хемокинов CCL-2, CXCL-1 и CXCL-5. Эти изменения сопровождались повышением уровня фосфо-форм белков IκBa, SAPK/JNK

МАРК, р38 МАРК (Thr180/Tyr182), ERK1/2 МАРК (p44/42) и могли быть заингибированы гирудином [17].

Дендритные клетки

Дендритные клетки служат связующим звеном между реакциями врожденного и адаптивного иммунитета. На основе фенотипа и способности к праймингу “наивных” Т-клеток дендритные клетки обычно подразделяют на незрелые, индуцирующие Т клеточную анергию/толерантность и зрелые, вызывающие Т клеточную активацию и поляризацию реакций адаптивного иммунного ответа. Функциональные изменения от незрелых к зрелым дендритным клеткам происходят под влиянием PAMPs и/или DAMPs в очаге воспаления [205]. Предполагают, что формирующийся при инфекции и/или гемостазе тромбин может выполнять роль адьюванта, индуцирующего дифференцировку зрелых дендритных клеток. Более того, некоторые авторы рассматривают PARs как “неклассические” PRRs, которые также запускают реакции врожденного иммунитета [226–228]. В пользу этого указывает способность PARs активироваться под влиянием протеиназ патогенов или протеиназ, которые генерируются при повреждении тканей [72]. Более того, были задокументированы как прямые (т.е. коиммунопреципитация PAR2–TLR4 [226], так и не прямые (т.е. пересечение сигнальных путей) PAR–TLR взаимодействия в условиях стимуляции клеток липополисахаридом и агонистами TLR *in vitro* и *in vivo* [226–229]. PARs также, по-видимому, способны взаимодействовать с сигнальными путями NLR [230]. Однако эти реакции слабо изучены [231].

Действие тромбина на дендритные клетки опосредовано рецептором PAR1 [232, 233]. Как плазмацитоидные, так и миелоидные дендритные клетки экспрессируют этот рецептор и могут активироваться тромбином для выработки MCP-1, IL-10 и IL-12 [18]. Активация PAR1 тромбином зрелых дендритных клеток также может индуцировать экспрессию CCL18 и, таким образом, привлекать незрелые дендритные клетки и Т-лимфоциты [234] в очаг воспаления. Предполагают, что сразу после повреждения ткани сигнальный путь тромбин/PAR1 способствует активации дендритных клеток для максимальной презентации антигена. В подтверждение этой точки зрения, удаление PAR1 защищает мышей от индуцированного фиброза печени за счет уменьшения инфильтрации тканей Т-клетками [235]. Показано, что под влиянием тромбина дендритные клетки секретируют провоспалительные цитокины MCP-1, IL-10 и IL-12. Кроме того, тромбин повышает на этих клетках уровень экспрессии HLA-DR и CD86 [236], а также их способность эффективно стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов [18].

Тромбин модулирует действие на дендритные клетки других регуляторных молекул. Функции иммунных клеток, их миграция и жизнеспособность в значительной степени зависят от регуляции продукции S1P и передачи сигналов S1P в клетку. Незрелые дендритные клетки преимущественно экспрессируют S1PR1, но при активации и созревании на этих клетках повышается уровень другого рецептора – S1PR3. Было установлено, что стимуляция дендритных клеток тромбином индуцировала выработку S1P, которая через S1PR3 приводила к аутокринному усилению коагуляции и воспаления за счет увеличения выработки TF и IL-1β [237].

Остеопонтин (OPN) – плеiotропный цитокин, продуцируемый как иммунными, так и неиммунными клетками, действующий на различные клеточные мишени, контролирующей их подвижность, адгезию и жизнеспособность [238], недавно был идентифицирован как еще одна мишень тромбина. Выработка OPN усиливается при патологических состояниях, включая аутоиммунные заболевания (например, волчанку, рассеянный склероз и ревматоидный артрит) и опухолевый рост [239, 240]. Протеолитическое расщепление OPN тромбином приводит к измене-

нию конформации и экспозиции нового интегрин-связывающего мотива (Thg-OPN), что существенно влияет на его биологические функции, усиливает хемокин-индуцированную миграцию дендритных клеток [241]. Предполагают, что это может служить механизмом усиления миграции дендритных клеток в очаг воспаления. В подтверждение этому было установлено, что Thg-OPN критически вовлечен в обострение фиброза печени. Уровень Thg-OPN был значительно выше у пациентов с циррозом печени, чем у пациентов с хроническим гепатитом В, а также здоровых лиц контрольной группы и положительно коррелировал со степенью фиброза печени. Эти данные были подтверждены в исследованиях на мышах. Кроме того, было показано, что по сравнению с полноразмерным белком OPN, Thg-OPN демонстрировал большую способность стимулировать активацию, пролиферацию и миграцию звездчатых клеток печени. Эффекты Thg-OPN были опосредованы $\alpha 9$ - и $\alpha 4$ -интегринами, с вовлечением MAPK и NF- κ B сигнальных каскадов [242].

Таким образом, тромбин может модулировать миграционную активность дендритных клеток, выполнять роль адьюванта и запускать развитие адаптивного иммунитета. Эти данные позволяют предполагать, что массивная продукция тромбина может играть важную роль в активации Т-клеток даже в отсутствие инфекции и провоцировать иммунный ответ на аутоантигены или амплифицировать уже развивающийся аутоиммунный процесс.

Лимфоциты

Исследования экспрессии мРНК и белка основных рецепторов тромбина на популяциях лимфоцитов человека показывают, что высокоаффинный рецептор тромбина PAR1, наиболее распространенный представитель семейства PAR, присутствующий на поверхности этих клеток. Натуральные киллеры экспрессируют PAR1, PAR2 и PAR3, CD4+ Т-клетки экспрессируют PAR1 и PAR2, а на $\gamma\delta$ и CD8+ популяциях Т-лимфоцитов экспрессируется только PAR1. При этом на В-клетках экспрессия PARs не была обнаружена [243]. Несмотря на важную роль лимфоцитов в реакциях адаптивного иммунитета и вовлеченность этих клеток в усиление воспалительных реакций, при разных патологических процессах, данные о влиянии тромбина на эти клетки крайне скудны.

Ранние исследования показали, что в физиологических концентрациях (1–10 мкг/мл, 30–300 нМ) тромбин значительно усиливает пролиферацию Т-клеток в ответ на митогены, суперантигены, аллоантигены и стимуляцию анти-CD3 антителами. Усиленная пролиферация была связана с повышенной продукцией IL-2, IL-6 и с увеличением числа IL2R γ (CD25)-позитивных Т-клеток. Сам по себе тромбин не был митогенным и не индуцировал выработку IL-2 или усиление экспрессии CD25. Однако мононуклеарные лейкоциты периферической крови, подвергшиеся воздействию тромбина, продуцировали высокие уровни IL-6. Тромбин также усиливал индуцированную под действием IL-2 пролиферацию мышиных и человеческих клеточных линий [244].

Другие данные о влиянии тромбина на лимфоциты косвенные, получены с использованием экспериментальных животных моделей или исследовании биологического материала человека. Так, было показано, что тромбин играет ключевую роль в стимуляции аллоиммунных реакций Т-клеток при ишемически-реперфузионном повреждении тканей (ИРП) после трансплантации. Ингибирование тромбина в сосудистой сети трансплантата улучшает приживление трансплантата и эффективность Трег-инфузионной терапии, которая в настоящее время активно вводится в клинику. Введение ингибитора тромбина PTL060 снижало повреждение тканей, подавляло экспрессию хемокинов CCL2 и CCL3, но усиливало экспрес-

сию CCL17 и CCL22, а также инфильтрацию тканей Treg. Когда PTL060 сочетали с инфузией дополнительных Treg, эти эффекты еще больше усиливались [220].

В исследованиях на мышах C57Bl/6 с меланомой B16 было показано, что тромбин способствует противоопухолевому ответу в ходе анти-PD1 терапии. Терапия анти-PD1 значительно ограничивала рост опухоли у мышей с нормальным уровнем протромбина. Однако терапия анти-PD1 не смогла уменьшить рост опухоли у мышей со сниженной экспрессией протромбина. Терапия анти-PD1 приводила к значительно большей частоте CD8⁺ инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в опухолях, полученных от мышей с нормальным уровнем протромбина, но не в опухолях мышей с низким уровнем протромбина. Исследования *in vitro* показали, что CD8⁺ Т-клетки мышей дикого типа, стимулированные CD3/CD28 в присутствии тромбина, демонстрировали дозозависимое повышение жизнеспособности и продукции цитокинов. Генетическая делеция либо PAR1, либо PAR4 уменьшала воздействие тромбина. Исследования показали, что PAR4, по-видимому, является рецептором тромбина, опосредующим пролиферацию Т-клеток, а PAR2, напротив, ограничивает пролиферацию Т-клеток и выработку цитокинов. Трансактивация через PAR1 является механизмом, приводящим к активации PAR2 [245].

Был описан еще один механизм регуляции тромбином адаптивных реакций, опосредованный S1P. Было показано, что взаимодействие PAR1 на тромбоцитах с тромбином и последующая активация SphK1 приводит к продукции и накоплению S1P этими клетками в участке тромбоза. Обычно высокие концентрации S1P обнаруживаются в плазме крови, что служит механизмом, обеспечивающим рециркуляцию лимфоцитов из органов иммунной системы в кровь и обратно [246]. Повышение уровня S1P в периферических тканях при воспалении способствует накоплению Т-клеток в тканях [247]. Примечательно, что S1P, по-видимому, поляризует эффекторные Т-клетки в сторону Th2 и Th17, одновременно подавляет поляризацию Th1 [13] и Treg [248]. Предполагают также, что S1PR1 подавляет развитие и функциональную активность Treg посредством активации Akt-mTOR сигнального пути [248].

Таким образом, тромбин может регулировать реакции адаптивного иммунитета, усиливая воспаление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тромбин, центральная протеаза системы коагуляции, играет значительную роль в регуляции и развитии иммунных реакций. Тромбин служит важным провоспалительным фактором, который активирует эндотелий сосудов, стимулирует гуморальные и клеточные факторы врожденного иммунитета. Установлено, что тромбин может служить алармином, способствовать созреванию дендритных клеток и активации реакций адаптивного иммунитета. Нельзя исключать, что тромбин может модулировать стратегию развития иммунного ответа за счет поляризации макрофагов и Th популяций лимфоцитов. Усиленная выработка тромбина может влиять не только на ход инфекционного процесса, но также стимулировать активацию адаптивного звена иммунитета в отсутствие патогена. Это может служить важным механизмом провокации стерильного воспаления, развития и поддержания аутоиммунных реакций. Дальнейшие исследования роли тромбина в регуляции иммунного ответа могут способствовать открытию новых важных связей между иммунной системой и системой коагуляции.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20020, <https://rscf.ru/project/22-25-20020/>, и Региона (грант Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 14 апреля 2022 г. № 46/2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией: Э.А.С. — разработка концепции и написание статьи; Дж.Т.М. — графическое оформление, редактирование статьи; О.Я.П. — редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Petzold T, Massberg S* (2019) Thrombin: A Gas Pedal Driving Innate Immunity. *Immunity* 50: 1024–1026.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.006>
2. *Göbel K, Eichler S, Wiendl H, Chavakis T, Kleinschnitz C, Meuth SG* (2018) The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders-A Systematic Review. *Front Immunol* 9: 1731.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731>
3. *Antoniak S* (2018) The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost* 2: 549–557.
<https://doi.org/10.1002/rth2.12109>
4. *Jenne CN* (2018) Pathogen-induced coagulation: a new angle? *Blood* 132: 771–773.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-859967>
5. *Krurup A, Wallis R, Presanis JS, Gál P, Sim RB* (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One* 2: e623.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000623>
6. *Delvaeye M, Conway EM* (2009) Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood* 114: 2367–2374.
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-199208>
7. *Hajela K, Kojima M, Ambrus G, Wong KHN, Moffatt BE, Ferluga J, Hajela S, Gál P, Sim RB* (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology* 205: 467–475.
<https://doi.org/10.1078/0171-2985-00147>
8. *Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ* (1986) Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood* 68: 875–880.
9. *Posma JJN, Posthuma JJ, Spronk HHM* (2016) Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J Thromb Haemost* 14: 1908–1916.
<https://doi.org/10.1111/jth.13441>
10. *Qu Z, Chaikof EL* (2010) Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Current Opinion Immunol* 22: 634–642.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.017>
11. *Bogatcheva NV, Garcia JGN, Verin AD* (2002) Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)* 67: 75–84.
<https://doi.org/10.1023/a:1013904231324>
12. *Catar R, Moll G, Hosp I, Simon M, Luecht C, Zhao H, Wu D, Chen L, Kamhieh-Milz J, Korybalska K, Zickler D, Witowski J* (2021) Transcriptional Regulation of Thrombin-Induced Endothelial VEGF Induction and Proangiogenic Response. *Cells* 10: 910.
<https://doi.org/10.3390/cells10040910>
13. *Machida T, Takata F, Matsumoto J, Miyamura T, Hirata R, Kimura I, Kataoka Y, Dohgu S, Yamauchi A* (2017) Contribution of thrombin-reactive brain pericytes to blood-brain barrier dysfunction in an in vivo mouse model of obesity-associated diabetes and an in vitro rat model. *PLoS One* 12: e0177447.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177447>
14. *Yuliani FS, Chen J-Y, Cheng W-H, Wen H-C, Chen B-C, Lin C-H* (2022) Thrombin induces IL-8/CXCL8 expression by DCLK1-dependent RhoA and YAP activation in human lung ep-

- ithelial cells. *J Biomed Sci* 29: 95.
<https://doi.org/10.1186/s12929-022-00877-0>
15. *Strande JL, Phillips SA* (2009) Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells *in vitro*. *J Inflamm (Lond)* 6: 4.
<https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-4>
 16. *Ukan Ü, Delgado Lagos F, Kempf S, Günther S, Siragusa M, Fisslthaler B, Fleming I* (2022) Effect of Thrombin on the Metabolism and Function of Murine Macrophages. *Cells* 11: 1718.
<https://doi.org/10.3390/cells11101718>
 17. *Fang X, Liao R, Yu Y, Li J, Guo Z, Zhu T* (2019) Thrombin Induces Secretion of Multiple Cytokines and Expression of Protease-Activated Receptors in Mouse Mast Cell Line. *Mediators Inflamm* 2019: e4952131.
<https://doi.org/10.1155/2019/4952131>
 18. *Yanagita M, Kobayashi R, Kashiwagi Y, Shimabukuro Y, Murakami S* (2007) Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 318–324.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.002>
 19. *Kaplan ZS, Zarpellon A, Alwis I, Yuan Y, McFadyen J, Ghasemzadeh M, Schoenwaelder SM, Ruggeri ZM, Jackson SP* (2015) Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIb and PAR4. *Nat Commun* 6: 7835.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8835>
 20. *Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L* (2022) Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cell Mol Life Sci* 79: 190.
<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04222-4>
 21. *Krisinger MJ, Goebeler V, Lu Z, Meixner SC, Myles T, Prydzial ELG, Conway EM* (2012) Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood* 120: 1717–1725.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-412080>
 22. *Marin V, Farnarier C, Grès S, Kaplanski S, Su MS, Dinarello CA, Kaplanski G* (2001) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood* 98: 667–673.
<https://doi.org/10.1182/blood.v98.3.667>
 23. *Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schöber A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C* (2007) MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13: 587–596.
<https://doi.org/10.1038/nm1567>
 24. *Bae J-S, Yang L, Manithody C, Rezaie AR* (2007) The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* 110: 3909–3916.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096651>
 25. *Bae J-S, Kim Y-U, Park M-K, Rezaie AR* (2009) Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase. *J Cell Physiol* 219: 744–751.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21718>
 26. *Ma L, Dorling A* (2012) The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* 34 :63–72.
<https://doi.org/10.1007/s00281-011-0281-9>
 27. *Grammas P, Samany PG, Thirumangalakudi L* (2006) Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: implications for disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis* 9: 51–58.
<https://doi.org/10.3233/jad-2006-9105>
 28. *Yin X, Wright J, Wall T, Grammas P* (2010) Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 176: 1600–1606.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090406>
 29. *Murakami H, Okazaki M, Amagasa H, Oguchi K* (2003) Increase in hepatic mRNA expression of coagulant factors in type 2 diabetic model mice. *Thromb Res* 111: 81–87.
[https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00404-3](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00404-3)
 30. *Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE* (2013) Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med (Berl)* 91: 1257–1271.
<https://doi.org/10.1007/s00109-013-1074-5>
 31. *Kim D-Y, Cho SH, Takabayashi T, Schleimer RP* (2015) Chronic Rhinosinusitis and the Coagulation System. *Allergy, Asthma & Immunol Res* 7: 421–430.
<https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.5.421>
 32. *Cugno M, Tedeschi A, Borghi A, Bucciarelli P, Asero R, Venegoni L, Griffini S, Grovetti E, Berti E, Marzано AV* (2015) Activation of Blood Coagulation in Two Prototypic Autoimmune Skin Diseases

- es: A Possible Link with Thrombotic Risk. *PLoS One* 10: e0129456.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129456>
33. Iannucci J, Grammas P (2023) Thrombin, a Key Driver of Pathological Inflammation in the Brain. *Cells* 12: 1222.
<https://doi.org/10.3390/cells12091222>
 34. Iliadi V, Konstantinidou I, Aftzoglou K, Iliadis S, Konstantinidis TG, Tsigalou C (2021) The Emerging Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Thrombosis in COVID-19. *Int J Mol Sci* 22: 5368.
<https://doi.org/10.3390/ijms22105368>
 35. Лобастов КВ, Счастливцев ИВ, Порембская ОЯ, Дженина ОВ, Барганджия АБ, Цаплин СН (2021) COVID-19-ассоциированная коагулопатия: обзор современных рекомендаций по диагностике, лечению и профилактике. *Амбулат хирургия* (3-4): 36–51. [Lobastov KV, Schastlivtsev IV, Porembskaya OY, Dzenina OV, Bargandzhiya AB, Tsaplin SN (2020) COVID-19-associated coagulopathy: review of current recommendations for diagnosis, treatment and prevention. *Ambulat Surgery* (3-4): 36–51. (In Russ)].
<https://doi.org/10.21518/1995-1477-2020-3-4-36-51>
 36. Порембская ОЯ, Кравчук ВН, Гальченко МИ, Деев РВ, Чесноков МШ, Аванесян АВ, Лобастов КВ, Цаплин СН, Лаберко ЛА, Ермаков ВС, Пашовкина ОВ, Счастливцев ИВ, Сайганов СА (2022) Тромбоз сосудистого русла легких при COVID-19: клинико-морфологические параллели. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 18: 376–384. [Porembskaya OY, Kravchuk VN, Galchenko MI, Deev RV, Chesnokov MS, Avanesyan AV, Lobastov KV, Tsaplin SN, Laberko LA, Ermakov VS, Pashovkina OV, Schastlivtsev IV, Sayganov SA (2022) Pulmonary Vascular Thrombosis in COVID-19: Clinical and Morphological Parallels. *Rational Pharmacother in Cardiol* 18: 376–384. (In Russ)].
<https://doi.org/10.20996/1819-6446-2022-08-01>
 37. Porembskaya O, Lobastov K, Pashovkina O, Tsaplin S, Schastlivtsev I, Zhuravlev S, Laberko L, Rodoman G, Kravchuk V, Skvortsov A, Saiganov S (2020) Thrombosis of pulmonary vasculature despite anticoagulation and thrombolysis: The findings from seven autopsies. *Thrombosis Update* 1:100017.
<https://doi.org/10.1016/j.tru.2020.100017>
 38. Kudryavtsev I, Rubinstein A, Golovkin A, Kalinina O, Vasilyev K, Rudenko L, Isakova-Sivak I (2022) Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients: A Comprehensive Overview. *Viruses* 14: 1082.
<https://doi.org/10.3390/v14051082>
 39. Grover SP, Mackman N (2019) Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 331–338.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312130>
 40. Prydzial ELG, Leatherdale A, Conway EM (2022) Coagulation and complement: Key innate defense participants in a seamless web. *Front Immunol* 13: 918775.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918775>
 41. Maas C, Oschatz C, Renné T (2011) The Plasma Contact System 2.0. *Semin Thromb Hemost* 37: 375–381.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1276586>
 42. Maas C, Renné T (2012) Regulatory mechanisms of the plasma contact system. *Thromb Res* 129: S73–S76.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.02.039>
 43. Яковлева ЕВ, Зозуля НИ (2022) Физиологическая и патологическая роль фактора свертывания крови XII. *Гематол и трансфузиол* 67: 570–578. [Yakovleva EV, Zozulya NI (2022) Physiological and pathological role of factor XII. *Russ J Hematol Transfusiol* 67(4): 570–578. (In Russ)].
<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-67-4-570-578>
 44. Konrath S, Mailer RK, Beerens M, Englert H, Frye M, Kuta P, Preston RJS, Maas C, Butler LM, Roest M, de Laat B, Renné T (2022) Intrinsic coagulation pathway-mediated thrombin generation in mouse whole blood. *Front Cardiovasc Med* 9: 1008410.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1008410>
 45. Navarro S, Stegner D, Nieswandt B, Heemskerk JWM, Kuijpers MJE (2021) Temporal Roles of Platelet and Coagulation Pathways in Collagen- and Tissue Factor-Induced Thrombus Formation. *Int J Mol Sci* 23: 358.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010358>
 46. Manz XD, Bogaard HJ, Aman J (2022) Regulation of VWF (Von Willebrand Factor) in Inflammatory Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol* 42: 1307–1320.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318179>
 47. Ben Shimon M, Lenz M, Ikenberg B, Becker D, Shavit Stein E, Chapman J, Tanne D, Pick CG, Blatt I, Neufeld M, Vlachos A, Maggio N (2015) Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease. *Front Cell Neurosci* 9: 151.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00151>

48. *Tsuchida T, Hayakawa M, Kawahara S, Kumano O* (2022) Thrombin generation capacity is enhanced by low antithrombin activity and depends on the activity of the related coagulation factors. *Thromb J* 20: 29.
<https://doi.org/10.1186/s12959-022-00388-w>
49. *Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D* (1991) Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6: 575–581.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90060-d](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90060-d)
50. *Riek-Burchardt M, Striggow F, Henrich-Noack P, Reiser G, Reymann KG* (2002) Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett* 329: 181–184.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00645-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00645-6)
51. *Citron BA, Smirnova IV, Arnold PM, Festoff BW* (2000) Upregulation of neurotoxic serine proteases, prothrombin, and protease-activated receptor 1 early after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17: 1191–1203.
<https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.1191>
52. *Van Landingham JW, Cekic M, Cutler SM, Hoffman SW, Washington ER, Johnson SJ, Miller D, Stein DG* (2008) Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1786–1794.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.73>
53. *Coelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL* (2001) Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 85: 1066–1070.
54. *Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE* (2001) Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 28: 389–392.
<https://doi.org/10.1038/ng578>
55. *Danckwardt S, Gehring N, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze M, Kulozik A* (2004) The prothrombin 3' end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 104: 428–435.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2894>
56. *Danckwardt S, Hartmann K, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE* (2006) 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol* 115: 192–197.
<https://doi.org/10.1159/000090934>
57. *Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, Slifer S, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J* (2000) Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 95: 2780–2785.
58. *Huber-Lang M, Sarma JV, Zetouni FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA* (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12: 682–687.
<https://doi.org/10.1038/nm1419>
59. *Boven LA, Vergnolle N, Henry SD, Silva C, Imai Y, Holden J, Warren K, Hollenberg MD, Power C* (2003) Up-regulation of proteinase-activated receptor 1 expression in astrocytes during HIV encephalitis. *J Immunol* 170: 2638–2646.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2638>
60. *Danckwardt S, Gantzer A-S, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, Gröne H-J, Schirmacher P, Hentze MW, Kulozik AE* (2011) p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell* 41: 298–310.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.032>
61. *Levi M, van der Poll T, Büller HR* (2004) Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 109: 2698–2704.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131660.51520.9A>
62. *Esmon CT* (2005) The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 131: 417–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05753.x>
63. *Coughlin SR* (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258–264.
<https://doi.org/10.1038/35025229>
64. *Ossovskaya VS, Bunnnett NW* (2004) Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol Rev* 84: 579–621.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2003>
65. *Coughlin SR* (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thrombosis and Haemostasis* 3: 1800–1814.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>
66. *Luo W, Wang Y, Reiser G* (2007) Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev* 56:

- 331–345.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.002>
67. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245–282.
 68. Traynelis SF, Trejo J (2007) Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Hematol* 14: 230.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280dce568>
 69. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y (2016) Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* 428: 3868.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
 70. Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000) Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5255–5260.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5255>
 71. Little PJ, Burch ML, Al-aryahi S, Zheng W (2011) The paradigm of G protein receptor trans-activation: a mechanistic definition and novel example. *Scient World J* 11: 709–714.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2011.75>
 72. Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R (2013) Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communicat and Signal* 11: 86.
<https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-86>
 73. Van den Biggelaar M, Hernández-Fernaund JR, van den Eshof BL, Neilson LJ, Meijer AB, Mertens K, Zanivan S (2014) Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells. *Blood* 123: e22–e36.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-546036>
 74. Stefanini L, Boulafali Y, Ouellette TD, Holinstat M, Désiré L, Leblond B, Andre P, Conley PB, Bergmeier W (2012) Rap1-Rac1 circuits potentiate platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 434–441.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.239194>
 75. Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S (1999) Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 144: 745–754.
<https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.745>
 76. Zhao P, Metcalf M, Bunnnett NW (2014) Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 67.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00067>
 77. Offermanns S, Mancino V, Revel JP, Simon MI (1997) Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Gα13 deficiency. *Science* 275: 533–536.
<https://doi.org/10.1126/science.275.5299.533>
 78. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 17: 5316–5326.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05316.1997>
 79. Flock T, Ravarani CNJ, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, Veprintsev DB, Babu MM (2015) Universal allosteric mechanism for Gα activation by GPCRs. *Nature* 524: 173–179.
<https://doi.org/10.1038/nature14663>
 80. Alberelli MA, De Candia E (2014) Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul Pharmacol* 62: 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.001>
 81. Hung DT, Vu TH, Nelken NA, Coughlin SR (1992) Thrombin-induced events in non-platelet cells are mediated by the unique proteolytic mechanism established for the cloned platelet thrombin receptor. *J Cell Biol* 116: 827–832.
<https://doi.org/10.1083/jcb.116.3.827>
 82. Feistritzer C, Riewald M (2005) Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 105: 3178–3184.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3985>
 83. Bae J-S, Yang L, Rezaie AR (2007) Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2867–2872.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611493104>
 84. Donovan FM, Cunningham DD (1998) Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem* 273: 12746–12752.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12746>
 85. Lee-Rivera I, López E, López-Colomé AM (2022) Diversification of PAR signaling through receptor crosstalk. *Cell Mol Biol Lett* 27: 77.
<https://doi.org/10.1186/s11658-022-00382-0>

86. Lin H, Liu AP, Smith TH, Trejo J (2013) Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 65: 1198–1213.
<https://doi.org/10.1124/pr.111.004747>
87. Abraham LA, MacKie EJ (1999) Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J Bone Miner Res* 14: 1320–1329.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.8.1320>
88. Madhusudhan T, Wang H, Straub BK, Gröne E, Zhou Q, Shahzad K, Müller-Krebs S, Schwenger V, Gerlitz B, Grinnell BW, Griffin JH, Reiser J, Gröne H-J, Esmon CT, Nawroth PP, Isermann B (2012) Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood* 119: 874–883.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365973>
89. Arachiche A, Mumaw MM, de la Fuente M, Nieman MT (2013) Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by α -thrombin. *J Biol Chem* 288: 32553–32562.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472373>
90. Pavic G, Grandoch M, Dangwal S, Jobi K, Rauch BH, Doller A, Oberhuber A, Akhyari P, Schrör K, Fischer JW, Fender AC (2014) Thrombin receptor protease-activated receptor 4 is a key regulator of exaggerated intimal thickening in diabetes mellitus. *Circulation* 130: 1700–1711.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007590>
91. Yu G, Jiang P, Xiang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhang C, Lee S, Lee W, Zhang Y (2015) Increased expression of protease-activated receptor 4 and Trefol factor 2 in human colorectal cancer. *PLoS One* 10: e0122678.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122678>
92. Gomides LF, Lima OCO, Matos NA, Freitas KM, Francischi JN, Tavares JC, Klein A (2014) Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. *Inflamm Res* 63: 935–941.
<https://doi.org/10.1007/s00011-014-0767-8>
93. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS, Brass LF (2000) Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem* 275: 13502–13509.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13502>
94. Kaneider NC, Leger AJ, Agarwal A, Nguyen N, Perides G, Derian C, Covic L, Kuliopulos A (2007) “Role reversal” for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol* 8: 1303–1312.
<https://doi.org/10.1038/ni1525>
95. Lidington EA, Steinberg R, Kinderlerer AR, Landis RC, Ohba M, Samarel A, Haskard DO, Mason JC (2005) A role for proteinase-activated receptor 2 and PKC-epsilon in thrombin-mediated induction of decay-accelerating factor on human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1437–C1447.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00502.2004>
96. Chen C-H, Paing MM, Trejo J (2004) Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 279: 10020–10031.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310590200>
97. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J (2002) beta-Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem* 277: 1292–1300.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109160200>
98. Stalheim L, Ding Y, Gullapalli A, Paing MM, Wolfe BL, Morris DR, Trejo J (2005) Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol Pharmacol* 67: 78–87.
<https://doi.org/10.1124/mol.104.006072>
99. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148: 1267–1281.
<https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1267>
100. Abouzeid H, Boisset G, Favez T, Youssef M, Marzouk I, Shakankiry N, Bayoumi N, Descombes P, Agosti C, Munier FL, Schorderet DF (2011) Mutations in the SPARC-related modular calcium-binding protein 1 gene, SMOC1, cause waardenburg anophthalmia syndrome. *Am J Hum Genet* 88: 92–98.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.12.002>
101. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R (2001) Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J Biol Chem* 276: 4692–4698.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008160200>

102. *Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO* (2015) Activated protein C: biased for translation. *Blood* 125: 2898–2907.
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-355974>
103. *Bea F, Kreuzer J, Preusch M, Schaab S, Isermann B, Rosenfeld ME, Katus H, Blessing E* (2006) Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2787–2792.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000246797.05781.ad>
104. *Soh UJK, Dores MR, Chen B, Trejo J* (2010) Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* 160: 191–203.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00705.x>
105. *Mahajan-Thakur S, Böhm A, Jedlitschky G, Schrör K, Rauch BH* (2015) Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation. *Mediators Inflamm* 2015: 831059.
<https://doi.org/10.1155/2015/831059>
106. *Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM* (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278: 6258–6267.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212231200>
107. *Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM* (2002) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277: 9429–9436.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M106457200>
108. *DeFea K* (2008) β -arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *Br J Pharmacol* 153: S298–S309.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707508>
109. *Huang J, Sun Y, Huang X-Y* (2004) Distinct roles for Src tyrosine kinase in beta2-adrenergic receptor signaling to MAPK and in receptor internalization. *J Biol Chem* 279: 21637–21642.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400956200>
110. *Sun Y, Huang J, Xiang Y, Bastepe M, Jüppner H, Kobilka BK, Zhang JJ, Huang X-Y* (2007) Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J* 26: 53–64.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601502>
111. *López-Zambrano M, Rodriguez-Montesinos J, Crespo-Avilan GE, Muñoz-Vega M, Preissner KT* (2020) Thrombin Promotes Macrophage Polarization into M1-Like Phenotype to Induce Inflammatory Responses. *Thromb Haemost* 120: 658–670.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1703007>
112. *Tran T, Stewart AG* (2003) Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 138: 865–875.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705106>
113. *Gu Y-H, Hawkins BT, Izawa Y, Yoshikawa Y, Koziol JA, Del Zoppo GJ* (2022) Intracerebral hemorrhage and thrombin-induced alterations in cerebral microvessel matrix. *J Cereb Blood Flow Metab* 42: 1732–1747.
<https://doi.org/10.1177/0271678X221099092>
114. *Koller GM, Schafer C, Kemp SS, Aguera KN, Lin PK, Forgy JC, Griffin CT, Davis GE* (2020) The pro-inflammatory mediators, IL-1 β , TNF α , and thrombin directly induce capillary tube regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40: 365–377.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313536>
115. *Groeneveld D, Pereyra D, Veldhuis Z, Adelmeijer J, Ottens P, Kopec AK, Starlinger P, Lisman T, Luyendyk JP* (2019) Intrahepatic fibrin(ogen) deposition drives liver regeneration after partial hepatectomy in mice and humans. *Blood* 133: 1245–1256.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869057>
116. *Wang X, Xu Y, Li L, Lu W* (2021) Thrombin Aggravates Hypoxia/Reoxygenation Injury of Cardiomyocytes by Activating an Autophagy Pathway-Mediated by SIRT1. *Med Sci Monit* 27: e928480.
<https://doi.org/10.12659/MSM.928480>
117. *Xu Y, Wang X, Liu W, Lu W* (2021) Thrombin-activated platelet-rich plasma enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by activating SIRT1-mediated autophagy. *Eur J Med Res* 26: 105.
<https://doi.org/10.1186/s40001-021-00575-x>
118. *Yang C-C, Hsiao L-D, Shih Y-F, Hsu C-K, Hu C-Y, Yang C-M* (2022) Thrombin Induces COX-2 and PGE2 Expression via PAR1/PKCalpha/MAPK-Dependent NF-kappaB Activation in Human Tracheal Smooth Muscle Cells. *Mediators Inflamm* 2022: 4600029.
<https://doi.org/10.1155/2022/4600029>
119. *Motta J-P, Palese S, Giorgio C, Chapman K, Denadai-Souza A, Roussel P, Sagnat D, Guiraud L, Edir A, Seguy C, Alric L, Bonnet D, Bournet B, Buscail L, Gilletta C, Buret AG, Wallace JL, Hol-*

- lenberg MD, Oswald E, Barocelli E, Le Grand S, Le Grand B, Deraison C, Vergnolle N (2021) Increased Mucosal Thrombin is Associated with Crohn's Disease and Causes Inflammatory Damage through Protease-activated Receptors Activation. *J Crohns Colitis* 15: 787–799. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/ijaa229>
120. Zheng X, Wang P, Jia M, Li Q, Zhang A, Zhou Q (2022) Baicalin Alleviates Thrombin-Induced Inflammation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biomed Res Int* 2022: 5799308. <https://doi.org/10.1155/2022/5799308>
 121. Ye F, Garton HJL, Hua Y, Keep RF, Xi G (2021) The Role of Thrombin in Brain Injury After Hemorrhagic and Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res* 12: 496–511. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00855-4>
 122. Molinar-Inglis O, Wozniak JM, Grimsey NJ, Orduña-Castillo LB, Cheng N, Lin Y, Gonzalez Ramirez ML, Birch CA, Lapek JD, Gonzalez DJ, Trejo J (2022) Phosphoproteomic analysis of thrombin- and p38 MAPK-regulated signaling networks in endothelial cells. *J Biol Chem* 298: 101801. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101801>
 123. Falcione S, Munsterman D, Joy T, Kamtchum-Tatuene J, Sykes G, Jickling G (2022) Association of Thrombin Generation With Leukocyte Inflammatory Profile in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Neurology* 99: e1356–e1363. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200909>
 124. Zhang Y, Sun L, Wang X, Zhou Q (2023) Integrative analysis of HASMCs gene expression profile revealed the role of thrombin in the pathogenesis of atherosclerosis. *BMC Cardiovasc Disord* 23: 191. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03211-0>
 125. Lesbo M, Hviid CVB, Brink O, Juul S, Borris LC, Hvas A-M (2023) Age-dependent thrombin generation predicts 30-day mortality and symptomatic thromboembolism after multiple trauma. *Sci Rep* 13: 1681. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28474-7>
 126. Eivazadeh-Keihan R, Saadatidizaji Z, Maleki A, de la Guardia M, Mahdavi M, Barzegar S, Ahadian S (2022) Recent Progresses in Development of Biosensors for Thrombin Detection. *Biosensors (Basel)* 12: 767. <https://doi.org/10.3390/bios12090767>
 127. Sloan AR, Lee-Potursalski C, Hoffman HC, Harris PL, Elder TE, Richardson B, Kerstetter-Fogle A, Cioffi G, Schroer J, Desai A, Cameron M, Barnholtz-Sloan J, Rich J, Jankowsky E, Sen Gupta A, Sloan AE (2022) Glioma stem cells activate platelets by plasma-independent thrombin production to promote glioblastoma tumorigenesis. *Neurooncol Adv* 4: vdac172. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdac172>
 128. Leung LL, Myles T, Morser J (2023) Thrombin Cleavage of Osteopontin and the Host Anti-Tumor Immune Response. *Cancers (Basel)* 15: 3480. <https://doi.org/10.3390/cancers15133480>
 129. Berkowitz S, Gofrit SG, Aharoni SA, Golderman V, Qassim L, Goldberg Z, Dori A, Maggio N, Chapman J, Shavit-Stein E (2022) LPS-Induced Coagulation and Neuronal Damage in a Mice Model Is Attenuated by Enoxaparin. *Int J Mol Sci* 23: 10472. <https://doi.org/10.3390/ijms231810472>
 130. Conway EM (2019) Thrombin: Coagulation's master regulator of innate immunity. *J Thromb Haemost* 17: 1785–1789. <https://doi.org/10.1111/jth.14586>
 131. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008) Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8: 776–787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>
 132. Cohen I, Rider P, Vornov E, Tomas M, Tudor C, Wegner M, Brondani L, Freudenberg M, Mittler G, Ferrando-May E, Dinarello CA, Apte RN, Schneider R (2015) IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* 5: 14756. <https://doi.org/10.1038/srep14756>
 133. Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N, Kitt LL, Summers C, Tatham KC, Martin PB, Bennett MR, Clarke MCH (2019) The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. *Immunity* 50: 1033–1042.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.003>
 134. Treeck O, Buechler C, Ortmann O (2019) Chemerin and Cancer. *Int J Mol Sci* 20: 3750. <https://doi.org/10.3390/ijms20153750>
 135. Buechler C, Feder S, Haberl EM, Aslanidis C (2019) Chemerin Isoforms and Activity in Obesity. *Int J Mol Sci* 20: 1128. <https://doi.org/10.3390/ijms20051128>
 136. Du X, Myles T, Morser J, Leung LL (2009) Prochemerin Is a New Substrate for Thrombin. *Blood* 114: 3591. <https://doi.org/10.1182/blood.V114.22.3591.3591>

137. Du X-Y, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL (2009) Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *J Biol Chem* 284: 751–758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805000200>
138. Ferland DJ, Mullick AE, Watts SW (2020) Chemerin as a Driver of Hypertension: A Consideration. *Am J Hypertens* 33: 975–986. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa084>
139. Macvanin MT, Rizzo M, Radovanovic J, Sonmez A, Paneni F, Isenovic ER (2022) Role of Chemerin in Cardiovascular Diseases. *Biomedicines* 10: 2970. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112970>
140. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blaupain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D (2003) Specific Recruitment of Antigen-presenting Cells by Chemerin, a Novel Processed Ligand from Human Inflammatory Fluids. *J Exp Med* 198: 977–985. <https://doi.org/10.1084/jem.20030382>
141. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, Mollereau C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M (1998) ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* 28: 1689–1700. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199805\)28:05<1689::AID-IMMU1689>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1689::AID-IMMU1689>3.0.CO;2-I)
142. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC (2005) Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol* 174: 244–251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.244>
143. Yamawaki H, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y (2012) A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.103>
144. Haybar H, Shahrazi S, Rezaeeyan H, Shirzad R, Saki N (2019) Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Toxicol* 19: 13–22. <https://doi.org/10.1007/s12012-018-9493-8>
145. Dimitriadis GK, Kaur J, Adya R, Miras AD, Mattu HS, Hattersley JG, Kaltsas G, Tan BK, Rande HS (2018) Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion. *Oncotarget* 9: 16678–16690. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24659>
146. Neves KB, Nguyen Dinh Cat A, Lopes RAM, Rios FJ, Anagnostopoulou A, Lobato NS, de Oliveira AM, Tostes RC, Montezano AC, Touyz RM (2015) Chemerin Regulates Crosstalk Between Adipocytes and Vascular Cells Through Nox. *Hypertension* 66: 657–666. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05616>
147. Landgraf K, Friebe D, Ullrich T, Kratzsch J, Dittrich K, Herberth G, Adams V, Kiess W, Erbs S, Körner A (2012) Chemerin as a Mediator between Obesity and Vascular Inflammation in Children. *J Clin Endocrinol & Metabol* 97: E556–E564. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2937>
148. Neves KB, Lobato NS, Lopes RAM, Filgueira FP, Zanutto CZ, Oliveira AM, Tostes RC (2014) Chemerin reduces vascular nitric oxide/cGMP signalling in rat aorta: a link to vascular dysfunction in obesity? *Clin Sci* 127: 111–122. <https://doi.org/10.1042/CS20130286>
149. Didion SP, Heistad DD, Faraci FM (2001) Mechanisms That Produce Nitric Oxide-Mediated Relaxation of Cerebral Arteries During Atherosclerosis. *Stroke* 32: 761–766. <https://doi.org/10.1161/01.STR.32.3.761>
150. Xie Y, Liu L (2022) Role of Chemerin/ChemR23 axis as an emerging therapeutic perspective on obesity-related vascular dysfunction. *J Transl Med* 20: 141. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03220-7>
151. Gallwitz M, Enoksson M, Thorpe M, Hellman L (2012) The extended cleavage specificity of human thrombin. *PLoS One* 7: e31756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031756>
152. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93: 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>
153. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM (2019) Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 16: 166–179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
154. Garraud O, Cognasse F (2015) Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells? *Front Immunol* 6: 70. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00070>

155. Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ (2018) Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2: 450–460.
<https://doi.org/10.1002/rth2.12107>
156. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y₁ receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 273: 2030–2034.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2030>
157. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2341–2349.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>
158. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA (2012) Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 34: 5–30.
<https://doi.org/10.1007/s00281-011-0286-4>
159. Linden MD (2013) Platelet physiology. *Methods Mol Biol* 992: 13–30.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_2
160. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD (1996) Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 87: 1238–1242.
161. Schrottmaier M, Mussbacher M, Salzmann M, Assinger A (2020) Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis* 307: 109–120.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.018>
162. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391: 591–594.
<https://doi.org/10.1038/35393>
163. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwartz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2005) Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122: 379–391.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.015>
164. Kraemer BF, Campbell RA, Schwartz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WHA, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS (2011) Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog* 7: e1002355.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002355>
165. Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM (2013) Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J Immunol* 191: 5196–5203.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300354>
166. Olumuyiwa-Akeredolu O-O, Page MJ, Soma P, Pretorius E (2019) Platelets: emerging facilitators of cellular crosstalk in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 15: 237–248.
<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0187-9>
167. Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin J-L, Adrian I, Errazuriz-Cerda E, Frasilho S, Antunes L, Lina B, Bordet J-C, Jandrot-Perrus M, Ludwig S, Riteau B (2015) Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 191: 804–819.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1031OC>
168. Middleton EA, Weyrich AS, Zimmerman GA (2016) Platelets in Pulmonary Immune Responses and Inflammatory Lung Diseases. *Physiol Rev* 96: 1211–1259.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2015>
169. Yaron M, Djaldetti M (1978) Platelets in synovial fluid. *Arthritis Rheum* 21: 607–608.
<https://doi.org/10.1002/art.1780210509>
170. Farr M, Wainwright A, Salmon M, Hollywell CA, Bacon PA (1984) Platelets in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 4: 13–17.
<https://doi.org/10.1007/BF00683878>
171. Yan M, Jurasz P (2016) The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1863: 392–400.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.008>
172. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Bozza FA (2013) Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost* 11: 951–962.
<https://doi.org/10.1111/jth.12178>
173. Koupenova M, Vitseva O, MacKay CR, Beaulieu LM, Benjamin EJ, Mick E, Kurt-Jones EA, Ravid K, Freedman JE (2014) Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during

- viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* 124: 791–802.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-536003>
174. Vogel S, Arora T, Wang X, Mendelsohn L, Nichols J, Allen D, Shet AS, Combs CA, Quezada ZMN, Thein SL (2018) The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. *Blood Adv* 2: 2672–2680.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021709>
 175. Tsai J-C, Lin Y-W, Huang C-Y, Lin C-Y, Tsai Y-T, Shih C-M, Lee C-Y, Chen Y-H, Li C-Y, Chang N-C, Lin F-Y, Tsai C-S (2014) The role of calpain-myosin 9-Rab7b pathway in mediating the expression of Toll-like receptor 4 in platelets: a novel mechanism involved in α -granules trafficking. *PLoS One* 9: e85833.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085833>
 176. Chao C-H, Wu W-C, Lai Y-C, Tsai P-J, Perng G-C, Lin Y-S, Yeh T-M (2019) Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog* 15: e1007625.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007625>
 177. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K-I, Kawashima S, Yokoyama M (2004) Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res* 113: 379–385.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.03.023>
 178. Anabel A-S, Eduardo P-C, Pedro Antonio H-C, Carlos S-M, Juana N-M, Honorio T-A, Nicolás V-S, Sergio Roberto A-R (2014) Human platelets express Toll-like receptor 3 and respond to poly I:C. *Hum Immunol* 75: 1244–1251.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.09.013>
 179. Zakeri A, Russo M (2018) Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Front Immunol* 9: 1027.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01027>
 180. Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM (2008) Lipopolysaccharide is a Direct Agonist for Platelet RNA Splicing. *J Immunol* 181: 3495–3502.
 181. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O (2008) Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol* 141: 84–91.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06999.x>
 182. Berthet J, Damien P, Hamzeh-Cognasse H, Arthaud C-A, Eyraud M-A, Zéni F, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O, Cognasse F (2012) Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol* 145: 189–200.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.09.004>
 183. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z (2009) Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 182: 7997–8004.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802884>
 184. Koessler J, Niklaus M, Weber K, Koessler A, Kuhn S, Boeck M, Kobsar A (2019) The Role of Human Platelet Preparation for Toll-Like Receptors 2 and 4 Related Platelet Responsiveness. *TH Open* 3: e94–e102.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1685495>
 185. Damien P, Cognasse F, Eyraud M-A, Arthaud C-A, Pozzetto B, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H (2015) LPS stimulation of purified human platelets is partly dependent on plasma soluble CD14 to secrete their main secreted product, soluble-CD40-Ligand. *BMC Immunol* 16: 3.
<https://doi.org/10.1186/s12865-015-0067-2>
 186. Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM, Walter U (2010) Thrombin and Collagen Induce a Feedback Inhibitory Signaling Pathway in Platelets Involving Dissociation of the Catalytic Subunit of Protein Kinase A from an NF κ B-I κ B Complex*. *J Biol Chem* 285: 18352–18363.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077602>
 187. Hachem A, Yacoub D, Zaid Y, Mourad W, Merhi Y (2012) Involvement of nuclear factor κ B in platelet CD40 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.049>
 188. Lannan KL, Sahler J, Kim N, Spinelli SL, Maggirwar SB, Garraud O, Cognasse F, Blumberg N, Phipps RP (2015) Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol* 6: 48.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00048>
 189. Unsworth AJ, Flora GD, Gibbins JM (2018) Non-genomic effects of nuclear receptors: insights from the anucleate platelet. *Cardiovasc Res* 114: 645–655.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvy044>

190. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O (2005) Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 83: 196–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01314.x>
191. Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Devine MT, Fuchs TA, Weyrich AS, Semple JW, Flaumenhaft R, Italiano JE (2012) T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol* 198: 561–574.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201111136>
192. Hally KE, La Flamme AC, Larsen PD, Harding SA (2016) Toll-like receptor 9 expression and activation in acute coronary syndrome patients on dual anti-platelet therapy. *Thromb Res* 148: 89–95.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.10.026>
193. Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, Byzova TV, Podrez EA (2013) Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyper-reactivity and thrombosis. *Circ Res* 112: 103–112.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.274241>
194. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER (2012) Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem* 359: 301–313.
<https://doi.org/10.1007/s11010-011-1024-x>
195. De Pablo-Moreno JA, Serrano LJ, Revuelta L, Sánchez MJ, Liras A (2022) The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. *Int J Mol Sci* 23: 8283.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158283>
196. Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, Iino N, Shimokawa H, Egashira K, Takeshita A (2001) Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1759–1763.
<https://doi.org/10.1161/hq1101.098489>
197. Popovic M, Laumonier Y, Burysek L, Syrovets T, Simmet T (2008) Thrombin-induced expression of endothelial CX3CL1 potentiates monocyte CCL2 production and transendothelial migration. *J Leukoc Biol* 84: 215–223.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0907652>
198. Szaba FM, Smiley ST (2002) Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion *in vivo*. *Blood* 99: 1053–1059.
<https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.1053>
199. Chen D, Carpenter A, Abrahams J, Chambers RC, Lechler RI, McVey JH, Dorling A (2008) Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocyte recruitment *in vivo*. *J Exp Med* 205: 1739–1746.
<https://doi.org/10.1084/jem.20071427>
200. Camerer E, Regard JB, Cornelissen I, Srinivasan Y, Duong DN, Palmer D, Pham TH, Wong JS, Pappu R, Coughlin SR (2009) Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J Clin Invest* 119: 1871–1879.
<https://doi.org/10.1172/jci38575>
201. Sun X-J, Chen M, Zhao M-H (2019) Thrombin Contributes to Anti-myeloperoxidase Antibody Positive IgG-Mediated Glomerular Endothelial Cells Activation Through SphK1-S1P-S1PR3 Signaling. *Front Immunol* 10: 237.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00237>
202. Delekta PC, Apel JJ, Gu S, Siu K, Hattori Y, McAllister-Lucas LM, Lucas PC (2010) Thrombin-dependent NF- κ B activation and monocyte/endothelial adhesion are mediated by the CARMA3-Bcl10-MALT1 signalosome. *J Biol Chem* 285: 41432–41442.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158949>
203. Hirano K (2007) The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 27–36.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251995.73307.2d>
204. Terada M, Kelly EAB, Jarjour NN (2004) Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling? *Am J Respir Crit Care Med* 169: 373–377.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200308-1156OC>
205. Козлов ВА, Тихонова ЕП, Савченко АА, Кудрявцев ИВ, Андронova НВ, Анисимова ЕН, Головкин АС, Демина ДВ, Здзитовецкий ДЭ, Калинина ЮС, Каспаров ЭВ, Козлов ИГ, Корсунский ИА, Кудлай ДА, Кузьмина ТЮ, Миноранская НС, Протеус АП, Старикова ЭА, Черданцев ДВ, Чесноков АВ, Шестерня ПА, Борисов АГ (2021) Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. Красноярск. Изд-во Поликор. [Kozlov VA, Tikhonova EP, Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Andronova NV, Anisimova EN, Golovkin AS, Demina DV, Zdzitovetsky DE, Kalinina YS, Kasparov EV, Kozlov IG, Korsunsky IA, Kudlay DA, Kuzmina TY, Minoranskaya NS, Proteus AP, Starikova EA, Cherdantsev DV, Chesnokov AB, Shesternya PA, Borisov AG (2021) Clinical immunology. A practical guide for infectious diseases. Krasnoyarsk. Publ House Polikor. (In Russ)].

206. *Noubouossie DF, Reeves BN, Strahl BD, Key NS* (2019) Neutrophils: back in the thrombosis spotlight. *Blood* 133: 2186–2197.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-862243>
207. *Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA* (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 184: 205–213.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>
208. *Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y* (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207: 1853–1862.
<https://doi.org/10.1084/jem.20100239>
209. *Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR* (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103: 879–887.
<https://doi.org/10.1172/JCI6042>
210. *St-Onge M, Lagarde S, Laflamme C, Rollet-Labelle E, Marois L, Naccache PH, Pouliot M* (2010) Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *The FASEB J* 24: 2116–2125.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-146167>
211. *Jenkins AL, Howells GL, Scott E, Le Bonniec BF, Curtis MA, Stone SR* (1995) The response to thrombin of human neutrophils: evidence for two novel receptors. *J Cell Sci* 108 (Pt 9): 3059–3066.
<https://doi.org/10.1242/jcs.108.9.3059>
212. *Hoeksema M, van Eijk M, Haagsman HP, Hartshorn KL* (2016) Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. *Future Microbiol* 11: 441–453.
<https://doi.org/10.2217/fmb.15.151>
213. *Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A* (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.
<https://doi.org/10.1126/science.1092385>
214. *Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, Liaw PC* (2014) Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1977–1984.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304114>
215. *Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD* (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15880–15885.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005743107>
216. *McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, Jenne CN* (2017) Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood* 129: 1357–1367.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741298>
217. *Longstaff C, Varjú I, Sótónyi P, Szabó L, Krumrey M, Hoell A, Bóta A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K* (2013) Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem* 288: 6946–6956.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404301>
218. *Lim CH, Adav SS, Sze SK, Choong YK, Saravanan R, Schmidtchen A* (2018) Thrombin and Plasmin Alter the Proteome of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 9: 1554.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01554>
219. *Unuvar Purcu D, Korkmaz A, Gunalp S, Helvacı DG, Erdal Y, Dogan Y, Suner A, Wingender G, Sag D* (2022) Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLoS One* 17: e0265196.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265196>
220. *Peng Q, Nowocin A, Ratnasothy K, Smith RA, Smyth LA, Lechler RI, Dorling A, Lombardi G* (2023) Inhibition of thrombin on endothelium enhances recruitment of regulatory T cells during IRI and when combined with adoptive Treg transfer, significantly protects against acute tissue injury and prolongs allograft survival. *Front Immunol* 13.
221. *Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, Leibovich SJ* (2013) The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Rα) signaling. *Inflammation* 36: 921–931.
<https://doi.org/10.1007/s10753-013-9621-3>
222. *Yang B-G, Kim A-R, Lee D, An SB, Shim YA, Jang MH* (2023) Degranulation of Mast Cells as a Target for Drug Development. *Cells* 12: 1506.
<https://doi.org/10.3390/cells12111506>
223. *Britzen-Laurent N, Weidinger C, Stürzl M* (2023) Contribution of Blood Vessel Activation, Remodeling and Barrier Function to Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci* 24: 5517.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065517>
224. *Asero R, Riboldi P, Tedeschi A, Cugno M, Meroni P* (2007) Chronic urticaria: A disease at a crossroad between autoimmunity and coagulation. *Autoimmun Rev* 7: 71–76.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.08.002>

225. Gordon JR, Zhang X, Stevenson K, Cosford K (2000) Thrombin Induces IL-6 but Not TNF α Secretion by Mouse Mast Cells: Threshold-Level Thrombin Receptor and Very Low Level Fc ϵ RI Signaling Synergistically Enhance IL-6 Secretion. *Cell Immunol* 205: 128–135. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1714>
226. Rallabhandi P, Nhu QM, Toshchakov VY, Piao W, Medvedev AE, Hollenberg MD, Fasano A, Vogel SN (2008) Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem* 283: 24314–24325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804800200>
227. Nhu QM, Shirey K, Teijaro JR, Farber DL, Netzel-Arnett S, Antalis TM, Fasano A, Vogel SN (2010) Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors *in vitro* and *in vivo*. *Mucosal Immunol* 3: 29–39. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.120>
228. Nhu QM, Shirey KA, Pennini ME, Stiltz J, Vogel SN (2012) Proteinase-activated receptor 2 activation promotes an anti-inflammatory and alternatively activated phenotype in LPS-stimulated murine macrophages. *Innate Immunol* 18: 193–203. <https://doi.org/10.1177/1753425910395044>
229. Bucci M, Vellecco V, Harrington L, Brancialeone V, Roviezzo F, Mattace Raso G, Ianaro A, Lungarella G, De Palma R, Meli R, Cirino G (2013) Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) is involved in vascular function. *Br J Pharmacol* 168: 411–420. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02205.x>
230. Kersse K, Bertrand MJM, Lamkanfi M, Vandenaabee P (2011) NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 257–276. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.09.003>
231. Uehara A, Imamura T, Potempa J, Travis J, Takada H (2008) Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cell Microbiol* 10: 1181–1189. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01119.x>
232. Kissel K, Berber S, Nockher A, Santoso S, Bein G, Hackstein H (2006) Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion* 46: 818–827. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00802.x>
233. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DNJ (2002) Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 100: 2858–2866. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.8.2858>
234. Li X, Syrovets T, Paskas S, Laumonnier Y, Simmet T (2008) Mature dendritic cells express functional thrombin receptors triggering chemotaxis and CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine induction. *J Immunol* 181: 1215–1223. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1215>
235. Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, Cubel G, Haurie V, Petibois C, Taras D, Dugot-Senard N, Deleris G, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J (2008) Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G226–G235. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00444.2007>
236. Vowinkel T, Wood KC, Stokes KY, Russell J, Tailor A, Anthoni C, Senninger N, Kriegelstein CF, Granger DN (2007) Mechanisms of platelet and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1054–G1060. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00350.2007>
237. Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C, Pawlinski R, Bhattacharjee G, Chun J, Derian CK, Andrade-Gordon P, Rosen H, Ruf W (2008) Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452: 654–658. <https://doi.org/10.1038/nature06663>
238. Wang KX, Denhardt DT (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.001>
239. Sozzani S (2005) Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 581–592. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.04.008>
240. Tiberio L, Del Prete A, Schioppa T, Sozio F, Bosio D, Sozzani S (2018) Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cell Mol Immunol* 15: 346–352. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>
241. Shao Z, Morser J, Leung LLK (2014) Thrombin cleavage of osteopontin disrupts a pro-chemotactic sequence for dendritic cells, which is compensated by the release of its pro-chemotactic C-terminal fragment. *J Biol Chem* 289: 27146–27158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.572172>

242. Cui G, Chen J, Wu Z, Huang H, Wang L, Liang Y, Zeng P, Yang J, Uede T, Diao H (2019) Thrombin cleavage of osteopontin controls activation of hepatic stellate cells and is essential for liver fibrogenesis. *J Cell Physiol* 234: 8988–8997.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27571>
243. López ML, Soriano-Sarabia N, Bruges G, Marquez ME, Preissner KT, Schmitz ML, Hackstein H (2014) Expression pattern of protease activated receptors in lymphoid cells. *Cell Immunol* 288: 47–52.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.02.004>
244. Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE, Klimpel GR (1993) Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell Immunol* 147: 367–377.
<https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1076>
245. The Role of the Thrombin/PAR Axis in the Anti-tumor CD8+ T Cell Response Following Immune Checkpoint Inhibition Therapy. In: ISTH Congress Abstracts. <https://abstracts.isth.org/abstract/the-role-of-the-thrombin-par-axis-in-the-anti-tumor-cd8-t-cell-response-following-immune-checkpoint-inhibition-therapy>. Accessed 1 Aug 2023.
246. Tiper IV, East JE, Subrahmanyam PB, Webb TJ (2016) Sphingosine 1-phosphate signaling impacts lymphocyte migration, inflammation and infection. *Pathog Dis* 74: ftw063.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw063>
247. Ledgerwood LG, Lal G, Zhang N, Garin A, Esses SJ, Ginhoux F, Merad M, Peche H, Lira SA, Ding Y, Yang Y, He X, Schuchman EH, Allende ML, Ochando JC, Bromberg JS (2008) The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 9: 42–53.
<https://doi.org/10.1038/ni1534>
248. Liu G, Burns S, Huang G, Boyd K, Proia RL, Flavell RA, Chi H (2009) The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR. *Nat Immunol* 10: 769–777.
<https://doi.org/10.1038/ni.1743>

Thrombin in the Crossroad Hemostasis and Inflammation

E. A. Starikova^{a, b, c, *}, J. T. Mammedova^a, and O. Ya. Porembskaya^{a, d}

^a*Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia*

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

^c*Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia*

^d*Mechnikov North-Western State Medical University, Saint-Petersburg, Russia*

*e-mail: Starickova@yandex.ru

Hemostasis and immune responses are evolutionarily and functionally related systems on the coordinated work of which vital processes – protection from blood loss and pathogens, depend. Thrombin is the central enzyme of the coagulation system, which has pronounced pro-inflammatory activity and plays an important role in the pathogenesis of a wide range of infectious and non-infectious diseases. Many humoral immune factors regulating inflammation (IL-1 α , C3 and C5 complement components) and cell migration to the lesion site (osteopontin, chimerin) are thrombin targets and become activated by proteolytic cleavage. The main thrombin receptors – protease-activating receptors (PARs), are expressed on many cells of the immune system and are considered as non-classical pattern-recognizing receptors (PRRs). The effect of thrombin on innate immune cells may not be related to its enzymatic effects. Thrombin action on adaptive immunity is just beginning to be studied. Recent studies show that thrombin can act as an alarmin, stimulate the maturation of dendritic cells and adaptive immune responses. The production of this factor also affects Th cell polarization, which determines immune response strategy. The study of the immune functions of the components of the coagulation system reveals new pathogenetic mechanisms of the development of sterile inflammation and expands existing possibilities of allergic, autoimmune and neuroinflammatory disease therapy.

Keywords: thrombin, hemostasis, protease-activated receptor, inflammation, innate immunity, adaptive immunity

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ
НА СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МОЗГА

© 2023 г. А. Н. Турсунов¹, Д. С. Васильев², *, Н. Н. Наливаева², **

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: dvasilyev@bk.ru

**E-mail: natalia.nalivaeva@outlook.com

Поступила в редакцию 23.06.2023 г.

После доработки 09.09.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Вальпроевая кислота (вальпроат, ВА) уже несколько десятилетий широко используется как противоэпилептическое средство, а также в лечении биполярного аффективного расстройства. На протяжении многих лет способность ВА купировать эпилептические приступы разного характера связывали с усилением ГАМКергической нейротрансмиссии, угнетением глутаматергической нейротрансмиссии и общим снижением гиперактивности ЦНС путем воздействия на ионные каналы, однако точные механизмы реализации противосудорожного эффекта ВА до сих пор не ясны. С течением времени стало известно о влиянии ВА на другие нейромедиаторные системы, ферменты и внутриклеточные сигнальные пути, что, однако, не объясняет эффективность препарата в качестве антиконвульсанта и нормотимика, а лишь расширяет его фармакологический профиль. За последние 10 лет фокус интереса к ВА сместился в связи с его способностью изменять экспрессию генов как путем ингибирования деацетилаз гистонов, так и изменением уровня метилирования ДНК, и новые исследования скорее раскрывают альтернативные механизмы его действия, чем пытаются проверить и подтвердить ранее выдвинутые гипотезы.

Ключевые слова: вальпроевая кислота, эпилепсия, депрессия, расстройства аффективного спектра, регуляция экспрессии генов, ингибитор деацетилаз гистонов, нейропротекция

DOI: 10.31857/S0869813923100126, EDN: CSIKAO

ВВЕДЕНИЕ

Вальпроевая кислота (2-пропилпентановая кислота) – это насыщенная разветвленная одноосновная карбоновая кислота (рис. 1), синтезированная еще в 1881 г. Бертоном [1], но получившая применение в клинической практике лишь спустя практически целый век [2]. Фармакологическое действие вальпроевой кислоты и ее производных [3] обусловлено химическим сходством ее молекулы с такими нейромедиаторами, как гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и глутамат (рис. 1).

Соли вальпроевой кислоты, именуемые вальпроатами (далее по тексту ВА), широко известны как противоэпилептические средства [3], применяются в терапии аффективных расстройств [4], в профилактике и купировании мигреней [5, 6], а также обладают слабым выраженным антидепрессивным эффектом [7]. ВА использу-

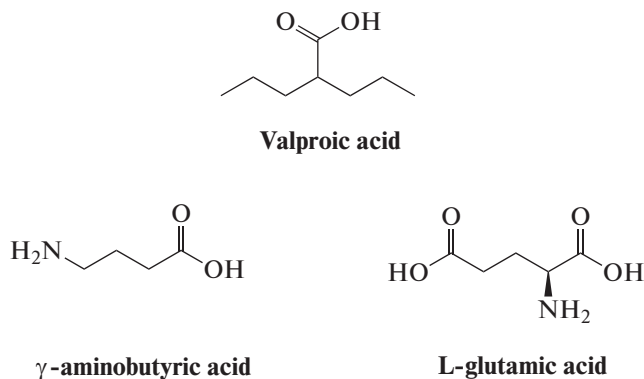


Рис. 1. Строение молекулы вальпроевой кислоты, а также нейромедиаторов — гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и глутаминовой кислоты, с которыми вальпроевая кислота имеет элементы сходства, являясь разветвленной короткоцепочечной жирной кислотой.

ется для лечения практически всех типов эпилепсии, однако наибольшую эффективность он демонстрирует против абсансов, ювенильной миоклонической эпилепсии, а также против эпилепсии с генерализованными тонико-клоническими приступами [8]. Стоит отметить, что ВА обладает наименьшим показателем аггравации среди всех используемых в клинической практике противосудорожных средств, что говорит о хорошей переносимости препарата [9, 10]. Однако, несмотря на то, что этот препарат используется в психиатрии и медицине уже более 60 лет, лишь немногие из механизмов действия ВА доказаны и не вызывают сомнений. В частности, одним из наиболее широко изучаемым и подтвержденным свойством ВА является способность ингибировать деацетилазы гистонов и влиять на состояние хроматина и экспрессию генов [11–13]. Судя по всему, именно способность вальпроата натрия влиять на эпигенетические механизмы экспрессии генов отличает его от других противосудорожных, нормотимических и противомигренозных препаратов и ответственна как за преимущества ВА перед ними, так и за нежелательные побочные эффекты.

Поскольку фармакокинетика ВА уже не раз подробно рассматривалась в литературе [14, 15], анализ его метаболизма и токсичности не входили в цели данного обзора, и основной акцент сделан на обсуждении молекулярных механизмов, обуславливающих его клинически значимые свойства.

ВАЛЬПРОАТ И ГАМКЕРГИЧЕСКАЯ НЕЙРОТРАНСМИССИЯ

Исторически сложилось, что противосудорожный эффект ВА чаще всего ассоциируется с воздействием на тормозную ГАМКергическую систему, т.к. введение ВА приводит к повышению концентрации ГАМК в мозге [16]. В попытках объяснить ГАМК-позитивный эффект ВА проводилось изучение наиболее вероятных механизмов, с помощью которых он мог бы осуществлять такое действие. В частности, было показано, что ВА повышал в срезах мозга активность глутаматдекарбоксилазы (GAD) — фермента, синтезирующего ГАМК из глутаминовой кислоты [17]. Введение ВА также снижало экспрессию транспортеров ГАМК GAT-1 и GAT-3 в гиппокампе крыс и повышало уровень глутамат-аспартатного транспортера (GLAST), приводя к повышению уровня ГАМК [18]. Также было отмечено, что наибольший эффект ВА на уровень ГАМК имеет место в обонятельных луковицах и гипоталамусе, которые характеризуются высокой активностью GAD и ГАМК-

трансаминазы (GABA-T) [19, 20]. Также экспериментально подтвердилось действие ВА на метаболические пути расщепления ГАМК [21, 22]. Несколько лет господствовало мнение, что ВА напрямую ингибирует GABA-T, катализирующую реакцию превращения ГАМК в янтарный (сукциниловый) полуальдегид [23], хотя повышение концентрации ГАМК в тканях при введении ВА обусловлено ингибированием дегидрогеназы янтарного полуальдегида (сукцинил-полуальдегид-дегидрогеназы, SSADH), которая окисляет янтарный полуальдегид до сукцината [22]. Накапливаясь в присутствии ВА, янтарный полуальдегид ингибирует прямую реакцию, катализируемую GABA-T, тем самым замедляя метаболизм ГАМК и увеличивая ее концентрацию.

Повышение уровня янтарного полуальдегида может стимулировать обратную реакцию GABA-T, в ходе которой янтарный полуальдегид конвертируется в ГАМК, приводя к еще большему повышению уровня нейромедиатора, что часто наблюдается у пациентов с дефицитом SSADH [24]. Исследования *in vitro* также подтвердили хоть и незначительное, но прямое ингибирование GABA-T миллимольными концентрациями ВА, однако *in vivo* данный эффект не наблюдается, т.к. такие крайне высокие концентрации недостижимы при введении терапевтических доз препарата [25].

Несмотря на большое количество исследований, в которых прием вальпроата увеличивает концентрацию ГАМК в нервной ткани и ликворе, существуют работы, в которых было продемонстрировано, что уровень ГАМК после хронического введения вальпроевой кислоты либо остается на базальном уровне, либо вовсе понижается. Так, было показано, что введение ВА пациентам со сложными фокальными эпилептическими приступами не изменяло уровень ГАМК в затылочной доле мозга (измерение нейромедиаторов проводилось *in vivo* с помощью ЯМР-спектроскопии) [26]. В другом исследовании [27] было показано, что хроническое введение ВА крысам понижало уровни ГАМК во всех исследованных отделах мозга.

Учитывая всю имеющуюся на данный момент информацию, можно предположить, что в основе противосудорожных свойств вальпроата лежит ГАМКергический механизм [28, 29], хотя имеющиеся данные свидетельствуют о более широком спектре его действия. Так, с использованием культур эмбриональных клеток мозга крыс, а также стволовых клеток человека было показано, что ВА существенно повышает нейрогенез и рост нейритов, превышая эффект BDNF, причем число ГАМК-положительных нейронов увеличивается почти в десять раз [30]. Такой избирательный нейрогенный эффект ВА рассматривается как возможный механизм терапевтического действия ВА [31].

ВАЛЬПРОАТ И ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКАЯ НЕЙРОТРАНСМИССИЯ

Другое возможное объяснение противосудорожного действия ВА заключается во влиянии на глутаматергическую систему [32]. На данный момент считается, что вальпроевая кислота и ее соли подавляют кратковременную деполяризацию (ВПСП), вызванную активацией NMDA-рецепторов (далее NMDAR) глутамата [33]. NMDAR — это ионотропные рецепторы глутаминовой кислоты, обладающие высокой проницаемостью для ионов Ca^{2+} и принимающие непосредственное участие в долговременной потенциации (LTP) — процессе, который является молекулярной основой обучения и памяти. Гиперфункция NMDAR, особенно экстрасинаптических, ассоциирована с эксайтотоксичностью, вызванной избытком ионов кальция в клетке. На организменном уровне гиперактивация глутаматергической системы может приводить к судорогам. Независимо друг от друга были получены данные о том, что у крыс ВА подавляет деполяризацию, ассоциированную с введением N-метил-D-аспартата (агонист NMDAR), в медиальной префронтальной ко-

ре крыс [34], в срезах гиппокампа [35], в клетках нейронов неокортекса *in vitro* [36] и в срезах миндалевидного тела (амигдалы) [37]. Угнетение NMDAR-опосредованной передачи сигналов может объяснить противоэпилептические свойства ВА.

Относительно других ионотропных глутаматных рецепторов считается, что ВА не подавляет ВПСР, ассоциированные с AMPA-рецепторами [35]. Однако этим влияние ВА на глутаматергическую трансмиссию не заканчивается. Показано, что хроническое введение вальпроата (как и лития — другого нормотимического препарата) снижает синаптическую экспрессию GluR1-субъединицы AMPA-рецепторов в гиппокампе [38], а также экспрессию GluR2-субъединицы AMPAR, наличие которой определяет кальциевую непроницаемость содержащих ее AMPA-рецепторов [39]. Точные механизмы, лежащие в основе такой даун-регуляции AMPA-рецепторов, содержащих данные субъединицы, все еще не выяснены. Предполагают, что увеличение плотности AMPA-рецепторов на мембране нейронов является одной из причин возникновения маниакальных и гипоманиакальных фаз, характерных для биполярного и других аффективных расстройств [40], и способность солей лития и ВА понижать уровни синаптической экспрессии GluR1 и GluR2 вносит вклад в реализацию нормотимической активности этих препаратов.

Потенциальное взаимодействие ВА с метаботропными рецепторами глутамата (mGluR1–8) на данный момент не изучено. Тем не менее есть данные о пренатальном влиянии ВА как на систему эндоканабиноидных рецепторов, так и на систему mGlu-рецепторов, приводящем к развитию дефицита социального поведения грызунов (модель аутизма) [41, 42], однако наблюдаемые изменения в этих рецепторных системах, вероятнее всего, являются результатом эпигенетической регуляции экспрессии их генов [43].

Возвращаясь к NMDAR, следует упомянуть, что оказываемое ВА влияние на деполяризацию, вызванную активацией данного вида рецепторов, можно также объяснить тем, что ВА является их антагонистом [44]. Однако на данный момент не было проведено исследований сайта связывания ВА на этом рецепторе и того, связывается ли он с ним напрямую.

Важное преимущество ВА заключается в том, что он довольно редко вызывает когнитивные и поведенческие эффекты, присущие блокаторам ионного канала NMDA-рецептора (таким как кетамин, фенциклидин и мемантин), а именно галлюцинации, паранойю, когнитивный дефицит, деперсонализацию, дереализацию, сенсорную депривацию и психоз [45].

Исходя из всей имеющейся информации, можно предположить, что ВА, скорее всего, не является блокатором поры ионного канала NMDA-рецептора и представляет собой либо негативный аллостерический модулятор данного рецептора, либо ортостерический антагонист сайта связывания L-глутамата или глицина, а также, возможно, реализует свое действие на NMDAR косвенно, не связываясь с самим рецептором. Требуется дальнейшее изучение влияния ВА на NMDA-рецептор. В частности, на наш взгляд, довольно перспективным выглядит подробное исследование наличия или отсутствия аффинности ВА непосредственно к NMDAR, к mGluRs, а также исследование точного молекулярного механизма подавления деполяризации, вызванной активацией NMDA-рецептора. Исследования вышеупомянутых процессов позволят определить, играют ли NMDA-рецепторы роль в противосудорожном действии ВА.

ВАЛЬПРОАТ И ФОСФОИНОЗИТИДНАЯ СИСТЕМА

Пытаясь объяснить способность купировать симптоматику и облегчать течение расстройств аффективного спектра у таких разных препаратов, как литий и ВА, несколько научных групп обнаружили, что введение лития и ВА понижает уровень

инозитола, фосфорилированные производные которого входят в состав мембран всех клеток и являются внутриклеточными вторичными мессенджерами. Эти эффекты обнаружены как у животных [46], так и в дрожжах [47]. Однако в действии этих двух препаратов было выявлено отличие. Так, при введении ВА понижалась концентрация и инозитола, и инозитол-3-фосфата, в то время как при введении лития уровень инозитола понижался, а уровень инозитол-3-фосфата повышался [47]. Было выяснено, что эта особенность связана с тем, что литий и ВА воздействуют на разные ферменты, регулирующие синтез инозитола. ВА, в основном, снижает активность мио-инозитол-3-фосфат-синтазы [48] — первого фермента в пути синтеза инозитола, катализирующего реакцию превращения D-глюкозо-6-фосфата в 1D-мио-инозитол-3-фосфат, в то время как литий вызывает истощение инозитола путем ингибирования инозитол-монофосфатазы [49] — следующего фермента в цепочке биосинтеза инозитола, катализирующего отщепление фосфатного остатка от 1D-мио-инозитол-3-фосфата с образованием свободного инозитола.

Однако в исследованиях *in vitro* было отмечено, что ВА не оказывает ингибирующего действия на очищенную мио-инозитол-3-фосфат-синтазу, и исследователи полагают, что *in vivo* фермент ингибируется либо метаболитами ВА, либо неопределенными компонентами, которые накапливаются в присутствии ВА [48]. Таким образом, ВА, понижая концентрацию инозитола, может влиять на фосфоинозитидный цикл, который регулирует многочисленные клеточные функции [50].

Считается, что важным аспектом в патогенезе аффективных расстройств является гиперфункция фосфоинозитидно-кальциевого сигнального пути в различных популяциях нейронов, что ведет к нарушению баланса процессов возбуждения и торможения в головном мозге и циклической смене фаз мании и депрессии, что и является главным симптомом этих заболеваний [51]. Изучение эффектов ВА на состояние нервной ткани показало, что он ингибирует нарушение конусов роста сенсорных нейронов и увеличивает их площадь, а инозитол и ингибиторы фермента пролилолигопептидазы (ПО) обращают эти процессы вспять [52, 53]. С другой стороны, ВА непосредственно ингибирует ПО, что способствует усилению фосфоинозитидной передачи сигнала [54]. Таким образом, ВА регулирует возбудимость ЦНС и способствует стабилизации настроения. Как было показано на клетках астроцитов, ВА в фармакологических дозах также способен снижать захват инозитола клетками при его высокой концентрации и повышать при низкой [55]. Это объясняет дуализм действия ВА, который может или предотвращать изменение настроения, понижая фосфоинозитидную передачу, или предотвращать депрессию, повышая ее [54]. Таким образом, одним из возможных механизмов, обуславливающих эффективность ВА в терапии аффективных расстройств, является его влияние на фосфоинозитидную систему вторичных мессенджеров [56].

ВЛИЯНИЕ ВАЛЬПРОАТА НА МОНОАМИНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ

Серотонин, дофамин и норадреналин — это нейромедиаторы, дефицит которых влечет к симптомам, характерным для депрессивных расстройств. Хотя моноаминовая гипотеза депрессии на данный момент не является центральной в связи с открытием роли нейровоспаления, свободных радикалов, дефицита нейротрофических факторов и нарушения нейрогенеза в патогенезе депрессивных расстройств [57], нельзя недооценивать важную роль этих нейромедиаторов в процессах возникновения депрессии. Наличие данных о том, что ВА повышает содержание моноаминов в мозге, создало предпосылки для изучения возможности его применения в терапии депрессивных расстройств [58].

Одним из способов повысить уровни какого-либо нейромедиатора в ЦНС является подавление его деградации. Основным ферментом, окисляющим классиче-

ские моноамины, является моноаминоксидаза, существующая в двух изоформах — МАО-А и МАО-Б. Анализ действия ряда антидепрессантов и нормотимиков, включая ВА и литий, показал, что даже в высоких концентрациях (в обоих случаях $IC_{50} > 10000$ мкмоль/л) ни ВА, ни литий не подавляли активность обеих изоформ МАО в грубой митохондриальной фракции коры мозга свиньи [59]. В другом исследовании с использованием клеток нейробластомы BE(2)C было показано, что ВА повышал каталитическую активность МАО-А посредством влияния на уровень экспрессии ее мРНК и активность промотора ее гена, при этом механизм действия ВА затрагивал Akt/FoxO1 сигнальный каскад [60]. В этом же исследовании было показано, что другие ингибиторы деацетилаз гистонов, бутират натрия и трихостатин А, также повышали активность МАО-А. Это позволяет полагать, что ВА оказывает свой эффект на этот фермент именно путем активации экспрессии его гена. Тем не менее вопрос о том, каким путем ВА способен повышать уровень моноаминов в ткани мозга, остается открытым. Повышение уровня серотонина в ткани мозга и сыворотке крови у потомства наблюдался также при введении ВА беременным самкам крыс на разных сроках эмбриогенеза [61]. Поскольку в данном исследовании введение тератогена талидомида также вызывало повышение уровня серотонина в ткани мозга и крови потомства, был сделан вывод о возможном сходстве механизмов их действия во внутриутробный период развития, приводящих к развитию аутизма.

Анализ действия ВА на крыс, подвергаемых постоянному непредсказуемому стрессу, также показал у них повышение экспрессии ферментов тирозингидроксилазы и триптофангидроксилазы в префронтальной коре мозга [62]. Это ферменты, участвующие в синтезе дофамина (и впоследствии норадреналина) и серотонина соответственно. Примечательно, что как хроническое, так и однократное введение ВА также повышало уровень мРНК тирозингидроксилазы в нейронах голубого пятна — основном скоплении норадренергических нейронов в ЦНС [63], которые посылают свои проекции к гиппокампу, миндалевидному телу, таламусу, гипоталамусу, практически всему неокортексу и спинному мозгу. Таким образом, ВА, позитивно влияя на синтез норадреналина в голубом пятне, повышает общую норадренергическую нейротрансмиссию во всей ЦНС.

Другим примером действия ВА на моноаминергическую систему мозга может служить модуляция дофамин-опосредованной передачи сигналов. Будучи ингибитором деацетилаз гистонов, ВА повышает экспрессию белка Par-4, который конкурирует с кальмодулином за образование комплекса с дофаминовым D2-рецептором, связанным с Gi-белком [64]. Одним из сигнальных каскадов, ассоциированных с D2R, является ингибирование аденилатциклазы через Gi-белок и подавление цАМФ-зависимого сигнального пути, а формирование комплекса между Par-4 и D2R при низкой концентрации кальция в цитоплазме является необходимым условием для избирательной активации сигнального каскада через Gi-белок и дальнейшего подавления функции аденилатциклазы [65]. Примечательно то, что мутантные мыши с нарушенным взаимодействием Par-4 и D2R демонстрировали симптомы депрессии [65]. Более того, уровень Par-4 в посмертных образцах височной доли мозга пациентов, страдавших от длительного депрессивного расстройства, был на 67% ниже, чем уровень Par-4 в контрольной группе [66]. Судя по всему, повышенная активность аденилатциклазного сигнального каскада в дофаминергических путях мозга, возникающая из-за недостаточного образования комплекса Par-4/D2R/Gi-белок, является одним из факторов возникновения депрессивных расстройств. Таким образом, ВА, повышая экспрессию белка Par-4 и способствуя его дальнейшему связыванию с дофаминовыми D2 рецепторами, может проявлять антидепрессивный эффект и облегчать течение депрессии.

ВАЛЬПРОАТ И ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Возвращаясь к обсуждению механизмов, лежащих в основе противосудорожного эффекта ВА, нельзя не упомянуть большое число исследований, посвященных взаимодействию ВА и ионных каналов, а также влиянию ВА на возбудимость клеточной мембраны [67–69]. Действительно, снижение избыточной активности нейронов могло бы объяснить способность ВА купировать эпилептические приступы и проявление маниакальных состояний при расстройствах аффективного спектра. Однако результаты опубликованных на данный момент работ расходятся между собой и зачастую противоречат друг другу, что сильно препятствует формированию единой теории, объясняющей действие ВА на ионные каналы и насколько оно значимо для клинической практики. Так, несколько исследовательских групп независимо друг от друга обнаружили, что хроническое введение ВА повышает уровень мРНК субъединиц потенциалзависимых натриевых каналов (далее Nav-каналы) и увеличивает их плотность на поверхности клетки [70]. Однако в другой работе было продемонстрировано как отсутствие взаимодействия ВА с Nav-каналами, так и наличие какого-либо существенного влияния на параметры, характеризующие электрическую активность нейронов [71]. Более позднее исследование связывания ВА с ионными каналами NavMs прокариот *Magnetococcus marinus*, функционально и структурно схожими с натриевыми каналами Na_v1.1 человека [72], показало, что он дестабилизирует их и подавляет входящие через канал токи натрия. Методом молекулярного докинга также было показано, что сайт связывания ВА ассоциирован с сенсором напряжения, а не с гидрофобным участком поры канала, с которым связываются многие блокаторы натриевых каналов, что сильно отличает ВА от последних [68]. Также в другой работе было показано, что ВА селективно ослабляет токи, вызванные активацией кальциевых каналов Т-типа в ганглионарных нейронах крысы [73]. Еще в одном исследовании, проведенном на таламических нейронах, ВА не влиял на токи, ассоциированные с этим же семейством низкопороговых кальциевых каналов [74]. Возможно, расхождение результатов обусловлено различием в выборе исследуемых популяций нейронов, однако окончательного объяснения пока что не предложено. Таким образом, даже спустя 30 лет с начала активного изучения взаимодействия ВА с ионными каналами результаты нельзя считать исчерпывающими. Примечательно, что в большинстве случаев при введении ВА отмечается подавление натриевых токов, и более современные данные предлагают возможные объяснения этому процессу. В частности, на нейрональных клетках Neuro-2a было показано, что ВА подавляет экспрессию гена натриевого канала SCN3A, уровень которого повышен при эпилепсии, что будет несомненно способствовать снижению возбудимости нервной ткани [75]. Способность ВА стабилизировать возбудимость нейрональных мембран и ионные токи также рассматривается как один из механизмов его действия при лечении шизофрении [76, 77].

ВАЛЬПРОАТ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

При изучении механизмов терапевтического эффекта ВА было показано, что он обладает способностью снижать уровень окислительного стресса как у животных, так и у человека. Так, на модели хронического стресса у крыс было показано, что введение ВА приводит к увеличению активности двух важнейших антиоксидантных ферментативных систем — супероксиддисмутазы и каталазы — в сыворотке крови, а также к снижению уровня малонового диальдегида — маркера перекисного окисления липидов, повышение которого наблюдается при окислительном стрессе [78]. Многие исследования подчеркивают тесную связь между окислительным стрессом и возникновением депрессивных расстройств и тяжестью протекания эпилепсии [79],

а также обнаруживают антиоксидантные свойства ВА и других противосудорожных средств [80]. Как было показано в системном исследовании на детях, страдающих эпилепсией, монотерапия ВА в течение 6–12 месяцев приводила к восстановлению активности антиоксидантных систем в плазме крови, коррелирующее с улучшением их состояния и снижением судорожной активности [81]. Более того, введение ВА крысам с аллоксановым диабетом приводило к снижению у них уровня глюкозы в крови, а также уровня каталазы и малонового диальдегида в почках и печени с одновременным повышением активности супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и улучшению липидной формулы крови [82]. Таким образом, ВА потенциально способен проявлять антиэпилептогенный, антидепрессивный и антидиабетический эффекты, нивелируя негативное влияние окислительного стресса на организм. В настоящее время вопрос о превентивном влиянии ВА на развитие диабета 2-го типа продолжает интенсивно обсуждаться [83, 84].

ВЛИЯНИЕ НА СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ

Помимо упомянутых выше систем, на которые ВА может действовать на клеточном и молекулярном уровнях, важно также отметить ряд сигнальных каскадов, регулирующих клеточный ответ на различные стимулы, в частности сигнал-регулируемый киназный путь (ERK) [85]. Как было показано, ВА в терапевтических дозах снижал уровень фосфорилирования ERK1, JNK-1 и JNK-2 в гиппокампе крыс, который был повышен после введения декстроамфетамина, вызывающего у животных маниакальный тип поведения [86]. При этом введение ВА приводило к восстановлению нормального паттерна поведения животных. Поскольку этот киназный путь включает в себя ответ на множество сигнальных факторов и регулирует транскрипцию таких генов, как Elk1 и c-Fos, возможно, что эффект ВА может затрагивать процессы нейрогенеза, дендритной арборизации, выживания и пластичности нейронов [87].

С другой стороны, существует мнение, что ВА и литий способны активировать сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [88]. Хотя точный механизм этой активации остается неясным, исследование на простой биомедицинской модели *Dictyostelium discoideum* предполагает, что эффект ВА может осуществляться путем ингибирования протеинкиназы А [89].

Еще один фермент, на который может оказывать действие ВА, это киназа гликогенсинтазы GSK3, которая также была предложена в качестве мишени для лечения биполярного аффективного расстройства [90]. Действительно, исследование на мышцах с нокаутом гена GSK3 β или на мышцах дикого типа, получавших ингибиторы GSK3 β , показало снижение депрессии и маниакального поведения после введения ВА или лития [91]. В исследовании пациентов с острым маниакальным синдромом оценка уровня белка и киназной активности GSK3 до и после лечения стабилизаторами настроения и атипичными антипсихотиками показала, что литий, ВА и антипсихотики второго поколения оказывают ингибирующее фосфорилирование фермента [92]. Высказывается мнение, что ингибирование GSK3 под действием ВА происходит как прямо, так и косвенно [91], поскольку он может оказывать влияние не только непосредственно на сами молекулы ферментов, но также путем изменения уровня экспрессии их генов.

ВАЛЬПРОАТ КАК МОДУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Учитывая накопленный опыт о том, что требуется около 10 дней приема ВА, чтобы его эффект был ощутимым, а также длительность его действия после отмены приема препарата, неизбежно возникло предположение, что механизм его действия включает в себя не только острые и краткосрочные биохимические эффекты,

но и изменения на геномном уровне [93]. Как было показано в многочисленных исследованиях, ВА действительно изменяет экспрессию большого числа генов [94–96]. При этом описываемые эффекты ВА показывают как разнонаправленный характер регуляции экспрессии [93] и его зависимость от возраста и пола животных [94], так и его положительный или негативный эффект на организм в зависимости от используемой экспериментальной модели [95, 96]. В частности, пренатальное введение ВА часто используется для создания животных моделей аутизма [43, 97, 98]. С другой стороны, введение ВА также повышает нейропластичность и способно вновь “открыть” критический период обучения [99]. Обучение в такие “критические” периоды онтогенеза облегчает овладение определенными навыками. Примерами таких навыков являются изучение языка и развитие абсолютного слуха [99]. По-видимому, это свойство ВА обусловлено его способностью повышать экспрессию генов, кодирующих нейротрофины BDNF и GDNF, играющие важную роль в нейрогенезе [100].

Одним из основных механизмов действия ВА на уровне генома является его способность изменять компактизацию хроматина и изменять доступность промоторов генов для транскрипционных факторов [101]. При этом ВА выступает в качестве ингибитора деацетилаз гистонов [11–13], а также активирует процессы деметилирования ДНК [102, 103]. Более того, есть данные, что ВА индуцирует протеасомальную деградацию белка DICER — важного регулятора продукции микро-РНК. Однако поскольку под действием ВА наблюдается увеличение содержания ряда микро-РНК, это указывает на повышение экспрессии их генов-мишеней еще до деградации DICER [104]. Учитывая такой широкий спектр действия ВА неудивительно, что часто встает вопрос о его тератогенных свойствах [105].

Среди транскрипционных факторов, связывание которых с промоторами генов-мишеней регулируется под действием ВА, можно назвать белок-активатор 1 (AP-1) [106] и AICD [107], которые вовлечены в патогенез болезни Альцгеймера (БА). В связи с этим ВА рассматривался в качестве терапевтического средства для профилактики БА и деменции [108–110]. Кроме того, ВА рассматривается и как средство для восстановления функций мозга после травм [111] и при полиглутаминовых (polyQ) заболеваниях [112].

Ряд наших исследований показал, что введение ВА крысам, подвергнутым пренатальной гипоксии, усиливает экспрессию нейропептидазы неприлизина (далее НЕП), который регулирует действие широкого спектра нейропептидов, а также является одним из основных амилоид-деградирующих ферментов в ткани мозга [113]. Базальный уровень НЕП у животных гипоксической группы был ниже, и у них наблюдался когнитивный дефицит по сравнению с контрольными сверстниками. Внутривентрикулярное введение ВА гипоксическим животным приводило к повышению экспрессии как мРНК НЕП, так и самого белка до уровней у контрольных животных. Увеличение мРНК НЕП наблюдалось в энторинальной коре, теменной коре и гиппокампе, но не в дорсальном стриатуме и обонятельных луковицах, где экспрессия гена НЕП оставалась неизменно высокой. Примечательно, что после введения ВА у гипоксических крыс также восстанавливался дефицит обонятельной функции, что коррелирует с повышением экспрессии НЕП в соответствующих областях мозга и говорит о роли последнего в реализации обонятельной функции [114]. Активирующее действие ВА на экспрессию гена НЕП было ранее показано на культуре клеток нейробластомы человека NB7, где он выступал в качестве ингибитора деацетилаз гистонов [107], а позже в неокортексе и гиппокампе крыс, причем паттерн усиления экспрессии зависел от возраста животных [115]. В субстратный профиль неприлизина входят многие биологически активные пептиды, такие как субстанция Р, энкефалины, брадикинин, адреномедуллин и соматостатин, что говорит о способности этого фермента регулировать широкий

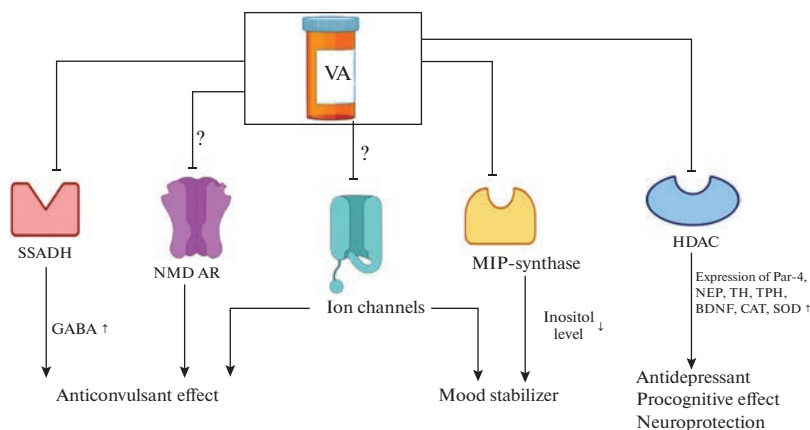


Рис. 2. Схема основных молекулярных механизмов действия вальпроевой кислоты и ее натриевой соли, лежащих в основе клинически значимых эффектов. Обозначения: VA — вальпроевая кислота; SSADH — дегидрогеназа янтарного полуальдегида; NMDAR — NMDA-рецептор глутамата; MIP-синтаза — миоинозитол-3-фосфат-синтаза; HDAC — деацетилазы гистонов; Par-4 — белок-супрессор опухолей; NEP — неврилизин; TH — тирозингидроксилаза; TPH — триптофангидроксилаза; BDNF — нейротрофический фактор головного мозга; CAT — каталаза; SOD — супероксиддисмутаза. Вопросительные знаки отмечают те мишени, на которые влияние ВА изучено недостаточно подробно.

спектр физиологических реакций [116]. Способность НЕП также расщеплять амилоидный пептид Aβ делает его перспективной мишенью для профилактики развития БА [117, 118]. Поскольку экспрессия НЕП снижается с возрастом, при ишемии, воздействии пренатальной гипоксии и других патологических состояниях, это располагает к накоплению в ткани мозга Aβ, а способность ВА повышать экспрессию НЕП позволяет предположить, что он может препятствовать накоплению Aβ и, тем самым, снижать риск развития амилоидогенеза и связанных с ним патологических процессов, характерных для БА.

Еще одним интригующим свойством ВА и его производных является способность подавлять активность вируса герпеса (*Herpes simplex viruses*), который вызывает существенные хронические нарушения в нервной системе [119]. Более того, относительно недавно ВА стал вызывать интерес исследователей в плане его влияния на клетки иммунной системы и противовоспалительных свойств [120]. Все эти исследования существенно расширяют наши представления о терапевтическом потенциале ВА и продолжают вызывать интерес к изучению его свойств и механизмов действия на молекулярные системы мозга и организма в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента своего “переоткрытия” и внедрения в клиническую практику вальпроевая кислота и ее натриевая соль активно использовались в качестве средства против эпилепсии и маниакально-депрессивного психоза, более известного как биполярное аффективное расстройство, а к сегодняшнему дню ВА продемонстрировал важное значение как ингибитор деацетилаз гистонов и регулятор экспрессии генов, что расширяет область применения данного соединения (рис. 2). За все время изучения ВА было предложено много механизмов, объясняющих его способности купировать эпилептические судороги и облегчать состояние пациентов с биполярным аффективным расстройством: первое свойство ВА чаще всего ассоциируют с

угнетением глутаматергической и усилением ГАМКергической трансдукции; вторую способность связывают с влиянием ВА на метаболизм фосфоинозитидов в нейронах ЦНС. Примечательно то, что среди перечисленных механизмов действия ВА в научном сообществе не вызывает сомнений лишь его влияние на метаболизм ГАМК и производных инозитола. Механизм потенциального блокирования ионотропных NMDA-рецепторов глутаминовой кислоты и роль этого процесса в реализации антиконвульсантного действия ВА требуют дальнейшего прояснения. Неизвестным остается и возможное взаимодействие ВА с метаботропными рецепторами глутамата.

Также неоднократно поднималась тема взаимодействия ВА с ионными каналами, воздействие на которые могло бы объяснить сразу и противосудорожную, и нормотимическую активность ВА, однако имеющиеся противоречивые данные препятствуют возникновению единого мнения на этот счет.

Способность ВА усиливать экспрессию большого числа генов путем ингибирования деацетилаз гистонов также лежит в основе его антидепрессивного, нейропротекторного и прокогнитивного действия, однако стоит помнить, что такая неселективная активация экспрессии генов может негативно сказаться на состоянии пациентов, особенно в долгосрочной перспективе. Длительное вмешательство в эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов приводит к непредсказуемым эффектам, которые могут выразиться в соматических, психических и поведенческих нарушениях.

Дальнейшие работы, посвященные углубленному анализу регуляторных свойств ВА, несомненно, помогут пролить свет на истинные процессы, лежащие в основе его противосудорожного, антиманиакального, а также нейропротекторного эффектов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Госзадания (075-00408-21-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование обзора – А.Н.Т., написание и редактирование манускрипта – А.Н.Т., Д.В.С., Н.Н.Н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burton BS* (1882) On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Am Chem J* 3: 385–395.
2. *Tomson T, Battino D, Perucca E* (2016) The remarkable story of valproic acid. *Lancet Neurol* 15: 141. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00398-1)
3. *Bialer M, Yagen B* (2007) Valproic Acid: Second Generation. *Neurotherapeutics* 4: 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.11.007>
4. *Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM.* (2013) Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev* 65: 105–142. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005512>
5. *Shahien R, Saleh SA, Bowirrat A* (2011) Intravenous sodium valproate aborts migraine headaches rapidly. *Acta Neurol Scand* 123: 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2010.01394.x>
6. *Rosenberg G* (2007) The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci* 64: 2090–2103. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7079-x>
7. *Lima IVA, Almeida-Santos AF, Ferreira-Vieira TH, Aguiar DC, Ribeiro FM, Campos AC, de Oliveira ACP* (2017) Antidepressant-like effect of valproic acid-Possible involvement of

- PI3K/Akt/mTOR pathway. *Behav Brain Res* 329: 166–171.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.015>
8. Tomson T, Battino D, Perucca E (2016) Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol* 15: 210–218.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)00314-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)00314-2)
 9. Hirsch E, Genton P (2003) Antiepileptic Drug-Induced Pharmacodynamic Aggravation of Seizures. *CNS Drugs* 17: 633–640.
<https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00003>
 10. Gayatri NA, Livingston JH (2006) Aggravation of epilepsy by anti-epileptic drugs. *Dev Med Child Neurol* 48: 394–398.
<https://doi.org/10.1017/S0012162206000843>
 11. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pellicci PG, Heinzel T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969–6978.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
 12. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734–36741.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
 13. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2009) Sodium valproate: an old drug with new roles. *Trends Pharmacol Sci* 30: 509–514.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.002>
 14. Methaneethorn J (2018) A systematic review of population pharmacokinetics of valproic acid. *Br J Clin Pharmacol* 84: 816–834.
<https://doi.org/10.1111/bcp.13510>
 15. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, Altman RB, Klein TE (2013) Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 23: 236–241.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>
 16. Löscher W, Vetter M (1984) Relationship between drug-induced increases of GABA levels in discrete brain areas and different pharmacological effects in rats. *Biochem Pharmacol* 33: 1907–1914.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90546-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90546-x)
 17. Bolanos JP, Medina JM (1993) Evidence of stimulation of the γ -aminobutyric acid shunt by valproate and E- Δ^2 -valproate in neonatal rat brain. *Mol Pharmacol* 43: 487–490.
 18. Ueda Y, Willmore LJ (2000) Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by valproic acid in rat hippocampus during epileptogenesis. *Exp Brain Res* 133: 334–339.
<https://doi.org/10.1007/s002210000443>
 19. Hariton C, Ciesielski L, Simler S, Valli M, Jadot G, Gobaille S, Mesdjian E, Mandel P (1984) Distribution of sodium valproate and GABA metabolism in CNS of the rat. *Biopharm Drug Dispos* 5: 409–414.
<https://doi.org/10.1002/bdd.2510050412>
 20. Löscher W, Hönack D, Gramer M (1999) Effect of depth electrode implantation with or without subsequent kindling on GABA turnover in various rat brain regions. *Epilepsy Res* 37: 95–108.
[https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(99\)00038-8](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(99)00038-8)
 21. van der Laan JW, de Boer T, Bruinvels J (1979) D-n-propylacetate and GABA degradation. Preferential inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase and indirect inhibition of GABA-transaminase. *J Neurochem* 32: 1769–1780.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb02290.x>
 22. Whittle SR, Turner AJ (1982) Effects of anticonvulsants on the formation of gamma-hydroxybutyrate from gamma-aminobutyrate in rat brain. *J Neurochem* 38: 848–851.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb08710.x>
 23. Larsson OM, Gram L, Schusboe I, Schusboe A (1986) Differential effect of gamma-vinyl GABA and valproate on GABA-transaminase from cultured neurones and astrocytes. *Neuropharmacology* 25: 617–625.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90214-5](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90214-5)
 24. Lee HHC, McGinty GE, Pearl PL, Rotenberg A (2022) Understanding the Molecular Mechanisms of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency (SSADHD): Towards the Development of SSADH-Targeted Medicine. *Int J Mol Sci* 23: 2606.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052606>
 25. Löscher W (1999) Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* 58: 31–59.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00075-6](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00075-6)
 26. Petroff OA, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Mattson RH (1999) Effects of valproate and other antiepileptic drugs on brain glutamate, glutamine, and GABA in patients with refractory com-

- plex partial seizures. *Seizure* 8: 120–127.
<https://doi.org/10.1053/seiz.1999.0267>
27. O'Donnell T, Rotzinger S, Ulrich M, Hanstock CC, Nakashima TT, Silverstone PH (2003) Effects of chronic lithium and sodium valproate on concentrations of brain amino acids. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 220–227.
[https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(03\)00070-1](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(03)00070-1)
 28. Romoli M, Mazzocchi P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, Verrotti A, Calabresi P, Costa C (2019) Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Curr Neuropharmacol* 17: 926–946.
<https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
 29. Johannessen CU, Johannessen SI (2003) Valproate: Past, Present, and Future. *CNS Drug Rev* 9: 199–216.
<https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x>
 30. Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H, Thyagarajan R, Mallon BS, Altar CA (2004). The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat fore-brain stem cells. *J Neurochem* 91: 238–251.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02725.x>
 31. Gao J, Luo Y, Lu Y, Wu X, Chen P, Zhang X, Han L, Qiu M, Shen W (2022) Epigenetic regulation of GABAergic differentiation in the developing brain. *Front Cell Neurosci* 23: 988732.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2022.988732>
 32. Kim JE, Kim DS, Kwak SE, Choi HC, Song HK, Choi SY, Kwon OS, Kim YI, Kang TC (2007) Anti-glutamatergic effect of riluzole: comparison with valproic acid. *Neuroscience* 147: 136–145.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.018>
 33. Zou X, Zhu Z, Guo Y, Zhang H, Liu Y, Cui Z, Ke Z, Jiang S, Tong Y, Wu Z, Mao Y, Chen L, Wang D (2022) Neural excitatory rebound induced by valproic acid may predict its inadequate control of seizures. *EBioMedicine* 83: 104218.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104218>
 34. Gobbi G, Janiri L (2006) Sodium- and magnesium-valproate in vivo modulate glutamatergic and GABAergic synapses in the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 185: 255–262.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0317-3>
 35. Ko GY, Brown-Crofts LM, Teyler TJ (1997) The effects of anticonvulsant drugs on NMDA-EPSP, AMPA-EPSP, and GABA-IPSP in the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 42: 297–302.
[https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(96\)00268-7](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(96)00268-7)
 36. Zeise ML, Kasparow S, Zieglgänsberger W (1991) Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex *in vitro*. *Brain Res* 544: 345–348.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90078-a](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90078-a)
 37. Gean PW, Huang CC, Hung CR, Tsai JJ (1994) Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices. *Brain Res Bull* 33: 333–336.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90202-x](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90202-x)
 38. Du J, Gray NA, Falke CA, Chen W, Yuan P, Szabo ST, Einat H, Manji HK (2004) Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci* 24: 6578–6589.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1258-04.2004>
 39. Gray NA, Du J, Falke CS, Yuan P, Manji HK (2003) Lithium Regulates Total and Synaptic Expression of the AMPA Glutamate Receptor GluR2 *in Vitro* and *in Vivo*. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 402–404.
<https://doi.org/10.1196/annals.1300.036>
 40. Du J, Quiroz J, Yuan P, Zarate C, Manji H (2004) Bipolar disorder: involvement of signaling cascades and AMPA receptor trafficking at synapses. *Neuron Glia Biol* 1: 231–243.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X05000098>
 41. Mehta MV, Gandal MJ, Siegel SJ (2011) mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *PLoS One* 6: e26077.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026077>
 42. Wu HF, Lu TY, Chu MC, Chen PS, Lee CW, Lin HC (2020) Targeting the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorate the endocannabinoid-mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism. *Neuropharmacology* 162: 107736.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107736>
 43. Kuo HY, Liu FC (2018) Molecular pathology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder-like phenotypes using rodent models. *Front Cell Neurosci* 12: 422.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00422>
 44. Basselin M, Chang L, Chen M, Bell JM, Rapoport SI (2008) Chronic administration of valproic acid reduces brain NMDA signaling via arachidonic acid in unanesthetized rats. *Neurochem Res* 33: 2229–2240.
<https://doi.org/10.1007/s11064-008-9700-2>

45. Chateavieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2010) Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010: 479364.
<https://doi.org/10.1155/2010/479364>
46. Shaltiel G, Shamir J, Ding D, Dalton E, Bialer M, Harwood AJ, Belmaker RH, Greenberg ML, Agam G (2004) Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biol Psychiatry* 56: 868–874.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.027>
47. Vaden DL, Ding D, Peterson B, Greenberg ML (2001) Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis. *J Biol Chem* 276: 15466–15471.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M004179200>
48. Ju S, Shaltiel G, Shamir A, Agam G, Greenberg ML (2004) Human 1-D-myo-Inositol-3-phosphate Synthase Is Functional in Yeast. *J Biol Chem* 279: 21759–21765.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312078200>
49. Murray M, Greenberg ML (2000) Expression of yeast INM1 encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. *Mol Microbiol* 36: 651–661.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01886.x>
50. Berridge MJ (2016) The Inositol Triphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev* 96: 1261–1296.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
51. Silverstone PH, McGrath BM, Kim H (2005) Bipolar disorder and myo-inositol: a review of the magnetic resonance spectroscopy findings. *Bipolar Disord* 7: 1–10.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2004.00174.x>
52. Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ (2002) A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417: 292–295.
<https://doi.org/10.1038/417292a>
53. Eickholt BJ, Towers GJ, Ryves WJ, Eikel D, Adley K, Ylinen LM, Chadborn NH, Harwood AJ, Nau H, Williams RS (2005) Effects of valproic acid derivatives on inositol triphosphate depletion, teratogenicity, glycogen synthase kinase-3 β inhibition, and viral replication: a screening approach for new bipolar disorder drugs derived from the valproic acid core structure. *Mol Pharmacol* 67: 1426–1433.
<https://doi.org/10.1124/mol.104.009308>
54. Cheng L, Lumb M, Polgár L, Mudge AW (2005) How can the mood stabilizer VPA limit both mania and depression? *Mol Cell Neurosci* 29: 155–161.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.12.003>
55. Wolfson M, Bersudsky Y, Zinger E, Simkin M, Belmaker RH, Hertz L (2000) Chronic treatment of human astrocytoma cells with lithium, carbamazepine or valproic acid decreases inositol uptake at high inositol concentrations but increases it at low inositol concentrations. *Brain Res* 855: 158–161.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02371-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02371-9)
56. Yu W, Greenberg ML (2016) Inositol depletion, GSK3 inhibition and bipolar disorder. *Future Neurol* 11: 135–148.
<https://doi.org/10.2217/fnl-2016-0003>
57. Boku S, Nakagawa S, Toda H, Hishimoto A (2018) Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 3–12.
<https://doi.org/10.1111/pcn.1260445>
58. Meshki Baf MH, Subhash MN, Lakshmana KM, Rao BS (1994) Sodium valproate induced alterations in monoamine levels in different regions of the rat brain. *Neurochem Int* 24: 67–72.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)90130-9)
59. Fisar Z, Hroudová J, Raboch J (2010) Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett* 31: 645–656. PMID: 21200377
60. Wu JB, Shih JC (2011) Valproic acid induces monoamine oxidase A via Akt/Forkhead box O1 activation. *Mol Pharmacol* 80: 714–723.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.072744>
61. Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N (2002) Increased Monoamine Concentration in the Brain and Blood of Fetal Thalidomide- and Valproic Acid-Exposed Rat: Putative Animal Models for Autism. *Pediatr Res* 52: 576–579.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200210000-00018>
62. Qiu HM, Yang JX, Jiang XH, Hu XY, Liu D, Zhou QX (2015) Enhancing tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase expression and improving oxidative stress involved in the antidepressant effect of sodium valproate on rats undergoing chronic unpredicted stress. *Neuroreport* 26: 1145–1150.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000482>
63. Sands SA, Guerra V, Morilak DA (2000) Changes in tyrosine hydroxylase mRNA expression in the rat locus coeruleus following acute or chronic treatment with valproic acid. *Neuropsychopharmacol* 21: 1145–1150.

- pharmacology 22: 27–35.
[https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00072-X)
64. Lee S, Jeong J, Park YU, Kwak Y, Lee SA, Lee H, Son H, Park SK (2012) Valproate alters dopamine signaling in association with induction of Par-4 protein expression. *PLoS One* 7: e45618.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045618>
65. Park SK, Nguyen MD, Fischer A, Luke MP, Affarel B, Dieffenbach PB, Tseng HC, Shi Y, Tsai LH (2005) Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* 122: 275–287.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.031>
66. Glantz LA, Gilmore JH, Overstreet DH, Salimi K, Lieberman JA, Jarskog LF (2010) Pro-apoptotic Par-4 and dopamine D2 receptor in temporal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophr Res* 118: 292–299.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.12.027>
67. Large CH, Kalinichev M, Lucas A, Carignani C, Bradford A, Garbati N, Sartori Austin NE, Ruffo A, Jones DNC, Alvaro G, Read KD (2009) The relationship between sodium channel inhibition and anticonvulsant activity in a model of generalised seizure in the rat. *Epilepsy Res* 85: 96–106.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.02.018>
68. Zannata G, Sula A, Miles AJ, Ng LCT, Torella R, Pryde DC, DeCaen PG, Wallace BA (2019) Valproic acid interactions with the NavMs voltage-gated sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 26549–26554.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1909696116>
69. Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 9: 413–424.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70059-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70059-4)
70. Yamamoto R, Yanagita T, Kobayashi H, Yokoo H, Wada A (1997) Up-regulation of sodium channel subunit mRNAs and their cell surface expression by antiepileptic valproic acid: activation of calcium channel and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 68: 1655–1662.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68041655.x>
71. Albus H, Williamson R (1998) Electrophysiologic analysis of the actions of valproate on pyramidal neurons in the rat hippocampal slice. *Epilepsia* 39: 124–139.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01350.x>
72. Bagnéris C, DeCaen PG, Naylor CE, Pryde DC, Nobeli I, Clapham DE, Wallace BA (2014) Prokaryotic NavMs channel as a structural and functional model for eukaryotic sodium channel antagonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 8428–8433.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1406855111>
73. Kelly KM, Gross RA, Macdonald RL (1990) Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neurosci Lett* 116: 233–238.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90416-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90416-7)
74. Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA (1989) Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann Neurol* 25: 582–593.
<https://doi.org/10.1002/ana.410250610>
75. Tan NN, Tang HL, Lin GW, Chen YH, Lu P, Li HJ, Gao MM, Zhao QH, Yi YH, Liao WP, Long YS (2017) Epigenetic Downregulation of Scn3a Expression by Valproate: a Possible Role in Its Anticonvulsant Activity. *Mol Neurobiol* 54: 2831–2842.
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9871-9>
76. Tseng PT, Chen YW, Chung W, Tu KY, Wang HY, Wu CK, Lin PY (2016) Significant Effect of Valproate Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia: A Meta-analysis Study. *Medicine (Baltimore)* 95: e2475.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002475>
77. Nayak R, Rosh I, Kustanovich I, Stern S (2021) Mood Stabilizers in Psychiatric Disorders and Mechanisms Learnt from In Vitro Model Systems. *Int J Mol Sci* 22: 9315.
<https://doi.org/10.3390/ijms22179315>
78. Qiu HM, Yang JX, Jiang XH, Hu XY, Liu D, Zhou QX (2015) Enhancing tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase expression and improving oxidative stress involved in the antidepressant effect of sodium valproate on rats undergoing chronic unpredicted stress. *Neuroreport* 26: 1145–1150.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000482>
79. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 676–692.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.004>
80. Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L, Romero-Toledo A, Sampieri A 3rd, Ortega-Cuellar D, Montesinos-Correa H, Florian-Sánchez E, Carmona-Aparicio L (2013) Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models. *Oxid Med Cell*

- Longev 2013: 598493.
<https://doi.org/10.1155/2013/598493>
81. Beltrán-Sarmiento E, Arregoitia-Sarabia CK, Floriano-Sánchez E, Sandoval-Pacheco R, Galván-Hernández DE, Coballase-Urrutia E, Carmona-Aparicio L, Ramos-Reyna E, Rodríguez-Silverio J, Cárdenas-Rodríguez N (2018) Effects of Valproate Monotherapy on the Oxidant-Antioxidant Status in Mexican Epileptic Children: A Longitudinal Study. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 7954371.
<https://doi.org/10.1155/2018/7954371>
 82. Akindele AJ, Otuguor E, Singh D, Ota D, Benebo AS (2015) Hypoglycemic, antilipidemic and antioxidant effects of valproic acid in alloxan-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 762: 174–183.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.044>
 83. Khan S, Kumar S, Jena G (2016) Valproic acid reduces insulin-resistance, fat deposition and FOXO1-mediated gluconeogenesis in type-2 diabetic rat. *Biochimie* 125: 42–52.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.014>
 84. Rakitin A (2017) Does Valproic Acid Have Potential in the Treatment of Diabetes Mellitus? *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 147.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00147>
 85. Bourin M (2020) Mechanism of Action of Valproic Acid and Its Derivatives. *SOJ Pharm Sci* 7: 1–4.
<https://doi.org/10.15226/2374-6866/7/1/00199>
 86. Valvasori SS, Gava FF, Dal-Pont GC, Simoes HL, Damiani-Neves M, Andersen ML, Boeck CR, Quevedo J (2019) Effects of lithium and valproate on ERK/JNK signaling pathway in an animal model of mania induced by amphetamine. *Heliyon* 5: e01541.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01541>
 87. Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, Gould TD, Manji HK, Chen G (2004) Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci* 24: 6590–6599.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5747-03.2004>
 88. Lee JG, Woo YS, Park SW, Seog DH, Seo MK, Bahk WM (2022) Neuromolecular Etiology of Bipolar Disorder: Possible Therapeutic Targets of Mood Stabilizers. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 20: 228–239.
<https://doi.org/10.9758/cpn.2022.20.2.228>
 89. Boeckeler K, Adley K, Xu X, Jenkins A, Jin T, Williams RS (2006) The neuroprotective agent, valproic acid, regulates the mitogen-activated protein kinase pathway through modulation of protein kinase A signaling in Dictyostelium discoideum. *Eur J Cell Biol* 85: 1047–1057.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.013>
 90. Muneer A (2017) Wnt and GSK3 Signaling Pathways in Bipolar Disorder: Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 15: 100–114.
<https://doi.org/10.9758/cpn.2017.15.2.100>
 91. Jonathan RW, Dalton EC, Harwood AJ, Williams RS (2005) GSK-3 activity in neocortical cells is inhibited by lithium but not carbamazepine or valproic acid. *Bipolar Disord* 7: 260–265.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2005.00194.x>
 92. Li X, Liu M, Cai Z, Wang G, Li X (2010) Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. *Bipolar Disord* 12: 741–752.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2010.00866.x>
 93. Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M (2009) Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res* 65: 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.05.002>
 94. Kim SA, Jang EH, Lee J, Cho SH (2023) Neonatal Exposure to Valproate Induces Long-Term Alterations in Steroid Hormone Levels in the Brain Cortex of Prepubertal Rats. *Int J Mol Sci* 24: 6681.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076681>
 95. Felisbino MB, Ziemann M, Khurana I, Okabe J, Al-Hasani K, Maxwell S, Hari Krishnan KN, de Oliveira CBM, Mello MLS, El-Osta A (2021) Valproic acid influences the expression of genes implicated with hyperglycaemia-induced complement and coagulation pathways. *Sci Rep* 11: 2163.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81794-4>
 96. Guerra M, Medici V, Weatheritt R, Corvino V, Palacios D, Geloso MC, Farini D, Sette C (2023) Fetal exposure to valproic acid dysregulates the expression of autism-linked genes in the developing cerebellum. *Transl Psychiatry* 13: 114.
<https://doi.org/10.1038/s41398-023-02391-9>
 97. Arafat EA, Shabaan DA (2019) The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid:

- Animal model of autism. *Acta Histochem* 121: 841–851.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.08.002>
98. *Chen J, Lei L, Tian L, Hou F, Roper C, Ge X, Zhao Y, Chen Y, Dong Q, Tanguay RL, Huang C* (2018) Developmental and behavioral alterations in zebrafish embryonically exposed to valproic acid (VPA): An aquatic model for autism. *Neurotoxicol Teratol* 66: 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.01.002>
99. *Gervain J, Vines BW, Chen LM, Seo RJ, Hensch TK, Werker JF, Young AH* (2013) Valproate reopens critical-period learning of absolute pitch. *Front Syst Neurosci* 27: 102.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00102>
100. *Chen PS, Peng GS, Li G, Yang S, Wu X, Wang CC, Wilson B, Lu RB, Gean PW, Chuang DM, Hong JS* (2006) Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry* 11: 1116–1125.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001893>
101. *Mello MLS* (2021) Sodium Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Front Cell Dev Biol* 9: 645518.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645518>
102. *Veronezi GM, Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML, Vidal BC* (2017) DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS One* 12: e0170740.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170740>
103. *Detich N, Bovenzi V, Szyf M* (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278: 27586–27592.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M303740200>
104. *Zhang Z, Convertini P, Shen M, Xu X, Lemoine F, de la Grange P, Andres DA, Stamm S* (2013) Valproic acid causes proteasomal degradation of DICER and influences miRNA expression. *PLoS One* 8: e82895.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082895>
105. *Lloyd KA* (2013) A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience Horizons: Int J Stud Res* 6: hzt003.
<https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt003>
106. *Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK* (1999) Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 52–58.
[https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00303-9](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00303-9)
107. *Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ* (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10: 94–100.
<https://doi.org/10.1038/embor.2008.222>
108. *Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufienbiel M, Cai F, Zhang Z, Wei S, Sun X, Chen C-H, Zhou W, Wang K, Song W* (2008) Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 205: 2781–2789.
<https://doi.org/10.1084/jem.20081588>
109. *Appleby BS, Cummings JL* (2013) Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. *Curr Top Med Chem* 13: 2306–2327.
<https://doi.org/10.2174/15680266113136660162>
110. *Zhang C, Sun L, Sun H* (2022) Effects of magnesium valproate adjuvant therapy on patients with dementia: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 101: e29642.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029642>
111. *Lynch DG, Narayan RK, Li C* (2023) Multi-Mechanistic Approaches to the Treatment of Traumatic Brain Injury: A Review. *J Clin Med* 12: 2179.
<https://doi.org/10.3390/jcm12062179>
112. *Yi J, Zhang L, Tang B, Han W, Zhou Y, Chen Z, Jia D, Jiang H* (2013) Sodium Valproate Alleviates Neurodegeneration in SCA3/MJD via Suppressing Apoptosis and Rescuing the Hypoacetylation Levels of Histone H3 and H4. *PLoS One* 8: e54792.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054792>
113. *Nalivaeva NN, Zhuravin IA, Turner AJ* (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech Ageing Dev* 192: 111363.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111363>
114. *Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Zhuravin IA, Nalivaeva NN* (2021) Developmental Profile of Brain Neprilysin Expression Correlates with Olfactory Behaviour of Rats. *J Mol Neurosci* 71: 1772–1785.
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01786-3>
115. *Nalivaeva NN, Belyaev ND, Lewis DI, Pickles AR, Makova NZ, Bagrova DI, Dubrovskaya NM, Plesneva SA, Zhuravin IA, Turner AJ* (2012) Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J Mol Neurosci* 46: 569–577.
<https://doi.org/10.1007/s12031-011-9644-x>

116. *Наливаева НН, Васильев ДС, Дубровская НМ, Turner AJ, Журавин ИА* (2020) Роль неприлизина в синаптической пластичности и памяти. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106: 1191–1208. [*Nalivaeva NN, Vasiliev DS, Dubrovskaya NM, Turner AJ, Zhuravin IA* (2020) Role of Neprilysin in Synaptic Plasticity and Memory. *Russ J Physiol* 106: 1191–1208. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920100076>
117. *Marr RA, Hafez DM* (2014) Amyloid- β and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid- β clearance. *Front Aging Neurosci* 6: 187. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00187>
118. *Nalivaeva NN, Turner AJ* (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* 176: 3447–3463. <https://doi.org/10.1111/bph.14593>
119. *Andreu S, Ripa I, Bello-Morales R, López-Guerrero JA* (2020) Valproic Acid and Its Amidic Derivatives as New Antivirals against Alpha herpesviruses. *Viruses* 12: 1356. <https://doi.org/10.3390/v12121356>
120. *Soria-Castro R, Scholnik-Cabrera A, Rodríguez-López G, Campillo-Navarro M, Puebla-Ororio N, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Chacón-Salinas R, Chávez-Blanco AD* (2019) Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *J Immunol Res* 2019: 9678098. <https://doi.org/10.1155/2019/9678098>

Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions

A. N. Tursunov^a, D. S. Vasilyev^{b, *}, and N. N. Nalivaeva^{b, **}

^a*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

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

*e-mail: dvasilyev@bk.ru

**e-mail: natalia.nalivaeva@outlook.com

Valproic acid (valproate, VA) has been widely used as an antiepileptic agent for several decades, as well as in the treatment of bipolar affective disorder. For many years, the ability of VA to stop epileptic seizures of a different nature has been associated with increased GABAergic neurotransmission, inhibition of glutamatergic neurotransmission and a general decrease in CNS hyperactivity by acting on ion channels, however precise mechanisms of VA anticonvulsant effects are still not clear. Over time, the effects of VA on other neurotransmitter systems, enzymes and intracellular signalling pathways have been revealed, however they do not explain the effectiveness of the drug as an anticonvulsant and mood stabilizer, but only expand its pharmacological profile. Over the past 10 years, the focus of interest in valproate research has changed due to its ability to alter gene expression both by inhibiting histone deacetylases and by changing levels of DNA methylation. These new studies reveal alternative mechanisms of valproate action rather than trying to test and confirm hypotheses previously put forward.

Keywords: valproic acid, pharmacodynamics, epilepsy, depression, affective spectrum disorders, regulation of gene expression, histone deacetylase inhibition, neuroprotection

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**ОРГАНОФОСФАТ-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПАТОЛОГИЯ:
МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ, ПРИНЦИПЫ ТЕРАПИИ
И ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

© 2023 г. Н. В. Гончаров^{1, 2, *}, Д. А. Белинская², П. В. Авдонин³

¹*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,
г.п. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия*

²*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

³*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

*E-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

Органофосфаты (ОФ) — одни из наиболее распространенных ксенобиотиков нейротоксического действия. При остром отравлении ОФ в результате подавления активности синаптической ацетилхолинэстеразы (АХЭ) развивается холинергический синдром, который может трансформироваться в эпилептический статус. В течение нескольких суток после острого отравления может развиваться так называемый промежуточный синдром, который связан с продолжительным ингибированием АХЭ, десенситизацией никотиновых рецепторов, функциональной деградацией синапсов и мышечных волокон. Через 10–20 дней после однократного острого или неоднократного подострого отравления может развиваться ОФ-индуцированная отставленная полинейропатия (ОФИП) — нейродегенеративное заболевание, признаками которого являются атаксия, потеря функции дистальных отделов сенсорных и моторных аксонов периферических нервов. Возникновение нервно-психического расстройства, вызванное хроническим воздействием относительно малотоксичных фосфорорганических соединений (ХФР), обычно не связано с острым отравлением, среди симптомов — когнитивные расстройства, хроническая усталость и экстрапирамидные симптомы. Перечень возможных заболеваний или патологических состояний (синдромов), развивающихся в результате острого, подострого или хронического воздействия ОФ на организм человека, в последние годы расширился за счет ряда известных нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона, рассеянный склероз и др.). Старение организма в целом и старение мозга в частности рассмотрены в обзоре с точки зрения последствий отравления ОФ, которые могут служить неспецифическим триггером старения и связанных с ним нейродегенеративных заболеваний. Синдром Персидского залива не является следствием интоксикации ОФ, но также представляет интерес и рассмотрен в контексте именно ОФ-индуцированной патологии, поскольку его этиология и патогенез связаны с воздействием на организм ингибиторов холинэстераз. Кроме того, в обзоре представлены данные, свидетельствующие о важной роли эндотелия сосудов в развитии ОФ-индуцированной патологии; первые предположения были высказаны клиницистами в конце 1980-х, а первые экспериментальные данные были получены в начале 2000-х годов. Изложены принципы терапии острых отравлений с учетом экспериментальных данных последних лет. Представлены некоторые методы исследования ОФ в экспериментах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* с лабораторными животными, в том числе с применением ингибиторов карбоксил-

эстераз; важнейшей частью исследований *in vivo* был и остается поиск новых биомаркеров для оценки эффективности средств адъювантной и регенеративной терапии.

Ключевые слова: органофосфаты, холинэстераза, холинергический синдром, эпилептический статус, нейродегенеративные заболевания, старение, эндотелий

DOI: 10.31857/S0869813923100059, **EDN:** TCRKYL

ВВЕДЕНИЕ

Органофосфаты (ОФ, общее название для фосфорорганических соединений и фосфорорганических отравляющих веществ, ФОС и ФОВ соответственно) принадлежат к числу наиболее распространенных и опасных ксенобиотиков, обладающих нейротоксическим эффектом [1]. Случайные отравления загрязнителями окружающей среды, а также преднамеренные отравления, связанные с попытками суицида, ежегодно поражают миллионы людей во всем мире. ОФ весьма эффективны в борьбе с насекомыми-вредителями, однако, по некоторым оценкам, лишь 0.1% ОФ достигают целевого эффекта [2].

В настоящее время идентифицируют четыре состояния, обусловленные нейротоксическим действием органофосфатов: холинергический синдром (криз), промежуточный синдром, ОФ-индуцированная отставленная полинейропатия (ОФИП) и нервно-психическое расстройство, вызванное хроническим воздействием ФОС (ХФР) [3]. Однако существуют основания дополнить этот перечень как минимум синдромом войны в Заливе (Gulf War Illness, GWI), интерес к которому у зарубежных исследователей не только не угасает, но даже нарастает в последние годы: если за первые 10 лет исследований в базе PubMed зарегистрировано около 140 публикаций по теме GWI, то за один только 2022 г. их было около 60. Более того, появляется все больше сведений о возможности развития общеизвестных нейродегенеративных заболеваний в качестве варианта ОФ-индуцированной пато-

Список сокращений: 2-РАМ — пралидоксим; АЛТ — аланинаминотрансфераза; АФК — активные формы кислорода; АХЭ — ацетилхолинэстераза; БА — болезнь Альцгеймера; БАС — боковой амиотрофический склероз; БДН — болезнь двигательных нейронов; БП — болезнь Паркинсона; БХЭ — бутирилхолинэстераза; ВВ — внеклеточные везикулы; ГГТ — гамма-глутамилтранспептидаза; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ДАФ — диалкилфосфат ДЕК — дексмететомидин; ДнБФ — ди-*n*-бутилфосфат; ДФП — дифенилфосфат; КЭ — карбоксилэстераза; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ЛФХ — лизофосфатидилхолин; НПВП — нестероидные противовоспалительные препараты; ОП — ограничение питания; ОФ — органофосфаты; ОФИП — ОФ-индуцированная отставленная полинейропатия; ОФЭС — ОФ-индуцируемый эпистатус; ПАС — периферический анионный сайт ХЭ; РАС — расстройства аутистического спектра; РС — рассеянный склероз; СГБ — синдром Гийена–Барре; СДВГ — синдром дефицита внимания и гиперактивности; СРП — спонтанные рецидивирующие припадки; ФОВ — фосфорорганические отравляющие вещества; ФОС — фосфорорганические соединения; ХФР — нервно-психическое расстройство, вызванное хроническим воздействием ФОС; ХЭ — холинэстеразы; ЭЗЧ — деофеинизированный экстракт зеленого чая; ЭК — эндотелиальные клетки; эпистатус — эпилептический статус; APN — аминопептидаза N; АСТ — аспаратаминотрансфераза; ВВОЕР — бис(2-бутоксиэтил)фосфат; BDCIPP — бис(1,3-дихлор-2-пропил)фосфат; BDNF — мозговой нейротрофический фактор; CB [7] — кукурбит [7]урилы; CBDP — 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид; ChIP — иммунопреципитация хроматина; CICR — кальций-индуцированное высвобождение Ca²⁺; COX1 — циклооксигеназа-1; COX2 — циклооксигеназа-2; CPF — хлорпирифос; DFP — диизопротилфторфосфат; DICR — индуцируемое деполаризацией высвобождение Ca²⁺; EAAAT — транспортеры возбуждающих аминокислот (Excitatory Amino Acid Transporters); EDRF — эндотелий-зависимый фактор релаксации; EP2 — рецептор простагландина E2; FDA — управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США; GW — Персидский залив; GWI — синдромом войны в Заливе; H&E окрашивание — окрашивание гематоксилином и эозином; HDAC — деацетилаза гистонов; HDAC1 — гистондеацетилаза 1; LPS — липополисахариды; MFS — прорастание моховидных (мшистых) волокон; MNBP — моно-*n*-бутилфталат; nAChR — никотиновые рецепторы; NTE — нейропатическая эстераза; PB — пиридопигментин; PER — перметрин; PGC-1 α — коактиватор 1-альфа гамма-рецептора, активируемого пероксисомными пролифераторами; PGE2 — простагландин E2; PLB — фосфолипаза B; PON1 — параксоназа 1; PON2 — параксоназа 2; POX — параксон; PPAR — рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами; PYR — пиретроиды; QMP — хинонметиды; RyR — рианодинновый рецептор; α CM — альфа-циперметрин; λ CH — лямбда-цигалотрин.

логии. Многочисленные исследования показали, что воздействие ОФ как на людей, так и на животных может привести к абберациям в эмбриональном развитии, дефектам нейрокognитивных функций в раннем возрасте и существенному вкладу в развитие нейродегенеративных заболеваний у взрослых [2, 4–7].

Три из вышеперечисленных состояний ОФ-индуцированной патологии, так или иначе, зависят от тяжести острого отравления и степени проявления холинергического синдрома, поэтому во многих странах мира фармакологи уделяют особое внимание поиску эффективной терапии острых отравлений. Базовый антидотный комплекс предназначен, прежде всего, для выживания организма в догоспитальный период, но не предназначен для предотвращения развития оставленных эффектов острого отравления. Поиск препаратов, способных предотвратить повреждение мозга на поздних сроках после отравления ОФ — одна из наиболее важных и сложных проблем современной токсикологии. Этот поиск, однако, невозможен или малопродуктивен без понимания молекулярно-генетических и особенно молекулярно-клеточных механизмов развития патологии, т.к. последние являются своеобразным “знаменателем” фенотипа заболевания и во многом определяют общую направленность патогенеза.

ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Это наиболее известное и хорошо изученное состояние, которое регистрируется ежегодно по всему миру, но в первую очередь в слаборазвитых и развивающихся странах, где не очень строго следят за соблюдением правил безопасности при работе с фосфорорганическими пестицидами, и где довольно высокий уровень попыток суицида с применением ФОС. Смертность при острых отравлениях составляет не менее 15% [8, 9].

Клинические симптомы и диагностические критерии холинергического синдрома описаны во многих статьях и учебниках по токсикологии [3, 10]. Они связаны, прежде всего, с подавлением активности синаптической ацетилхолинэстеразы (АХЭ), последующим накоплением ацетилхолина и, как следствие, гиперактивацией никотиновых и мускариновых рецепторов. Основные симптомы — это миоз, потоотделение, ринорея, слезотечение и слюноотделение, спазмы кишечника, нарушения дыхания (кашель, одышка, хрипы), подергивания лицевых мышц и языка, тремор кистей и пальцев рук, фасцикуляции скелетных мышц, брадикардия, бледность и цианоз, тошнота, рвота, диарея, непроизвольное мочеиспускание и дефекация. Эти симптомы сопровождаются признаками поражения ЦНС, такими как головокружение и головная боль, спутанность сознания, дрожь, атаксия, усталость и парестезия. При более тяжелом отравлении возникают судороги, конвульсии, кома и дыхательная недостаточность. Если пациент выживает в течение первых суток после острого отравления, происходят изменения личности, перепады настроения, агрессивные действия и психотические эпизоды, включая шизоидные реакции, генерация параноидальных идей, обострения ранее существовавших проблем психологического характера. Резко нарушается качество сна из-за ночных кошмаров и галлюцинаций, ухудшается память и внимание. Смерть обычно наступает вследствие дыхательной недостаточности, возникающей в результате сочетания центральных и периферических эффектов, паралича дыхательных мышц и угнетения дыхательного центра [3, 10].

Одним из клинических проявлений и ближайших последствий острого отравления ОФ является эпилептический статус (status epilepticus, эпистатус). Это состояние, при котором эпилептические припадки следуют один за другим (обычно более 30 мин), и в промежутках между припадками больной не приходит в сознание. Радикальным отличием эпистатуса от единичного эпилептического припадка яв-

ляется неспособность организма к его купированию. Но почему холинергический криз стали чуть ли не отождествлять с эпистатусом? Дело в том, что при остром отравлении ОФ первичные судороги становятся нехолинергическими по своей природе, что может привести к периодическому возобновлению судорожной активности, по своим клиническим признакам напоминающей эпилептические припадки [11]. Ранняя фаза судорожной активности (холинергическая фаза токсикогенной стадии отравления, до 5 мин после начала приступа) сначала обретает смешанную холинергическую и нехолинергическую модуляцию (5–40 мин), а затем трансформируется в нехолинергическую фазу токсикогенной стадии отравления [12]. Нейропатология, вызванная судорогами, обусловлена прежде всего глутаматергической эксайтотоксичностью вследствие дисбаланса возбуждающих и тормозных механизмов ЦНС. Неконтролируемый эпистатус существенно повышает риск повреждения головного мозга даже при своевременном оказании медицинской помощи и без серьезных сопутствующих заболеваний [13, 14]. Прогноз становится более серьезным в случае массивной химической атаки, при сопутствующих травмах, заболеваниях и в отсутствие медицинской помощи [15, 16].

Общепринятой моделью эпистатуса *in vitro* является воздействие среды с низким содержанием магния на смешанную культуру нейронов и глиальных клеток гиппокампа. С использованием этой модели было показано, что поглощение Ca^{2+} эндоплазматическим ретикулом было значительно ингибировано в гомогенатах из культур, демонстрирующих электрофизиологические фенотипы судорог. Поглощение ионов Ca^{2+} обеспечивают в основном нейроны, но глиальное поглощение Ca^{2+} также было значительно ингибировано. При этом жизнеспособность нейронов, подвергшихся воздействию низкого содержания магния, не снижалась по сравнению с контрольными нейронами [17]. Выживаемость при ОФ-индуцируемом эпистатусе (ОФЭС) сопряжена с вероятной дисфункцией настроения и памяти, наряду со спонтанными рецидивирующими припадками (СРП) спустя длительное время после отравления. В эксперименте на крысах моделирование ОФЭС осуществляют с помощью различных ОФ, например, с применением параоксона (РОХ, 2 мг/кг, п/к), диизопропилфторфосфата (DFP, 4 мг/кг, п/к) или зарина (2 мг/кг, в/м), с последующим введением атропина и пралидоксима (2-РАМ) [18]. Через 1 ч после начала ОФЭС вводят мидазолам для стабилизации состояния. Примерно через 6 месяцев после ОФЭС оценивают СРП с помощью видео- и ЭЭГ-мониторинга, проводят гистопатологическое исследование с использованием гематоксилина и эозина (Н&Е), а окрашивание сульфидом серебра (метод Тимма) используют для оценки прорастания моховидных (мшистых) волокон (Mossy Fiber Sprouting, MFS). Хронические СРП развиваются у более чем 60% крыс, переживших ОФЭС. Окрашивание Н&Е выявило значительную потерю нейронов гиппокампа, тогда как окрашивание по Тимму позволило идентифицировать обширные области MFS в зубчатой извилине. Следовательно, ОФЭС обуславливает развитие хронической эпилепсии. Подобного рода модели на животных создают уникальную возможность для исследования механизмов развития хронических заболеваний в результате отравления ОФ, для проведения скрининга средств терапии с целью предотвращения развития последствий острого отравления [18].

Антидотная терапия при отравлении ОФ направлена на блокаду ацетилхолиновых рецепторов с помощью атропина, на реактивацию АХЭ с помощью оксимов (карбоксим, пралидоксим, HI-6, дипироксим, токсогонин, обидоксим и ряд других), а также на ослабление судорог с помощью агонистов бензодиазепиновых рецепторов (диазепам, мидазолам и др.) [19–22]. В больших дозах атропин обладает не только периферическим, но и центральным М-холинолитическим действием, а также существенно снижает высвобождение дофамина в ответ на введение ОФ [23].

Принцип реактивации заключается в разрушении химической связи между ОФ и АХЭ, в результате чего восстанавливается структура АХЭ и ее функция. Кроме того, реактиваторы АХЭ обладают Н-холинолитическими свойствами, что обосновывает их применение в сочетании с атропином [24].

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СИНДРОМ

Промежуточный синдром возникает с частотой от 7.7 до 84% в течение 1–4 сут после острого отравления ОФ [25], когда клинические признаки (симптомы) холинергического синдрома (миоз, фасцикуляции и т.д.) уже не проявляются. Это состояние является следствием поражения нервно-мышечных синапсов дыхательных мышц (диафрагма, межреберные мышцы), сгибателей шеи, отводящих мышц плеча и сгибателей бедер, однако его этиология и факторы риска все еще малопонятны. Дыхательная недостаточность является не только одним из клинических признаков промежуточного синдрома, но и основным фактором вероятного тана-тогенеза. На молекулярном и ультраструктурном уровне развитие промежуточного синдрома и сопряженной с ним миопатии связывают с продолжительным ингибированием АХЭ, десенситизацией и сниженной экспрессией никотиновых рецепторов, оксидативным стрессом, некрозом мышечных волокон [26]. Поражение синапсов и мышечных волокон обуславливает повышенный уровень в крови креатинкиназы и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Среди рисков возникновения промежуточного синдрома — задержка метаболизма ОФ, генетические предпосылки, тяжесть отравления, неадекватная терапия атропином и оксимами. Промежуточный синдром чаще возникает после отравления ФОС, имеющими структуру диметилфосфата (фентион, диметоат, монокротофос, дихлофос, метилпаратион), но также развивается после отравления этилпаратионом и метамидофосом (фосфорамидат) [3, 27]. Следует отметить, что практически нет сведений о возникновении промежуточного синдрома после отравления ФОВ [28]. Правильный диагноз промежуточного синдрома и своевременные терапевтические мероприятия позволяют предотвратить развитие дыхательной недостаточности и обеспечить выздоровление организма, свидетельством чего является последовательное восстановление функциональной активности мышц, иннервируемых черепно-мозговыми нервами, затем дыхательных мышц, проксимальных мышц конечностей и, в последнюю очередь, мышц-сгибателей шеи. Поскольку промежуточный синдром является одним из наиболее ранних последствий острого отравления и холинергического синдрома, терапевтические мероприятия профилактического характера во многом совпадают с терапией холинергического синдрома и включают в себя очистку желудочно-кишечного тракта, применение атропина и оксимов, а кроме того — респираторную поддержку продолжительностью от одной до трех недель после отравления при условии непрерывного мониторинга гемодинамики и кислотно-основного состояния [3, 27]. В то же время продолжительность искусственной вентиляции легких при остром отравлении ФОС может стать одним из факторов риска, определяющих заболеваемость и смертность, наряду с возрастом и тяжестью отравления [29]. Причиной тому является повышение уровня газовых микроэмбол и/или гипероксия: эти факторы обуславливают активацию эндотелиальных гидролаз и, как следствие, уменьшение толщины эндотелиального гликокаликса, что, в свою очередь, приводит к нарушению механотрансдукции, генерации оксида азота эндотелиальными клетками, повышению уровня активных форм кислорода (АФК) и проницаемости эндотелиального монослоя [30]. В организме человека в норме эндотелиальный слой гликокаликса удерживает до 1 литра плазмы крови (20%), мажорным белком которой является альбумин; эта пристеночная фракция плазмы имеет повышенное коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление, составляющее порядка 60% всего

онкотического давления плазмы крови [31]. Уменьшение гликокаликса приводит к уменьшению онкотического давления и гиповолемии, так что соответствующая компенсация могла бы стать одним из терапевтических факторов при остром отравлении ФОС с целью снижения риска смертельного исхода и предупреждения оставленной патологии. И действительно, описаны случаи успешного применения свежзамороженной плазмы при лечении промежуточного синдрома [32].

ОФ-ИНДУЦИРОВАННАЯ ОТСТАВЛЕННАЯ ПОЛИНЕЙРОПАТИЯ (ОФИП)

Полинейропатии развиваются в результате диффузного поражения периферических нервов — их аксонов (аксональные полинейропатии), миелиновой оболочки (демиелинизирующие полинейропатии) либо тел нейронов (нейронопатии). В основе патогенеза полинейропатий аксонального типа лежит генерализованное повреждение осевых цилиндров периферических нервов. Аксональная дегенерация (аксонопатия) — результат нарушения метаболизма нейрона вследствие недостаточной выработки энергии в митохондриях и/или нарушения аксонального транспорта. Миелиновая оболочка при аксонопатиях страдает вторично (вторичная демиелинизация). Миелин может повреждаться в результате ишемии нервов (поражение *vasa nervorum*), отложения токсичных для нерва веществ или иммунных комплексов в эндоневрии [33, 34]. ОФИП обычно проявляется через 10–20 дней после однократного острого отравления с выраженным холинергическим синдромом, после успешного проведения терапевтических мероприятий. Однако десятки тысяч случаев возникновения ОФИП в 1930 г. в США, в 1959 г. в Марокко, а также в разные годы в Румынии, Шри Ланке, Китае и бывшей Югославии связаны с неоднократным отравлением триортокрезилфосфатом в составе суррогатного алкоголя или продуктов питания без явных признаков холинергического синдрома [3]. ОФИП относится к нейродегенеративным заболеваниям, характерными признаками которого являются атаксия, потеря функции дистальных отделов сенсорных и моторных аксонов периферических нервов, а также восходящих и нисходящих путей спинного мозга. Диагностическим критерием ОФИП является замедление проводимости нервных волокон [35]. Ранними неврологическими симптомами обычно бывают острые, похожие на судороги боли в икроножных мышцах, покалывания в ногах и руках, сопровождаемые онемением дистальных отделов конечностей. Мышечный тонус конечностей постепенно нарастает, появляется спастичность в нижних конечностях. При депрессии сухожильных рефлексов возникает прогрессирующая слабость в ногах, пациенты теряют равновесие. Обследование выявляет дистальную симметричную, в основном моторную полинейропатию (хотя сенсорная компонента тоже присутствует) со слабостью мышц дистальных отделов нижних конечностей. При тяжелой форме ОФИП наблюдается квадриплегия с отвисанием стоп и запястий [36]. В менее серьезных случаях, при поражении преимущественно дистальных отделов и сохранением морфофункциональной целостности аксонов спинного мозга, наблюдается некоторое восстановление функций, но со временем появляются пирамидные знаки, свидетельствующие о поражении нейронов коры головного мозга. На молекулярном уровне пусковым механизмом, обуславливающим развитие ОФИП, считается ингибирование не менее 70% нейропатической эстеразы (neuropathy target esterase, NTE) — интегрального фермента мембран нейронов, позже идентифицированного как фосфолипаза В (PLB, лизофосфолипаза), физиологическим субстратом которого является лизолецитин (лизофосфатидилхолин) [37, 38]. Накопление лизолецитина в мембранах нейронов ведет к нарушению формирования нейритов (аксонов) и целостности уже существующих аксонов, т.к. NTE (PLB) участвует в антероградном транспорте макро-

молекул в дистальные участки аксона [39]. Подавление активности NTE связывают с нарушением баланса ионов кальция и активацией цистеиновых протеаз [40].

Однако для необратимого ингибирования NTE должна иметь место вторичная химическая реакция — деацилирование (т.н. “старение” фермента, aging) [41]. Ингибирование NTE само по себе не ответственно за дегенерацию аксонов, как это было продемонстрировано с ингибиторами иного химического строения (органофосфинаты, сульфонилфториды и карбаматы), которые также ковалентно взаимодействуют с NTE, но без последующего деацилирования [42].

Считается, что ингибирование NTE и ОФИП (OPIDN) способствует развитию нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых сопряжен с дегенерацией аксонов: это и болезнь Альцгеймера (БА), и болезнь Паркинсона (БП), и болезни двигательных нейронов (БДН), которые включают боковой амиотрофический склероз (БАС) и прогрессирующий бульбарный паралич [43]. Поскольку эти заболевания у людей в первую очередь связаны со старением, интересно отметить, что в экспериментальных моделях возрастные животные гораздо более восприимчивы к ОФИП (OPIDN) и гораздо хуже восстанавливаются после него по сравнению с молодыми [43]. Терапия ОФИП у людей исключительно симптоматическая, препараты для лечения острого отравления (атропин, оксимы, диазепам) неэффективны.

НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКОЕ РАССТРОЙСТВО И ДРУГИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ИНТОКСИКАЦИИ ОФ

Возникновение ХФР может быть не связано с острым отравлением ФОС и сопутствующим подавлением активности АХЭ [44]. Диагностические критерии ХФР весьма расплывчаты, так что это состояние вряд ли можно рассматривать как самостоятельную нозологическую единицу. Среди симптомов ХФР — когнитивные расстройства (ослабление памяти, ухудшение концентрации внимания, снижение скорости обработки информации), изменение настроения (беспокойство, депрессия, психотические симптомы, эмоциональный дисбаланс, частые мысли о суициде), хроническая усталость, периферическая нейропатия и экстрапирамидные симптомы (дистония, тремор в покое, брадикинезия, постуральная нестабильность, ригидность мышц лица) [3]. Депрессию и попытки суицида сельскохозяйственных рабочих, регулярно контактирующих с ФОС-пестицидами, связывают с нарушением баланса серотонина в ЦНС [45]. Воспалительные процессы и оксидативный стресс служат дежурным объяснением нейротоксических эффектов малых доз ОФ [46], последствием которых могут быть нейродегенеративные заболевания, такие как БП, БА, рассеянный склероз [47]. Попытки объяснить синдром войны в Персидском заливе хроническим отравлением ФОВ не увенчались особым успехом, в основном из-за отсутствия доказательств отравления пострадавших военнослужащих именно ФОВ, при наличии свидетельств другого рода — назначение военнослужащим с целью профилактики различных заболеваний множества препаратов, взаимодействие между которыми в организме человека не было изучено должным образом [48]. Более того, анализ литературных данных выявил отсутствие в принципе убедительных доказательств возникновения психических/когнитивных расстройств вследствие хронического отравления ОФ, безотносительно истории в Персидском заливе [49]. Это вовсе не означает, что таких заболеваний/расстройств нет и быть не может; такое состояние дел можно объяснить отсутствием общепринятой методологии поиска причинно-следственных связей в данной области медицины.

В связи с этим важно понимать следующее: четыре вышеописанных патологических состояния, возникающих вследствие отравления органофосфатами, являются как бы вершиной айсберга и не отражают всю палитру коморбидности и тем более полиморбидности, если учитывать множество факторов генетического, климати-

ческого, социального характера, связанных с конкретным человеком. Однократное острое, неоднократное подострое и хроническое отравление малыми дозами ОФ с той или иной долей вероятности обуславливают развитие как известных нейродегенеративных и психических заболеваний, так и малоизвестных, нозологическая принадлежность которых до конца не установлена [50]. К известным, помимо ОФИП, относятся деменция, синдром дефицита внимания и гиперактивности, БП, БАС, рассеянный склероз и ряд других [47, 51–53]. Патогенез этих заболеваний сопряжен с воспалительными процессами в ЦНС, периферических нервных волокнах и кровеносных сосудах [34, 46, 54]. Роль АФК в развитии нейродегенеративных заболеваний подчеркивается практически всеми, кто занимался изучением этого вопроса. Дифференцированные нейроны более чувствительны к токсическому действию ФОС и карбаматов вследствие усиленной индукции АФК и образования карбонилированных белков [55]. Исследование некоторых ОФ-индуцированных заболеваний (в частности БАС) позволило акцентировать внимание научной общественности на таких малоизвестных ферментах антиоксидантной защиты как параоксоназа 2 (PON2), роль которой состоит в разложении пероксида водорода в клетках [52]. Особое значение имеет активность PON2 в клетках эндотелия сосудов [56, 57]. Что касается более изученной параоксоназы 1 (PON1), из двух экзонных полиморфизмов (L55M и Q192R) и генетических вариантов в регионе промотора (C-108T) для оценки риска психических расстройств и нейродегенеративных заболеваний вследствие контакта с ОФ имеют значение исключительно экзонные полиморфизмы. Так, максимальная вероятность развития БП существует у носителей гомозиготных генотипов 192QQ и 55MM [58]. В то же время арилэстеразная активность PON1 значительно ниже у больных БА [59]. Помимо PON1, вероятность развития ОФ-индуцированной патологии определяют полиморфизмы таких ферментов как цитохром P450, глутатионтрансфераза и ацетилтрансфераза [60].

Синдром войны в Заливе

GWI — это хроническое многофакторное заболевание, проявляющееся различными симптомами, в числе которых усталость, депрессия, нарушения сна, дефицит памяти и концентрации внимания, мышечно-скелетная боль и желудочно-кишечные расстройства. Этим заболеванием страдает примерно треть ветеранов 1-й войны в Персидском заливе (the Gulf War, GW). Развитие GWI связано с химическим фактором, однако это не ФОВ (хотя такие предположения и основания для них были, см., например, дискуссии по этому вопросу в National Institutes of Health [61]), а результат совместного воздействия бромид пиридопиримидина (PB) и перметрина (PER), которые регулярно принимали участники боевых действий из состава коалиции в качестве профилактической меры против реального отравления ФОВ и чесотки/педикулеза соответственно [62]. Предложено несколько молекулярных механизмов, участвующих в патогенезе GWI: хроническое воспаление, митохондриальная дисфункция, оксидативный стресс, дисбаланс липидов, кальция, микробиоты кишечника, эпигенетические модификации [63]. С целью изучения патогенеза и разработки средств терапии разрабатывают экспериментальные симптоматические модели на грызунах. При одновременном введении мышам в течение десяти дней PER и PB вызывают симптомы, подобные тем, которые наблюдаются у ветеранов GWI [62]. Т.е. органофосфаты как будто “непричастны” к этиологии и патогенезу GWI. Однако эксперименты с применением ОФ позволили установить, что это не так, и, вероятно, любой ингибитор АХЭ при соответствующем режиме применения/воздействия может стать причинным фактором синдрома типа GWI.

В одной из экспериментальных моделей самцов крыс Sprague-Dawley подвергали воздействию DFP (0.5 мг/кг, подкожно в течение 5 дней). Через 6 мес. после воздействия крыс исследовали в поведенческих тестах, а нагруженные Fura-2AM изолированные нейроны гиппокампа использовали для оценки $[Ca^{2+}]_i$. У крыс, подвергшихся воздействию относительно низких доз DFP, наблюдали симптомы хронической депрессии и когнитивный дефицит, а в нейронах гиппокампа наблюдалось повышение концентрации $[Ca^{2+}]_i$ наряду со значительным увеличением числа нейронов, демонстрирующих эти повышения [64]. Такое устойчивое повышение уровня ионов кальция может активировать множественные сигнальные каскады и изменять экспрессию генов белков, участвующих в синаптической пластичности, и, возможно, лежать в основе повреждения нейронов и хронических заболеваний при GWI за счет нейровоспаления, оксидативного стресса и повреждения митохондрий в ЦНС. Ca^{2+} -гипотеза GWI предполагает, что устойчивое повышение уровня Ca^{2+} в нейронах служит молекулярным триггером патологической синаптической пластичности, которая позволила сохранить симптомы GWI [65]. Применение леветирацетама снижает повышенный уровень $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах и улучшает GWI-подобные поведенческие симптомы [66]. Кроме того, в результате введения субанестезирующих доз кетамина (3, 5 или 10 мг/кг, внутривенно) крысам, получавшим DFP, наблюдали значительное улучшение поведенческих реакций. R-кетамин оказался более сильным стереоизомером по сравнению с S-кетаминном [67].

Эпигенетические модификации хроматина (метилирование ДНК и ацетилирование гистонов) представляют собой регуляторные механизмы, которые могут адаптивно или неадекватно реагировать на токсические факторы. В гиппокампе отравленных крыс выявлено повышение уровня гистондеацетилазы 1 (HDAC1) наряду со значительным увеличением активности HDAC. Локус-специфическое исследование ChIP (иммунопреципитация хроматина) выявило снижение H3K9ac на промоторе IV мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в сочетании со значительным снижением белка BDNF. Применение ингибитора HDAC вальпроевой кислоты снижало активность HDAC и уменьшало время неподвижности отравленных крыс в тесте принудительного плавания [68].

Установлено, что патология GWI связана с дисбиозом кишечника. В исследованиях на животных моделях воздействие PB и PER приводило к аналогичным изменениям в микробиоме кишечника, что и у ветеранов GW [69]. Исследования с использованием моделей на животных также показали, что развитие заболевания может быть и усилено, и подавлено с помощью механизмов межклеточной коммуникации за счет внеклеточных везикул (ВВ), выделяемых кишечными бактериями и кишечным эпителием. Кроме того, некоторые полифенолы из числа нутрицевтиков (куркумин), способствуют уменьшению симптомов GWI в экспериментальных моделях [69].

Стресс, связанный с войной, также определяется как фактор патологии GWI. В одном из экспериментальных исследований изучалось влияние иммобилизационной стрессовой нагрузки крыс, получавших фенобарбитал, через три месяца после нагрузки. Выявлено ухудшение холинергических реакций гиппокампа на иммобилизационный стресс. Дополнительная иммунная нагрузка внутривенным введением липополисахарида (LPS) способствовала развитию дефицита памяти [70].

Применение повторных доз ОФ в экспериментальных моделях призвано имитировать профессиональные воздействия во взрослом возрасте. В типичном исследовании взрослым самцам крыс ежедневно в течение 21 дня вводили хлорпирифос (CPF) подкожно в дозах 1, 3, 5 или 10 мг/кг/сут. В зависимости от дозы ОФ, актив-

ность холинэстераз (ХЭ) ингибировалась на 60–80% в крови и примерно на 20–50% в гиппокампе через 2 суток после окончания воздействия. После 12-недельного периода отмечено полное восстановление активности ХЭ, однако наблюдалось дозозависимое усиление признаков, связанных с ангедонией (тест предпочтения сахарозы), тревогой (открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт) и поведенческим отчаянием (тест принудительного плавания).

Таким образом, в экспериментальных моделях установлены элементы причинно-следственных отношений между “профессиональным” воздействием ОФ и других ингибиторов АХЭ на взрослых крыс и развитием долгосрочных последствий, связанных с депрессией и повышенным риском хронического поведенческого дефицита [71].

Органофосфаты и нейродегенеративные заболевания

Экотоксиканты могут взаимодействовать с различными частями систем нейротрансмиссии млекопитающих и человека, что в случае острого воздействия обуславливает отравления разной степени тяжести, а при хроническом воздействии повышает риск отставленных последствий, в числе которых нейродегенеративные заболевания. Холинергическая система является мишенью антихолинэстеразных (ОФ и карбаматы) и неоникотиноидных (имидаклоприд и др.) пестицидов. Клинические исследования, подкрепленные экспериментами на животных моделях, демонстрируют нейротоксическое воздействие инсектицидов в период развития ЦНС, при этом развивающийся мозг особенно уязвим к действию инсектицидов. Более того, высокополиморфные системы детоксикации обуславливают широкую вариабельность индивидуальной восприимчивости к нейротоксическим эффектам [72]. Однократное острое, повторное подострое и хроническое воздействие ОФ обуславливает развитие различных нейродегенеративных и психических заболеваний, помимо вышеуказанных [50]. Среди них деменция, БАС, БП, синдром Гийена–Барре (СГБ), рассеянный склероз, синдром дефицита внимания и гиперактивности, аутизм [5, 47, 51–53, 73]. Остановимся подробнее на некоторых из них.

Органофосфаты, деменция и болезнь Альцгеймера. С 1990 по 2019 гг. заболеваемость и распространенность БА и других деменций увеличились на 148 и 161% соответственно [74]. Развитие БА происходит в значительной степени за счет хронического дефицита холинергической активности в базальных отделах переднего мозга, что во многом определяется повышением активности АХЭ (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8). Повышение активности ХЭ приводит к постепенному прекращению холинергической нейротрансмиссии и нарушению памяти и когнитивных функций [75, 76].

АХЭ и БХЭ имеют примерно 50% гомологии последовательностей, схожие третичные и четвертичные структуры, обладают каталитической триадой из трех аминокислот (серин, глутамат и гистидин), расположенной в глубине “ущелья” третичной структуры. Поначалу считалось, что БХЭ служит “резервом” для АХЭ в механизмах нейротрансмиссии, но постепенно пришло понимание того, что БХЭ позволяет людям и животным получать питательные вещества из растений, многие из которых токсичны, если их эндогенные сложные эфиры не будут своевременно гидролизваны в организме. Кроме того, выяснилось, что БХЭ гидролизует и в результате инактивирует ацил-грелин, пептидный гормон, влияющий не только на аппетит, но также на память и когнитивные функции мозга, процессы сна и бодрствования. Интересно, что повышение уровня БХЭ у мышей в эксперименте привело к снижению стресса и агрессии, наряду со снижением уровня грелина в плазме [77].

От БА страдают примерно 35 миллионов человек во всем мире [78]. Для данного обзора важно отметить, что избыток ацетилхолина в результате острого отравления ОФ может привести к функциональному дефициту нейронов базальных ядер переднего мозга, дефициту холинэргической регуляции и развитию БА, что требует применения ингибиторов холинэстераз уже в качестве терапевтических средств, повышающих уровень ацетилхолина.

Препаратами для лечения БА являются медленно связывающиеся ингибиторы АХЭ и антагонист NMDA-рецепторов мемантин [79, 80]. В настоящее время Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрены следующие препараты для терапии БА [81]: галантамин (Разадин®, 4aS,6R,8aS-5,6,9,10,11,12-гексагидро-3-метокси-11-метил-4aH-[1]бензофу-ро[3a,3,2-ef] [2]бензазепин-6-ол), ривастигмин (Exelon®, [3-((1S)-1-(диметиламино)этил]фенил]N-этил-N-метилкарбамат) и донепезил (Aricept®, 2-((1-бензилпи-перидин-4-ил)метил)-5,6-диметокси-2,3-дигидро-1H-инден-1-он). Первым препаратом-ингибитором ХЭ, одобренным FDA для лечения БА, стал в 1993 г. такрин (Cognex®, 1,2,3,4-тетрагидроакридин-9-амин), но его применение было ограничено коротким периодом полувыведения и признаками гепатотоксичности. Метаанализ эффективности ингибиторов холинэстеразы при БА показал, что донепезил, ривастигмин и галантамин дают относительно минимальные, но стабильные преимущества, включая улучшение когнитивных функций [82]. Донепезил и галантамин селективны в отношении холинэстераз ЦНС, но все три могут вызывать тошноту, диарею и другие нежелательные эффекты [82–86]. К сожалению, они практически не влияют на прогрессирование заболевания. Интересно, что по данным Tricco и соавт. [82], галантамин связан со снижением отношения шансов смерти, в то время как согласно базам данных фармаконадзора в США и Канаде отношение шансов смерти повышено при приеме ривастигмина [83].

Ряд исследований предполагают, что обе холинэстеразы играют некаталитическую “морфогенную” роль в развитии нервной системы позвоночных [87]. В связи с этим важно отметить, что в развитии и прогрессировании БА обе холинэстеразы также выполняют некаталитическую функцию: скопления бета-амилоида (A β) и нейрофибриллярных клубков обычно включают отложения АХЭ и БХЭ. Возможно, отложения ферментов являются компенсаторной реакцией на токсичность амилоида, в пользу этого свидетельствуют данные о том, что АХЭ способствует росту нейритов посредством адгезивных взаимодействий с внеклеточным матриксом [88]. Однако имеются сведения и о том, что холинэстеразы усиливают формирование амилоидных бляшек и развитие БА [89].

Установлено, что A β взаимодействует с периферическим анионным сайтом АХЭ [90], так что разработка фармпрепаратов должна быть сопряжена с поиском не классических конкурентных ингибиторов АХЭ, но аллостерических модуляторов или неконкурентных ингибиторов, взаимодействующих с периферическим анионным сайтом (ПАС) на поверхности фермента [91].

Из четырех ингибиторов холинэстераз, официально утвержденных в качестве средств терапии при БА (такрин, галантамин, ривастигмин и донепезил), первые три взаимодействуют с активным центром АХЭ [92], лишь донепезил может взаимодействовать с остатками ароматических кислот ПАС [93]. Интересно отметить, что холиномиметики антихолинэстеразного действия, применяемые при БА (в частности галантамин), могут быть более эффективными средствами профилактики при острых отравлениях высокотоксичными ОФ по сравнению со штатным средством профилактики – пиридостигмином [94].

При разработке новых препаратов – ингибиторов холинэстераз – важно минимизировать их взаимодействие с АХЭ нейромышечных синапсов. Таким образом, поиск более эффективных или многоцелевых ингибиторов ХЭ по-прежнему актуа-

лен. Поскольку этиология и патогенез нейродегенеративных заболеваний, в том числе БА, многофакторны, поэтому одной из стратегий лечения является разработка препаратов, способных воздействовать на несколько мишеней, связанных с патогенезом заболевания [95, 96].

Органофосфаты и болезнь Паркинсона. Этиология БП в основном обсуждается с точки зрения баланса между холинергической и дофаминергической нейротрансмиссией в стриатуме, поэтому многие исследователи предполагали возможную связь между воздействием ОФ и изменениями в центральной холинергической и дофаминергической активностях [97–103]. Эти предположения основаны на множестве случаев паркинсонизма, о которых сообщалось после острого, подострого или хронического воздействия ОФ [97–99, 102, 104–107]. Более того, риск развития БП был связан даже с проживанием в сельской местности из-за повышенной вероятности хронического воздействия пестицидов, в том числе ОФ [99]. Имеющиеся данные свидетельствуют о связи между хроническим воздействием ОФ-пестицидов и нейропсихологическими эффектами, особенно у лиц с определенным полиморфизмом PON1 [108]. Однако нет единого мнения о конкретных когнитивных расстройствах [1, 73].

Механизм(ы), посредством которых ОФ могут вызывать дегенерацию дофаминергических нейронов, во многом остаются непонятными, хотя были предложены оксидативный стресс, нейровоспаление, дефицит аксонального транспорта и аутоиммунные реакции [4, 109–111]. Например, CPF может ингибировать пролиферацию клеток, активировать пироптоз, повышать восприимчивость к оксидативному стрессу за счет повышения уровня miR-181 при даун-регуляции пути SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 в клетках нейробластомы SH-SY5Y [112]. Кроме того, воздействие CPF значительно повышает экспрессию проапоптотического медиатора Bbc3/Puma, связанного с внутренним путем апоптоза [113]. В культурах нейронов Bbc3–/– повышена экспрессия белка, связанного с аутофагией, что сопряжено со снижением CPF-индуцированных высокомолекулярных агрегатов α Syn и тау-иммунореактивных белков.

Еще одно направление работ – исследование влияния ОФ на микробиом и выяснение роли кишечной микробиоты при БП [114]. Так, хроническое потребление мышами диазинона с питьевой водой изменяет микробиом кишечника, функциональный метабеном и связанный с ним метаболический профиль [115]. Эффекты были более выражены у самцов мышей. Примеры наблюдаемых эффектов включают значительные изменения в родах бактерий, изменения содержания желчных кислот и резкое снижение уровня таурина [115]. В другом исследовании были выявлены специфические изменения в микробиоме кишечника, вызванные диазиноном, включая оксидативный стресс, метаболизм жирных кислот и углеводов, а также чувство кворума микроорганизмов [116]. При исследовании микробиома ротовой полости у сельскохозяйственных рабочих, контактирующих с ФОС-пестицидами, обнаружена связь между воздействием азинфос-метила и нарушением баланса среди семи распространенных у человека бактериальных таксонов, включая значимое снижение представителей рода *Streptococcus* [117]. В свете этих и других данных врачи (психиатры, неврологи, профпатологи), к которым обращаются пациенты с когнитивными нарушениями, обязательно должны выяснять и в целом учитывать вероятность отравления ФОС-пестицидами. Значение раннего выявления и диагностики БП и других нейродегенеративных заболеваний особенно важно для пациентов с легкими когнитивными нарушениями, которые обычно игнорируются в течение длительного времени [5].

Синдром дефицита внимания и гиперактивности. Все больше исследований посвящено изучению воздействия ксенобиотиков на организм детей в связи с нарастающим количеством больных с симптомами синдрома дефицита внимания и гиперактив-

ности (СДВГ). Исследование одновременного воздействия химических веществ разных классов, в т.ч. ФОС, на развитие СДВГ у детей с диагнозом расстройства аутистического спектра (РАС) показало наличие связи смеси метаболитов фталатов в моче, взвешенных по моно-*n*-бутилфталату (MNBП), моно-2-гептилфталату и монокарбоксизонилфталату с подшкалой гиперактивности, тогда как смесь фенолов/парабенов, нормированная (стандартизованная) по нескольким парабенам и бисфенолам, оказалась связана с подшкалой дефицита внимания. Однако по метаболитам ФОС такой связи не было выявлено [118].

Сравнительный анализ в моче метаболитов эндокринных разрушителей, или дизрапторов (акриламида, акролеина, нонилфенола, фталатов), фосфорорганических пестицидов, а также биомаркеров оксидативного стресса с точки зрения их способности индуцировать развитие СГДВ у детей показал повышенную восприимчивость детей к эндокринным дизрапторам, тогда как основной риск вследствие высокой вероятности контакта связан с фосфорорганическими пестицидами [119]. Более высокие гестационные концентрации диалкилфосфата (ДАФ) в моче беременных ассоциировались у подростков детей (7–12 лет) с поведением, характерным для СГДВ [120]. В другом исследовании выявлено увеличение вероятности развития СДВГ у детей дошкольного возраста при воздействии ОФ-ретардантов бис(2-бутоксизетил)фосфата (ВБОУЕР) и бис(1,3-дихлор-2-пропил)фосфата (ВДСІРР) на организм беременных матерей (по уровню дифенилфосфата (ДФП) и ди-*n*-бутилфосфата (ДнБФ) в моче на сроке беременности 17 недель) [121]. В то же время исследование 17-летних подростков, работающих с СРФ и пиретроидами (PYR) альфа-циперметрином (α СМ) и лямбда-цигалотрина (λ СН), не выявили взаимосвязи между воздействием СРФ и симптомами СДВГ, хотя α СМ такую взаимосвязь показал [122].

Таким образом, риск развития СДВГ у детей связан главным образом с воздействием ОФ на организм беременных матерей.

Боковой амиотрофический склероз. Известно, что БАС, одно из самых страшных нервно-мышечных заболеваний со смертельным исходом, возникает и развивается в результате взаимодействия генов и окружающей среды. Лишь около 10% всех заболеваний БАС имеют генетическую основу. Спектр факторов риска развития БАС достаточно широк и включает курение, свинец, пестициды, интенсивную физическую активность, травмы и электромагнитные поля, однако роль этих факторов в отдельности и совокупности очень слабо изучена [51].

БАС характеризуется прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, контролирующих произвольные движения. Лежащие в основе механизмы остаются неясными, что препятствует разработке эффективных методов терапии. ОФ — одни из главных факторов этиологии БАС, поскольку их воздействие связано с более высокой заболеваемостью БАС среди фермеров и ветеранов войны в Персидском заливе. Полиморфизм PON1, фермента, способного детоксицировать ОФ, может повысить индивидуальную уязвимость как по отношению к ОФ, так и к риску развития БАС. Воздействие высоких доз ОФ может вызвать не только ОФИП, но и БАС, клинические признаки этих заболеваний во многом совпадают и характеризуются аналогичными нарушениями двигательной активности и параличами [123]. Имеются сведения о роли эпигенетических модификаций (в частности, метилирование ДНК по сайтам CpG, близких к сайту начала транскрипции PON1) во взаимосвязях между полиморфизмом PON1 и IQ/поведением у детей, однако доказательств воздействия ФОС на эти изменения не получено [124]. К пестицидам, имеющим наибольшую положительную статистически значимую корреляцию с вероятностью развития БАС, относятся гербициды 2,4-D и глифосат, инсектициды карбарил и хлорпирифос [125]. Мета-анализ выявил шесть факторов, способствующих возникновению или усугубляющих прогрессирование БАС: это травма головы, фи-

зическая активность, поражение электрическим током, военная служба, пестициды и свинец. К факторам риска БАС на основании этого же мета-анализа не относятся цереброваскулярные заболевания, занятость в сельском хозяйстве, промышленности и сфере услуг, курение, прочие химические вещества и тяжелые металлы (за исключением пестицидов и свинца). Интересно отметить, что сахарный диабет 2-го типа оказался защитным фактором для БАС [126].

Синдром Гийена–Барре. Сообщалось также о случаях СГБ как следствие отсроченных токсических эффектов острого отравления ОФ [127]. В клинической диагностике выделяют 4 клинические формы СГБ: 1) острая воспалительная демиелинизирующая полирадикулоневропатия, 2) острая моторно-аксональная нейропатия, 3) острая сенсорно-моторная аксональная нейропатия и 4) вариант Миллера–Фишера, характеризующийся офтальмоплегией, атаксией и арефлексией, с небольшой мышечной слабостью [128]. Довольно эффективным средством терапии при разных формах СГБ, в том числе и при ОФ-индуцированном варианте, служит плазмаферез [127, 129].

Геронтогенез. По данным ВОЗ, доля людей старше 60 лет к 2050 г. достигнет 22% от общей численности населения мира. ОФ можно рассматривать как геронтогены, но не в генетическом смысле, а в токсиколого-экологическом. Старение биологических систем — неизбежный и необратимый процесс, однако не существует геронтогенов (в генетическом смысле), обладающих специфической эволюционной функцией, обуславливающей старение. Хотя старение и является некой общей причиной всех возрастных заболеваний, само по себе оно не может считаться болезнью. Такое понимание старения как процесса предполагает изменение подхода к воздействиям на организм: от разработки иллюзорных методов борьбы со старением к разработке реалистичных и практических методов поддержания здоровья на протяжении всей жизни. Проблемы со здоровьем, вызванные возрастом, для которых не существует других четко определенных причинных факторов, могут быть лучше решены, если сосредоточить внимание на механизмах здоровья и их поддержании, а не только на контроле и лечении заболеваний. Для этого необходимо определить набор измеримых, научно обоснованных и доказуемых параметров здоровья [130]. Старение является результатом несовершенства систем “обслуживания и ремонта”, которые приводят к постепенному сокращению “гомеодинамического пространства” человека. Одним из подходов к сложному аспекту старения с целью поддержания и/или улучшения здоровья является “физиологический гормезис”, представляющий собой мягкий стресс посредством физических, умственных и пищевых факторов (горметинов) [131].

Систематический подход к оценке геронтогенного риска факторов окружающей среды еще не разработан, равно как не определен эффективный биомаркер старения как инструмент для количественной оценки эффектов геронтогенного воздействия. Согласно современным представлениям, к основным эндогенным геронтогенным механизмам, участвующими в ускорении старения под воздействием окружающей среды, относятся вызванные стрессом воспалительные и оксидативные процессы, ведущие к нарушению регуляции анаболизма и катаболизма. К геронтогенам окружающей среды относят различные виды радиации, некоторые пестициды, тяжелые металлы, наркотики, нездоровый характер питания и малоподвижный образ жизни, а также психосоциальный стресс [132].

Геронтогены можно изучать через их влияние на “признаки старения” — девять физиологических признаков, которые возникают в стареющих клетках и тканях организма: (1) истощение стволовых клеток; (2) изменение межклеточной коммуникации; (3) геномная нестабильность; (4) сокращение теломер; (5) эпигенетические изменения; (6) утрата протеостаза; (7) нарушение регуляции восприятия питательных веществ; (8) митохондриальная дисфункция; и (9) старение клеток [133].

Для некоторых отдельных органов предложены дополнительные признаки старения, например, признаки старения мозга, которые, помимо вышеперечисленных, включают: (10) нарушение регуляции гомеостаза кальция в нейронах; (11) оксидативный стресс; (12) нарушение утилизации молекулярных отходов; (13) нарушение способности репарации ДНК; (14) активация глиальных клеток; и (15) нарушение передачи сигналов адаптивной реакции на стресс [134]. Таким образом, признаки старения могут быть полезным инструментом для оценки геронтогенного воздействия загрязнителей окружающей среды [135].

Старение мозга сопряжено с молекулярными и морфологическими изменениями, которые обуславливают поведенческие и когнитивные дисфункции. Возрастные изменения включают в себя атрофию мозга, потерю нейронов, амилоидные бляшки, цереброваскулярную амилоидную ангиопатию, минерализацию сосудов, нейрофибриллярные клубки, менингеальную костную метаплазию и накопление липофусцина [136]. Возрастные нейродегенеративные заболевания в той или иной степени сопряжены с нейрональным возбуждением с участием возбуждающих глутаматных рецепторов, а этот механизм, в свою очередь, тесно связан с реакцией на острое воздействие ОФ. Возбуждение, возникающее в результате стимуляции ионотропных рецепторов глутамата, запускает кальций-зависимые пути, которые могут стать причиной гибели нейронов. В особенности это относится к каинатным рецепторам глутамата: воздействие каината индуцирует снижение экспрессии митохондриальной Mn-супероксиддисмутазы (Mn-SOD) и разобщающего белка UCP-2, генерацию АФК и перекисное окисление липидов, окисление белков, нарушение гомеостаза глутатиона, высвобождение цитохрома C из митохондрий и расщепление каспазы-3, в конечном счете — апоптоз в нейронах во многих областях мозга, особенно в субрегионах гиппокампа CA1 и CA3, а также в воротах зубчатой извилины [137, 138]. Уязвимость нейронов гиппокампа связана с распределением и избирательной чувствительностью AMPA/каинатных рецепторов в мозге. Системное введение каината крысам приводит также к активации глиальных клеток и воспалительным реакциям, обычно наблюдаемым при нейродегенеративных заболеваниях. Среди этих изменений — накопление липофусцин-подобных веществ, процессинг белка-предшественника амилоида, изменение экспрессии тау-белка [137].

В модели каинатной эксайтотоксичности на крысах показано, что нутрицевтики могут подавлять уровень глутамата и связанную с ним эксайтотоксичность. Так, эупатилин, компонент китайской полыни *Artemisia argyi*, предотвращал повышение уровня глутамата и глутамат-генерирующего фермента глутаминазы, уменьшение количества транспортеров возбуждающих аминокислот (EAAT), снижение уровня белка GluN2A и увеличение белка GluN2B в коре мозга крыс, и в конечном счете препятствовал дегенерации нейронов. Этот эффект сопровождался модуляцией $[Ca^{2+}]_i$, ингибированием Ca^{2+} -каналов P/Q-типа, снижением Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования синапсина I [139]. Рилузол (блокатор тетродотоксин-чувствительных натриевых каналов, а также каинатных и NMDA-рецепторов) и другие аминотиазолы ослабляют острое повреждение нейронов гиппокампа после каинат-индуцированного эпистатуса [140].

Один из способов увеличения продолжительности жизни — ограничение питания (ОП; dietary restriction). В экспериментальной модели на нематодах *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) исследовали накопление липофусцина как маркера старения и двигательные способности этого вида круглых червей как показатель скорости деградации мышц [141]. Ориентируясь на эти маркеры, ОП увеличивало как продолжительность жизни, так и здоровье *C. elegans*, т.е. способствовало более здоровому старению.

Эти исследования показывают, что эксайтотоксичность, индуцированная каиноматом, может быть использована в качестве модели для выяснения механизмов, лежащих в основе оксидативного стресса и воспаления при нейродегенеративных заболеваниях. Из этих исследований также следует, что ОФ-индуцированная патология включает в себя элементы геронтогенеза, универсальным маркером которого является липофусцин.

Агрегаты липофусцина в клетках состоят из ковалентно сшитых между собой остатков белков (30–70%) и липидов (20–50%), среди которых триглицериды, свободные жирные кислоты, холестерин и фосфолипиды [142, 143]. Также для клеток коры головного мозга человека показано наличие углеводных остатков в скоплениях липофусцина [144]. Кроме того, липофусцин содержит ионы металлов, таких как железо, алюминий, кальций, цинк, медь, марганец [145]. Гранулы липофусцина локализируются совместно с аутолизосомами. Оксидативный стресс активируют аутофагию, но не способствует удалению липофусцина, в результате чего формируется множество заполненных липофусцином аутолизосом [146]. Поскольку клетка неспособна справиться с каскадом повреждающих событий, она деградирует. После гибели клеток гранулы липофусцина высвобождаются в паренхиму мозга, где его можно обнаружить в сочетании с патогномоничными белковыми отложениями, такими как бета-амилоидные бляшки. Эти отложения рекрутируют клеточный мусор и ионы металлов, провоцируя усиление оксидативного стресса и активацию микроглии, нейровоспаление и провоспалительную выработку интерлейкинов, тем самым способствуя расширению нейродегенерации [147].

Связь между старением и продолжительностью жизни не столь однозначна, как может показаться на первый взгляд. Масса примеров, когда люди живут довольно долго, будучи прикованными к инвалидной коляске, и когда здоровые на вид и по своим функциональным показателям люди неожиданно умирают в расцвете сил. Идеалом является здоровое долголетие. Поиск универсальных маркеров здоровья представляется не менее важным, чем поиск маркеров заболеваний.

В заключение данного раздела приведем схему (рис. 1) предполагаемой взаимосвязи между уровнем/режимом токсического воздействия и характером/динамикой развития патогенетического процесса.

О РОЛИ ЭНДОТЕЛИЯ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ОРГАНОФОСФАТАМИ

Роль эндотелия в развитии ОФ-индуцированной патологии заслуживает отдельного рассмотрения. В предыдущих разделах было сказано о последствиях нарушения целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при остром отравлении органофосфатами, также была упомянута роль *vasa nervorum* в патогенезе демиелинизирующей полинейропатии, подчеркнуто значение активности PON2 в эндотелиальных клетках. Старение клеток было упомянуто в качестве девятого “признака старения” безотносительно типа клеток [133], хотя старение эндотелиальных клеток — это совершенно особый процесс, рассмотрение которого выходит за рамки данного обзора, но ему посвящены отдельные замечательные работы последних лет [148, 149].

Однако далеко не всегда роль эндотелия в развитии той или иной патологии просматривается со всей очевидностью. Так, если мы говорим, что в основе аксональной полинейропатии лежат нарушения метаболизма нейрона вследствие недостаточной выработки энергии в митохондриях и связанные с этим нарушения аксонального транспорта, то вряд ли при этом думаем о кровеносных сосудах, по которым движутся эритроциты, в которых находится кислород, без которого ни о какой выработке энергии не может быть и речи. В связи с рассматриваемой про-

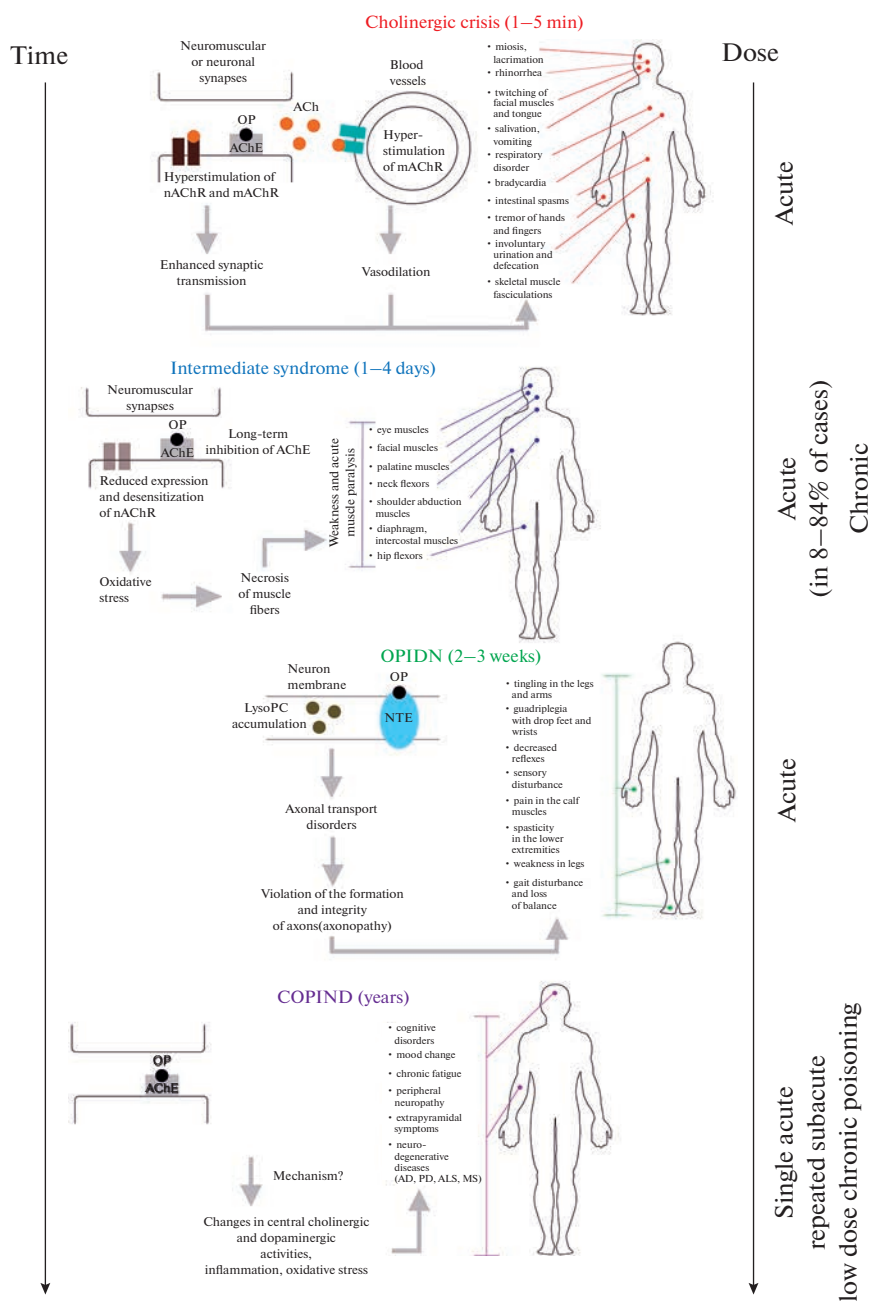


Рис. 1. Варианты развития патогенетических процессов в результате токсического воздействия органо-фосфатов.

блемой следует напомнить, что не только нейрональные и нервно-мышечные сигналы, но также эндотелиальные клетки (ЭК) имеют признаки вегетативной холинергической регуляции. Благодаря экспрессии мускариновых рецепторов, ЭК стали известны в 1980 г. как источник эндотелий-зависимого расслабляющего фактора (EDRF) [150]; позже было установлено, что это оксид азота [151]. В мембране ЭК были также обнаружены N-холинорецепторы [152], показана активность АХЭ [153, 154], в клетках выявлена холинацетилтрансфераза и везикулярная система транспорта ацетилхолина [155, 156]. Будучи в стороне от этих фундаментальных исследований, но работая с контингентом на объектах по производству химического оружия, сотрудники НИИ ГПЭЧ в 1980-х годах впервые заявили о том, что последствия острых отравлений ФОВ не сводятся к промежуточному синдрому или ОФИП [157]. Говоря о “микроорганических расстройствах неясной этиологии” в ЦНС и других органах, Мусийчук и Янно [157] интуитивно приблизились к пониманию роли эндотелия сосудов в развитии не только и не столько полинейропатии, но и других патологических состояний, которых на самом деле может быть гораздо больше, и вероятность их возникновения может быть даже выше по сравнению с ОФИП. Обусловленность научными представлениями того времени, отсутствия прямых доказательств и даже самой возможности провести более глубокие исследования с целью получения этих доказательств не позволили в вышеуказанной статье указать с большей определенностью на эндотелий сосудов как один из главных участников патогенеза. Между тем лейтмотивом продолжавшихся исследований в подавляющем большинстве токсикологических лабораторий мира было выявление взаимодействия ОФ с молекулярными мишенями в нервных клетках. Например, было установлено, что ОФ могут образовывать ковалентные связи с тирозиновыми остатками тубулина, сайты связывания ОФ расположены вблизи сайтов связывания ГТФ или внутри петель, взаимодействующих с протофиламентами [158], что будто бы частично объясняет угнетение быстрого аксонального транспорта и нейрофизиологические последствия хронического воздействия ОФ [159, 160]. Лишь несколько работ сообщали о влиянии ОФ на эндотелий. Так, исследование легочной ткани мышей при их отравлении *O,O,S*-триметилфосфориоатом выявило значительное увеличение массы легких и процентного содержания в них воды, что справедливо связали с нарушением проницаемости капилляров и последующим отеком [161]. В другом исследовании хлорпирифос в широком диапазоне концентраций не показал влияния на изолированную грудную аорту, хотя активность АХЭ в плазме была снижена, в то время как активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), наряду с уровнем NO в плазме крови были повышены в группе отравленных животных [162]. В наших исследованиях мы также обратили внимание на повреждение эндотелия сосудов при развитии ОФ-индуцированной отставленной патологии [163–165]. Мы были, вероятно, первыми, кто заявил в 2000-х годах о том, что микроангиопатии, вызванные повреждением эндотелия, особенно в тканях нервной системы, могут быть основной причиной развития отсроченных эффектов интоксикации ОФ; значение такого рода повреждений стало более очевидным десятилетие спустя [34, 166]. Взаимосвязь между кровоснабжением нервных волокон и нервно-мышечной проводимостью представляет существенный интерес по причине небольшой доли эндоневральных капилляров в структуре нервных волокон. Степень зависимости трофики нервных волокон от целостности сосудов можно представить по следующим данным: объем капилляров не превышает 4% от общего объема нервных волокон [167]. Кроме того, в периферических нервах нет лимфатических сосудов, которые могли бы обеспечить эффективный отток капиллярного инфильтрата и предотвратить развитие отека [168, 169].

После первых же экспериментов в начале 2000-х годов мы предположили роль несинаптических и зависимых от кровеносных сосудов механизмов отставленных эффектов при остром и субхроническом воздействии ОФ. Через несколько недель после отравления были обнаружены ангиодистонические нарушения, новые — или открытие ранее существовавших — артерио-венозные анастомозы, расширенные и дистонические венулы в эндоневрии седалищного нерва и брыжейке тонкой кишки [34]. Морфологические признаки поражения эндотелия сосудов сопровождались функциональными, такими как норадреналин-индуцированное сокращение и карбахол-индуцированное расслабление аорты крысы после субхронического (3 мес.) воздействия POX и DFP в дозах 1/100 ЛД₅₀ и 2 мес. “восстановления”. Морфофункциональные изменения микрососудов могут влиять на функциональное состояние тромбоцитов, обуславливая этиологию отставленных эффектов острого и субхронического отравления. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о множественных очагах микроангиопатии, поэтому клинические признаки за частую скрыты компенсаторными механизмами локального или центрального генеза.

Дополнительные свидетельства важной роли эндотелия дал проведенный нами масс-спектрометрический анализ плазмы крови животных, отравленных веществом типа Vx, который выявил фрагменты фибринопептида A, что указывало на усиление тромбообразования и/или снижение экспрессии экзопептидаз (аминопептидаз) [165]. Известно, что в плазме крови и клетках сосудов функционируют различные аминопептидазы, которые могут быть ответственны за эти эффекты. Аминопептидаза A (КФ 3.4.11.7) гидролизует пептидные связи с кислыми аминокислотами (Asp и Glu во фрагментах фибринопептида A) [170]. Аминопептидаза N (APN, КФ 3.4.11.2) является многофункциональным ферментом и основной аминопептидазой крови и кровеносной системы, который экспрессирован на клетках миелоидного происхождения, включая моноциты и нейтрофилы [171]. Он также был обнаружен на фибробластах, эпителиальных и — что важно — эндотелиальных клетках, причем ангиогенные и ряд других факторов повышают экспрессию APN [172–174]. С другой стороны, альфа-статин, пептид из 24 аминокислот, полученный из аминоконца α -цепи человеческого фибриногена, обладает антиангиогенной активностью, которая ранее была обнаружена в продукте деградации фибриногена E [175]. Многие другие продукты протеолиза были также идентифицированы в качестве эндогенных ингибиторов ангиогенеза [176].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОИСК ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ

Антидотная терапия при отравлении ОФ — это, по сути, терапия холинергического синдрома, и, как уже было указано, она направлена на блокаду ацетилхолиновых рецепторов с помощью атропина, на реактивацию АХЭ с помощью оксимов и на ослабление судорог. Модели эпистатуса на грызунах демонстрируют повреждение нейронов, устойчивость к бензодиазепинам и неврологические сопутствующие заболевания, которые наблюдаются у людей, выживших после воздействия ОФ. Экспериментальные модели воздействия ОФ на грызунах позволили выявить некоторые особенности развития отставленных последствий или сопутствующих заболеваний, среди которых изменения баланса ионов кальция [177, 178] оксидативный стресс [179], нейровоспаление [180], циклооксигеназный путь [181], активация индуцибельной NO-синтазы [182].

Одно из направлений в разработке антидотных комплексов — идентификация соединений, способных эффективно восстанавливать функцию никотиновых рецепторов (nAChR) при интоксикации ОФ. Перспективны производные биспиридина, не обладающие свойствами оксимов, но способные восстанавливать чувствительность десенсибилизированных никотином h α 7-nAChR [24]. ОФ вызывают

кинетический тремор, активируя нейроны верхней оливы через nAChR. Тремор ингибировался неспецифическим антагонистом nAChR мекамиламином, тогда как антагонист М-рецепторов тригексифенидил не оказывал влияния [183].

Поскольку антидоты не могут достичь места своего действия в ЦНС быстро и в терапевтически значимых концентрациях, они обеспечивают эффективную защиту только периферической нервной системы. Это ограничение может быть преодолено путем инкапсуляции антидотов в наночастицы, что может увеличить их накопление в ЦНС без нарушения целостности ГЭБ [184]. Ведется разработка новых систем-носителей для доставки компонентов антидотного комплекса, выполняющих три задачи: (а) улучшение биодоступности, (б) повышение направленности и (в) снижение системной токсичности, т.е. отрицательных побочных эффектов самих средств терапии. Например, применение кукурбит [7]урилов (СВ [7]) с оксимами может положительно повлиять на эффективность антидотной терапии при интоксикации ОФ [185]. СВ [7] представляют собой жесткие макроциклы в форме тыквы, которые могут включать молекулы в свою полость, в частности связывать положительно заряженные ароматические соединения, препараты на основе платины с органическими лигандами или специфические комплексы металлов [186].

Тяжелое отравление требует повторного применения атропина и реактиваторов, но при этом повышается — в случае выживания организма — риск возникновения атропин-индуцированного психоза, побочного эффекта интенсивной терапии, о котором, к сожалению, очень мало говорят и столь же мало исследуют [187]. Кроме того, роль реактиваторов минимальна в случае отравления некоторыми ОФ, отличающимся высокой скоростью “старения”, т.е. отщепления (деацилирования) второй уходящей группы после фосфилирования (образования ковалентной связи Р–О между фосфором ОФ и кислородом серина в активном центре АХЭ). В этом случае основную антидотную функцию выполняет атропин и агонисты бензодиазепинового ряда, но при развитии эпистатуса (нехолинергической фазы судорожного синдрома) бензодиазепины в качестве антиконвульсантов малоэффективны. Здесь следует отметить, что в последние годы ведется поиск препаратов, способных реалкилировать “состарившуюся” АХЭ. Перспективными являются предшественники хинонметидов (QMP) в качестве реалкираторов. Некоторые из этих соединений проявляют свойства как реалкилятора, так и реактиватора [188].

Бензодиазепины и другие противосудорожные средства

Прогресс в разработке новых средств терапии острых отравлений ОФ связан с применением новых бензодиазепинов, антагонистов глутаматных рецепторов, антимускариновых препаратов с дополнительной антиглутаматергической активностью, антагонистов аденозиновых рецепторов, модуляторов метаболизма. Так, установлена эффективность алкалоида скополамина, действующего подобно атропину; мемантин — неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов — показал гораздо меньшую эффективность, как и фенобарбитал, действие которого проявляется с неприемлемой задержкой [189]. Для предотвращения или ослабления судорожного синдрома используют блокаторы NMDA-рецепторов (МК-801, кетамин) и вальпроаты, противоэпилептическое действие которых обусловлено ингибированием ГАМК-трансферазы с последующим повышением содержания ГАМК в ЦНС и стимуляцией ГАМКергических процессов [54, 190, 191]. Перспективной оказалась комбинация диазепама, кетамина и вальпроата, которая позволяет наиболее эффективно предотвращать развитие эпистатуса [191]. Изоболограмма показала, что с точки зрения терапевтической эти препараты проявляют позитивный кооперативный эффект (синергизм), т.к. он более выражен, чем трехкратная доза каждого из компонентов в отдельности; по критериям токсического эффекта их

взаимодействие носит исключительно аддитивный характер [191]. При эпистатусе происходит инактивация ГАМК_A-рецепторов вследствие их интернализации, но активация NMDA-рецепторов вследствие повышения их экспрессии в синаптических мембранах. Действие диазепама направлено на стимуляцию оставшихся ГАМК_A-рецепторов, кетамина — на ослабление стимуляции NMDA-рецепторов, а вальпроата — на неспецифическое усиление ингибирования активации. Получены обнадеживающие результаты с изофлураном, средством для ингаляционного наркоза, который предотвращал развитие эпистатуса и последующее повреждение нейронов в случае применения через 20–30 мин после отравления РОХ [192]. Однако изофлуран противопоказан при повышенном внутричерепном давлении и особенно при злокачественной гипертермии в анамнезе, что практически невозможно учесть при необходимости оказания экстренной помощи пациенту в состоянии тяжелой интоксикации.

Высокую эффективность в качестве противосудорожного средства при отравлении зоманом показал препарат LY293558 (tezampanel), антагонист АМРА- и каинатных GluK1 рецепторов, в сочетании с карамифеном, антагонистом мускариновых и NMDA-рецепторов [193, 194]. Однократное введение комплекса, состоящего из атропина, HI-6, LY293558 и карамифена, через 20 мин после отравления крыс зоманом в дозе 1.2 ЛД₅₀ не только прекращает развитие судорожной активности, но и предотвращает ее возобновление. Более того, отравленные крысы, получившие вышеуказанную терапию, по динамике веса и другим исследуемым показателям не отличались от контрольных животных. Также эффективна комбинация мидазолама (1.8 мг/кг) с неконкурентным антагонистом АМРА-рецепторов перампанелом (2 мг/кг) [195]. Введение нейростероидов в качестве дополнения к терапии бензодиазепинами является эффективным средством лечения бензодиазепин-рефрактерного эпистатуса. Показана эффективность аллостерических модуляторов ГАМК_A-рецепторов прегнанолона и аллопрегнанолона (6 мг/кг) [195, 196].

Судороги и адренергическая система

Эпистатус особенно влияет на сердце и мозг. В различных моделях на животных было неоднократно показано, что в развитии судорог и эпистатуса важную роль играет адренергическая система [197–202]. Повышенная симпатическая активность обуславливает электрофизиологические изменения и повреждения миокарда. Сердечная декомпенсация является ведущим фактором в прогнозировании смертности у пациентов, переживших эпистатус [203], так что введение β1-адреноблокатора атенолола пациентам с ишемией улучшает их сердечную функцию [201, 204, 205]. Адювантная терапия, включающая введение леветирацетама и атенолола 2 раза в сутки в течение 2, 7 или 14 дней после индуцированного РОХ эпистатуса (основной антидотный комплекс состоял из атропина, праидоксима и мидазолама) привела к значительному снижению смертности по прошествии 30 дней. Внутримышечное введение адювантного комплекса по сравнению с пероральным введением позволило достичь более быстрых и стабильных терапевтических уровней как атенолола, так и леветирацетама в условиях эпистатуса [206].

Снижение уровня норадреналина в мозге, сопутствующее эпилептиформным приступам в моделях острого отравления ОФ, способствует инициации и/или поддержанию эпистатуса [11, 207, 208]. Стимуляция голубого пятна (locus coeruleus), основного сайта продукции норадреналина в головном мозге, уменьшает тяжесть судорог, обусловленных активацией миндалевидного тела (corpus amygdaloideum), в то время как разрушение терминалов голубого пятна превращает спорадические судороги в отчетливо выраженный лимбический (психомоторный) эпистатус [209, 210]. По некоторым данным, стимуляция α2-адренорецепторов вносит основной

вклад в защитные эффекты норадреналина в моделях судорожного синдрома, в том числе с применением ОФ, вследствие их генерализованной ингибирующей функции в ЦНС посредством пресинаптических и постсинаптических механизмов [197, 198]. Высокую эффективность в отдаленные сроки после отравления показал дексметомидин (ДЕК), специфический агонист $\alpha 2$ -адренорецепторов [202]. Антагонист этих рецепторов атипамизол блокировал действие ДЕК, но лишь в случае предварительного или одновременного с ним введения, что свидетельствует о важности $\alpha 2$ -адренорецепторов в инициации механизма прекращения начавшейся судорожной активности. Гистохимическое исследование с применением красителя фторджейда показало, что сочетание ДЕК + мидазолам значительно сокращает число погибших нейронов в миндалине, таламусе и пириформной коре, но не влияет на их уровень в гиппокампе и парietальной коре даже в случае полного прекращения судорожной активности [202]. В то же время применение атенолола оказывает лучшее кардиозащитное действие во время каинат-индуцированного эпистатуса по сравнению с клонидином, $\alpha 2$ -агонистом центрального действия [211–213].

Дисбаланс ионов кальция при холинергическом синдроме

Разработка антидотной и адъювантной терапии при интоксикации ОФ идет по нескольким направлениям. Одно из них – предотвращение кальциевой перегрузки нейронов и скелетных мышц. На дисбаланс ионов кальция при интоксикации ОФ обратили внимание американские исследователи под руководством Deshpande [214], которые показали, что блокаторы рианодиновых рецепторов (дантролен, леветирацетам, каризбамат) могут эффективно контролировать уровень внутриклеточного кальция в нейронах, снижая тем самым степень повреждения нейронов при интоксикации ОФ [177, 215].

Известно, что активация ацетилхолиновых и многих других рецепторов (как ионотропных, так и метаботропных) обуславливает в норме мобилизацию, а при патологии – дисбаланс ионов кальция в клетках и связанные с этим нарушения в регуляции многих ферментных систем, в том числе генерирующих АФК. В основе роста элементарных сократительных ответов в составе тетанусов задействован механизм кальций-индуцированного выброса кальция (calcium-induced calcium release, CICR) [216–218]. Рианодиновый рецептор (RyR, кальциевый канал) – это центральный элемент макромолекулярного комплекса, обеспечивающего электро-механическое сопряжение мышц. Он связан как с дигидропиридин-чувствительным каналом (индикатором напряжения) саркоплазматической мембраны, так и с кальсеквестрином (“резервуаром” ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме) [219].

Деструктивные изменения в мышцах могут стать одной из важнейших причин нарушения механизма как деполяризации индуцируемого высвобождения Ca^{2+} (depolarization induced calcium release, DICR), так и CICR. Редокс-регуляция активности кальциевых каналов играет важнейшую роль в активации мышечного сокращения. Активность RyR регулируется пост-трансляционными редокс-модификациями, такими как S-окисление, S-нитрозилирование, S-пальмитоилирование; последний тип модификации также определяет активность Ca-АТФазы 1A саркоплазматического ретикулума и субъединицы $\alpha 1\text{S}$ дигидропиридинового рецептора $\text{CaV}1.1$ [220]. Следует отметить роль S-глутатионилирования тропонина I в повышении чувствительности к ионам кальция мышц II типа у человека [221].

Уровень кальция и механизмы регуляции баланса кальция в скелетных мышцах не были предметом исследования группы Deshpande, хотя этот аспект действия ОФ, с одной стороны, и блокаторов CICR, с другой стороны, представляется весьма важным, т.к. из трех апробированных ими веществ лишь дантролен является

эффективным ингибитором CICR в скелетных мышцах. С учетом этого факта, логическим продолжением токсикологических исследований должно было стать определение коэффициента защиты дантролена, однако эти эксперименты не были проведены, либо они были проведены, но оказались безуспешными в силу разных причин, одни из которых лежат на поверхности, другие совсем не очевидны. К числу первых относится малая проникающая способность дантролена через ГЭБ, о чем упоминает Deshpande. Для решения этой проблемы надо понимать структуру ГЭБ, механизмы транспорта веществ через ГЭБ и условия, при которых проницаемость ГЭБ увеличивается для тех или иных веществ. Так, например, группа российских ученых открыла простой и эффективный способ повышения проницаемости ГЭБ с помощью микромолярных концентраций пероксида водорода [222]. Серьезным упущением лаборатории Deshpande мы считаем игнорирование роли кальциевого баланса в скелетных мышцах при остром отравлении ОФ как в токсикогенную фазу, так и в соматогенную. Для лучшего понимания сути подходов в терапии отравлений ОФ следует упомянуть вещества периферического действия — миорелаксанты, или нейромышечные блокаторы, т.к. они осуществляют блокаду Н-холинорецепторов в синапсах, т.е. блокируют действие ацетилхолина на нервно-мышечные окончания. Миорелаксанты были исследованы в разное время в разных лабораториях мира, но показали неоднозначные результаты, что не позволило их включить в существующие антидотные комплексы. Они классифицируются в соответствии с механизмом индукции блокады: деполяризующие агенты ультракороткого действия (сукцинилхолин) и недеполяризующие агенты короткого, среднего и длительного действия, которые, в свою очередь, классифицируются как аминостероиды (рокуроний, векуроний, панкуроний) и бензилизохинолины (цисатракурин и атракурин) [223]. Расслабление идет “снизу вверх”, от кончиков пальцев ног до мимических мышц, последней расслабляется диафрагма. Восстановление проводимости идет в обратном порядке. Они не проходят через ГЭБ, не растворяются в жирах. Основной путь введения — внутривенный, но некоторые принимаются и внутрь. Деполяризующие миорелаксанты при контакте с рецепторами вызывают стойкую деполяризацию мембраны синапса, сопровождающуюся кратковременным хаотичным сокращением мышечных волокон (фасцикуляции), переходящим в миорелаксацию. Метаболизируются БХЭ, выводятся почками. Сами обладают высокой токсичностью, причем эффективного антидота нет. Недеполяризующие миорелаксанты блокируют рецепторы и мембранные каналы без их открытия, не вызывая деполяризацию. Антидотом является прозерин (неостигмин, связывается с анионным и эстеразным центрами АХЭ, обратимо экранируя их от ацетилхолина), который вводится внутривенно, а за 2–3 мин перед его применением для нивелирования побочных эффектов самого прозерина вводится атропин. Все это осложняет возможность их применения при отравлении ОФ. Кроме того, декураризация противопоказана при глубоком мышечном блоке и любым нарушением водно-электролитного баланса. А если действие прозерина кончается раньше, чем действие миорелаксанта, то может произойти рекураризация — возобновление миорелаксации из-за активации холинэстеразы. При одновременном применении диазепама с миорелаксантами увеличивается риск возникновения апноэ. Одно из наиболее серьезных осложнений при применении миорелаксантов, главным образом деполяризующих (сукцинилхолин), — злокачественная гипертермия, которая часто заканчивается летальным исходом [224–227]. Но даже в отсутствие летального исхода возможны такие осложнения, как миопатия, рабдомиолиз, аритмия, нарушения в системе гемостаза [227, 228]. Злокачественная гипертермия может возникать как один из сопутствующих или даже патогномоничных признаков злокачественного нейрорептического синдрома через 12–13 дней после острого отравления ОФ с применением классической антидотной терапии, вклю-

чающей в себя атропин и реактиватор пралидоксим, и через 5–6 дней после восстановления уровня (активности) холинэстераз [229]. Само по себе отравление ОФ обычно обуславливает снижение температуры тела в первые дни после отравления, так что гипертермия является одним из возможных последствий не самого по себе острого отравления ОФ, но применяемом при остром отравлении атропином, т.е. типичной ятрогенной патологией [230, 231]. Атропин в сочетании с галоперидолом является базовым компонентом модели злокачественного нейрорептического синдрома на животных [232]. Такого рода ятрогенная патология лишь недавно стала предметом серьезных обсуждений в научной литературе [233]. В токсикологии органофосфатов это состояние практически не изучено, а вопрос о модификации антидотной терапии с учетом возможных последствий самой терапии даже не поставлен, т.к. главной задачей терапии острых отравлений была и остается выживаемость организма.

В более поздней работе лаборатории Deshpande представлены некоторые данные токсикологических экспериментов *in vivo* с применением POX и DFP в качестве токсикантов [178]. Блокада антагонистами RyR, такими как дантролен, карисбамат и леветирацетам, снижала обусловленное эпистатусом Ca^{2+} -плато и обеспечивала значительную нейропротекцию. Никаких, однако, коэффициентов защиты терапевтических комплексов с применением дантролена авторы не получили, да и задачи такой они как будто и не ставили. Дозировка ОФ в их экспериментах составляла 1.5 ЛД₅₀, атропин и пралидоксим вводили сразу после отравления, тогда как мидазолам (препарат короткого действия класса бензодиазепинов, аналог диазепамы) и другие компоненты терапии, в т.ч. дантролен, вводили через час после отравления, т.е. на фоне уже наблюдаемого эпистатуса. Чрезвычайно высокую дозу дантролена, 10 мг/кг, вводили крысам внутрибрюшинно в виде водного раствора, предварительно нагретого и обработанного в ультразвуковой бане (соникаторе). Особенности токсикологической модели авторы объясняют необходимостью имитации реальной обстановки, когда нет возможности оказания экстренной помощи, а медицинская бригада прибывает через час. Такое объяснение вряд ли может считаться приемлемым. Во-первых, введение атропина и пралидоксима в таком случае было бы невозможным, а если оно все-таки возможно, что тогда мешает одновременно ввести противосудорожные препараты и предотвратить развитие эпистатуса? Во-вторых, трудно себе представить использование соникатора бригадой скорой помощи в полевых условиях.

Противоэпилептический препарат леветирацетам является ингибитором белка SV2A синаптических везикул [234], ингибирует глутамат-индуцированную эксайтотоксичность [235], что может быть опосредовано ингибированием CICR в нейронах через RyR и IP3-рецепторы [236, 237].

Судороги и воспалительные процессы

В последние годы внимание стали уделять компонентам адъювантной терапии, направленным на предотвращение воспалительных реакций. Дело в том, что запуск эксайтотоксического каскада обычно сопряжен с воспалением и оксидативным стрессом, преимущественно в постсинаптических холинергических волокнах; это сопряжено с повышением экспрессии бета1-интегрин в пре- и постсинаптических холинергических и близлежащих глутаматергических волокнах, а также с активацией в них циклооксигеназы-2 (COX2) [181, 238]. Подсчет лейкоцитов у пациентов, пострадавших от острых отравлений ОФ, выявил очень высокие метрологические характеристики этого метода при прогнозировании смертности: чувствительность 60%, специфичность 76% и отрицательная прогностическая значимость 85% при количестве лейкоцитов более 12000/мкл, а также чувствительность 30%,

специфичность 95% и отрицательная прогностическая значимость 80% при количестве лейкоцитов более 15000/мкл [239]. Циклооксигеназа-1 (COX1) конститутивно экспрессирована во всем организме и участвует во многих физиологических функциях, включая поддержание целостности желудочно-кишечного тракта [240], тогда как COX2 активируется в ответ на повреждение или судороги, в том числе при остром отравлении ОФ [241, 242]. В модели на крысах показан позитивный результат применения TG6-10-1, селективного антагониста EP2 (рецептора простагландина E2), активация которого является следствием активации COX2. Введение шести однократных доз TG6-10-1 в течение 2–3 дней после отравления DFP ускоряет функциональное восстановление, ослабляет нейродегенерацию гиппокампа, нейровоспаление, глиоз, нарушение целостности ГЭБ и предотвращает когнитивный дефицит, не блокируя при этом сам эпистатус [181].

Одним из критериев целостности ГЭБ является его высокая селективность по отношению к белкам плазмы крови, в частности к альбумину. Когда целостность ГЭБ не нарушена, альбумин практически отсутствует в паренхиме головного мозга. Однако альбумин был обнаружен в коре головного мозга мышей через четыре дня после эпистатуса, вызванного пилокарпином [243–245]. Аналогично, повышение уровня альбумина примерно в четыре раза было выявлено в головном мозге крыс, пребывающих в состоянии эпистатуса после отравления DFP [181]. Однако пилокарпин не приводит к появлению альбумина в головном мозге мышей, нокаутных по COX2 в главных нейронах переднего мозга [244]. Введение TG6-10-1, антагониста EP2, через 4 и 24 ч после начала судорожного синдрома также предотвращает экстравазацию альбумина в кору головного мозга мышей [243].

В то же время применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) во время судорог оказалось неэффективным или даже вредным. Оказалось, что повышенные уровни простагландина E2 (PGE2) играют положительную роль сразу после судорог, вызванных ОФ, так что раннее ингибирование продукции PGE2 противопоказано [246]. После прекращения судорог ибупрофен, селективный ингибитор COX2 нимесулид и ингибитор фосфолипазы A2 (PLA-2) хинакрин частично эффективны в снижении маркеров воспаления головного мозга. Эти результаты свидетельствуют о том, что активация COX2 и рецепторов EP2 инициирует нарушение целостности ГЭБ, а предотвращение активации сигнального пути COX2/EP2 может быть перспективным средством контроля целостности ГЭБ.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ПОИСКА НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫХ СРЕДСТВ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ

Как было сказано выше, одна из наиболее сложных и в наименьшей степени решенных проблем — предупреждение отставленной патологии. Продолжительные судороги, развивающиеся при остром отравлении, обуславливают поражение миндалины, пириформной коры, гиппокампа, коры, таламуса и хвостатого ядра [247]. Эффективность применения противосудорожных препаратов зависит от многих факторов, а в случае даже небольшой передозировки наиболее популярных и в целом достаточно эффективных бензодиазепинов они могут усилить токсический эффект в токсикогенную фазу или привести к возобновлению судорог (эпистатус) в соматогенную фазу отравления. Менее популярный вальпроат может стать причиной идиосинкратического и/или токсического гепатита [248]. Вариантов, предлагаемых в качестве альтернативы бензодиазепинам и вальпроату, немного, порой они бывают довольно экзотичными, как, например, уретан в экспериментальной модели отравления ФОС на крысах [249], так что перспектива их использования для человека вызывает большие сомнения. Дело в том, что с точки зрения токсикологии ОФ главной биохимической особенностью грызунов, которую необходимо

принимать во внимание при изучении механизмов действия не только ФОС, но и карбаматов, к коим относится уретан, является наличие в плазме крови карбоксилэстеразной активности. В плазме крови человека, обезьян и полорогих парнокопытных (к коим относятся важнейшие сельскохозяйственные животные — коровы, овцы, козы) практически нет карбоксилэстераз (КЭ) [250]. Подавление активности КЭ плазмы крови грызунов может в значительной степени повысить адекватность экспериментальных моделей. Для этого иногда используют нокаутных (ES1—/—) мышей [251]. Нокаутные крысы, однако, не выведены вследствие технической сложности и дороговизны технологии. Применение специфических ингибиторов КЭ является гораздо более простым и доступным методом, который, однако, применялся в очень ограниченных масштабах: динамика возникновения оставленных последствий острого отравления ОФ на фоне подавления активности КЭ плазмы крови крыс практически не изучена. Более того, даже без предварительного подавления активности КЭ последствия острого отравления ОФ изучали в ограниченных временных интервалах и, как правило, с использованием небольшого перечня показателей [252]. Ранее мы разработали две токсикологические модели острого отравления крыс ФОС на примере РОХ с предварительным ингибированием КЭ эквитоксическими дозами самого РОХ (группа РОХ2х) и более специфического ингибитора карбоксилэстераз — 2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксида (CBDP, группа CBPOX) [253, 254].

В поисках средств предупреждения отставленной патологии в последнее время стали уделять внимание нутрицевтикам, биологически активным веществам природного происхождения, как правило, компонентам продуктов питания, действие которых проявляется не сразу, но при продолжительном приеме, иногда в составе так называемого функционального питания [255–257]. В экспериментах с ОФ установлены превентивные эффекты омега-3-полиненасыщенных жирных кислот [258], экстракта корня имбиря *Zingiber officinale* [259] и полифенолов *Parquetina nigrescens*, представителя семейства Кутровых [260]. Представляет интерес действие полифенолов декофеинизированного зеленого чая *Camellia sinensis* (ЭЗЧ) в силу его плейотропных эффектов посредством активации “сигнального хаба” GGC-1 α (коактиватор 1-альфа гамма-рецептора, активируемого пероксисомными пролифераторами) и различных изоформ PPAR (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами), что позволяет использовать этот нутрицевтик в целях профилактики заболеваний, ускорения регенеративных процессов в спортивной медицине [261, 262], однако перспективы применения ЭЗЧ в токсикологии изучены очень слабо, а в токсикологии ФОС не изучены вообще. Трудности изучения эффектов нутрицевтиков частично обусловлены тем, что вещества фосфорорганической природы обладают различными токсикокинетическими характеристиками, а потому имеют различный спектр молекулярных и клеточных мишеней. Другая, более весомая причина состоит в отсутствие критериев диагностики на дальних сроках после отравления, когда уровень или активность холинэстераз не отличается от нормы, а дорогими химико-аналитическими методами, даже если они доступны, невозможно определить аддукты ОФ с белками крови. Развитие метаболизма дало некоторую надежду на решение проблемы диагностики на поздних стадиях интоксикации, однако сложность методологии и малодоступность инструментальной базы, наряду с неоднозначными и порой малопонятными для практического врача выводами существенно снижает уровень оптимизма [263]. Можно отметить общие тенденции изменения комплекса биохимических показателей: помимо холинэстераз крови, активность аминотрансфераз и γ -глутамилтрансферазы являются биохимическими маркерами интоксикации в течение первой недели после острого отравления высокотоксичными ФОС, тогда как уровень креатинина и мочевины можно рассматривать как неспецифические маркеры отравления на более позд-

них сроках [264]. Установлены изменения в показателях углеводного и жирового обмена крыс на разных сроках после отравления РОХ [253]. Комбинация отдельных показателей (биомаркеров) составляет комбинаторный биомаркер, который по сути является формализованным представлением некоего синдрома, для идентификации которого обычно применяют многопараметрический анализ [265]. Для определения паттерна показателей, составляющих комбинаторный биомаркер, требуется применение методов биоинформатики, которые еще нужно должным образом адаптировать для работы с многомерным пространством данных. Одной из задач наших исследований состояла в разработке алгоритма поиска новых комбинаторных биомаркеров, с помощью которых можно было бы определять эффективность ЭЗЧ (либо других немедикаментозных препаратов) в качестве профилактического средства, ускоряющего регенерацию организма крыс в экспериментальных моделях острого отравления РОХ с применением CBDP в качестве специфического ингибитора КЭ [266]. Мы оптимизировали предложенный ранее алгоритм поиска комбинаторных биомаркеров по методу ветвей и границ [267], что позволило не только повысить статистическую значимость межгрупповых и/или временных отличий, но и сформировать синдромальные комплексы за счет кластеризации физиолого-биохимических показателей. Последнее может послужить существенным дополнением методического или даже методологического характера к экспериментальным исследованиям, проводимым на разных видах животных, с последующей более адекватной интерпретацией полученных данных применительно к человеку (трансляционная медицина).

Детали и результаты эксперимента описаны ранее [266]. Здесь кратко отметим, что ЭЗЧ обуславливает снижение индексов атерогенности, а также позитивную динамику комбинаторных индексов за счет изменения уровней альбумина, триглицеридов, орозомукоида, мочевой кислоты, баланса клеток иммунной системы, способствуя регенерации организма после острого отравления РОХ. В общей сложности нами было получено 18 новых индексов с высоким уровнем чувствительности и специфичности, из которых достаточно подробно проанализированы два — С12 и С118. Индекс С118 имеет очень высокую чувствительность и максимальную специфичность (0.91 и 0.95 соответственно), его динамика позволяет говорить о мобилизации в группах отравленных животных гемопоэза и эритропоэза, иммуно- и эндотелиогенеза (хотя о последнем можно судить лишь по косвенным признакам), смещении баланса белок-синтезирующей функции печени в пользу липопротеинлипаз, баланса клеточного и гуморального, специфического и неспецифического звеньев иммунитета. У крыс, принимавших ЭЗЧ в составе спецкорма (стандартный гранулированный корм, в который ЭЗЧ внесен в качестве добавки при размельчении с последующим регранулированием), изменения индекса С118 более выражены по сравнению с крысами, принимавших обычный корм, а в группе РОХ2х + ЭЗЧ отличия от группы СВРОХ + ЭЗЧ имеют статистическую значимость на всех временных интервалах проведения исследований, что можно объяснить гепатотоксическим действием CBDP, специфического ингибитора КЭ, несколько снизившим регенеративный потенциал ЭЗЧ. Выбранная нами мультимаркерная стратегия поиска комбинаторных индексов с переводом их в цифровой формат повышает ценность экспериментов с крысами и другими видами лабораторных животных, т.к. по своей сути является интегративной, отражая как специфические, так и неспецифические для разных видов животных адаптационные или дезадаптационные изменения. Результаты данной работы могут внести вклад в дальнейшее развитие трансляционной медицины, а также выявить особенности функциональных взаимосвязей в экстремальных условиях у разных видов животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При изучении механизмов и эффектов воздействия ОФ на организм человека и животных приходится иметь дело с совокупностью проблем, одни из которых давно являются, а другие могут стать самостоятельными научными дисциплинами на ближайшие годы. В первую очередь, это сугубо токсикологические проблемы антидотной терапии острых отравлений, диагностики и предупреждения отставленных последствий, аналитического поиска химических и биологических маркеров острого или хронического отравления. Кроме того, это проблемы из области “гражданской” медицины, такие как нарушения холинергической регуляции при аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях, а также при некоторых пищевых отравлениях. Особое положение по отношению к первым двум категориям занимают проблемы экспериментальной биологии и трансляционной медицины, суть которых состоит в разработке новых и адекватном использовании имеющихся экспериментальных моделей *in silico*, *in vitro*, *in vivo* с тем, чтобы минимизировать использование животных и более эффективно “транслировать” полученные данные в область практической медицины. Лейтмотивом работ в этой области может послужить фрагмент названия одной из ранних публикаций: “человек не есть большая крыса” [268].

В предыдущих разделах были рассмотрены четыре основных варианта развития патологических отклонений в результате нейротоксического действия ОФ: холинергический синдром, промежуточный синдром, ОФИП и ХФР. Первые три из них в значительной степени зависят от тяжести отравления, так что уже по этой причине разработке антидотной терапии уделялось и продолжает уделяться большое внимание в научных исследованиях. В то же время наметился определенный кризис на пути поиска более эффективных препаратов или терапевтических комплексов, особенно в части предупреждения оставленной патологии, развивающейся в случае выживания организма при остром отравлении сублетальными или даже летальными дозами яда с последующим применением средств терапии и проведением реанимационных мероприятий. На наш взгляд, такое состояние дел обусловлено двумя причинами. Первая — пробелы в понимании механизмов взаимодействия ОФ не с основными мишенями — холинэстеразами (в первую очередь и главным образом с АХЭ), а с мишенями вторичными, на этапе, предшествующем их взаимодействию с АХЭ. Т.е. это элемент токсикокинетики ОФ. Вторая причина — это пробелы в понимании молекулярно-клеточных механизмов развития оставленной патологии, это уже важнейший элемент токсикодинамики. В значительной степени решение проблем “второго рода” связано с выяснением роли эндотелия в развитии как эпистатуса, так и отдаленных нейродегенеративных заболеваний.

Изучение препаратов природного происхождения, способствующих восстановлению организма при острых отравлениях бытовыми и промышленными токсикантами, является задачей не только токсикологии, но также информатики как важнейшего инструмента развития методологии системного анализа. Для решения задач поиска новых биомаркеров в качестве основной эвристики мы применили принципы аналитической комбинаторики и разработали алгоритм поиска комбинаторных биомаркеров по методу ветвей и границ, который включает в себя четыре основных этапа и реализован на языке Python. Это позволило повысить статистическую значимость межгрупповых и/или временных отличий, сформировать синдромальные комплексы за счет кластеризации физиолого-биохимических показателей. Последнее может послужить существенным дополнением к экспериментальным исследованиям, проводимым на разных видах животных, с последующей более адекватной интерпретацией полученных данных применительно к человеку.

Что касается решения проблем “первого рода”, эффективность существующей антидотной, симптоматической и профилактической терапии можно повысить за счет усиления детоксикации ОФ на первом этапе поступления яда в организм — в кровеносном русле; это позволит уменьшить токсическое действие ОФ на АХЭ нервно-мышечных и нейрональных синапсов и избежать отставленных эффектов отравления. В настоящее время исследования, связанные с разработкой средств детоксикации ОФ на первом этапе поступления яда в организм, направлены в основном на получение рекомбинантных биочистильщиков: бутирилхолинэстеразы для стехиометрического и параоксоназы для каталитического взаимодействия с ОФ [269–271]. Несмотря на огромные затраты, связанные с разработкой биочистильщиков, перспективы получения на их основе эффективных и применимых на практике средств антидотной терапии весьма туманны, поскольку для достижения желаемого эффекта требуется существенная “перекройка” ферментов на атомарном уровне [272, 273]. Высокоаффинное связывание ОФ в кровеносном русле можно также обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, представляющих собой короткие нити олигонуклеотидов [274]. Основная сложность в подборе аптамеров к ОФ состоит в том, что молекулы этих токсических веществ часто имеют схожую структуру. Это затрудняет выбор аптамера, который не просто хорошо связывает молекулу ОФ, но связывает ее с высокой специфичностью [275, 276]. Существуют и трудности в методологии, связанные с тем, что молекула аптамера в разы больше, чем молекула отравляющего вещества. Что касается возможности направленного воздействия на альбумин для усиления терапии отравления ОФ, основные преимущества этого подхода следующие: 1) альбумин является основным транспортным белком крови и его концентрация в плазме крайне высока, 2) трехмерная структура альбумина достаточно лабильна и легко подвержена аллостерической модуляции, 3) альбумин может связывать практически все биоактивные вещества, а влиять на его активность можно доступными и дешевыми соединениями.

До недавнего времени альбумин не был в поле зрения токсикологов и фармакологов, занимающихся вопросами токсикологии органофосфатов. Было известно, что распределение ОФ по органам и тканям организма хорошо коррелирует (0.8) с их коэффициентами распределения (LogP) [277], но при этом основным “депо” ОФ с высоким LogP в крови считались эритроциты [278]. Однако наши данные свидетельствуют о высокой степени родства ОФ к белкам плазмы крови [279]. Результаты предварительных расчетов *in silico* и экспериментов *in vitro* позволяют сделать вывод о том, что с помощью эндогенных и экзогенных лигандов альбумина возможно регулировать эффективность взаимодействия альбумина с ОФ. Другой вопрос, что в условиях *in vivo* качество этой модуляции зависит от многих факторов и не в последнюю очередь от количественного соотношения модуляторов и ОФ. Наши данные позволяют предположить, что позитивный результат с точки зрения выживания при остром отравлении ОФ можно получить лишь в случае менее токсичных ОФ с более высокой аффинностью к альбумину. Например, меньшая токсичность одних ОФ по сравнению с другими может быть связана не только с меньшей ингибиторной активностью в отношении холинэстераз, но также с повышенной аффинностью к сайтам Садлоу альбумина [280].

Кроме того, недостаточно изучено влияние воспалительных процессов на развитие как острой интоксикации, так и оставленной патологии. С одной стороны, обратимые ингибиторы АХЭ (донепезил, галантамин, гуперзин, неостигмин, пиридостигмин) в нетоксических дозах обуславливают повышение уровня ацетилхолина, который не только повышает холинергический статус организма, но также иммунный и противовоспалительный потенциал при БА, миастении и ряде других [281]. С другой стороны, тяжелая интоксикация самыми разными препаратами, в том числе органофосфатами, обычно сопровождается развитием воспалительного

и оксидативного стресса, рекрутингом лейкоцитов, а также активацией протеаз, усилением катаболических процессов, дисбактериозом и, как следствие, развитием гипераммониемии, обусловленной интенсификацией поступления аммиака из желудочно-кишечного тракта в бассейн каудальной поллой вены в обход печени (трансперитонеальная диффузия) и отставанием синтеза глутамина и мочевины в печени от поступления аммиака в бассейн воротной вены [282–285]. Увеличение пула аммиака в просвете пищеварительного тракта и плазме крови отягощает интоксикацию и “обогащает” ее проявления симптомами острого отравления солями аммония. 15 лет назад в лаборатории Виноградова был открыт феномен усиления ионами аммония генерации пероксида водорода в митохондриях [286]. Таким образом, гиперактивация клеточного звена иммунной системы, оксидативный стресс и гипераммониемия являются компонентами танатогенеза при острой интоксикации ОФ. В связи с этим при разработке более эффективного антидотного комплекса необходимо использовать адъюванты, т.е. вспомогательные компоненты, которые не только могут повысить индекс защиты базового комплекса, но и ускорить регенерацию, обеспечить полноту терапевтического эффекта. Ранее мы предположили, что основными компонентами адъювантной терапии может стать блокатор риадиноновых рецепторов дантролен в сочетании с противовоспалительным препаратом гидрокортизоном, известным глюкокортикостероидом с выраженным быстродействующим противовоспалительным, антиэкссудативным (противоотечным), десенсибилизирующим (антиаллергическим), иммунодепрессивным, противошоковым и антитоксическим действием [287]. Несмотря на возможные осложнения, отмеченные при использовании гидрокортизона и других глюкокортикоидов в терапии ряда критических состояний (например, геморрагический шок, черепно-мозговая травма), особенно в ветеринарной практике, анализ таких случаев свидетельствует о всегда существующей вероятности ятрогенных последствий в случае применения препаратов без должного учета их плеiotропного действия [288]. В то же время имеются примеры разумного сочетания глюкокортикоидов с, казалось бы, “нейтральными” витаминами, результатом чего стало существенное повышение терапевтической эффективности глюкокортикоидов благодаря выявленным эффектам синергизма или потенцирования [289]. К числу базовых компонентов адъювантной терапии, безусловно, можно отнести диазепам, известный транквилизатор анксиолитического, седативного, противосудорожного и центрального миорелаксирующего действия. В поисках возможного “усилителя” центрального или миорелаксирующего эффекта, помимо дантролена, был использован мидокалм, который показан к применению при таких заболеваниях, как спинномозговые и церебральные параличи, сопровождающиеся мышечным спазмом и контрактурой конечностей, при экстрапирамидных расстройствах (постэнцефалический и атеросклеротический паркинсонизм), при эпилепсии, энцефалопатии сосудистого генеза и некоторых других состояниях или заболеваниях. Каптоприл, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, экспрессируемого эндотелиальными клетками (преимущественно в легких), также вошел в число возможных компонентов комплексной адъювантной терапии, как на основании собственных данных о его эффективности при критических состояниях токсического генеза, так и данных зарубежных авторов, свидетельствующих о способности каптоприла снижать вероятность желудочковых фибрилляций и интенсивность воспалительных реакций [290, 291]. ТАК-242 — относительно новый препарат, механизм действия которого состоит в блокаде Toll-подобных рецепторов 4-го типа, экспрессируемых, в том числе, клетками эндотелия. Его эффективность в терапии септических состояний весьма противоречива, хотя существует возможность его применения в комплексной терапии менее генерализованных воспалительных заболеваний и инсулиновой резистентности [292, 293].

Эти принципы и подходы системного характера выходят далеко за рамки собственно токсикологических исследований, так как полученные данные могут оказаться весьма полезными при разработке новых или модификации существующих средств профилактики/терапии известных нейродегенеративных заболеваний, развивающихся с возрастом вне всякой связи с воздействием органофосфатов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-15-00155.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Н.В.Г. и П.В.А.), сбор и обработка данных литературы (Н.В.Г., Д.А.Б. и П.В.А.), написание и редактирование манускрипта (Н.В.Г., Д.А.Б. и П.В.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Perez-Fernandez C, Flores P, Sánchez-Santed F* (2019) A Systematic Review on the Influences of Neurotoxicological Xenobiotic Compounds on Inhibitory Control. *Front Behav Neurosci* 13: 139. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00139>
2. *Neylon J, Fuller JN, van der Poel C, Church JE, Dworkin S* (2022) Organophosphate Insecticide Toxicity in Neural Development, Cognition, Behaviour and Degeneration: Insights from Zebrafish. *J Dev Biol* 10(4): 49. <https://doi.org/10.3390/jdb10040049>
3. *Jokanović M* (2018) Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. *Toxicology* 410: 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.09.009>
4. *Karimani A, Ramezani N, Afkhami Goli A, Nazem Shirazi MH, Nourani H, Jafari AM* (2021) Subchronic neurotoxicity of diazinon in albino mice: Impact of oxidative stress, AChE activity, and gene expression disturbances in the cerebral cortex and hippocampus on mood, spatial learning, and memory function. *Toxicol Rep* 8: 1280–1288. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.017>
5. *Zhang HY, Wang C, Li HS* (2021) Effect of organophosphate pesticides poisoning on cognitive impairment. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 39(4): 313–316. (In Chinese). <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121094-20200325-00161>
6. *Roe K* (2022) An Alternative Explanation for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Initiation from Specific Antibiotics, Gut Microbiota Dysbiosis and Neurotoxins. *Neurochem Res* 47(3): 517–530. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03467-y>
7. *Jokanović M, Oleksak P, Kuca K* (2023) Multiple neurological effects associated with exposure to organophosphorus pesticides in man. *Toxicology* 484: 153407. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153407>
8. *Eddleston M, Juszczak E, Buckley NA, Senarathna L, Mohamed F, Dissanayake W, Hittarage A, Azher S, Jegannathan K, Jayamanne S, Sheriff MR, Warrell DA, Ox-Col Poisoning Study collaborators* (2008) Multiple-dose activated charcoal in acute self-poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet* 371(9612): 579–587. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60270-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60270-6)
9. *Jokanović M, Antonijević B, Vučinić S* (2010) Epidemiological studies of anticholinesterase pesticide poisoning in Serbia. In: Satoh T, Gupta RC (eds) *Anticholinesterase Pesticides: Metab-*

- olism, Neurotoxicity and Epidemiology. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey. US. 481–494. <https://doi.org/10.1002/9780470640500.ch35>
10. Куценко СА (2004) Основы токсикологии. Санкт-Петербург. Фолиант. [Kutsenko SA (2004) Fundamentals of toxicology. Saint Petersburg. Foliant. (In Russ)].
 11. McDonough JH Jr, Shih TM (1997) Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 21(5): 559–579. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00050-4)
 12. Tattersall J (2009) Seizure activity post organophosphate exposure. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14(10): 3688–36711. <https://doi.org/10.2741/3481>
 13. DeLorenzo RJ, Kirmani B, Deshpande LS, Jakkampudi V, Towne AR, Waterhouse E, Garnett L, Ramakrishnan V (2009) Comparisons of the mortality and clinical presentations of status epilepticus in private practice community and university hospital settings in Richmond, Virginia. *Seizure* 18: 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2009.02.005>
 14. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH (2015) A definition and classification of status epilepticus—Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56(10): 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/epi.13121>
 15. Ben Abraham R, Rudick V, Weinbroum AA; Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Tel Aviv Sourasky Medical Center and the Sackler Faculty of Medicine (2002) Practical guidelines for acute care of victims of bioterrorism: conventional injuries and concomitant nerve agent intoxication. *Anesthesiology* 97(4): 989–1004. <https://doi.org/10.1097/00000542-200210000-00035>
 16. Rosman Y, Eisenkraft A, Milk N, Shiyovich A, Ophir N, Shrot S, Kreiss Y, Kassirer M (2014) Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media. *Ann Intern Med* 160(9): 644–648. <https://doi.org/10.7326/M13-2799>
 17. Deshpande LS, DeLorenzo RJ, Churn SB, Parsons JT (2020) Neuronal-Specific Inhibition of Endoplasmic Reticulum Mg^{2+}/Ca^{2+} ATPase Ca^{2+} Uptake in a Mixed Primary Hippocampal Culture Model of Status Epilepticus. *Brain Sci* 10(7): 438. <https://doi.org/10.3390/brainsci10070438>
 18. Blair RE, Hawkins E, Pinchbeck LR, DeLorenzo RJ, Deshpande LS (2023) Chronic epilepsy and mossy fiber sprouting following organophosphate-induced status epilepticus in rats. *J Pharmacol Exp Ther JPET-AR-2023-001739*. <https://doi.org/10.1124/jpet.123.001739>
 19. Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P (2004) Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol* 68(11): 2237–2248. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.038>
 20. Watson A, Opreko D, Young RA, Hauschild V, King J and Bakshi K (2015) Organophosphate Nerve Agents. In: Gupta RC (ed) *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 2nd ed. Acad Press/Elsevier. Amsterdam. 111–130.
 21. Reddy SD, Reddy DS (2015) Midazolam as an anticonvulsant antidote for organophosphate intoxication—A pharmacotherapeutic appraisal. *Epilepsia* 56(6): 813–821. <https://doi.org/10.1111/epi.12989>
 22. Reddy SD, Younus I, Clossen BL, Reddy DS (2015) Antiseizure Activity of Midazolam in Mice Lacking δ -Subunit Extrasynaptic GABA(A) Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 353(3): 517–528. <https://doi.org/10.1124%2Fjpet.114.222075>
 23. Faro LRF, Fajardo D, Durán R, Alfonso M (2018) Characterization of acute intrastriatal effects of paraoxon on in vivo dopaminergic neurotransmission using microdialysis in freely moving rats. *Toxicol Lett* 299: 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.017>
 24. Scheffel C, Niessen KV, Rappenglück S, Wanner KT, Thiermann H, Worek F, Seeger T (2018) Counteracting desensitization of human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors with bispyridinium compounds as an approach against organophosphorus poisoning. *Toxicol Lett* 293: 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.005>
 25. John M, Oommen A, Zachariah A (2003) Muscle injury in organophosphorous poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. *Neurotoxicology* 24(1): 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0161-813x\(02\)00111-0](https://doi.org/10.1016/s0161-813x(02)00111-0)
 26. Abdollahi M, Karami-Mohajeri S (2012) A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicol Appl Phar-*

- macol 258(3): 309–314.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.014>
27. Yang CC, Deng JF (2007) Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. *J Chin Med Assoc* 70(11): 467–472.
[https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(08\)70043-1](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(08)70043-1)
 28. Balali-Mood M, Saber H (2012) Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. *Iran J Med Sci* 37(2): 74–91.
 29. Patil G, Murthy N, Nikhil M (2016) Contributing Factors for Morbidity and Mortality in Patients with Organophosphate Poisoning on Mechanical Ventilation: A Retrospective Study in a Teaching Hospital. *J Clin Diagn Res* 10(12): UC18–UC20.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/22116.9038>
 30. Myers GJ, Wegner J (2017) Endothelial Glycocalyx and Cardiopulmonary Bypass. *J Extra Corpor Technol* 49(3): 174–181.
 31. Perrin RM, Harper SJ, Bates DO (2007) A role for the endothelial glycocalyx in regulating microvascular permeability in diabetes mellitus. *Cell Biochem Biophys* 49(2): 65–72.
<https://doi.org/10.1007/s12013-007-0041-6>
 32. Yilmaz M, Sebe A, Ay MO, Gumusay U, Topal M, Atli M, Icme F, Satar S (2013) Effectiveness of therapeutic plasma exchange in patients with intermediate syndrome due to organophosphate intoxication. *Am J Emerg Med* 31(6): 953–957.
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.03.016>
 33. Ковражкина ЕА (2013) Аксональные полинейропатии: патогенез и лечение. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 113(6): 22–25. [Kovrazhkina EA (2015) Axonal polyneuropathies: pathogenesis and treatment. *Zh Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova* 113(6): 22–25. (In Russ)].
 34. Goncharov NV, Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin PV (2017) Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 9759735.
<https://doi.org/10.1155/2017/9759735>
 35. Kobayashi S, Okubo R, Ugawa Y (2017) Delayed Polyneuropathy Induced by Organophosphate Poisoning. *Intern Med* 56(14): 1903–1905.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.56.7921>
 36. Lotti M (1991) The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit Rev Toxicol* 21(6): 465–487.
<https://doi.org/10.3109/10408449209089884>
 37. Johnson MK (1990) Organophosphates and delayed neuropathy—is NTE alive and well? *Toxicol Appl Pharmacol* 102(3): 385–399.
[https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90036-t](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90036-t)
 38. Chang PA, Wu YJ (2010) Neuropathy target esterase: an essential enzyme for neural development and axonal maintenance. *Int J Biochem Cell Biol* 42(5): 573–575.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.007>
 39. Read DJ, Li Y, Chao MV, Cavanagh JB, Glynn P (2009) Neuropathy target esterase is required for adult vertebrate axon maintenance. *J Neurosci* 29(37): 11594–11600.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3007-09.2009>
 40. Song F, Xie K (2012) Calcium-dependent neutral cysteine protease and organophosphate-induced delayed neuropathy. *Chem Biol Interact* 200(2–3): 114–118.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.10.001>
 41. Lotti M, Moretto A (2005) Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev* 24(1): 37–49.
<https://doi.org/10.2165/00139709-200524010-00003>
 42. Peraica M, Capodicasa E, Moretto A, Lotti M (1993) Organophosphate polyneuropathy in chicks. *Biochem Pharmacol* 45(1): 131–135.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90385-a](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90385-a)
 43. Richardson RJ, Fink JK, Glynn P, Hufnagel RB, Makhaeva GF, Wijeyesakere SJ (2020) Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN). *Adv Neurotoxicol* 4: 1–78.
<https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.01.001>
 44. Ray DE, Richards PG (2001) The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol Lett* 120(1–3): 343–351.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00266-1)
 45. London L, Flisher AJ, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H (2005) Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? *Am J Ind Med* 47(4): 308–321.
<https://doi.org/10.1002/ajim.20147>

46. *Rohlman DS, Anger WK, Lein PJ* (2011) Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32(2): 268–276.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.12.008>
47. *Kori RK, Singh MK, Jain AK, Yadav RS* (2018) Neurochemical and Behavioral Dysfunctions in Pesticide Exposed Farm Workers: A Clinical Outcome. *Indian J Clin Biochem* 33(4): 372–381.
<https://doi.org/10.1007/s12291-018-0791-5>
48. *Riddle JR, Brown M, Smith T, Ritchie EC, Brix KA, Romano J* (2003) Chemical warfare and the Gulf War: a review of the impact on Gulf veterans' health. *Mil Med* 168(8): 606–613.
49. *Khan N, Kennedy A, Cotton J, Brumby S* (2019) A Pest to Mental Health? Exploring the Link between Exposure to Agrichemicals in Farmers and Mental Health. *Int J Environ Res Public Health* 16(8): 1327.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16081327>
50. *Voorhees JR, Rohlman DS, Lein PJ, Pieper AA* (2017) Neurotoxicity in Preclinical Models of Occupational Exposure to Organophosphorus Compounds. *Front Neurosci* 10: 590.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00590>
51. *Trojsi F, Monsurro MR, Tedeschi G* (2013) Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: state of the art and research perspectives. *J Mol Sci* 14(8): 15286–15311.
<https://doi.org/10.3390/ijms140815286>
52. *Sánchez-Santed F, Colomina MT, Herrero Hernández E* (2016) Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex* 74: 417–426.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>
53. *Costa LG* (2018) Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicol Sci* 162(1): 24–35.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx266>
54. *de Araujo Furtado M, Rossetti F, Chanda S, Yourick D* (2012) Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology* 33(6): 1476–1490.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.09.001>
55. *Mudyanselage AW, Wijamunige BC, Kocon A, Carter WG* (2023) Differentiated Neurons Are More Vulnerable to Organophosphate and Carbamate Neurotoxicity than Undifferentiated Neurons Due to the Induction of Redox Stress and Accumulate Oxidatively-Damaged Proteins. *Brain Sci* 13(5): 728.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13050728>
56. *Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Krüger M, Strand D, Förstermann U* (2007) Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 115(15): 2055–2064.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.681700>
57. *Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Döhrmann M, Xia N, Li H, Spiecker L, Ruf W, Horke S* (2018) Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor. *Blood* 131(19): 2161–2172.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-807040>
58. *Lee PC, Rhodes SL, Sinsheimer JS, Bronstein J, Ritz B* (2013) Functional paraoxonase 1 variants modify the risk of Parkinson's disease due to organophosphate exposure. *Environ Int* 56: 42–47.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.03.004>
59. *Zuin M, Rosta V, Trentini A, Bosi C, Zuliani G, Cervellati C* (2023) Paraoxonase 1 activity in patients with Alzheimer disease: Systematic review and meta-analysis. *Chem Biol Interact* 382: 110601.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110601>
60. *Teodoro M, Briguglio G, Fenga C, Costa C* (2019) Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. *Toxicol Rep* 6: 564–570.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.004>
61. *Gavaghan H* (1994) NIH panel rejects Persian Gulf syndrome. *Nature* 369(6475): 8.
<https://doi.org/10.1038/369008a0>
62. *Reddy DS, Wu X, Singh T, Neff M* (2023) Experimental Models of Gulf War Illness, a Chronic Neuropsychiatric Disorder in Veterans. *Curr Protoc* 3(3): e707.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.707>
63. *Ribeiro ACR, Deshpande LS* (2021) A review of pre-clinical models for Gulf War Illness. *Pharmacol Ther* 228: 107936.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107936>
64. *Phillips KF, Deshpande LS* (2018) Chronic Neurological Morbidities and Elevated Hippocampal Calcium Levels in a DFP-Based Rat Model of Gulf War Illness. *Mil Med* 183(suppl_1):

- 552–555.
<https://doi.org/10.1093/milmed/usx148>
65. Phillips KF, Deshpande LS (2020) Calcium Hypothesis of Gulf War Illness: Role of Calcium Ions in Neurological Morbidities in a DFP-Based Rat Model for Gulf War Illness. *Neurosci Insights* 15: 2633105520979841.
<https://doi.org/10.1177/2633105520979841>
66. Phillips KF, Santos E, Blair RE, Deshpande LS (2019) Targeting Intracellular Calcium Stores Alleviates Neurological Morbidities in a DFP-Based Rat Model of Gulf War Illness. *Toxicol Sci* 169(2): 567–578.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz070>
67. Zhu J, Hawkins E, Phillips K, Deshpande LS (2020) Assessment of Ketamine and Its Enantiomers in an Organophosphate-Based Rat Model for Features of Gulf War Illness. *Int J Environ Res Public Health* 17(13): 4710.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17134710>
68. Ribeiro ACR, Jahr FM, Hawkins E, Kronfol MM, Younis RM, McClay JL, Deshpande LS (2021) Epigenetic histone acetylation and Bdnf dysregulation in the hippocampus of rats exposed to repeated, low-dose diisopropylfluorophosphate. *Life Sci* 281: 119765.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119765>
69. Slevin E, Koyama S, Harrison K, Wan Y, Klaunig JE, Wu C, Shetty AK, Meng F (2023) Dysbiosis in gastrointestinal pathophysiology: Role of the gut microbiome in Gulf War Illness. *J Cell Mol Med* 27(7): 891–905.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.17631>
70. Burzynski HE, Ayala KE, Frick MA, Dufala HA, Woodruff JL, Macht VA, Eberl BR, Hollis F, McQuail JA, Grillo CA, Fadel JR, Reagan LP (2023) Delayed cognitive impairments in a rat model of Gulf War Illness are stimulus-dependent. *Brain Behav Immun* 113: 248–258.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.07.003>
71. Ribeiro ACR, Hawkins E, Jahr FM, McClay JL, Deshpande LS (2022) Repeated exposure to chlorpyrifos is associated with a dose-dependent chronic neurobehavioral deficit in adult rats. *Neurotoxicology* 90: 172–183.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.03.011>
72. Cassereau J, Ferré M, Chevrollier A, Codron P, Verny C, Homedan C, Lenaers G, Procaccio V, May-Panloup P, Reynier P (2017) Neurotoxicity of Insecticides. *Curr Med Chem* 24(27): 2988–3001.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666170526122654>
73. Dolgacheva LP, Zinchenko VP, Goncharov NV (2022) Molecular and Cellular Interactions in Pathogenesis of Sporadic Parkinson Disease. *Int J Mol Sci* 23(21): 13043.
<https://doi.org/10.3390/ijms232113043>
74. Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y (2022) Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Front Aging Neurosci* 14: 937486.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.937486>
75. Soria Lopez JA, González HM, Léger GC (2019) Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* 167: 231–255.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
76. Mantzavinos V, Alexiou A (2017) Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Curr Alzheimer Res* 14(11): 1149–1154.
<https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125942>
77. Brimijoin S, Chen VP, Pang YP, Geng L, Gao Y (2016) Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem Biol Interact* 259(Pt B): 271–275.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.013>
78. Prince M, Guerchet M, Prina M (2015) The Epidemiology and Impact of Dementia-Current State and Future Trends. WHO Thematic Briefing. Geneva: World Health Organization. <https://hal.science/hal-03517019>. Accessed 03 Sep 2023
79. Lushchekina SV, Masson P (2020) Slow-binding inhibitors of acetylcholinesterase of medical interest. *Neuropharmacology* 177: 108236.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108236>
80. García-Morales V, González-Acedo A, Melguizo-Rodríguez L, Pardo-Moreno T, Costela-Ruiz VJ, Montiel-Troya M, Ramos-Rodríguez JJ (2021) Current Understanding of the Physiopathology, Diagnosis and Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. *Biomedicines* 9(12): 1910.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9121910>
81. Mielke MM, Leoutsakos JM, Corcoran CD, Green RC, Welsh-Bohmer KA, Tschanz JT, Lyketsos CG (2012) Effects of Food and Drug Administration-approved medications for Alzheimer's disease on clinical progression. *Alzheimers Dement* 8(3): 180–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.02.011>

82. *Tricco AC, Ashoor HM, Soobiah C, Rios P, Veroniki AA, Hamid JS, Ivory JD, Khan PA, Yazdi F, Ghassemi M, Blondal E, Ho JM, Ng CH, Hemmelgarn B, Majumdar SR, Perrier L, Straus SE* (2017) Comparative effectiveness and safety of cognitive enhancers for treating Alzheimer's disease: systematic review and network metaanalysis. *J Am Geriatr Soc* 66(1): 170–178. <https://doi.org/10.1111/jgs.15069>
83. *Ali TB, Schleret TR, Reilly BM, Chen WY, Abagyan R* (2015) Adverse effects of cholinesterase inhibitors in dementia, according to the pharmacovigilance databases of the United-States and Canada. *PLoS One* 10(12): e0144337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144337>
84. *Mohammad D, Chan P, Bradley J, Lanctôt K, Herrmann N* (2017) Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms – a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf* 16(9): 1009–1019. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1351540>
85. *Pourmand A, Shay C, Redha W, Aalam A, Mazer-Amirshahi M* (2017) Cholinergic symptoms and QTc prolongation following donepezil overdose. *Am J Emerg Med* 35: 1386.e1–1386.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2017.06.044>
86. *Suzuki Y, Kamijo Y, Yoshizawa T, Fujita Y, Usui K, Kishino T* (2017) Acute cholinergic syndrome in a patient with mild Alzheimer's type dementia who had applied a large number of rivastigmine transdermal patches on her body. *Clin Toxicol (Phila)* 55(9): 1008–1010. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1329536>
87. *Brimijoin S, Koenigsberger C* (1999) Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1(Suppl 1): 59–64. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s159>
88. *Rees TM, Berson A, Sklan EH, Younkin L, Younkin S, Brimijoin S, Soreq H* (2005) Memory deficits correlating with acetylcholinesterase splice shift and amyloid burden in doubly transgenic mice. *Curr Alzheimer Res* 2(3): 291–300. <https://doi.org/10.2174/1567205054367847>
89. *Rees T, Hammond PI, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S* (2003) Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging* 24(6): 777–787. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00230-0](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00230-0)
90. *Dickerson TJ, Beuscher AE, 4th, Rogers CJ, Hixon MS, Yamamoto N, Xu Y, Olson AJ, Janda KD* (2005) Discovery of acetylcholinesterase peripheral anionic site ligands through computational refinement of a directed library. *Biochemistry* 44: 14845–14853. <https://doi.org/10.1021/bi051613x>
91. *Pope CN, Brimijoin S* (2018) Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol* 153: 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.044>
92. *Nordberg A, Svensson AL* (1998) Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf* 19(6): 465–480. <https://doi.org/10.2165/00002018-199819060-00004>
93. *Kryger G, Silman I, Sussman JL* (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* 7(3): 297–307. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80040-9)
94. *Lane M, Carter D, Pescrille JD, Aracava Y, Fawcett WP, Basinger GW, Pereira EFR, Albuquerque EX* (2020) Oral Pretreatment with Galantamine Effectively Mitigates the Acute Toxicity of a Supra-lethal Dose of Soman in Cynomolgus Monkeys Posttreated with Conventional Antidotes. *J Pharmacol Exp Ther* 375(1): 115–126. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.265843>
95. *Chelusnova YuV, Voronina PA, Belinskaia DA, Goncharov NV* (2023) Benzimidazole-Carboxamides as Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease: Primary Analysis In Silico and In Vitro. *Bull Exp Biol Med* 175(3): 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05865-4>
96. *Belinskaia DA, Voronina PA, Krivorotov DV, Jenkins RO, Goncharov NV* (2023) Anticholinesterase and Serotonergic Evaluation of Benzimidazole-Carboxamides as Potential Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmaceutics* 15(8): 2159. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082159>
97. *Hashim HZ, Wan Musa WR, Ngui CS, Wan Yahya WN, Tan HJ, Ibrahim N* (2011) Parkinsonism complicating acute organophosphate insecticide poisoning. *Ann Acad Med Singap* 40(3): 150–151.
98. *Pezzoli G, Cereda E* (2013) Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* 80(22): 2035–2041. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318294b3c8>
99. *Narayan S, Liew Z, Paul K, Lee PC, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B* (2013) Household organophosphorus pesticide use and Parkinson's disease. *Int J Epidemiol* 42(5): 1476–1485. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt170>

100. Wang A, Cockburn M, Ly TT, Bronstein JM, Ritz B (2014) The association between ambient exposure to organophosphates and Parkinson's disease risk. *Occup Environ Med* 71(4): 275–281. <https://doi.org/10.1136/oemed-2013-101394>
101. Norkaew S, Lertmaharit S, Wilaiwan W, Siri Wong W, Pérez HM, Robson MG (2015) An association between organophosphate pesticides exposure and Parkinsonism amongst people in an agricultural area in Ubon Ratchathani Province, Thailand. *Rocz Panstw Zakl Hig* 66(1): 21–26.
102. Chuang CS, Su HL, Lin CL, Kao CH (2017) Risk of Parkinson disease after organophosphate or carbamate poisoning. *Acta Neurol Scand* 136(2): 129–137. <https://doi.org/10.1111/ane.12707>
103. Davis KL, Yesavage JA, Berger PA (1978) Single case study. Possible organophosphate-induced parkinsonism. *J Nerv Ment Dis* 166(3): 222–225. <https://doi.org/10.1097/00005053-197803000-00010>
104. Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK (1999) Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology* 52(7): 1467–1471. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.7.1467>
105. Das K, Ghosh M, Nag C, Nandy SP, Banerjee M, Datta M, Devi G, Chatterjee G (2011) Role of familial, environmental and occupational factors in the development of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 8(5): 345–351. <https://doi.org/10.1159/000323797>
106. Kanthasamy A, Jin H, Charli A, Vellareddy A, Kanthasamy A (2019) Environmental neurotoxicant-induced dopaminergic neurodegeneration: a potential link to impaired neuroinflammatory mechanisms. *Pharmacol Ther* 197: 61–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.01.001>
107. Paul KC, Sinsheimer JS, Cockburn M, Bronstein JM, Bordelon Y, Ritz B (2017) Organophosphate pesticides and PON1 L55M in Parkinson's disease progression. *Environ Int* 107: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.018>
108. Muñoz-Quezada MT, Lucero BA, Iglesias VP, Muñoz MP, Cornejo CA, Achu E, Baumert B, Hanchey A, Concha C, Brito AM, Villalobos M (2016) Chronic exposure to organophosphate (OP) pesticides and neuropsychological functioning in farm workers: a review. *Int J Occup Environ Health* 22(1): 68–79. <https://doi.org/10.1080/10773525.2015.1123848>
109. Wani WY, Kandimalla RJL, Sharma DR, Kaushal A, Ruban A, Sunkaria A, Vallamkonda J, Chiarugi A, Reddy PH, Gill KD (2017) Cell cycle activation in p21 dependent pathway: An alternative mechanism of organophosphate induced dopaminergic neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(7): 1858–1866. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.014>
110. Naughton SX, Terry AV Jr (2018) Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology* 408: 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>
111. Farkhondeh T, Mehrpour O, Forouzanfar F, Roshanravan B, Samarghandian S (2020) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in organophosphate pesticide-induced neurotoxicity and its amelioration: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 27(20): 24799–24814. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09045-z>
112. Zhao MW, Yang P, Zhao LL (2019) Chlorpyrifos activates cell pyroptosis and increases susceptibility on oxidative stress-induced toxicity by miR-181/SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 signaling pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Implication for association between chlorpyrifos and Parkinson's disease. *Environ Toxicol* 34(6): 699–707. <https://doi.org/10.1002/tox.22736>
113. Anderson FL, von Herrmann KM, Young AL, Havrda MC (2021) Bbc3 Loss Enhances Survival and Protein Clearance in Neurons Exposed to the Organophosphate Pesticide Chlorpyrifos. *Toxicol Sci* 183(2): 378–392. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab090>
114. Parashar A, Udayabanu M (2017) Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 38: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.02.002>
115. Gao B, Bian X, Mahbub R, Lu K (2017) Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions. *Environ Health Perspect* 125(2): 198–206. <https://doi.org/10.1289/EHP202>
116. Gao B, Bian X, Chi L, Tu P, Ru H, Lu K (2017) Editor's Highlight: Organophosphate Diazinon Altered Quorum Sensing, Cell Motility, Stress Response, and Carbohydrate Metabolism of Gut Microbiome. *Toxicol Sci* 157(2): 354–364. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx053>

117. Stanaway IB, Wallace JC, Shojaie A, Griffith WC, Hong S, Wilder CS, Green FH, Tsai J, Knight M, Workman T, Vigoren EM, McLean JS, Thompson B, Faustman EM (2016) Human Oral Buccal Microbiomes Are Associated with Farmworker Status and Azinphos-Methyl Agricultural Pesticide Exposure. *Appl Environ Microbiol* 83(2): e02149–16.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02149-16>
118. Oh J, Kim K, Kannan K, Parsons PJ, Mlodnicka A, Schmidt RJ, Schweitzer JB, Hertz-Picciotto I, Bennett DH (2023) Early childhood exposure to environmental phenols and parabens, phthalates, organophosphate pesticides, and trace elements in association with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptoms in the CHARGE study. *Res Sq [Preprint]* rs.3.rs-2565914.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2565914/v1>
119. Waits A, Chang CH, Yu CJ, Du JC, Chiou HC, Hou JW, Yang W, Chen HC, Chen YS, Hwang B, Chen ML (2022) Exposome of attention deficit hyperactivity disorder in Taiwanese children: exploring risks of endocrine-disrupting chemicals. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 32(1): 169–176.
<https://doi.org/10.1038/s41370-021-00370-0>
120. Sagiv SK, Kogut K, Harley K, Bradman A, Morga N, Eskenazi B (2021) Gestational Exposure to Organophosphate Pesticides and Longitudinally Assessed Behaviors Related to Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Executive Function. *Am J Epidemiol* 190(11): 2420–2431.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwab173>
121. Hall AM, Ramos AM, Drover SS, Choi G, Keil AP, Richardson DB, Martin CL, Olshan AF, Vil-langer GD, Reichborn-Kjennerud T, Zeiner P, Øvergaard KR, Sakhi AK, Thomsen C, Aase H, Engel SM (2023) Gestational organophosphate ester exposure and preschool attention-deficit/hyperactivity disorder in the Norwegian Mother, Father, and Child cohort study. *Int J Hyg Environ Health* 248: 114078.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114078>
122. Eadeh HM, Davis J, Ismail AA, Abdel Rasoul GM, Hendy OM, Olson JR, Bonner MR, Rohlman DS (2023) Evaluating how occupational exposure to organophosphates and pyrethroids impacts ADHD severity in Egyptian male adolescents. *Neurotoxicology* 95: 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.01.001>
123. Merwin SJ, Obis T, Nunez Y, Re DB (2017) Organophosphate neurotoxicity to the voluntary motor system on the trail of environment-caused amyotrophic lateral sclerosis: the known, the misknown, and the unknown. *Arch Toxicol* 91(8): 2939–2952.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1926-1>
124. Huen K, Solomon O, Kogut K, Eskenazi B, Holland N (2018) PON1 DNA methylation and neurobehavior in Mexican-American children with prenatal organophosphate exposure. *Environ Int* 121(Pt 1): 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.044>
125. Andrew A, Zhou J, Gui J, Harrison A, Shi X, Li M, Guetti B, Nathan R, Tischbein M, Pioro EP, Stommel E, Bradley W (2021) Pesticides applied to crops and amyotrophic lateral sclerosis risk in the U.S. *Neurotoxicology* 87: 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.09.004>
126. Zhu Q, Zhou J, Zhang Y, Huang H, Han J, Cao B, Xu D, Zhao Y, Chen G (2023) Risk factors associated with amyotrophic lateral sclerosis based on the observational study: a systematic review and meta-analysis. *Front Neurosci* 17: 1196722.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1196722>
127. Bibi S, Kauser S, Ahsan I (2022) Guillain-Barre Syndrome: A Rare Complication of Organophosphate Poisoning. *J Coll Physicians Surg Pak* 32(4): S52–S54.
<https://doi.org/10.29271/jcpsp.2022.Supp1.S52>
128. Miranda C, Brannagan TH 3rd (2023) Acute/chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Handb Clin Neurol* 195: 619–633.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98818-6.00026-1>
129. Zubair AS, Rethana M, Ma A, McAlpine LS, Abulaban A, Munro BS, Patwa HS, Nowak RJ, Roy B (2023) Plasmapheresis Versus Intravenous Immunoglobulin in Patients with Autoimmune Neuromuscular and Neuro-immunological Conditions. *J Clin Neuromuscul Dis* 25(1): 11–17.
<https://doi.org/10.1097/CND.0000000000000439>
130. Rattan SI (2014) Aging is not a disease: implications for intervention. *Aging Dis* 5(3): 196–202.
<https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500196>
131. Rattan SIS (2018) Biogerontology: research status, challenges and opportunities. *Acta Biomed* 89(2): 291–301.
<https://doi.org/10.23750/abm.v89i2.7403>

132. Rackova L, Mach M, Brnoliakova Z (2021) An update in toxicology of ageing. *Environ Toxicol Pharmacol* 84: 103611.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103611>
133. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153(6): 1194–1217.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
134. Mattson MP, Arumugam TV (2018) Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab* 27(6): 1176–1199.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
135. Velez ST, Wise JP Jr (2023) Among Gerontogens, Heavy Metals Are a Class of Their Own: A Review of the Evidence for Cellular Senescence. *Brain Sci* 13(3): 500.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13030500>
136. Youssef SA, Capucchio MT, Rofina JE, Chambers JK, Uchida K, Nakayama H, Head E (2016) Pathology of the Aging Brain in Domestic and Laboratory Animals, and Animal Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Vet Pathol* 53(2): 327–348.
<https://doi.org/10.1177/0300985815623997>
137. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31(1–3): 3–16.
<https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:003>
138. Shin EJ, Jeong JH, Bing G, Park ES, Chae JS, Yen TP, Kim WK, Wie MB, Jung BD, Kim HJ, Lee SY, Kim HC (2008) Kainate-induced mitochondrial oxidative stress contributes to hippocampal degeneration in senescence-accelerated mice. *Cell Signal* 20(4): 645–658.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.11.014>
139. Lu CW, Wu CC, Chiu KM, Lee MY, Lin TY, Wang SJ (2022) Inhibition of Synaptic Glutamate Exocytosis and Prevention of Glutamate Neurotoxicity by Eupatilin from *Artemisia argyi* in the Rat Cortex. *Int J Mol Sci* 23(21): 13406.
<https://doi.org/10.3390/ijms232113406>
140. Kylo T, Singh V, Shim H, Latika S, Nguyen HM, Chen YJ, Terry E, Wulff H, Erickson JD (2023) Riluzole and novel naphthalenyl substituted aminothiazole derivatives prevent acute neural excitotoxic injury in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 224: 109349.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109349>
141. Loo J, Bana MAFS, Tan JK, Aan Goon J (2023) Effect of dietary restriction on health span in *Caenorhabditis elegans*: A systematic review. *Exp Gerontol* 2023: 112294. Epub ahead of print. PMID:
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112294>
142. Double KL, Dedov VN, Fedorow H, Kettle E, Halliday GM, Garner B, Brunk UT (2008) The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cell Mol Life Sci* 65(11): 1669–1682.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7581-9>
143. Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33(5): 611–619.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00959-0)
144. Benavides SH, Monserrat AJ, Fariña S, Porta EA (2002) Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Arch Gerontol Geriatr* 34(3): 219–231.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(01\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(01)00223-0)
145. Jolly RD, Douglas BV, Davey PM, Roiri JE (1995) Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 41(Suppl 2): 283–295.
<https://doi.org/10.1159/000213750>
146. Song SB, Shim W, Hwang ES (2023) Lipofuscin Granule Accumulation Requires Autophagy Activation. *Mol Cells* 46(8): 486–495.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0019>
147. Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M (2018) An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci* 12: 464.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00464>
148. Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, Donato AJ (2023) Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol* 20(1): 38–51.
<https://doi.org/10.1038/s41569-022-00739-0>
149. Sun X, Feinberg MW (2021) Vascular endothelial senescence: Pathobiological Insights, Emerging Long Noncoding RNA Targets, Challenges and Therapeutic opportunities. *Front Physiol* 12: 693067.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.693067>

150. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373–376.
<https://doi.org/10.1038/288373a0>
151. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122): 524–526.
<https://doi.org/10.1038/327524a0>
152. Hsu SH, Tsou TC, Chiu SJ, Chao JI (2005) Inhibition of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor expression by arsenite in the vascular endothelial cells. *Toxicol Lett* 159(1): 47–59.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.04.012>
153. Carvalho FA, Graça LM, Martins-Silva J, Saldanha C (2005) Biochemical characterization of human umbilical vein endothelial cell membrane bound acetylcholinesterase. *FEBS J* 272(21): 5584–5594.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04953.x>
154. Santos SC, Vala I, Miguel C, Barata JT, Garção P, Agostinho P, Mendes M, Coelho AV, Calado A, Oliveira CR, e Silva JM, Saldanha C (2007) Expression and subcellular localization of a novel nuclear acetylcholinesterase protein. *J Biol Chem* 282(35): 25597–25603.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700569200>
155. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I (2001) The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol* 85(1): 24–28.
<https://doi.org/10.1254/jjp.85.24>
156. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I (2003) Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sci* 72(18–19): 2111–2116.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00069-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00069-9)
157. Мусийчук ЮИ, Янно ЛВ (1988) К проблеме отдаленных последствий действия химических веществ у людей. *Гигиена труда* 8: 4–7. [Musiychuk YuI, Yanno LV (1988) On the problem of long-term effects of chemicals in humans. *Gigiyena truda* 8: 4–7. (In Russ)].
158. Grigoryan H, Schopfer LM, Thompson CM, Terry AV, Masson P, Lockridge O (2008) Mass spectrometry identifies covalent binding of soman, sarin, chlorpyrifos oxon, diisopropyl fluorophosphate, and FP-biotin to tyrosines on tubulin: a potential mechanism of long-term toxicity by organophosphorus agents. *Chem Biol Interact* 175(1–3): 180–186.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.013>
159. Stephens R, Spurgeon A, Calvert IA, Beach J, Levy LS, Berry H, Harrington JM (1995) Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *Lancet* 345(8958): 1135–1139.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90976-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90976-1)
160. Terry AV Jr, Gearhart DA, Beck WD Jr, Truan JN, Middlemore ML, Williamson LN, Bartlett MG, Prendergast MA, Sickles DW, Buccafusco JJ (2007) Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. *J Pharmacol Exp Ther* 322(3): 1117–1128.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.125625>
161. Durham SK, Imamura T (1988) Morphogenesis of O,O,S-trimethyl phosphorothioate-induced pulmonary injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 96(3): 417–428.
[https://doi.org/10.1016/0041-008x\(88\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0041-008x(88)90002-6)
162. Yıldırım E, Baydan E, Kanbur M, Kul O, Cinar M, Ekici H, Atmaca N (2013) The effect of chlorpyrifos on isolated thoracic aorta in rats. *Biomed Res Int* 2013: 376051.
<https://doi.org/10.1155/2013/376051>
163. Mindukshev IV, Ermolaeva EE, Vivulanets EV, Shabanova EYu, Petrishchev NN, Goncharov NV, Jenkins RO, Krivchenko AI (2005) A new method for studying platelets, based on the low-angle light scattering technique. 2. Application of the method in experimental toxicology and clinical pathology. *Spectroscopy* 19(5–6): 247–257.
<https://doi.org/10.1155/2005/919317>
164. Goncharov N, Radilov A, Mindukshev I, Kuznetsov S, Yermolayeva Ye, Glashkina L, Shkayeva I, Dobrylko I, Kuznetsov A (2006) New Understanding on Pathogenesis of Delayed Effects of Rvx Low-Dose Chronic Exposure. In: Kolodkin VM, Ruck W (eds) *Ecological Risks Associated with the Destruction of Chemical Weapons*. NATO Security through Science Series. Springer. Dordrecht. 297–303.
https://doi.org/10.1007/1-4020-3137-8_33
165. Radilov A, Rembovskiy V, Rybalchenko I, Savelieva E, Podolskaya E, Babakov V, Ermolaeva E, Dulov S, Kuznetsov S, Mindukshev I, Shpak A, Krasnov I, Khlebnikova N, Jenkins R, Goncharov N (2009) Russian VX. In: Gupta R (ed) *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier Inc. Oxford. 69–91.

166. Roumenina LT, Rayes J, Frimat M, Fremeaux-Bacchi V (2016) Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunol Rev* 274(1): 307–329.
<https://doi.org/10.1111/imr.12479>
167. Odman S, Levitan H, Robinson PJ, Michel ME, Ask P, Rapoport SI (1987) Peripheral nerve as an osmometer: role of endoneurial capillaries in frog sciatic nerve. *Am J Physiol* 252(3 Pt 1): C335–C341.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.252.3.C335>
168. Low PA (1984) Endoneurial fluid pressure and microenvironment of nerve. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (eds) *Peripheral Neuropathy*. WB Saunders. Philadelphia. 599–618.
169. Olsson Y (1984) Vascular permeability in the peripheral nervous system. In: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge RP (eds) *Peripheral Neuropathy*. WB Saunders. Philadelphia. 579–597.
170. Lalu K, Lampelo S, Vanha-Perttula T (1986) Characterization of three aminopeptidases purified from maternal serum. *Biochim Biophys Acta* 873(2): 190–197.
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90045-2)
171. Favaloro EJ, Browning T, Facey D (1993) CD13 (GP150; aminopeptidase-N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell-surface associated. *Exp Hematol* 21(13): 1695–1701.
172. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E (2000) Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60(3): 722–727.
173. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97(3): 652–659.
<https://doi.org/10.1182/blood.v97.3.652>
174. Bauvois B, Dauzonne D (2006) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 26(1): 88–130.
<https://doi.org/10.1002/med.20044>
175. Staton CA, Brown NJ, Rodgers GR, Corke KP, Tazzyman S, Underwood JC, Lewis CE (2004) Alphashtatin, a 24-amino acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. *Blood* 103(2): 601–606.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2192>
176. van Hinsbergh VW, Engelse MA, Quax PH (2006) Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4): 716–728.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17>
177. Deshpande LS, Blair RE, Phillips KF, DeLorenzo RJ (2016) Role of the calcium plateau in neuronal injury and behavioral morbidities following organophosphate intoxication. *Ann N Y Acad Sci* 1374(1): 176–183.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13122>
178. Deshpande LS, DeLorenzo RJ (2020) Novel therapeutics for treating organophosphate-induced status epilepticus co-morbidities, based on changes in calcium homeostasis. *Neurobiol Dis* 133: 104418.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.006>
179. Pearson JN, Patel M (2016) The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1378(1): 17–24.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13115>
180. Guignet M, Dhakal K, Flannery BM, Hobson BA, Zolkowska D, Dhir A, Bruun DA, Li S, Wahab A, Harvey DJ, Silverman JL, Rogawski MA, Lein PJ (2020) Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication. *Neurobiol Dis* 133: 104431.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.019>
181. Rojas A, Ganesh T, Wang W, Wang J, Dingleline R (2020) A rat model of organophosphate-induced status epilepticus and the beneficial effects of EP2 receptor inhibition. *Neurobiol Dis* 133: 104399.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.02.010>
182. Putra M, Sharma S, Gage M, Gasser G, Hinojo-Perez A, Olson A, Gregory-Flores A, Puttachary S, Wang C, Anantharam V, Thippeswamy T (2020) Inducible nitric oxide synthase inhibitor, 1400W, mitigates DFP-induced long-term neurotoxicity in the rat model. *Neurobiol Dis* 133: 104443.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.031>
183. Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Onishi M, Nomura Y, Matsubara N, Iwai C, Ogawa M, Hashimura M, Sato K, Kato M, Ohno Y (2019) Mechanism Underlying Organophosphate Para-

- oxon-Induced Kinetic Tremor. *Neurotox Res* 35(3): 575–583.
<https://doi.org/10.1007/s12640-019-0007-7>
184. *Manek E, Petroianu GA* (2021) Brain delivery of antidotes by polymeric nanoparticles. *J Appl Toxicol* 41(1): 20–32.
<https://doi.org/10.1002/jat.4029>
185. *Zdarova Karasova J, Mzik M, Kucera T, Vecera Z, Kassa J, Sestak V* (2020) Interaction of Cucurbit[7]uril with Oxime K027, Atropine, and Paraoxon: Risky or Advantageous Delivery System? *Int J Mol Sci* 21(21): 7883.
<https://doi.org/10.3390/ijms21217883>
186. *Laguna J, Fetting JC, Isaacs L* (2005) Cucurbit[n]uril analogues: synthetic and mechanistic studies. *J Org Chem* 70(25): 10381–10392.
<https://doi.org/10.1021/jo051655r>
187. *Licata C, Liu L, Mole D, Thorp J, Chand R, Chaulagain S* (2019) Social and Cultural Factors Leading to Suicide Attempt via Organophosphate Poisoning in Nepal. *Case Rep Psychiatry* 2019: 7681309.
<https://doi.org/10.1155/2019/7681309>
188. *Zhuang Q, Franjesevic AJ, Corrigan TS, Coldren WH, Dicken R, Sillart S, DeYong A, Yoshino N, Smith J, Fabry S, Fitzpatrick K, Blanton TG, Joseph J, Yoder RJ, McElroy CA, Ekici ÖD, Callam CS, Hadad CM* (2018) Demonstration of In Vitro Resurrection of Aged Acetylcholinesterase after Exposure to Organophosphorus Chemical Nerve Agents. *J Med Chem* 61(16): 7034–7042.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01620>
189. *Jackson C, Ardinger C, Winter KM, McDonough JH, McCarren HS* (2019) Validating a model of benzodiazepine refractory nerve agent-induced status epilepticus by evaluating the anticonvulsant and neuroprotective effects of scopolamine, memantine, and phenobarbital. *J Pharmacol Toxicol Methods* 97: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.02.006>
190. *Dorandeu F, Barbier L, Dhote F, Testylier G, Carpentier P* (2013) Ketamine combinations for the field treatment of soman-induced self-sustaining status epilepticus. Review of current data and perspectives. *Chem Biol Interact* 203(1): 154–159.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.013>
191. *Niquet J, Baldwin R, Suchomelova L, Lumley L, Eavey R, Wasterlain CG* (2017) Treatment of experimental status epilepticus with synergistic drug combinations. *Epilepsia* 58(4): e49–e53.
<https://doi.org/10.1111/epi.13695>
192. *Krishnan JKS, Figueiredo TH, Moffett JR, Arun P, Appu AP, Puthillathu N, Braga MF, Flagg T, Namboodiri AM* (2017) Brief isoflurane administration as a post-exposure treatment for organophosphate poisoning. *Neurotoxicology* 63: 84–89.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.009>
193. *Apland JP, Aroniadou-Anderjaska V, Figueiredo TH, De Araujo Furtado M, Braga MFM* (2018) Full Protection Against Soman-Induced Seizures and Brain Damage by LY293558 and Carbamiphen Combination Treatment in Adult Rats. *Neurotox Res* 34(3): 511–524.
<https://doi.org/10.1007/s12640-018-9907-1>
194. *Aroniadou-Anderjaska V, Figueiredo TH, Aplan JP, Braga MF* (2019) Targeting the glutamatergic system to counteract organophosphate poisoning: A novel therapeutic strategy. *Neurobiol Dis* 2019: 104406.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.02.017>
195. *Dhir A, Bruun DA, Guignet M, Tsai YH, González E, Calsbeek J, Vu J, Saito N, Tancredi DJ, Harvey DJ, Lein PJ, Rogawski MA* (2020) Allopregnanolone and perampanel as adjuncts to midazolam for treating diisopropyl fluorophosphate-induced status epilepticus in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1480(1): 183–206.
<https://doi.org/10.1111/nyas.14479>
196. *Lumley L, Miller D, Muse WT, Marrero-Rosado B, de Araujo Furtado M, Stone M, McGuire J, Whalley C* (2019) Neurosteroid and benzodiazepine combination therapy reduces status epilepticus and long-term effects of whole-body sarin exposure in rats. *Epilepsia Open* 4(3): 382–396.
<https://doi.org/10.1002/epi4.12344>
197. *Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F* (2004) The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neurosci Biobehav Rev* 28(5): 507–524.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.008>
198. *Weinshenker D, Szot P* (2002) The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol Ther* 94(3): 213–233.
[https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00218-8](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00218-8)
199. *Kuznetsov SV, Jenkins RO, Goncharov NV* (2007) Electrophysiological study of infant and adult rats under acute intoxication with fluoroacetamide. *J Appl Toxicol* 27(6): 538–550.
<https://doi.org/10.1002/jat.1234>

200. Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM (2005) Change of Parameters of Functioning of the Cardiovascular and Respiratory Systems in Rats of Different Ages under Effects of Low Doses of the Cholinesterase Inhibitor Phosphacol. *J Evol Biochem Phys* 41: 201–210.
<https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055-x>
201. Little JG, Bealer SL (2012) β adrenergic blockade prevents cardiac dysfunction following status epilepticus in rats. *Epilepsy Res* 99(3): 233–239.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.12.003>
202. McCarren HS, Arbutus JA, Ardinger C, Dunn EN, Jackson CE, McDonough JH (2018) Dexmedetomidine stops benzodiazepine-refractory nerve agent-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 141: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.01.010>
203. Boggs JG, Marmarou A, Agnew JP, Morton LD, Towne AR, Waterhouse EJ, Pellock JM, DeLorenzo RJ (1998) Hemodynamic monitoring prior to and at the time of death in status epilepticus. *Epilepsy Res* 31(3): 199–209.
[https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(98\)00031-x](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(98)00031-x)
204. Rossi PR, Yusuf S, Ramsdale D, Furze L, Sleight P (1983) Reduction of ventricular arrhythmias by early intravenous atenolol in suspected acute myocardial infarction. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286(6364): 506–510.
<https://doi.org/10.1136/bmj.286.6364.506>
205. Mangano DT, Layug EL, Wallace A, Tateo I (1996) Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N Engl J Med* 335(23): 1713–1720.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199612053352301>
206. Deshpande LS, Blair RE, Halquist M, Kosmider L, DeLorenzo RJ (2020) Intramuscular atenolol and levetiracetam reduce mortality in a rat model of paraoxon-induced status epilepticus. *Ann N Y Acad Sci* 1480(1): 219–232.
<https://doi.org/10.1111/nyas.14500>
207. el-Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau KA, Shipley MT (1992) Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AChE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol* 118(2): 153–163.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(92\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(92)90032-1)
208. Szot P, Weinshenker D, White SS, Robbins CA, Rust NC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Norepinephrine-deficient mice have increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. *J Neurosci* 19(24): 10985–10992.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-24-10985.1999>
209. Jimenez-Rivera C, Voltura A, Weiss GK (1987) Effect of locus ceruleus stimulation on the development of kindled seizures. *Exp Neurol* 95(1): 13–20.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90002-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90002-1)
210. Giorgi FS, Ferrucci M, Lazzeri G, Pizzanelli C, Lenzi P, Alessandri MG, Murri L, Fornai F (2003) A damage to locus coeruleus neurons converts sporadic seizures into self-sustaining limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 17(12): 2593–2601.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02692.x>
211. Bealer SL, Little JG, Metcalf CS, Brewster AL, Anderson AE (2010) Autonomic and cellular mechanisms mediating detrimental cardiac effects of status epilepticus. *Epilepsy Res* 91(1): 66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.06.013>
212. Read MI, McCann DM, Millen RN, Harrison JC, Kerr DS, Sammut IA (2015) Progressive development of cardiomyopathy following altered autonomic activity in status epilepticus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(9): H1554–H1564.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00256.2015>
213. Read MI, Harrison JC, Kerr DS, Sammut IA (2015) Atenolol offers better protection than clonidine against cardiac injury in kainic acid-induced status epilepticus. *Br J Pharmacol* 172(19): 4626–4638.
<https://doi.org/10.1111/bph.13132>
214. Deshpande LS, Phillips K, Huang B, DeLorenzo RJ (2014) Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. *Neurotoxicology* 44: 352–357.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.008>
215. Deshpande LS, Blair RE, Huang BA, Phillips KF, DeLorenzo RJ (2016) Pharmacological blockade of the calcium plateau provides neuroprotection following organophosphate paraoxon induced status epilepticus in rats. *Neurotoxicol Teratol* 56: 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.05.002>
216. Kubasov IV, Arutyunyan RS, Matrosova EV (2016) Transformation of individual contractile responses during tetanus in rat fast and slow skeletal muscles. *J Evol Biochem Phys* 52: 46–55.
<https://doi.org/10.1134/S0022093016010051>

217. Kubasov IV, Arutyunyan RS, Matrosova EV, Kubasov II (2016) Properties of intratetanic individual contractile responses in rat slow skeletal muscles during modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. *J Evol Biochem Phys* 52: 369–379.
<https://doi.org/10.1134/S002209301605006957>
218. Avila G, de la Rosa JA, Monsalvo-Villegas A, Montiel-Jaen MG (2019) Ca^{2+} Channels Mediate Bidirectional Signaling between Sarcolemma and Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Cells. *Cells* 9(1): 55.
<https://doi.org/10.3390/cells9010055>
219. Woo JS, Jeong SY, Park JH, Choi JH, Lee EH (2020) Calsequestrin: a well-known but curious protein in skeletal muscle. *Exp Mol Med* 52(12): 1908–1925.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-00535-1>
220. Chaube R, Hess DT, Wang YJ, Plummer B, Sun QA, Laurita K, Stamler JS (2014) Regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channel RyR1 by S-palmitoylation. *J Biol Chem* 289(12): 8612–8619.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548925>
221. Lamboley CR, Wyckelsma VL, Dutka TL, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD (2015) Contractile properties and sarcoplasmic reticulum calcium content in type I and type II skeletal muscle fibres in active aged humans. *J Physiol* 593(11): 2499–24514.
<https://doi.org/10.1113/JP270179>
222. Goldstein N, Goldstein R, Terterov D, Kamensky AA, Kovalev GI, Zolotarev YA, Avakyan GN, Terterov S (2012) Blood-brain barrier unlocked. *Biochemistry (Mosc)* 77(5): 419–424.
<https://doi.org/10.1134/S000629791205001X>
223. Rodríguez-Blanco J, Rodríguez-Yanez T, Rodríguez-Blanco JD, Almanza-Hurtado AJ, Martínez-Avila MC, Borré-Naranjo D, Acuña Caballero MC, Dueñas-Castell C (2022) Neuromuscular blocking agents in the intensive care unit. *J Int Med Res* 50(9): 3000605221128148.
<https://doi.org/10.1177/03000605221128148>
224. Bracali AM, Sette MP, Marana E (1979) Risk and choice of anesthetics for patients with previous malignant hyperthermia syndrome. *Minerva Anestesiol* 45(10): 749–753. (In Italian).
225. Ben Abraham R, Cahana A, Krivosic-Horber RM, Perel A (1997) Malignant hyperthermia susceptibility: anaesthetic implications and risk stratification. *QJM* 90(1): 13–18.
<https://doi.org/10.1093/qjmed/90.1.13>
226. Jönsson L, Häggendal J, Johansson G, Thorén-Tolling K, Bjurström S, Carlsten J (1989) Cardiac manifestation and blood catecholamine levels during succinylcholine-induced stress of malignant hyperthermia sensitive pigs. *Zentralbl Veterinarmed A* 36(10): 772–782.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1989.tb00791.x>
227. Lopez RJ, Byrne S, Vukcevic M, Sekulic-Jablanovic M, Xu L, Brink M, Alamelu J, Voermans N, Snoeck M, Clement E, Muntoni F, Zhou H, Radunovic A, Mohammed S, Wraige E, Zorzato F, Treves S, Jungbluth H (2016) An RYR1 mutation associated with malignant hyperthermia is also associated with bleeding abnormalities. *Sci Signal* 9(435): ra68.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad9813>
228. Riazi S, Kraeva N, Hopkins PM (2018) Malignant Hyperthermia in the Post-Genomics Era: New Perspectives on an Old Concept. *Anesthesiology* 128(1): 168–180.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001878>
229. Ochi G, Watanabe K, Tokuoka H, Hatakenaka S, Arai T (1995) Neuroleptic malignant-like syndrome: a complication of acute organophosphate poisoning. *Can J Anaesth* 42(11): 1027–1030.
<https://doi.org/10.1007/BF03011077>
230. Moffatt A, Mohammed F, Eddleston M, Azher S, Eyer P, Buckley NA (2010) Hypothermia and Fever after organophosphorus poisoning in humans—a prospective case series. *J Med Toxicol* 6(4): 379–385.
<https://doi.org/10.1007/s13181-010-0012-y>
231. Talaie H, Owliaey H, Pajoumand A, Gholaminejad M, Mehrpour O (2012) Temperature changes among organophosphate poisoned patients, Tehran- Iran. *Daru* 20(1): 52.
<https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-52>
232. Tani H, Taniguchi N, Niigawa H, Hosono T, Ikura Y, Sakamoto S, Kudo T, Nishimura T, Take-da M (1996) Development of an animal model for neuroleptic malignant syndrome: heat-exposed rabbits with haloperidol and atropine administration exhibit increased muscle activity, hyperthermia, and high serum creatine phosphokinase level. *Brain Res* 743(1-2): 263–270.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01059-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01059-1)
233. Oruch R, Pryme IF, Engelsen BA, Lund A (2017) Neuroleptic malignant syndrome: an easily overlooked neurologic emergency. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13: 161–175.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S118438>
234. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kinsel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam.

- Proc Natl Acad Sci U S A 101(26): 9861–9866.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0308208101>
235. *Lee CY, Chen CC, Liou HH* (2009) Levetiracetam inhibits glutamate transmission through pre-synaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. *Br J Pharmacol* 158(7): 1753–1762.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00463.x>
236. *Nagarkatti N, Deshpande LS, DeLorenzo RJ* (2008) Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture. *Neurosci Lett* 436(3): 289–293.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.076>
237. *Fukuyama K, Tanahashi S, Nakagawa M, Yamamura S, Motomura E, Shiroyama T, Tanii H, Okada M* (2012) Levetiracetam inhibits neurotransmitter release associated with CICR. *Neurosci Lett* 518(2): 69–74.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.056>
238. *Farizatto KLG, Bahr BA* (2017) Paraoxon: An Anticholinesterase That Triggers an Excitotoxic Cascade of Oxidative Stress, Adhesion Responses, and Synaptic Compromise. *Eur Sci J* 13: 29–37.
<https://doi.org/10.19044/esj.2017.c1p4>
239. *Kumar S, Agrawal S, Raisinghani N, Khan S* (2018) Leukocyte count: A reliable marker for the severity of organophosphate intoxication? *J Lab Physicians* 10(2): 185–188.
https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_100_17
240. *Davies NM* (1995) Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis Colon Rectum* 38(12): 1311–1321.
<https://doi.org/10.1007/BF02049158>
241. *Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P* (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2317–2321.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2317>
242. *Liu C, Li Y, Lein PJ, Ford BD* (2012) Spatiotemporal patterns of GFAP upregulation in rat brain following acute intoxication with diisopropylfluorophosphate (DFP). *Curr Neurobiol* 3(2): 90–97.
243. *Jiang J, Quan Y, Ganesh T, Pouliot WA, Dudek FE, Dingledine R* (2013) Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9): 3591–3596.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218498110>
244. *Serrano GE, Lelutiu N, Rojas A, Cochi S, Shaw R, Makinson CD, Wang D, FitzGerald GA, Dingledine R* (2011) Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. *J Neurosci* 31(42): 14850–14860.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3922-11.2011>
245. *Varvel NH, Neher JJ, Bosch A, Wang W, Ransohoff RM, Miller RJ, Dingledine R* (2016) Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(38): E5665–E5674.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604263113>
246. *Chapman S, Grauer E, Gez R, Egoz I, Lazar S* (2019) Time dependent dual effect of anti-inflammatory treatments on sarin-induced brain inflammation: Suggested role of prostaglandins. *Neurotoxicology* 74: 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.05.006>
247. *Figueiredo TH, Aplan JP, Braga MFM, Marini AM* (2018) Acute and long-term consequences of exposure to organophosphate nerve agents in humans. *Epilepsia* 59 Suppl 2(Suppl 2): 92–99.
<https://doi.org/10.1111/epi.14500>
248. *Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF* (2010) Polymerase γ gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology* 52(5): 1791–1796.
<https://doi.org/10.1002/hep.23891>
249. *Rojas A, Wang W, Glover A, Manji Z, Fu Y, Dingledine R* (2018) Beneficial Outcome of Urethane Treatment Following Status Epilepticus in a Rat Organophosphorus Toxicity Model. *eNeuro* 5(2): ENEURO.0070-18.2018.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0070-18.2018>
250. *Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, Lockridge O* (2005) Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol* 70(11): 1673–1684.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.002>
251. *Duysen EG, Cashman JR, Schopfer LM, Nachon F, Masson P, Lockridge O* (2012) Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos

- oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chem Biol Interact* 195(3): 189–198.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.006>
252. *Flannery BM, Bruun DA, Rowland DJ, Banks CN, Austin AT, Kukis DL, Li Y, Ford BD, Tancredi DJ, Silverman JL, Cherry SR, Lein PJ* (2016) Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J Neuroinflammat* 13(1): 267.
<https://doi.org/10.1186/s12974-016-0744-y>
 253. *Goncharov NV, Terpilowski MA, Shmurak VI, Belinskaia DA, Avdonin PV* (2019) The Rat (*Rattus norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 1. Biochemical Aspects. *J Evol Biochem Physiol* 55: 112–123.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019020042>
 254. *Гончаров НВ* (2018) Разработка эффективных средств профилактики, терапии и предупреждения отставленных последствий отравления фосфорорганическими соединениями. Отчет о НИР № 16-15-00199. Росс научн фонд. Москва. [*Goncharov NV* (2018) Development of effective means of prevention, therapy and prevention of delayed consequences of organophosphorus poisoning. Report of Research No. 16-15-00199. Russ Sci Found. Moscow. (In Russ)].
 255. *Chauhan B, Kumar G, Kalam N, Ansari SH* (2013) Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J Adv Pharm Technol Res* 4(1): 4–8.
<https://doi.org/10.4103/2231-4040.107494>
 256. *Abedin MM, Chourasia R, Phukon LC, Sarkar P, Ray RC, Singh SP, Rai AK* (2023) Lactic acid bacteria in the functional food industry: biotechnological properties and potential applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2023: 1–19.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2227896>
 257. *Baciu AM, Opris RV, Filip GA, Florea A* (2023) Effects of Phytochemicals from Fermented Food Sources in Alzheimer's Disease In Vivo Experimental Models: A Systematic Review. *Foods* 12(11): 2102.
<https://doi.org/10.3390/foods12112102>
 258. *Avci B, Bilge SS, Arslan A, Alici O, Darakci O, Baratzada T, Ciftcioglu E, Yardan T, Bozkurt A* (2018) Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicol Ind Health* 34(2): 69–82.
<https://doi.org/10.1177/0748233717737646>
 259. *Mukherjee S, Mukherjee N, Saini P, Roy P, Babu SP* (2015) Ginger extract ameliorates phosphamidon induced hepatotoxicity. *Indian J Exp Biol* 53(9): 574–584.
 260. *Oyagbemi AA, Omobowale TO, Ochigbo GO, Asenuga ER, Ola-Davies OE, Ajibade TO, Saba AB, Adedapo AA* (2018) Polyphenol-Rich Fraction of *Parquetina nigrescens* Mitigates Dichlorvos-Induced Cardiorenal Dysfunction Through Reduction in Cardiac Nitrotyrosine and Renal p38 Expressions in Wistar Rats. *J Diet Suppl* 15(3): 269–284.
<https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1336148>
 261. *Sinha S, Du Z, Maiti P, Klärner FG, Schrader T, Wang C, Bitan G* (2012) Comparison of three amyloid assembly inhibitors: the sugar scyllo-inositol, the polyphenol epigallocatechin gallate, and the molecular tweezer CLR01. *ACS Chem Neurosci* 3(6): 451–458.
<https://doi.org/10.1021/cn200133x>
 262. *Goncharov N, Maevsky E, Voitenko N, Novozhilov A, Kubasov I, Jenkins R, Avdonin P* (2016) Nutraceuticals in sports activities and fatigue In: *Gupta RC* (ed) *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Acad Press/Elsevier. Amsterdam. 177–188.
 263. *Гончаров НВ, Уколов АИ, Орлова ТИ, Мигаловская ЕД, Войтенко НГ* (2015) Метабомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. Успехи соврем биол 135(1): 317. [*Goncharov NV, Ukolov AI, Orlova TI, Migalovskaia ED, Voitenko NG* (2015) Metabolomics: on the Way to Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. *Uspekhi Sovrem Biol* 135(1): 3–17. (In Russ)].
 264. *Шмурак ВИ, Курдюков ИД, Надеев АД, Войтенко НГ, Глашкина ЛМ, Гончаров НВ* (2012) Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами. Токс Вестн 2012(4): 30–34. [*Shmurak VI, Kurdyukov ID, Nadeyev AD, Voytenko NG, Glashkina LM, Goncharov NV* (2012) Biochemical markers of intoxication with organophosphorus poisonous substances. *Toks Vestn* 2012(4): 30–34. (In Russ)].
 265. *Черепяхина НЕ, Табаксоева ДА, Marshall T, Агиров ММ, Абе Н, Роуз Н, Шогенов ЗС, Мартин ФЛ, Коттер Р, Эхрлих ГД, Покровский ВИ, Хуффлесс С, Маев ИВ, Ямада У, Сучков СВ* (2015) Постинфекционный аутоиммунный синдром как комбинаторный биомаркер хронических заболеваний инфекционной этиологии и аутоиммунной природы. Аллергол и иммунол 6(2): 206–209. [*Cherepakhina NE, Tabaksoeva DA, Marshall T, Agirov MM, Abe H, Rose N, Shogenov ZS, Martin FL, Cotter P, Ehrlich GD, Pokrovsky VI, Hutfless S, Maev IV, Ya-*

- mada Y, Suchkov SV* (2015) Post-infectious autoimmune syndrome as a combinatorial biomarker of chronic diseases of infectious etiology and autoimmune nature. *Allergol i immunol* 6(2): 206–209. (In Russ)].
266. *Goncharov NV, Terpilowski MA, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, Belinskaia DA, Sobolev VE, Shmurak VI, Korf EA, Avdonin PV* (2019) The Rat (*Rattus norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 2. A System Analysis of the Efficacy of Green Tea Extract in Preventing Delayed Effects of Poisoning. *J Evol Biochem Physiol* 55: 208–221. <https://doi.org/10.1134/S0022093019030062>
267. *Terpilowski MA, Korf EA, Jenkins RO, Goncharov NV* (2018) An algorithm for deriving combinatorial biomarkers based on ridge regression. *J Bioinform Genom* 2018: 1–6. <https://doi.org/10.18454/jbg.2018.1.6.2>
268. *Habert R, Livera G, Rouiller-Fabre V* (2014) Man is not a big rat: concerns with traditional human risk assessment of phthalates based on their anti-androgenic effects observed in the rat foetus. *Basic Clin Androl* 24: 14. <https://doi.org/10.1186/2051-4190-24-14>
269. *Terekhov SS, Smirnov IV, Shamborant OG, Bobik TV, Ilyushin DG, Murashev AN, Dyachenko IA, Palikov VA, Knorre VD, Belogurov AA, Ponomarenko NA, Kuzina ES, Genkin DD, Masson P, Gabibov AG* (2015) Chemical Polysialylation and In Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. *Acta Naturae* 7(4): 136–141.
270. *Masson P, Lushchekina SV* (2016) Emergence of catalytic bioscavengers against organophosphorus agents. *Chem Biol Interact* 259(Pt B): 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.010>
271. *Pashirova TN, Bogdanov A, Masson P* (2021) Therapeutic nanoreactors for detoxification of xenobiotics: Concepts, challenges and biotechnological trends with special emphasis to organophosphate bioscavenging. *Chem Biol Interact* 346: 109577. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109577>
272. *Kirby SD, Norris JR, Richard Smith J, Bahnson BJ, Cerasoli DM* (2013) Human paraoxonase double mutants hydrolyze V and G class organophosphorus nerve agents. *Chem Biol Interact* 203(1): 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.10.023>
273. *Lushchekina SV, Schopfer LM, Grigorenko BL, Nemukhin AV, Varfolomeev SD, Lockridge O, Masson P* (2018) Optimization of Cholinesterase-Based Catalytic Bioscavengers Against Organophosphorus Agents. *Front Pharmacol* 9: 211. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00211>
274. *Ku TH, Zhang T, Luo H, Yen TM, Chen PW, Han Y, Lo YH* (2015) Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors (Basel)* 15(7): 16281–16313. <https://doi.org/10.3390/s150716281>
275. *Zhang C, Wang L, Tu Z, Sun X, He Q, Lei Z, Xu C, Liu Y, Zhang X, Yang J, Liu X, Xu Y* (2014) Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded DNA based fluorescence polarization aptamer assay. *Biosens Bioelectron* 55: 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.020>
276. *Belinskaia DA, Avdonin PV, Avdonin PP, Jenkins RO, Goncharov NV* (2019) Rational in silico design of aptamers for organophosphates based on the example of paraoxon. *Comput Biol Chem* 80: 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2019.05.004>
277. *Czerwinski SE, Skvorak JP, Maxwell DM, Lenz DE, Baskin SI* (2006) Effect of octanol:water partition coefficients of organophosphorus compounds on biodistribution and percutaneous toxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 20(5): 241–246. <https://doi.org/10.1002/jbt.20140>
278. *Shih ML, McMonagle JD, Dolzine TW, Gresham VC* (1994) Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents. *J Appl Toxicol* 14(3): 195–199. <https://doi.org/10.1002/jat.2550140309>
279. *Корягина НЛ, Савельева ЕИ, Прокофьева ДС, Хлебникова НС, Каракашев ГВ, Уколова ЕС, Радиллов АС, Гончаров НВ* (2017) Особенности токсикокинетики метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ G-типа в биологических жидкостях крыс при использовании антидотной терапии. *Токс вестн* 2017(3): 8–16. [Koryagina NL, Savelyeva EI, Prokofieva DS, Khlebnikova NS, Karakashev GV, Ukolova ES, Radilov AS, Goncharov NV] (2015) Features of the toxicokinetics of metabolites of G-type organophosphorus poisonous substances in biological fluids of rats when using antidote therapy. *Toks Vestn* 2017(3): 8–16. (In Russ)].

280. *Goncharov NV, Belinskaia DA, Shmurak VI, Terpilowski MA, Jenkins RO, Aydonin PV* (2017) Serum Albumin Binding and Esterase Activity: Mechanistic Interactions with Organophosphates. *Molecules* 22(7): 1201.
<https://doi.org/10.3390/molecules22071201>
281. *Pohanka M* (2014) Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci* 15(6): 9809–9825.
<https://doi.org/10.3390/ijms15069809>
282. *Ченур СВ* (2010) Отдаленные органофосфатные нейропатии: патогенез, профилактика и лечение. *Токс вестн* 2010(3): 42–43. [*Chepur SV* (2010) Delayed organophosphate neuropathies: pathogenesis, prevention and treatment. *Toks Vestn* 2010(3): 42–43. (In Russ)].
283. *Шефер ТВ, Рейнюк ВЛ, Ивницкий ЮЮ* (2011) Роль гипераммониемии в формировании летального исхода острой интоксикации циклофосфамом у крыс. *Токс вестн* 2011(3): 33–36. [*Shefer TV, Reynyuk VL, Ivniitskiy YuYu* (2011) [The role of hyperammonemia in the formation of lethal outcome of acute cyclophosphamide intoxication in rats. *Toks Vestn* 2011(3): 33–36. (In Russ)].
284. *Goncharov NV, Jenkins RO, Radilov AS* (2006) Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. *J Appl Toxicol* 26(2): 148–161.
<https://doi.org/10.1002/jat.1118>
285. *Sobolev VE, Jenkins RO, Goncharov NV* (2017) Sulfated glycosaminoglycans in bladder tissue and urine of rats after acute exposure to paraoxon and cyclophosphamide. *Exp Toxicol Pathol* 69(6): 339–347.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.007>
286. *Grivennikova VG, Cecchini G, Vinogradov AD* (2008) Ammonium-dependent hydrogen peroxide production by mitochondria. *FEBS Lett* 582(18): 2719–2724.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.054>
287. *Гончаров НВ, Белинская ДА, Авдонин ПВ* (2021) Антидотная и адъювантная терапия при остром отравлении органофосфатами Часть 4: поиск новых сочетаний. В: Бережнов АВ, Зинченко ВП (ред) Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Том 2. Пушкинск научн центр биол исследований Рос акад наук. Пушкино. 642–647. [*Goncharov NV, Belinskaya DA, Avdonin PV* (2021) Antidote and adjuvant therapy in acute organophosphate poisoning Part 4: search for new combinations. In: Berezhnov AV, Zinchenko VP (eds) Receptors and intracellular signaling. Vol 2. Pushchinsk Scientific Center for Biol Research of the Russ Acad of Sci Pushchino. 642–647. (In Russ)].
288. *Aharon MA, Prittie JE, Buriko K* (2017) A review of associated controversies surrounding glucocorticoid use in veterinary emergency and critical care. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 27(3): 267–277.
<https://doi.org/10.1111/vec.12603>
289. *Marik PE* (2018) Hydrocortisone, Ascorbic Acid and Thiamine (HAT Therapy) for the Treatment of Sepsis. Focus on Ascorbic Acid. *Nutrients* 10(11): 1762.
<https://doi.org/10.3390/nu10111762>
290. *Wang H, Tang W, Ristagno G, Li Y, Sun S, Wang T, Weil MH* (2009) The potential mechanisms of reduced incidence of ventricular fibrillation as the presenting rhythm in sudden cardiac arrest. *Crit Care Med* 37(1): 26–31.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181928914>
291. *Gong X, Zhou R, Li Q* (2018) Effects of captopril and valsartan on ventricular remodeling and inflammatory cytokines after interventional therapy for AMI. *Exp Ther Med* 16(4): 3579–3583.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6626>
292. *Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Vincent JL, Angus DC, Aikawa N, Demeyer I, Sainati S, Amiot N, Cao C, Ji M, Matsuda H, Mouri K, Cohen J* (2010) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 38(8): 1685–1694.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181e7c5c9>
293. *Hussey SE, Liang H, Costford SR, Klip A, DeFronzo RA, Sanchez-Avila A, Ely B, Musi N* (2012) TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells. *Biosci Rep* 33(1): 37–47.
<https://doi.org/10.1042/BSR20120098>

Organophosphate-Induced Pathology: Mechanisms of Development, Principles of Therapy and Features of Experimental Studies

N. V. Goncharov^{a, b, *}, D. A. Belinskaia^b, and P. V. Avdonin^c

^a*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
p.o. Kuz'molovsky, Leningradsky Region, Russia*

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

^c*Koltsov Institute of Development Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Organophosphates (OP) are one of the most common neurotoxic xenobiotics. In acute OP poisoning, as a result of suppression of synaptic acetylcholinesterase (AChE) activity, a cholinergic syndrome develops, which can transform into status epilepticus. Within a few days after acute poisoning, the so-called an intermediate syndrome can develop, which is associated with prolonged inhibition of AChE, desensitization of nicotinic receptors, and functional degradation of synapses and muscle fibers. In 10–20 days after a single acute or repeated subacute poisoning, OP-induced delayed polyneuropathy (OPIDN) can develop – a neurodegenerative disease, the signs of which are ataxia, loss of function of the distal sensory and motor axons of peripheral nerves. The occurrence of a neuropsychiatric disorder (NPD) caused by chronic exposure to relatively low-toxicity organophosphorus compounds is usually not associated with acute poisoning; symptoms include cognitive impairment, chronic fatigue, and extrapyramidal symptoms. The list of possible diseases or pathological conditions (syndromes) that develop as a result of acute, subacute or chronic effects of OP on the human body has expanded in recent years due a number of known neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, multiple sclerosis, etc.). The aging of the body in general and the aging of the brain in particular are considered in the review from the point of view of the consequences of OP poisoning, which can serve as a nonspecific trigger of aging and related neurodegenerative diseases. Gulf syndrome is not a consequence of OP intoxication, but is also of interest and is considered in the context of OP-induced pathology, since its etiology and pathogenesis are associated with the exposure to cholinesterase inhibitors. The review presents data indicating the important role of the vascular endothelium in the development of OP-induced pathology; The first suggestions were made by clinicians in the late 1980s, and the first experimental data were obtained in the early 2000s. The principles of therapy for acute poisoning are outlined, taking into account experimental data from recent years. Some methods for studying OP in experiments *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* with laboratory animals, including the use of carboxylesterase inhibitors, are presented. The most important part of *in vivo* investigations has been and remains the search for new biomarkers to assess the effectiveness of adjuvant and regenerative therapies.

Keywords: organophosphates, cholinesterase, cholinergic syndrome, status epilepticus, neurodegenerative diseases, aging, endothelium

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ И ЗАЖИВЛЕНИЕ
ЯЗВ ЖЕЛУДКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ АППЛИКАЦИЕЙ
УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА ЕГО СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ У КРЫС**

© 2023 г. А. Л. Ефимов², Д. С. Сахно¹, Б. В. Сигуа²,
Н. И. Ярушкина^{1, *}, Л. П. Филаретова¹

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

²*Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия*

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

Поступила в редакцию 22.07.2023 г.

После доработки 21.08.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Ключевым фактором поддержания целостности слизистой оболочки желудка является ее нормальное кровоснабжение, в связи с этим использование препаратов, улучшающих его, в том числе за счет позитивного влияния на реологические свойства крови, востребовано для лечения язвенной болезни желудка. К таким препаратам относится антикоагулянт гепарин. Цель работы — изучить влияние гепарина на формирование и заживление язв желудка, индуцированных аппликацией 60%-ной уксусной кислоты на его слизистую оболочку, у крыс, оценив при этом возможный риск кровотечения. После аппликации уксусной кислоты (0 день) площадь язв желудка оценивали на 4-й день (формирование язв) и 7-й день (заживление язв). Для оценки влияния на формирование язв гепарин (1000 МЕ/кг/день, подкожно) вводили с 0-го по 3-й день, на заживление — с 4-го по 6-й день после аппликации кислоты. Для проверки возможного кровотечения под влиянием гепарина тестировали уровень гемоглобина в крови до аппликации кислоты (базальный), на 4-й и 7-й день после аппликации. Степень кровотечения оценивали на основании относительного снижения уровня гемоглобина. Введение гепарина приводило к уменьшению средней площади язв как на 4-й, так и на 7-й день по сравнению с таковой у контрольных крыс (растворитель гепарина). У контрольных крыс как на 4-й, так и на 7-й день уровень гемоглобина был снижен по сравнению с соответствующим базальным. Гепарин не влиял на уровень гемоглобина на 4-й день, но потенцировал снижение среднего уровня гемоглобина на 7-й день, увеличивая количество животных, имеющих большее относительное снижение уровня гемоглобина по сравнению с соответствующей контрольной группой. Таким образом, гепарин может оказывать гастропротективное действие, проявляющееся как в ослаблении формирования язв, так и ускорении их заживления, однако при этом существует риск кровотечения при заживлении язв.

Ключевые слова: язва желудка, гастропротекция, гепарин, антикоагулянт, кровотечение, крысы

DOI: 10.31857/S0869813923100047, EDN: NHPSLS

ВВЕДЕНИЕ

Проблема язв желудочно-кишечного тракта остается актуальной для клиницистов, поскольку за последние десятилетия, несмотря на успехи фармакотерапии, частота осложнений язвенной болезни существенно не снизилась [1]. Это относится как к хроническим, так и к острым язвам. К развитию острых язв могут приводить нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП) [2–7] и различные стрессорные воздействия [8–12]. Острые язвы часто возникают у больных с шоком, сепсисом, острой почечной недостаточностью, ожоговой болезнью, целым рядом других заболеваний, которые требуют лечения в отделениях реанимации. У пациентов, находящихся в критическом состоянии в отделениях реанимации, частота эрозивно-язвенного поражения может достигать 75–100%. Вероятность кровотечений из стрессорных язв у этой категории больных по данным различных авторов может составлять от 1.5 до 25% [11, 13–16]. Стрессорные язвы могут играть фатальную роль у больных с критическими состояниями. Высокая частота случаев эрозивно-язвенных поражений желудочно-кишечного тракта у пациентов, находящихся в тяжелом состоянии, является отражением ответа организма в целом [1, 17, 18], отражением того, что в тяжелой для организма ситуации желудок “отдается на заклятие”, и хорошо согласуется с представлением, что изначальная причина язвообразования может находиться вне желудка [19]. Для язвенной болезни характерно возникновение рецидивов и осложнений, таких как пенетрация язвы, пилородуоденальный стеноз, малигнизация язвы желудка. Кровотечение и перфорация могут быть осложнением не только хронических, но и острых язв. Данные осложнения непосредственно угрожают жизни больных.

В связи с тем, что нормальное кровоснабжение слизистой оболочки желудка является ключевым фактором, обеспечивающим поддержание ее целостности, а его нарушение приводит к повреждению слизистой оболочки [1, 13, 20–23], становится очевидной необходимость изучения влияния на слизистую оболочку препаратов, улучшающих ее кровоснабжение за счет позитивного влияния на реологические свойства крови и микроциркуляцию. По этой причине лечебные и профилактические препараты, влияющие на реологические свойства крови, могут быть дополнительно проанализированы в экспериментальных условиях с целью проверки их возможного гастропротективного действия. Хотя вопрос об использовании антикоагулянтов для профилактики и лечения язв желудочно-кишечного тракта поднимался, однако он не является решенным.

Гепарин является антикоагулянтом прямого действия, соответственно он влияет на реологические свойства крови [24]. Нефракционированный стандартный гепарин и низкомолекулярные гепарины в основном используются для лечения и профилактики тромбоэмболических осложнений, при нестабильной стенокардии и острым инфаркте миокарда, в области гематологии, трансфузионной медицины, кардиохирургии [25–27]. В последние годы в условиях пандемии COVID-19 прямые антикоагулянты активно используются для лечения пациентов с новой коронавирусной инфекцией [27, 28]. Несмотря на продолжительную историю изучения и применения в медицине, многие эффекты гепарина еще малоизвестны и соответственно мало используются в клинической практике [27]. Среди рутинных показаний для использования данных препаратов отсутствуют язвы желудочно-кишечного тракта.

Исходя из того, что язвы желудочно-кишечного тракта остаются серьезной клинической проблемой, о чем авторы статьи хорошо знают на основании своего клинического опыта [29–31], ими было инициировано изучение возможности использования гепарина в качестве одного из новых подходов к профилактике и лечению язв желудка. Выяснение вопроса о влиянии гепарина на формирование и заживле-

ние язв желудка представляет интерес и с точки зрения дальнейшего изучения механизмов гастропротекции, которыми давно и активно занимаются авторы статьи [32–40].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния гепарина на формирование и заживление язв желудка, индуцированных аппликацией 60%-ной уксусной кислоты на его слизистую оболочку (модель “kissing ulcers”), у крыс с оценкой возможного риска кровотечения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Спрейг-Дуоли массой тела около 300 г. Животных акклиматизировали к стандартным условиям лабораторного вивария (температура помещения 20–22°C, световой режим 12 ч : 12 ч, свободный доступ к воде и пище) за неделю до начала экспериментов. Работа выполнена с использованием 119 крыс из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Было исследовано влияние гепарина на формирование и заживление язв желудка, индуцированных аппликацией 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка по методу Okabe (модель “kissing ulcers”) [41] с модификацией Л.П. Филаретовой [42]. Аппликация уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка осуществлялась у наркотизированных крыс, которые были лишены пищи за 24 ч до операции. Для анестезии использовали препараты Золетил®50 (Virbac SanteAnimale, Франция, 15 мг/кг, 0.5 мл/кг, внутривенно) и Рометар (Биовета, Чешская Республика, 10 мг/кг, 0.5 мл/кг, внутривенно). После лапаротомии для одновременной индукции двух язв пинцетом с кольцевым наконечником (диаметром 9 мм) зажималась передняя и задняя стенка желудка в области пилорического отдела. В просвет между браншами пинцета, с помощью иглы для инъекций (18-го калибра) и шприца, вводили 60%-ную уксусную кислоту в объеме 0.2 мл. Не извлекая иглы, через 40 с раствор кислоты удаляли, брюшную полость зашивали. После операции животные содержались при обычном режиме. Известно, в том числе и из наших исследований [42, 43], что через 3–4 дня после аппликации уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка образуются две симметричные “целующиеся” язвы по передней и задней стенкам желудка [41]. Со временем язвы заживают, особенно заметное заживление, определяемое по уменьшению площади язвенного дефекта, происходит в течение первой недели [41–43]. В связи с этим после аппликации уксусной кислоты (0 день) площадь язв желудка оценивали на 4-й день (временная точка для оценки формирования язвы) и на 7-й день (временная точка для оценки заживления язвы).

Особенностью нашей работы является отдельная оценка влияния гепарина на формирование язв и на заживление уже сформировавшихся язв. Для изучения влияния на формирование и заживление язв гепарин (активное вещество: гепарин натрия, Велфарм, Россия, 5000 МЕ/мл) вводили многократно (до или после формирования язв) в дозе 1000 МЕ/кг/день (0.2 мл/кг, подкожно). Доза гепарина была выбрана на основании анализа данных литературы [44, 45]. Для оценки влияния на формирование язвы гепарин вводили с 0-го по 3-й день (рис. 1), на заживление — с 4-го по 6-й день после аппликации уксусной кислоты (рис. 2).

Были проведены две серии экспериментов (эксперимент № 1 и эксперимент № 2). В каждом эксперименте было две группы крыс: группа с введением гепарина и контрольная группа с введением растворителя гепарина — физиологического раствора.

В эксперименте № 1 исследовали влияние гепарина на формирование язв желудка (рис. 1). Гепарин вводили ежедневно в течение 4 дней (с 0-го по 3-й день по-

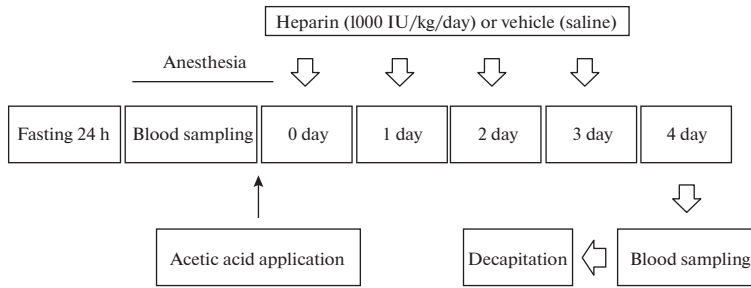


Рис. 1. Схема эксперимента № 1: влияние гепарина на формирование язв желудка, индуцированных аппликацией уксусной кислоты на его слизистую оболочку.

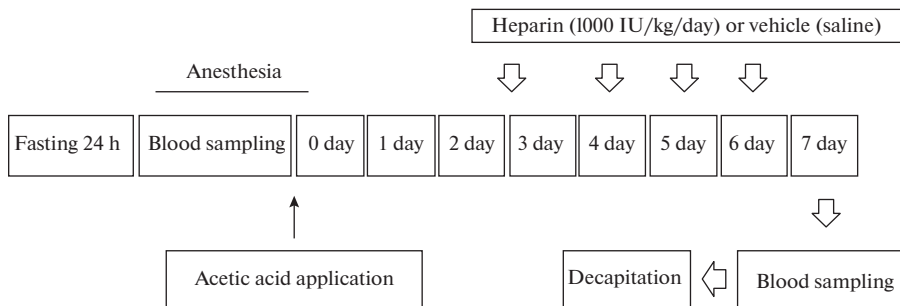


Рис. 2. Схема эксперимента № 2: влияние гепарина на заживление язв желудка, индуцированных аппликацией уксусной кислоты на его слизистую оболочку.

сле аппликации кислоты). Контрольным животным вводили физиологический раствор в те же сроки и в том же объеме (рис. 1). Площадь язв оценивали на 4-й день после аппликации уксусной кислоты как у контрольных крыс ($n = 28$), так и у крыс с предварительным введением гепарина ($n = 27$).

В эксперименте № 2 исследовали влияние гепарина на заживление уже сформировавшихся язв (рис. 2). Гепарин вводили ежедневно в течение 3 дней (с 4-го по 6-й день после аппликации уксусной кислоты). Контрольным животным вводили физиологический раствор в те же сроки и в том же объеме. Площадь язв оценивали на 7-й день после аппликации уксусной кислоты как у контрольных крыс ($n = 32$), так и у крыс с предварительным введением гепарина ($n = 28$). Выбор данной временной точки обусловлен тем, что к седьмому дню после аппликации уксусной кислоты уже четко была видна динамика репарации, но при этом полного заживления язв еще не происходило.

После декапитации крыс (на 4-й или 7-й день после аппликации уксусной кислоты) желудки извлекали для оценки язвенного поражения. Площадь язвенных повреждений оценивали на основании фотографий желудков с помощью модифицированной компьютерной программы Image J [46]. В каждом желудке оценивалась средняя площадь двух «целующихся» язв.

Для оценки возможного кровотечения и степени выраженности (тяжести) кровотечений из язв на фоне введения гепарина оценивали уровень гемоглобина в крови, который определяли на спектрофотометре (Shimadzu UV-1240) гемигло-

бинцианидным методом с помощью набора реагентов “Гемоглобин-Ольвекс” 015.013 (ООО “Ольвекс Диагностикум”). Содержание гемоглобина определяли в крови, взятой из хвостовой вены, до начала операции у наркотизированных животных (базальный уровень) и на 4-й день (эксперимент № 1) или 7-й день (эксперимент № 2) после аппликации уксусной кислоты. На основании относительного снижения уровня гемоглобина по сравнению с исходными значениями до операции оценивали степень выраженности кровопотери: 1-я степень (легкая) — снижение уровня гемоглобина до 20%; 2-я степень (средняя) — снижение уровня гемоглобина на 20–30%; 3-я степень (тяжелая) — снижение уровня гемоглобина более чем на 30%.

Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью программы MedCalc 12.7.0.0. (Статистика для биомедицинских исследований, MedCalcSoftware, Бельгия). Для анализа данных о влиянии гепарина на уровень гемоглобина использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated measures ANOVA): фактор 1 — группа (инъекция); фактор 2 — время). Для сравнения площадей язв после введения гепарина или его растворителя использовали Kruskal–Wallis тест. Для сравнения частоты проявления кровопотери легкой, средней и тяжелой степени выраженности после введения гепарина или его растворителя использовали Chi-squared test. Различия между группами считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние гепарина на формирование и заживление язв желудка, индуцированных аппликацией уксусной кислоты

У контрольных животных, которым вводили растворитель гепарина (физиологический раствор), на 4-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка наблюдалось образование двух “целующихся” язв, средняя площадь которых была около 45 мм² (рис. 3). На 7-й день после аппликации уксусной кислоты у контрольных животных происходило заживление язвенного дефекта, о чем свидетельствовало уменьшение площади язв до 25 мм² (рис. 4). Ежедневное введение гепарина с 0-го по 3-й день после аппликации уксусной кислоты (эксперимент № 1) приводило к уменьшению площади язв на 4-й день (гастропротективный эффект): средняя площадь язв в группе с введением гепарина была достоверно меньше ($p < 0.05$) таковой у контрольных крыс, которым вводили растворитель гепарина (рис. 3).

Введение гепарина после формирования язв, с 4-го по 6-й день после аппликации уксусной кислоты (эксперимент № 2), вызывало уменьшение средней площади язв на 7-й день, что свидетельствовало об ускорении заживления язвы желудка. Площадь язв в группе с введением гепарина была около 15 мм², что достоверно меньше ($p < 0.05$) таковой в контрольной группе (рис. 4).

Влияние гепарина на уровень гемоглобина в крови и степень выраженности кровопотери

В условиях формирования язвы (на 4-й день после аппликации уксусной кислоты) у контрольных крыс, которым вводили растворитель гепарина (физиологический раствор), наблюдалось снижение уровня гемоглобина по сравнению с соответствующим базальным уровнем до операции (рис. 5). Введение гепарина не влияло на уровень гемоглобина, который был достоверно ниже по сравнению с соответствующим уровнем до операции и не отличался от уровня у контрольных крыс после введения растворителя (рис. 5). Следует отметить также, что в условиях формиро-

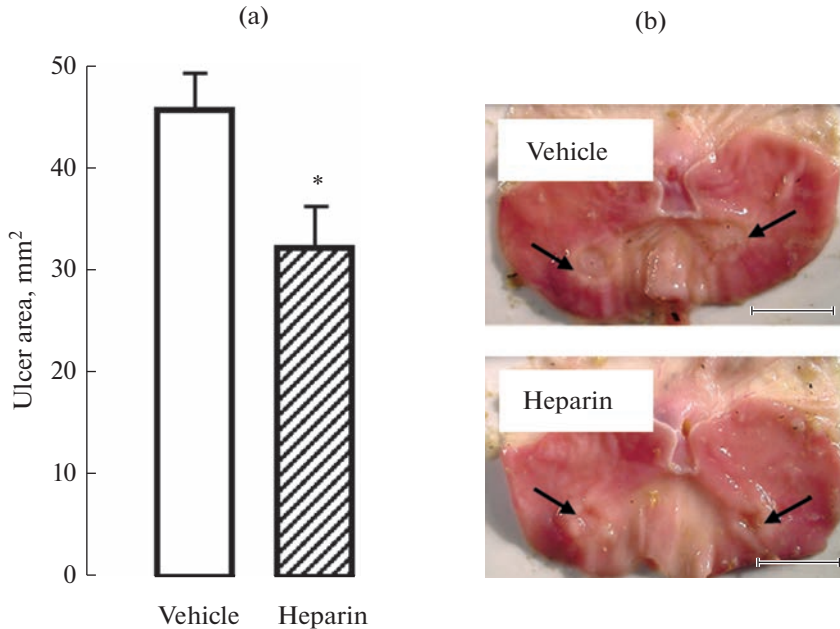


Рис. 3. Влияние гепарина на формирование язв желудка, индуцированных аппликацией 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку (эксперимент № 1), на 4-й день после аппликации. (а) — средняя площадь язв слизистой оболочки желудка на 4-й день после аппликации уксусной кислоты. * — Достоверность отличий при $p < 0.05$ от растворителя гепарина. Kruskal–Wallis test ($H_{1,55} = 5.47$, $p = 0.01$). Количество крыс в группе $n = 27$ –28. (б) — репрезентативные фотографии желудков на 4-й день после аппликации уксусной кислоты у крыс с предварительным введением гепарина или его растворителя. Стрелками указаны язвенные повреждения слизистой оболочки желудка, индуцированные аппликацией уксусной кислоты (kissing ulcers). Калибровка (внизу справа) 10 мм.

вания язвы введение гепарина не приводило к увеличению количества животных, имеющих сниженный уровень гемоглобина по сравнению с уровнем до операции. Так, в эксперименте № 1 снижение уровня гемоглобина по сравнению с уровнем до операции было обнаружено у 27 из 29 крыс, которым вводили гепарин, и у такого же количества животных (у 27 из 29) в контрольной группе (у 2 крыс в каждой группе снижение содержания гемоглобина не наблюдалось).

В условиях заживления язвы (на 7-й день после аппликации уксусной кислоты) так же, как и в условиях ее формирования, уровни гемоглобина после введения гепарина или его растворителя (физиологического раствора) были снижены по сравнению с соответствующими базальными уровнями до операции (рис. 6). Однако в условиях заживления язвы, в отличие от ее формирования, введение гепарина вызывало большее снижение уровня гемоглобина по сравнению с уровнем у контрольных животных (рис. 6), при этом введение гепарина не оказывало влияния на количество случаев снижения уровня гемоглобина. В эксперименте № 2 снижение уровня гемоглобина наблюдалось у 27 из 29 крыс в контрольной группе, и у 30 из 32 крыс в группе с введением гепарина (у 2 крыс в каждой группе снижение содержания гемоглобина не происходило).

Мы проанализировали влияние гепарина на частоту случаев возникновения кровотечения различной степени выраженности как в условиях формирования язв

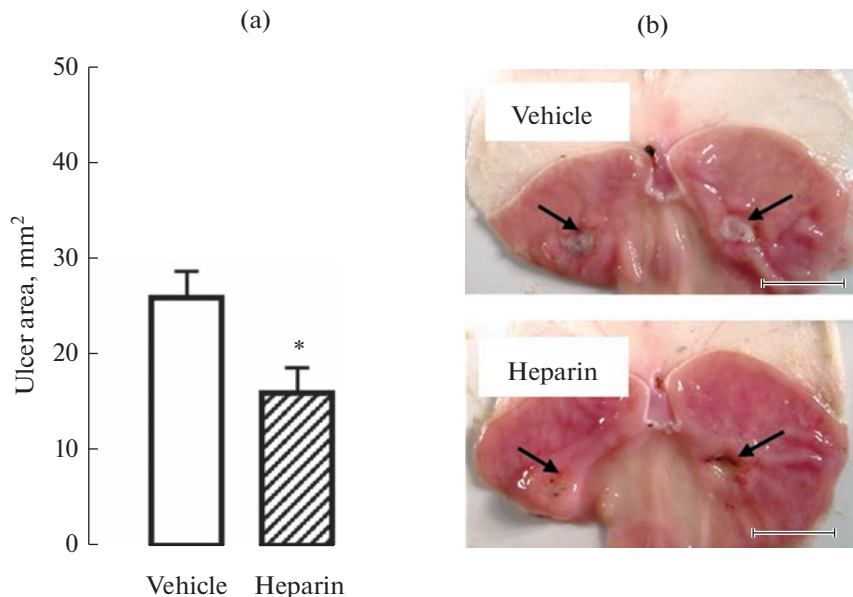


Рис. 4. Влияние гепарина на заживление язв желудка, индуцированных аппликацией 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку (эксперимент № 2), на 7-й день после аппликации. (а) — средняя площадь язв слизистой оболочки желудка на 7-й день после аппликации уксусной кислоты. * — Достоверность отличий при $p < 0.05$ от растворителя гепарина. Kruskal–Wallis test ($H_{1,60} = 12.86$, $p = 0.001$). Количество крыс в группе $n = 28–32$. (б) — репрезентативные фотографии желудков на 7-й день после аппликации уксусной кислоты у крыс с предварительным введением гепарина или его растворителя. Стрелками указаны язвенные повреждения слизистой оболочки желудка, индуцированные аппликацией уксусной кислоты (kissing ulcers). Калибровка (внизу справа) 10 мм.

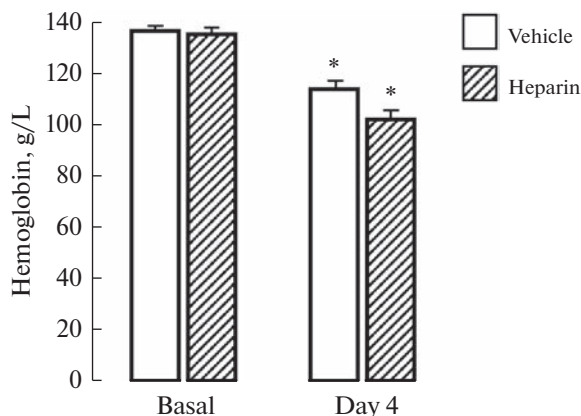


Рис. 5. Средние уровни гемоглобина после введения гепарина или его растворителя на 4-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка (формирование язв) и соответствующие им базальные уровни, измеренные у тех же животных до операции (Basal). Repeated measures ANOVA (group (injection) $F_{1,54} = 3.32$, $p < 0.07$; time $F_{1,54} = 174.58$, $p < 0.001$; group $\times$ time interaction $F_{1,54} = 5.98$, $p < 0.05$). * — Достоверность отличий при $p < 0.001$ от соответствующего базального уровня. Количество случаев в каждой группе $n = 29$.

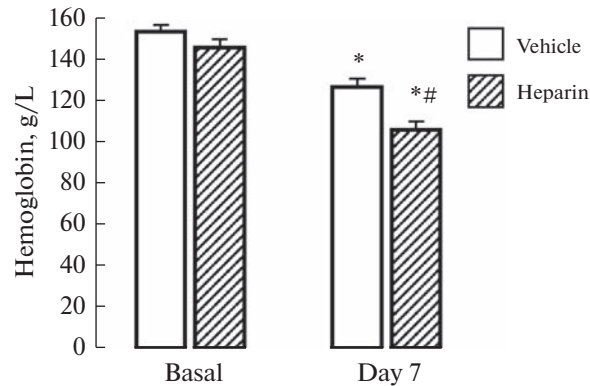


Рис. 6. Средние уровни гемоглобина после введения гепарина или его растворителя на 7-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку (заживление язв) и соответствующие им базальные уровни, измеренные у тех же животных до операции (Basal). Repeated measures ANOVA (group (injection) $F_{1,57} = 8.31$, $p < 0.001$; time $F_{1,57} = 178.88$, $p < 0.001$; group $\times$ time interaction $F_{1,57} = 6.77$, $p < 0.01$). * – Достоверность отличий при $p < 0.001$ от соответствующего базального уровня; # от растворителя. Количество случаев в каждой группе $n = 29-32$.

на 4-й день после аппликации уксусной кислоты (эксперимент № 1) (рис. 7), так и в условиях их заживления на 7-й день после аппликации уксусной кислоты (эксперимент № 2) (рис. 8). Количество случаев проявления кровотечения легкой, средней и тяжелой степени выраженности после введения гепарина достоверно не отличалось от количества случаев кровотечения различной степени выраженности после введения его растворителя как в условиях формирования язвы ($\text{Chi-squared}_{1,54} = 3.47$, $p = 0.06$), так и в условиях ее заживления ($\text{Chi-squared}_{1,57} = 2.5$; $p = 0.11$). Однако следует отметить, что в условиях формирования язвы у контрольных животных чаще всего проявлялась легкая степень кровотечения ($p < 0.01$), тогда как после введения гепарина превалирования легкой степени кровотечения по сравнению со средней или тяжелой степенью уже не наблюдалось ($p = 0.45$).

Несмотря на то, что в условиях заживления язвы гепарин достоверно не увеличивал количество случаев проявления кровотечения тяжелой степени (снижение уровня гемоглобина свыше 30%), он оказывал влияние на величину относительного снижения уровня гемоглобина в данной группе, характеризующую степень кровотечения. Величина относительного снижения уровня гемоглобина при тяжелой степени кровотечения варьировала от 30 до 34% у контрольных животных ($32.2 \pm 0.9\%$) и от 37 до 50% ($42.4 \pm 1.4\%$) в группе с введением гепарина. Введение гепарина достоверно увеличивало количество животных, имеющих относительное снижение уровня гемоглобина свыше 35% ($\text{Chi-squared}_{1,57} = 8.73$; $p = 0.01$). Количество животных с падением уровня гемоглобина свыше 35% после введения гепарина составляло 10 из 30, а в контрольной группе такие животные отсутствовали (0 из 27). В то же время в условиях формирования язвы у животных с тяжелой степенью кровотечения не было обнаружено влияния гепарина на величину относительного снижения уровня гемоглобина, которая варьировала от 33 до 40% ($36.1 \pm 1.9\%$) у контрольных животных и от 31 до 49% ($37.6 \pm 2.1\%$) в группе с введением гепарина. Количество животных со снижением уровня гемоглобина свыше 35% в группе с введением гепарина составляло 5 из 22, а в контрольной группе 2 из 25 ($\text{Chi-squared}_{1,54} = 0.66$; $p = 0.42$).

Таким образом, введение гепарина до формирования язвы приводило к уменьшению средней площади образовавшихся язв (4-й день после аппликации кислоты),

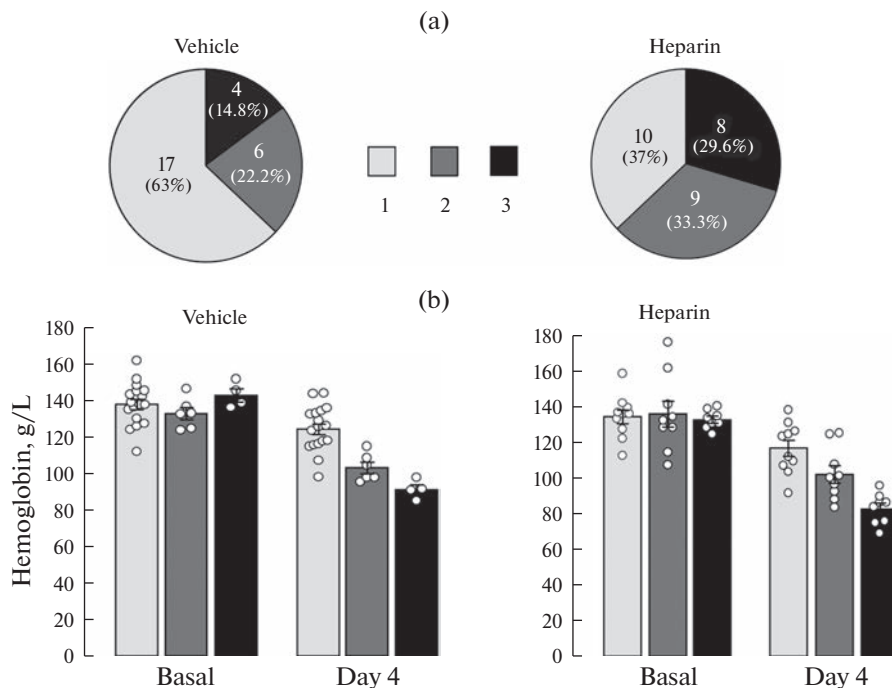


Рис. 7. Влияние гепарина на степень выраженности (тяжести) кровотечения на 4-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты (формирование язв). (а) — количество случаев проявления легкой степени кровотечения — снижение уровня гемоглобина до 20% (1); средней степени — снижение уровня гемоглобина на 20–30% (2); и тяжелой степени кровотечения — снижение уровня гемоглобина более, чем на 30% (3) после введения гепарина или его растворителя по отношению к общему количеству случаев снижения уровня гемоглобина; (б) — средние уровни гемоглобина у животных, имеющих легкую, среднюю или тяжелую степень кровотечения после введения гепарина или его растворителя на 4-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка и соответствующие им базальные уровни, измеренные у тех же животных до операции.

введение гепарина после формирования язвы способствовало ее заживлению, что проявлялось в уменьшении средней площади язв на 7-й день после аппликации кислоты. Как в условиях формирования язвы, так и в условиях ее заживления, введение гепарина не влияло на общее число случаев снижения уровня гемоглобина и количество случаев кровотечения легкой, средней и тяжелой степени выраженности. Однако в условиях заживления язвы введение гепарина увеличивало количество животных, имеющих большее относительное снижение уровня гемоглобина по сравнению с соответствующей контрольной группой, что проявлялось в более низком среднем уровне гемоглобина по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение крысам гепарина оказывает гастропротективное действие в условиях ulcerogenesis, индуцированного аппликацией уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка. Гастропротективное действие гепарина проявлялось как в уменьшении площади образовавшихся язв, так и в ускорении заживления уже сформированных язв.

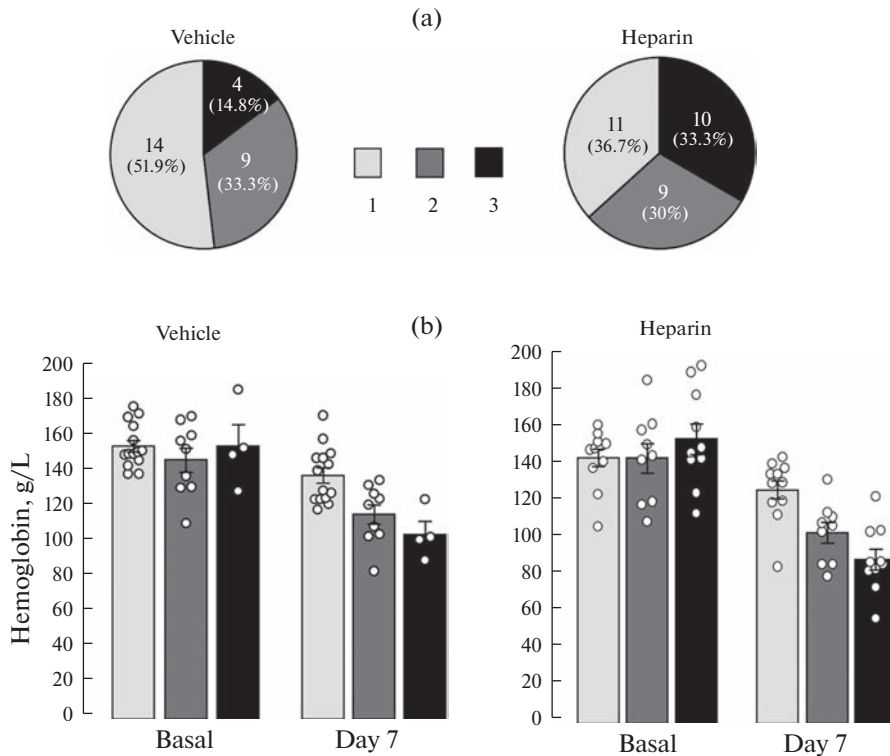


Рис. 8. Влияние гепарина на степень выраженности (тяжести) кровотечения на 7-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты (заживление язв). (а) — количество случаев проявления легкой степени кровотечения — снижение уровня гемоглобина до 20% (1); средней степени — снижение уровня гемоглобина на 20–30% (2); и тяжелой степени кровотечения — снижение уровня гемоглобина более чем на 30% (3) после введения гепарина или его растворителя по отношению к общему количеству случаев снижения уровня гемоглобина; (б) — средние уровни гемоглобина у животных, имеющих легкую, среднюю или тяжелую степень кровотечения после введения гепарина или его растворителя на 7-й день после аппликации 60%-ной уксусной кислоты на слизистую оболочку желудка и соответствующие им базальные уровни, измеренные у тех же животных до операции.

Интерес к исследованию вопроса о влиянии антикоагулянтов на процессы язвообразования в желудке проявлялся и ранее, что связано с пониманием важности нормального кровоснабжения слизистой оболочки желудка для поддержания ее целостности [1, 13, 20, 21, 47]. Важность нормального кровоснабжения слизистой оболочки желудка продемонстрирована и в предыдущих исследованиях одного из авторов статьи в ulcerогенной стрессорной модели [23, 48], а также “индометациновой” модели, использующей для ulcerогенеза НСПВП индометацин [49, 50]. При этом была показана важная роль глюкокортикоидных гормонов в поддержании кровотока (микроциркуляции) в слизистой оболочке [23, 48–50]. Нарушение кровоснабжения и микроциркуляции слизистой оболочки желудка, происходящее по различным причинам, способствует язвообразованию [1, 13, 20, 21, 23, 47, 49], следовательно, востребованными являются новые подходы, в том числе и фармакологические, к профилактике и коррекции таких нарушений.

В качестве одного из возможных подходов рассматривалось использование гепарина для лечения язв желудочно-кишечного тракта, однако, вопрос остался от-

крытым. Одним из показаний использования гепарина в клинике является профилактика и лечение микротромбообразования и нарушений микроциркуляции, а именно нарушения микроциркуляции в слизистой оболочке желудка лежат в основе образования язвенного дефекта [23, 49]. Имея свой интерес к гепарину как возможному кандидату в препараты, способные корректировать нарушенное кровоснабжение слизистой оболочки и таким путем позитивно влиять на ее состояние, мы решили провести экспериментальные исследования для выяснения этого вопроса. Начали эту работу, естественно, с анализа данных литературы.

Работ, посвященных исследованию влияния гепарина на язвообразование в желудке, оказалось немного и выполнены они были, за исключением одной, достаточно давно [44, 45, 51]. Наиболее активно этот вопрос изучался группой китайских авторов в исследованиях, проведенных в конце прошлого века [45, 52, 53]. В этих работах была использована аналогичная нашей модель язвообразования, индуцированного аппликацией уксусной кислоты (“kissing ulcers”), при этом был сделан вывод об ускорении заживления язв под влиянием гепарина, введенного как внутривенно [45, 52], так и интрагастрально [53]. В более поздних исследованиях на крысах [51] была подтверждена эффективность гепарина в отношении заживления язв, индуцированных уксусной кислотой. В то же время в ulcerогенной стрессорной модели не было выявлено влияния гепарина на заживление стресс-индуцированных эрозивных повреждений слизистой оболочки [44].

Научной новизной нашей работы по сравнению с другими исследованиями [45, 52, 53] является оценка как профилактического эффекта гепарина (на формирование язв), так и лечебного эффекта гепарина на уже сформированные язвы. В отличие от экспериментов Li, в которых гепарин начинали вводить через день после индукции язв (и в течение 4 дней), в нашей работе мы отдельно изучили эффекты гепарина на формирование язв и на заживление уже сформированных язв, соответственно вводя гепарин до формирования язв (эксперимент № 1) или же вводя его после формирования язв перед оценкой влияния на заживление на 7-й день (эксперимент № 2). За счет этого мы можем сделать определенный важный для клиники (для лечения язв) вывод о том, что гепарин может способствовать заживлению ранее сформировавшихся язв. Кроме этого, важным является и вывод о возможности профилактического действия гепарина, который можно сделать на основании полученного результата об ослабляющем влиянии гепарина на формирование язв в ulcerогенных условиях (эксперимент № 1).

Поскольку гепарин — антикоагулянт, то, естественно, исследователей волновал вопрос о возможном риске кровотечений. При этом были использованы разные подходы для оценки возможного риска кровотечений под влиянием гепарина [45, 52, 53]. В частности, в исследованиях группы Li [53] оценивали время кровотечения (кровоточивость) после “резекции” кусочка печени у крыс, подвергнутых действию гепарина и соответственно у контрольных крыс. При этом не было обнаружено различий в этом показателе между двумя группами крыс [53], и был сделан вывод о том, что введение гепарина в дозах, которые вызывают ускорение заживления, не повышает риск кровотечения.

Тем не менее в литературе высказано мнение об опасности использования гепарина из-за риска кровотечений [11, 44]. В экспериментах Kodama [44] показана зависимость риска кровотечений от дозы гепарина в условиях стрессорной ulcerогенной модели: иммобилизации при холоде в течение 3–4 ч (cold-restraint stress). В случае введения гепарина в дозе 50 или 500 Ед/кг после моделирования эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка существенного влияния на кровотечение (а также и на эрозии) не было выявлено. Однако при увеличении дозы до 5000 Ед/кг гепарин усиливал желудочные кровотечения.

Раздельное исследование влияния гепарина на формирование и на заживление язв, которое мы провели, оказалось полезным и для более тщательного анализа вопроса о возможности кровотечения под влиянием гепарина. Мы исследовали влияние гепарина на частоту возникновения кровотечения легкой, средней и тяжелой степени выраженности. Степени кровотечения были выделены на основании относительного снижения уровня гемоглобина по сравнению с базальным уровнем до операции по аналогии с классификацией оценки степени тяжести кровотечения Горбашко [54], рекомендованной к использованию в национальных клинических рекомендациях по лечению язвенных кровотечений и в национальном руководстве по абдоминальной хирургии [1]. Как в условиях формирования язвы, так и в условиях ее заживления, введение гепарина не влияло ни на общее число случаев снижения уровня гемоглобина, ни на количество случаев проявления кровотечения различной степени выраженности. Однако в условиях заживления язвы введение гепарина увеличивало количество животных, имеющих большее относительное снижение уровня гемоглобина по сравнению с соответствующей контрольной группой, вследствие чего в условиях заживления хронической язвы наблюдался более низкий средний уровень гемоглобина по сравнению с контролем.

Следовательно, введение гепарина в дозе, при которой он способен оказывать гастропротективное действие, проявляющееся как в ослаблении формирования язвы, так и ускорении ее заживления, может иметь риск кровотечения при заживлении язвы. По сути, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в наших экспериментальных условиях введение гепарина до формирования язв (аналог возможной схемы для профилактики) не влияет на кровотечение, однако гепарин может потенцировать небольшое кровотечение из уже сформированных язв.

Таким образом, в дополнение к данным литературы в наших экспериментах была показана эффективность гепарина в отношении гастропротекции, при этом было продемонстрировано как его лечебное действие на уже сформированные язвы, так и профилактическое влияние в ulcerогенных условиях. Однако принимая во внимание определенный риск возможных нежелательных эффектов гепарина как антикоагулянта, считаем необходимым продолжение исследований, направленных на дальнейшее выяснение данного вопроса, в том числе и при использовании разных доз гепарина (при многократном введении) и способов его введения, а также других ulcerогенных моделей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по содержанию и использованию животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 03/04 от 4.03.21 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Л.Е., Л.П.Ф.), проведение эксперимента (Д.С.С.), обработка данных (Н.И.Я., А.Л.Е., Д.С.С.), написание и редактирование рукописи (А.Л.Е., Л.П.Ф., Б.В.С., Н.И.Я.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, в которой выполнена работа: О.П. Комковой, Л.А. Афанасьевой, Т.И. Колбасовой, Ю.М. Пунину за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Затевахин ИИ* (2016) Абдоминальная хирургия. Национальное руководство: краткое издание. М. ГЭОТАР-Медиа [Zatevakhin AI (2016) Abdominal surgery. National Guide: Short Edition. M. GEOTAR-Media. (In Russ)].
2. *Shim YK, Kim N* (2016) Nonsteroidal anti-inflammatory drug and aspirin-induced peptic ulcer disease. *Korean J Gastroenterol* 67: 300–312.
<https://doi.org/10.4166/KJG.2016.67.6.300>
3. *Steadman CJ, Day RO, Henry DA, Muirden KD, Yeomans ND, Brooks PM, Stiel D, Prichard PJ* (1992) Prophylaxis against NSAID-induced ulcers. *Med J Aust* 157: 801–803.
<https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.1992.TB141292.X>
4. *Isaacs P* (1996) Misoprostol and NSAID ulcers. *Am J Gastroenterology* 91(2): 187–188.
5. *Teixeira DF, Santos AM, Oliveira AMS, Nascimento Júnior JAC, Frank LA, Santana Souza MT De, Carmargo EA, Serafini MR* (2021) Pharmaceuticals agents for preventing NSAID-induced gastric ulcers: a patent review. *Expert Rev Clin Pharmacol* 14: 677–686.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1909475>
6. *Rahman K, Ali G, Khan R, Khan I, Ali I, Mosa OF, Ahmed A, Ayaz M, Nawaz A, Murthy HCA* (2022) Analgesic and anti-Inflammatory potentials of a less ulcerogenic thiadiazinethione derivative in animal models: biochemical and histochemical correlates. *Drug Des Devel Ther* 16: 1143–1157.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S354779>
7. *Filaretova L* (2013) Gastroprotective role of glucocorticoids during NSAID-induced gastropathy. *Curr Pharm Des* 19: 29–33.
8. *Levenstein S* (2000) The very model of a modern etiology: a biopsychosocial view of peptic ulcer. *Psychosom Med* 62: 176–185.
<https://doi.org/10.1097/00006842-200003000-00003>
9. *Jones MP* (2006) The role of psychosocial factors in peptic ulcer disease: beyond *Helicobacter pylori* and NSAIDs. *J Psychosom Res* 60: 407–412.
<https://doi.org/10.1016/J.JPSYCHORES.2005.08.009>
10. *Realo A, Teras A, Kööts-Ausmees L, Esko T, Metspalu A, Allik J* (2015) The relationship between the Five-Factor Model personality traits and peptic ulcer disease in a large population-based adult sample. *Scand J Psychol* 56: 693–699.
<https://doi.org/10.1111/SJOP.12248>
11. *Goodwin CM, Hoffman JA* (2011) Deep vein thrombosis and stress ulcer prophylaxis in the intensive care unit. *J Pharm Pract* 24: 78–88.
<https://doi.org/10.1177/0897190010393851>
12. *Clarke K, Adler N, Agrawal D, Bhakta D, Sata SS, Singh S, Gupta A, Pahwa A, Pherson E, Sun A, Volpicelli F, Cho HJ* (2022) Indications for the Use of Proton Pump Inhibitors for Stress Ulcer Prophylaxis and Peptic Ulcer Bleeding in Hospitalized Patients. *Am J Med* 135: 313–317.
<https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2021.09.010>
13. *Гельфанд БР* (2006) Профилактика стресс-повреждений желудочно-кишечного тракта у больных в критическом состоянии. В кн: Сепсис в начале XXI века. М. Литтерра. 124–138. [Gel'fand BR (2006) Prevention of stress damage to the gastrointestinal tract in patients in critical condition. In: Sepsis at the beginning of the 21st century. M. Litterra. 124–138. (In Russ)].
14. *Rafinazari N, Abbasi S, Farsaei S, Mansourian M, Adibi P* (2016) Adherence to stress-related mucosal damage prophylaxis guideline in patients admitted to the Intensive Care Unit. *J Res Pharm Pract* 5: 186.
<https://doi.org/10.4103/2279-042X.185728>

15. *Bardou M, Quenot JP, Barkun A* (2015) Stress-related mucosal disease in the critically ill patient. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 98–107. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.235>
16. *Соколова ОВ* (2012) Стрессовые повреждения желудочно-кишечного тракта при синдроме полиорганной недостаточности у реаниматологических больных. *Вестник Нац мед-хирург Центра им НИ Пирогова* 7(2): 115–121. [*Sokolova OV* (2012) Stress damage to the gastrointestinal tract in multiple organ failure syndrome in intensive care patients. *Bull Nation Med Surgeon Pirogov Center* 7(2): 115–121. (In Russ)].
17. *Ohmann C, Imhof M, Röher HD* (2000) Trends in peptic ulcer bleeding and surgical treatment. *World J Surg* 24: 284–293. <https://doi.org/10.1007/S002689910046>
18. *Wilcox CM, Spenny JG* (1988) Stress ulcer prophylaxis in medical patients: who, what, and how much? *Am J Gastroenterol* 83(11): 1199–1211.
19. *Filaretova LP, Podvigina TT, Bobryshev PY, Bagaeva TR, Tanaka A, Takeuchi K* (2006) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: The hidden gold in gastric mucosal homeostasis. *Inflammopharmacology* 14: 207–213. <https://doi.org/10.1007/s10787-006-1544-2>
20. *Abdel-Salam OME, Czimmer J, Debrecei A, Szolcsányi J, Mózsik G* (2001) Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris* 95: 105–127. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00015-8)
21. *Akimoto M, Hashimoto H, Shigemoto M, Yokoyama I* (1998) Relationship between recurrence of gastric ulcer and the microcirculation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1: S507–S508. <https://doi.org/10.1097/00005344-199800001-00145>
22. *Kalia N, Bardhan KD* (2003) Of blood and guts: association between *Helicobacter pylori* and the gastric microcirculation. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 1010–1017. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1746.2003.03062.X>
23. *Filaretova LP, Mal'tsev N, Bogdanov A, Levkovich Y* (1999) Role of gastric microcirculation in the gastroprotection by glucocorticoids released during water-restraint stress in rats. *Chin J Physiol* 42: 145–152.
24. *Heestertermans M, Poenou G, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Bertoletti L* (2022) Anticoagulants: A Short History, Their Mechanism of Action, Pharmacology, and Indications. *Cells* 11(20): 3214. <https://doi.org/10.3390/cells11203214>
25. *Camporese G, Bernardi E* (2009) Low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis. *Curr Opin Pulm Med* 15: 443–454. <https://doi.org/10.1097/MCP.0B013E32832F5D9D>
26. *Venclauskas L, Llau JV, Jenny JY, Kjaersgaard-Andersen P, Jans Ø* (2018) European guidelines on perioperative venous thromboembolism prophylaxis: Day surgery and fast-track surgery. *Eur J Anaesthesiol* 35: 134–138. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000000706>
27. *Кондашевская МВ* (2022) Горизонты гепаринотерапии при COVID-19 и заболеваниях, связанных с пандемией. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(4): 399–413. [*Kondashevskaya MV* (2022) Horizons of heparin therapy for COVID-19 and diseases associated with the pandemic. *Russ J Physiol* 108(4): 399–413. (In Russ)].
28. *Billett HH, Reyes-Gil M, Szymanski J, Ikemura K, Stahl LR, Lo Y, Rahman S, Gonzalez-Lugo JD, Kushnir M, Barouqa M, Golestaneh L, Bellin E* (2020) Anticoagulation in COVID-19: Effect of Enoxaparin, Heparin, and Apixaban on Mortality. *Thromb Haemost* 120: 1691–1699. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1720978>
29. *Стилиди ИС, Сигуа БВ, Земляной ВП, Курков АА, Губков ИИ* (2022) Рак желудка, осложненный кровотечением. (Систематический обзор литературы). *Хирургия Журн им НИ Пирогова* 6: 102–115. [*Stilidi IS, Sigua BV, Zemlyanov VP, Kurkov AA, Gubkov II* (2022) Stomach cancer complicated by bleeding. (Systematic review of the literature). *Hirurgiya Zhurn im NI Pirogova* 6: 102–115. (In Russ)].
30. *Земляной ВП, Климов СЕ, Сигуа БВ, Козобин АА, Козловская МГ* (2016) Редкий случай кровотечения из острых язв тонкой кишки. *Журн им НВ Склифосовского Неотложная мед помощь* 4: 84–86. [*Zemlyanov VP, Klimov SE, Sigua BV, Kozobin AA, Kozlovskaya MG* (2016) A rare case of bleeding from acute ulcers of the small intestine. *Zhurn im NV Sklifosovskogo Neotlozhnaya med pomoshch* 4: 84–86. (In Russ)].
31. *Сигуа БВ, Земляной ВП, Губков ИИ, Данилов АМ, Сахно ДС, Захаров ЕА, Гуслев АБ* (2018) Тактика хирургического лечения желудочных кровотечений опухолевого генеза у лиц пожилого и старческого возраста. *Журн им НВ Склифосовского Неотложная мед помощь* 2: 152–155. [*Sigua BV, Zemlyanov VP, Gubkov II, Danilov AM, Sahno DS, Zaharov EA, Guslev AB* (2018) Tactics of surgical treatment of gastric bleeding of tumor origin in elderly and senile people. *Zhurn im NV Sklifosovskogo Neotlozhnaya med pomoshch* 2: 152–155. (In Russ)].

32. *Филаретова ЛП* (1990) Зависимость образования стрессорных язв желудка от состояния гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Физиол журн СССР им ИМ Сеченова 76(11): 1594–1600. [*Filaretova L* (1990) The dependence of the formation of stress stomach ulcers on the function of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal cortical system. Russ J Physiol 76(11): 1594–1600. (In Russ)].
33. *Filaretova LP, Filaretov AA, Makara GB* (1998) Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. Am J Physiol 274: G1024–G1030.
34. *Filaretova L* (2017) Gastroprotective effect of stress preconditioning: involvement of glucocorticoids. Curr Pharm Des 23(27): 3923–3927. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170215145125>
35. *Filaretova L, Bagaeva T* (2016) The Realization of the Brain-Gut Interactions with Corticotropin-Releasing Factor and Glucocorticoids. Curr Neuropharmacol 14: 876–881.
36. *Filaretova L, Tanaka A, Miyazawa T, Kato S, Takeuchi K* (2002) Mechanisms by which endogenous glucocorticoid protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. Am J Physiol – Gastrointest Liver Physiol 283: 1082–1089. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00189.2002>
37. *Filaretova L, Bagaeva T, Morozova O* (2012) Stress and the stomach: Corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa in stress through involvement of glucocorticoids. Cell Mol Neurobiol 32: 829–836. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9800-z>
38. *Filaretova LP, Morozova OY, Yarushkina NI* (2021) Peripheral corticotropin-releasing hormone may protect the gastric mucosa against indometacin-induced injury through involvement of glucocorticoids. J Physiol Pharmacol 72: 1–10. <https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.06>
39. *Filaretova L, Komkova O, Sudalina M, Yarushkina N* (2021) Non-Invasive Remote Ischemic Preconditioning May Protect the Gastric Mucosa Against Ischemia-Reperfusion-Induced Injury Through Involvement of Glucocorticoids. Front Pharmacol 12. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.682643>
40. *Filaretova LP, Morozova OYu* (2022) From hypothalamic regulation of pituitary-adrenocortical axis to participation of glucocorticoids in gastroprotective action of corticotropin-releasing factor. J Evol Biochem Physiol 58(6): 1994–2006.
41. *Tsukimi Y, Nozue C, Okabe S* (1996) Effects of leminoprazole, omeprazole and sucralfate on indomethacin-induced delayed healing of kissing gastric ulcers in rats. J Gastroenterol Hepatol 11: 335–340. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.1996.TB01380.X>
42. *Filaretova L, Bagaeva T, Podvigina T* (2002) Role of endogenous glucocorticoids in the healing of gastric erosions and chronic gastric ulcers in rats. Inflammopharmacology 10(4-6): 401–412.
43. *Филаретова ЛП, Багаева ТР, Подвигина ТТ, Морозова ОЮ* (2003) Недостаточная продукция глюкокортикоидов замедляет заживление острых эрозий и хронических язв слизистой оболочки желудка у крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 89(9): 1137–1146. [*Filaretova LP, Bagaeva TR, Podvigina TT, Morozova OYu* (2003) Deficiency of glucocorticoid production delays the healing of acute gastric mucosal erosion and chronic ulcers in rats. Russ J Physiol 89(9): 1137–1146. (In Russ)].
44. *Kodama Y, Kumashiro R, Gain T, Matsumoto T* (1983) The effect of heparin on stress ulcer formation in rats Am Surg 49(9): 506–510. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6605103/>
45. *Li Y, Cho CH* (1999) The ulcer healing effect of protamine sulphate in rat stomach. Aliment Pharmacol Ther 13: 1351–1362. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2036.1999.00618.X>
46. *Солнушкин СД, Чихман ВН* (2018) Компьютерная обработка биологических изображений. Биомед. радиоэлектроника 2: 35–40. [*Solnushkin SD, Chikhman VN* (2018) Experience of biological images processing. Biomed. Radioengineer 2: 35–40. (In Russ)].
47. *Magierowski M, Magierowska K, Surmiak M, Hubalewska-Mazgaj M, Kwiecień S, Wallace JL, Brzozowski T* (2017) The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alterations in gastric microcirculation. J Physiol Pharmacol 68(5): 749–756.
48. *Филаретова ЛП, Левкович ЮИ, Филаретов АА* (1995) Противоязвенное действие кортикостероидов обеспечивается за счет улучшения кровоснабжения желудка. Рос журн гастроэнтерологии гепатологии колопроктологии 5(3): 241–242. [*Filaretova L, Levkovich Y, Filaretov AA* The antiulcer effect of corticosteroids is provided by improving the blood supply to the stomach. Ross J Gastroenterol Hepatol Coloproctol 5(3): 241–242. (In Russ)].
49. *Bobryshev P, Podvigina T, Maltcev N, Filaretova L* (2006) Gastric microcirculation as target of gastroprotective action of glucocorticoid hormones in rats with desensitization of capsaicin-sensitive sensory neurons. Inflammopharmacology 14(5-6): 236–242. <https://doi.org/10.1007/s10787-006-1546-0>

50. Podvigina TT, Bobryshev PY, Bagaeva TR, Mal'tsev NA, Levkovich YI, Filaretova LP (2009) The effects of desensitization of capsaicin-sensitive afferent neurons on the microcirculation in the stomach in rats depend on the blood glucocorticoid hormone level. *Neurosci Behav Physiol* 39: 559–564.
<https://doi.org/10.1007/s11055-009-9172-0>
51. Kalayci M, Kocdor MA, Kuloglu T, Sahin I, Sarac M, Aksoy A, Yardim M, Dalkilic S, Gursu O, Aydin S, Akkoc RF, Ugras M, Artas G, Ozercan IH, Ugur K, Aydin S (2017) Comparison of the therapeutic effects of sildenafil citrate, heparin and neuropeptides in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. *Life Sci* 186: 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.013>
52. Li Y, Wang HY, Cho CH (1999) Association of heparin with basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and constitutive nitric oxide synthase on healing of gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2): 789–796.
53. Li Y, Wang WP, Wang HY, Cho CH (2000) Intragastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide-dependent mechanism in rats. *Eur J Pharmacol* 399: 205–214.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00278-8)
54. Горбашко АИ (1974) Острые желудочно-кишечные кровотечения. М. Медицина. [Gorbashko AI (1974) Acute gastrointestinal bleeding. M. Medicine. (In Russ)].

Effect of Heparin on the Formation and Healing of Gastric Ulcers Induced by Acetic Acid Application on the Gastric Mucosa in Rats

A. L. Efimov^b, D. S. Sakhno^a, B. V. Sigua^b, N. I. Yarushkina^{a, *}, and L. P. Filaretova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia*

^b*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: yarushkinani@infran.ru*

The key factor in maintaining the integrity of the gastric mucosa is its normal blood supply, respectively, the use of drugs that improve it, including through a positive effect on the rheological properties of blood, is in demand for the treatment of gastric ulcer. These drugs include the anticoagulant heparin. The aim of the work is to study the effect of heparin on the formation and healing of gastric ulcers induced by the application of 60% acetic acid to the gastric mucosa in rats, while assessing the possible risk of bleeding. After application of acetic acid (day 0), the area of gastric ulcers was assessed on the 4th day (formation of the ulcers) and the 7th day (healing of the ulcers). To assess the effect on ulcer formation, heparin (1000 IU/kg/day, subcutaneously) was administered from days 0 to 3, and on the healing from days 4 to 6 after acid application. To check for possible bleeding under the influence of heparin, the level of hemoglobin in the blood was tested before acid application (basal), on the 4th and 7th days after application. The degree of bleeding was assessed based on the relative decrease in hemoglobin levels. The administration of heparin led to a decrease in the average area of ulcers both on the 4th and on the 7th day compared with that in control rats (heparin vehicle). In control rats, both on the 4th and on the 7th day, the hemoglobin level was reduced compared to the corresponding basal level. Heparin had no effect on the hemoglobin level at day 4, but potentiated the decrease in mean hemoglobin level at day 7, increasing the number of animals having a greater relative decrease in hemoglobin level compared to the corresponding control group. Thus, heparin may have a gastroprotective effect, manifested both in the weakening of the formation of an ulcer and in the acceleration of its healing, however, there is a risk of bleeding when the ulcer heals.

Keywords: gastric ulcer, gastroprotection, heparin, anticoagulant, bleeding, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СТЕРОИДОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА И МЕТФОРМИНА У САМЦОВ КРЫС
С АНДРОГЕННЫМ ДЕФИЦИТОМ, ОБУСЛОВЛЕННЫМ
ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ**

© 2023 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач^{1, *}, И. А. Лебедев¹,
В. Н. Сорокоумов^{1, 2}, А. О. Шпаков¹

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

²Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: derkach_k@list.ru

Поступила в редакцию 08.07.2023 г.

После доработки 07.09.2023 г.

Принята к публикации 07.09.2023 г.

У мужчин с ожирением, наряду с метаболическими нарушениями и инсулиновой резистентностью, снижается уровень тестостерона и нарушаются функции репродуктивной системы. Одним из путей их коррекции может быть применение агонистов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) и антидиабетических препаратов, но механизмы их влияния на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось изучены недостаточно. Целью работы было изучить эффекты длительной терапии метформином (5 нед., 120 мг/кг) и пятидневной обработки ЛГР-агонистами — хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ, 20 МЕ/крысу/сутки, п/к) и аллостерическим агонистом ТП03 (15 мг/кг/сутки, в/б) на уровень тестостерона в крови и экспрессию тестикулярных и гипофизарных генов у самцов крыс с длительным диета-индуцированным ожирением (ДИО). ТП03 умеренно стимулировал продукцию тестостерона у самцов крыс с ДИО, не оказывая ингибирующего эффекта на экспрессию ЛГР в семенниках и лишь в небольшой степени снижая экспрессию гена β -субъединицы лютеинизирующего гормона в гипофизе. При однократном введении ДИО-крысам стероидогенный эффект ТП03 был сопоставим с таковым в контрольной группе, но при пятидневном введении существенно ему уступал. Стероидогенный эффект ХГЧ при однократном введении крысам с ДИО был ниже такового в контроле, но сопоставим с ним при пятидневном введении ХГЧ, и существенно превосходил соответствующие эффекты ТП03. В отличие от ТП03, ХГЧ значительно снижал экспрессию ЛГР в семенниках и более выражено ингибировал экспрессию лютеинизирующего гормона в гипофизе. Обработка метформином восстанавливала андрогенный статус, существенно не влияя на экспрессию генов стероидогенеза в семенниках. В группах с обработкой метформином не было усиления стероидогенных эффектов обоих ЛГР-агонистов. Полученные результаты указывают на перспективы применения ТП03 и ХГЧ для стимуляции тестикулярного стероидогенеза и на эффективность терапии метформином для нормализации продукции тестостерона при ДИО, что может быть использовано для коррекции репродуктивных расстройств при ожирении. В то же время совместное применение метформина и ЛГР-агонистов при ДИО представляется нецелесообразным.

Ключевые слова: гонадотропин, аллостерический агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, метформин, ожирение, андрогенный дефицит, семенники

DOI: 10.31857/S0869813923100035, **EDN:** CLCUZW

ВВЕДЕНИЕ

Среди причин нарушений продукции андрогенов и снижения фертильности у мужчин важное место занимают патологическое ожирение и метаболические расстройства, сопровождаемые ожирением, такие как сахарный диабет 2-го типа (СД2), метаболический синдром, стеатоз печени [1–5]. Имеются клинические данные о значимом снижении уровня тестостерона у мужчин с ожирением [1, 2, 4], а также о нарушении функций гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной (ГГТ) оси, развитии гипогонадотропных состояний и андрогенном дефиците у подростков пубертатного возраста с явно выраженным ожирением [6, 7]. Получены доказательства негативного влияния диета-индуцированного ожирения (ДИО) на тестикулярный стероидогенез и фертильность у самцов обезьян, крыс и мышей, а также установлены причинно-следственные взаимосвязи между андрогенным дефицитом и ожирением [3, 8, 9]. Среди факторов, провоцирующих андрогенную недостаточность при ожирении, можно выделить инсулиновую и лептиновую резистентность, гипергликемию, дислипидемию, липотоксичность, усиление воспалительных процессов, нарушение окислительно-восстановительного баланса, причем эти факторы могут действовать на различные компоненты ГГТ оси – продуцирующие гонадолиберин гипоталамические нейроны, гонадотрофы аденогипофиза и тестикулярные клетки, в том числе на синтезирующие тестостерон клетки Лейдига [2, 10].

Повышение уровня тестостерона у пациентов с ожирением с помощью заместительной терапии препаратами андрогенов и гонадотропинов, бариатрических операций и низкокалорийной диеты приводит к нормализации массы тела, снижению доли жировой ткани, улучшению липидного метаболизма [5, 11–15]. Однако терапия андрогенами и гонадотропинами имеет ряд побочных эффектов, включая нарушение кровотока и липидного баланса. Наряду с этим, для нее характерен синдром отмены, когда после прекращения лечения функциональные нарушения в ГГТ оси возвращаются и в ряде случаев даже прогрессируют [16–18]. Возможной альтернативой такой терапии является применение аллостерических регуляторов рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР). В отличие от гонадотропинов – хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), аллостерические регуляторы сравнительно мягко активируют ЛГР, более селективны в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, не вызывают десенситизации ЛГР и резистентности клеток-мишеней к эндогенному ЛГ, как это показано нами ранее для производных тиено[2,3-д]-пиримидина [19–22]. Другим подходом может быть применение препаратов, снижающих массу тела и жировой ткани и улучшающих гормональные и метаболические показатели при ожирении, и здесь наибольший интерес представляет метформин (МФ) – препарат, широко применяемый для лечения СД2 и метаболического синдрома. Имеются данные, что МФ при этих заболеваниях может восстанавливать сперматогенез и андрогенный статус, хотя также получены результаты, которые не поддерживают точку зрения о положительном влиянии МФ на репродуктивные функции при СД2 и метаболическом синдроме [23–26].

Несмотря на имеющийся прогресс в отношении коррекции андрогенного дефицита при метаболических расстройствах, эффективность и механизмы действия гонадотропинов, обладающих ЛГ-активностью, и МФ на стероидогенную активность тестикулярных клеток при ожирении без явных признаков нарушений панкреатических β -клеток остаются малоизученными, а для аллостерических ЛГР-агонистов такие данные вовсе отсутствуют. Нет сведений о влиянии комбинированного применения МФ и ЛГР-агонистов на продукцию тестостерона при ожирении. Влияние аллостерических ЛГР-агонистов на экспрессию гипофизарных генов, ко-

дирующих компоненты системы синтеза гонадотропинов, до настоящего времени не исследовано, а для диета-индуцированного ожирения (ДИО) такие сведения отсутствуют и для ХГЧ, и для МФ. Поскольку ожирение тесно связано с андрогенным дефицитом и гипогонадотропными состояниями, то такие исследования имеют несомненное практическое значение. Целью работы было изучить эффекты длительной (5 нед.) терапии МФ и пятидневной обработки ЛГР-агонистами, ХГЧ и разработанным нами тиено[2,3-d]-пиримидиновым производным ТП03 на уровень тестостерона в крови и на экспрессию тестикулярных генов, ответственных за стероидогенез, и гипофизарных генов, вовлеченных в синтез и секрецию гонадотропинов, у самцов крыс с ожирением, вызванным длительной высокожировой диетой. Наряду с раздельным применением препаратов, исследовали введение ЛГР-агонистов на фоне МФ терапии, чтобы проверить возможность потенцирующего влияния МФ на их эффекты. Ранее нами было продемонстрировано усиление стероидогенных эффектов ЛГР-агонистов при их однократном введении самцам крыс с СД2, длительное время леченных МФ [21]. Выбор ТП03 обусловлен его отчетливо выраженной стероидогенной активностью, показанной нами ранее у контрольных, диабетических и стареющих самцов крыс [20].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали самцов крыс линии Wistar, которым в начале эксперимента было два месяца. Ожирение и ассоциированные с ним метаболические и гормональные расстройства вызывали переводом двухмесячных самцов крыс на высокожировую диету, которая включала 52.4% жира (свиного сала), 41.7% творога, 5% паштета (свиная печень), 0.5% метионина, 0.2% дрожжей и 0.2% поваренной соли (NaCl) [27]. Крысы на протяжении 23 нед. получали ежедневно по 5–7 г высокожировой смеси, дополнительно к стандартному рациону (гранулированный сухой корм). Контрольная группа животных того же возраста получала только гранулированный сухой корм.

Перед началом лечения отбирали крыс с повышенным содержанием глюкозы в крови (выше 7.0 мМ) через 120 мин после глюкозной нагрузки в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте (ИГТТ, 2 г глюкозы/животное, в/б), а также с повышенной массой тела, рассматривая их как группу с ожирением и нарушенной толерантностью к глюкозе. Затем крыс с ожирением случайным образом распределяли на экспериментальные группы (в каждой $n = 18$), одна из которых (группа “ОЖ + МФ”) в течение 5 нед. получала МФ (“Sigma”, США; 120 мг/кг/сутки, перорально через зонд), другая (группа “ОЖ”) вместо МФ получала плацебо (водный раствор). Обе группы до конца эксперимента продолжали получать пищу с высоким содержанием насыщенных жиров. За неделю до окончания эксперимента, перед обработкой животных ЛГР-агонистами, проводили повторный ИГТТ для изучения чувствительности к глюкозе и инсулинового и лептинового ответа на глюкозную нагрузку, оценивая уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови через различные временные интервалы после введения глюкозы. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски “One-Touch Select Ultra” (США), для определения концентрации инсулина и лептина – наборы “Rat Insulin ELISA” (“Mercodia AB”, Швеция) и “ELISA Kit for Leptin” (Cloud-Clone Corp., США). В крови животных оценивали уровни гликированного гемоглобина (HbA1c), общего холестерина и триглицеридов, для чего использовали набор “Multi Test HbA1c System kit” (“Polymer Technology Systems, Inc.”, США) и тест-полоски “Cholesterol multiCare-in” и “Triglycerides multiCare-in” (“Biochemical Systems Int.”, Италия). На следующий день после ИГТТ оценивали уровни тестостерона в крови животных на протяжении шестичасового временного промежутка (в 10.00, 12.00, 14.00 и 16.00),

рассчитывая интегративное значение AUC_{0-6} (в относительных единицах). Концентрацию тестостерона определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия). Образцы крови забирали из хвостовой вены под местной анестезией, которую осуществляли с помощью 2%-ного раствора лидокаина из расчета 2–4 мг/кг массы тела.

После повторного тестирования группы “ОЖ” и “ОЖ + МФ” рандомизировали каждую на три подгруппы, после чего животных в течение 5 дней обрабатывали ЛГР-агонистами (ТП03, ХГЧ) или растворителем (ДМСО, растворитель для ТП03). Ранее было показано, что в используемом объеме ДМСО не влияет на метаболические и гормональные показатели [20]. Синтез и характеристику ТП03 осуществляли, как описано нами ранее [21], в то время как ХГЧ был производства “Московского эндокринного завода” (Россия).

Тем самым были сформированы следующие группы (в каждой $n = 6$): “К” (контроль), “ОЖ” (без лечения), “ОЖ + ТП” (ТП03, 15 мг/кг/сутки, в/б, 5 дней), “ОЖ + Г” (ХГЧ, 20 МЕ/крысу/сутки, п/к, 5 дней), “ОЖМ” (МФ, 120 мг/кг/сутки, перорально), “ОЖМ + ТП” (совместно МФ и ТП03), “ОЖМ + Г” (совместно МФ и ХГЧ). В ходе эксперимента оценивали концентрацию тестостерона в крови крыс после однократного введения ЛГР-агонистов (1-й день, забор крови до введения, которое осуществляли в 10.00, и через 1, 3 и 5 ч после него) и ежедневно в течение пяти дней через 3 ч после их введения (13.00). Сразу после последнего забора крови животных наркотизировали (хлоральгидрат, 400 мг/кг), декапитировали и забирали у них ткани семенников и гипофиза для оценки экспрессии целевых генов, а также оценивали массу абдоминального жира и рассчитывали его долю в общей массе тела.

Количественную ПЦР в реальном времени осуществляли, как описано ранее [20], для чего из семенников и гипофиза выделяли тотальную РНК, используя “ExtraRNA kit” (“Evrogen”, Россия). Обратную транскрипцию проводили, используя набор “MMLV RT Kit” (“Evrogen”, Россия). Амплификационный сигнал детектировали, используя прибор “7500 Real-Time PCR System” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для исследований использовали последовательности комплементарных кДНК прямого и обратного праймеров для генов крысы, кодирующих ЛГР (*Lhr*) и стероидогенные белки — холестерин-транспортирующий белок *StAR* (*Star*), цитохромы *CYP11A1* (*Cyp11a1*), *CYP17A1* (*Cyp17a1*) и *CYP19A1* (*Cyp19a1*) в семенниках, и гены, кодирующие рецептор гонадолиберина (*Gnrhr*), β -субъединицы ЛГ (*LHbeta*) и ФСГ (*FSHbeta*) в гипофизе (табл. 1). В качестве референсных использовали гены 18S-рРНК (*18S rRNA*) и β -актина (*Actb*). Анализ результатов проводили с использованием метода $\Delta\Delta C_t$. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе, в которой их принимали за единицу.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ “SPSS Statistics”, используя однофакторный дисперсионный анализ с попарным сравнением с помощью апостериорного критерия Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и абдоминального жира, а также содержание в крови триглицеридов и общего холестерина у крыс с ожирением значимо превышали эти показатели в контрольной группе (табл. 2). В группе “ОЖ” отмечали повышенные уровни глюкозы, инсулина и лептина, как базальные, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки, повышенное содержание гликированного гемоглобина, а также нарушенную толерантность к глюкозе, о чем свидетельствует повышенное значение AUC_{0-120} для глюкозной кривой в ИГТТ (табл. 2). Лечение МФ приводило к нормализации массы тела, базального и стимулированного глюкозной нагрузкой уровней инсулина и

Таблица 1. Структура праймеров, использованных для оценки экспрессии целевых генов в семенниках и гипофизе, а также референсных генов *Actb* и *18S rRNA*

Ген	Последовательность праймеров	Тотжига, °C	NCBI Reference Sequence
<i>Lhr</i>	For: CTGCGCTGTCCTGGCC Rev: CGACCTCATTAAGTCCCCCTGAA	55	NM_012978.1
<i>Star</i>	For: AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC Rev: CACCTGGCACCACCTTACTT	55	NM_031558.3
<i>Cyp11a1</i>	For: TATTCCGCTTTGCCTTTGAG Rev: CACGATCTCCTCCAACATCC	55	NM_017286.3
<i>Cyp17a1</i>	For: CATCCCCACAAGGCTAAC Rev: TGTGTCCTTGGGGACAGTAAA	55	XM_006231435.3
<i>Cyp19a1</i>	For: GGTATCAGCCTGTCGTGGAC Rev: AGCCTGTGCATTCTTCCGAT	56	NM_017085.2
<i>Gnrhr</i>	For: TGGGAGACTACCCAAGCACT Rev: TGCTAACCTGAGCCCAACC	56	NM_031038.3
<i>LHbeta</i>	For: TCACCTTCACCACCAGCATC Rev: GGTAGGTGCACACTGGCTGA	56	NM_012858.2
<i>FSHbeta</i>	For: TCGATCCAGCTTTGCATCCT Rev: TGGTGTAGCAGTAGCCCTCA	56	NM_001007597.2
<i>Actb</i>	For: CTGGCACCACACCTTCTACA Rev: AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	56	NM_031144.3
<i>18S rRNA</i>	For: GGACACGGACAGGATTGACA Rev: ACCCACGGAATCGAGAAAGA	56	NR_046237.1

Lhr – ген рецептора лютеинизирующего гормона; *Star* – ген холестерин-транспортирующего белка StAR (steroidogenic acute regulatory protein); *Cyp11a1* – ген цитохрома CYP11A1 (P450_{scC}), катализирующего превращение холестерина в прегненолон; *Cyp17a1* – ген цитохрома CYP17A1 (P450 17A1 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза), катализирующего превращение прогестерона в 17-гидроксипрогестерон и далее в андростендион; *Cyp19a1* – ген цитохрома CYP19A1 (ароматазы), катализирующего конверсию андрогенов в эстрогены путем ароматизации кольца А, что обеспечивает превращение андростендиона в эстрон и тестостерона в эстрадиол; *Gnrhr* – ген рецептора гонадолиберина, относящегося к G-белок-сопряженным рецепторам; *LHbeta* и *FSHbeta* – гены β -субъединиц ЛГ и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) соответственно, определяющие типовую принадлежность гонадотропина.

лептина, значимо снижало массу жировой ткани и содержание HbA1c, восстанавливало глюкозную чувствительность и липидный профиль (табл. 2). В группе “ОЖ” базовая концентрация тестостерона в крови была снижена. Лечение МФ повышало ее, на что указывает рассчитанное значение $AUC_{0-6(часы)}$ для тестостерона в 6-часовом временном промежутке (табл. 2). Тем самым четырехнедельное лечение МФ частично восстанавливало метаболические и гормональные показатели у крыс с ДИО, включая их андрогенный статус.

Однократная обработка крыс с ожирением с помощью ТП03 и ХГЧ, как и в случае контрольных животных, приводила к стимуляции продукции тестостерона (рис. 1), о чем свидетельствуют значения $AUC_{1-5(часы)}$ (табл. 3). При этом приросты уровня тестостерона в группе “ОЖ” с обработкой ХГЧ были существенно ниже, чем в контроле, составляя через 3 и 5 ч после начала обработки 58 и 65% от таковых в группе “К + Г”, о чем также свидетельствует снижение на 39% значения $AUC_{1-5(часы)}$ в группе “ОЖ + Г” в сравнении с группой “К + Г” (рис. 1а и 1б, табл. 3). Стероидогенные эффекты ТП03 были выражены слабее, чем в случае гонадотропина, и в группах “К + ТП” и “ОЖ + ТП” были сопоставимыми (рис. 1а и 1б, табл. 3). Лечение МФ, улучшая базовый андрогенный статус, не приводило к восстановлению стероидогенных эффектов ЛГР-агонистов (рис. 1с, табл. 3).

Таблица 2. Масса тела и жировой ткани, липидный профиль, уровни глюкозы, инсулина и лептина при проведении теста с глюкозной нагрузкой и уровни тестостерона у самцов крыс с ДИО, в том числе леченных метформином, в сравнении с контрольными животными

	Контроль	ОЖ	ОЖ + МФ
Масса тела, г	403.6 ± 7.7	446.3 ± 7.6 ^a	424.6 ± 6.5
Масса жира, г	7.14 ± 0.23	9.97 ± 0.50 ^a	8.46 ± 0.30 ^{a,b}
Доля жира, %	1.76 ± 0.03	2.22 ± 0.07 ^a	1.98 ± 0.04 ^{a,b}
Глюкоза (0), мМ	5.8 ± 0.1	6.5 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.2
Глюкоза (120), мМ	6.2 ± 0.2	9.0 ± 0.3 ^a	8.0 ± 0.3 ^{a,b}
AUC _{0–120(мин)} (глюкоза), усл. ед.	1188 ± 52	1811 ± 44 ^a	1563 ± 44 ^{a,b}
Инсулин (0), нг/мл	0.94 ± 0.15	1.55 ± 0.15 ^a	1.32 ± 0.19
Инсулин (60), нг/мл	2.16 ± 0.19	4.76 ± 0.43 ^a	2.78 ± 0.29 ^b
Инсулин (120), нг/мл	1.20 ± 0.22	2.75 ± 0.51 ^a	1.43 ± 0.09
Лептин (0), нг/мл	1.64 ± 0.23	2.34 ± 0.37 ^a	1.86 ± 0.62
Лептин (120), нг/мл	4.22 ± 0.90	11.97 ± 1.62 ^a	6.96 ± 1.24
HbA1c, %	4.12 ± 0.06	4.85 ± 0.06 ^a	4.43 ± 0.07 ^b
Триглицериды, мМ	2.06 ± 0.07	3.19 ± 0.14 ^a	2.70 ± 0.11 ^{a,b}
Холестерин, мМ	4.32 ± 0.11	6.81 ± 0.16 ^a	6.04 ± 0.16 ^{a,b}
Тестостерон (10.00), нМ	8.43 ± 0.67	4.51 ± 0.39 ^a	5.47 ± 0.29 ^a
Тестостерон (16.00), нМ	9.25 ± 0.56	5.52 ± 0.40 ^a	7.11 ± 0.48 ^{a,b}
AUC _{0–6(часы)} (тестостерон), усл. ед.	51.4 ± 2.6	30.8 ± 2.1 ^a	41.0 ± 2.1 ^{a,b}

Различия по сравнению с группами “К” (^a) и “ОЖ” (^b) статистически значимы при $p < 0.05$. Значения AUC_{0–120(мин)} — интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы (мМ)—время (мин)”, включающая временной промежуток 120 мин от момента в/б инъекции глюкозы (2 г/кг) с пятью измерениями уровня глюкозы в крови (до и через 15, 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки). Значения AUC_{0–6(часы)} — интегрированная площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)—время (часы)”, включающая временной промежуток от 10.00 до 16.00 (четыре измерения — в 10.00, 12.00, 14.00 и 16.00). Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 18$.

Пятидневная обработка с помощью ЛГР-агонистов во всех изученных группах приводила к повышению уровня тестостерона в крови, но стероидогенные эффекты существенно различались как по величине, так и по динамике (рис. 2). В контрольной группе стимулирующие продукцию тестостерона эффекты ТП03 составляли 176% в первый день обработки и постепенно повышались, достигая 289% на 5-й день. В группе “ОЖ+ТП” стимулирующий эффект ТП03 существенно не менялся в течение 5-дневной обработки препаратом, а в группе “ОЖМ+ТП” эффект ТП03 снижался и на 5-й день обработки составлял 55% от стимулирующего эффекта, полученного в 1-й день обработки (рис. 2b и 2c, табл. 3). Стероидогенные эффекты ХГЧ в группах “К + Г” и “ОЖ + Г” были максимальны в первый день обработки (726 и 978% соответственно), затем на 3-й день достоверно снижались на 60 и 46% соответственно, после чего восстанавливались, и на 4-й день в группе “К + Г” были в 1.4 раза выше, а в группе “ОЖ + Г” в 1.7 раза выше, чем на 3-й день обработки. При этом в 4–5-й дни в контрольной группе они были ниже, а в группе с ожирением сходными с таковыми в первый день обработки (рис. 2a и 2b). Важно отметить, что в группе “ОЖМ + Г” снижение эффекта гонадотропина в 2–4-й дни отсутствовало, а на пятый день обработки ХГЧ содержание тестостерона в крови нарастало и было достоверно выше, чем в первый день (рис. 2c). Тем самым при ожирении динамика стероидогенных эффектов ТП03 и ХГЧ не претерпевало значимых изменений, а в группах с лечением МФ отмечалось ослабление стероидогенного эффекта

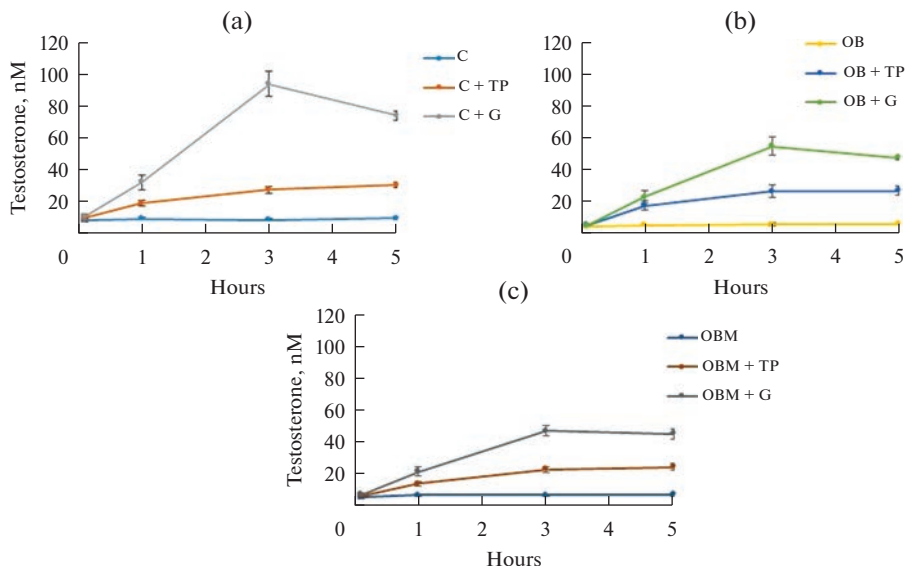


Рис. 1. Уровни тестостерона в сыворотке крови в течение 5 ч после введения ТП03 и ХГЧ самцам крыс с ожирением, в том числе леченных метформином, в сравнении с таковыми в контрольной группе. Обозначения групп: (а): С (К) – контроль; С + ТР (К + ТП) – ТП03, 15 мг/кг/сутки, в/б, 5 дней; С + Г (К + Г) – ХГЧ, 20 МЕ/крысу/сутки, п/к, 5 дней; (б): ОВ (ОЖ) – крысы с ожирением без лечения; ОВ + ТР (ОЖ + ТП) – крысы с ожирением, с обработкой ТП03, 15 мг/кг/сутки, в/б, 5 дней; ОВ + Г (ОЖ + Г) – крысы с ожирением, с обработкой ХГЧ, 20 МЕ/крысу/сутки, п/к, 5 дней; (с): ОВМ (ОЖМ) – крысы с ожирением, обработанные метформином, 120 мг/кг/сутки, перорально, 5 недель; ОВМ + ТР (ОЖМ + ТП) – крысы с ожирением, с обработкой метформином и ТП03; ОВМ + Г (ОЖМ + Г) – крысы с ожирением, с обработкой метформином и ХГЧ.

ТП03 и изменение динамики соответствующего эффекта ХГЧ (рис. 2, табл. 3). Оценка интегрированных значений уровней тестостерона показала, что, в отличие от однократного введения, значение $AUC_{1-5(дн)}$ для ХГЧ в группах “ОЖ + Г” и “ОЖМ + Г” значительно не отличались от такового в группе “К + Г”, что указывает на сохранение продукции тестостерона при длительном введении гонадотропина, в то время как в случае ТП03, напротив, начинало выявляться снижение значений $AUC_{1-5(дн)}$, в наибольшей степени в группе “ОЖМ + ТП” (табл. 3).

Анализ экспрессии тестикулярных генов показал, что в группе “ОЖ” снижена экспрессия гена *Star*, причем обработка МФ лишь частично восстанавливала его экспрессию (рис. 3). Пятидневная обработка контрольных крыс с помощью ТП03 существенно не влияла на экспрессию изученных стероидогенных генов, в то время как обработка ХГЧ в значительной степени снижала экспрессию гена *Lhr* и в среднем в два раза повышала экспрессию стероидогенных генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1* (рис. 3).

В группах с ожирением ТП03 повышал экспрессию гена *Star* в сравнении с группой “ОЖ” (но не с контролем), не влияя на экспрессию гена *Lhr* (рис. 3). Стимулирующие эффекты ХГЧ на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1* в группах “ОЖ + Г” и “ОЖМ + Г” сохранялись, причем обработка МФ усиливала эффект ХГЧ в отношении гена *Cyp17a1*. В то же время отмечалось значительное ингибирование экспрессии гена *Lhr* (рис. 3). Оба ЛГР-агониста существенно не влияли на экспрессию гена ароматазы, которая во всех группах была близка к таковой в контроле. Тем са-

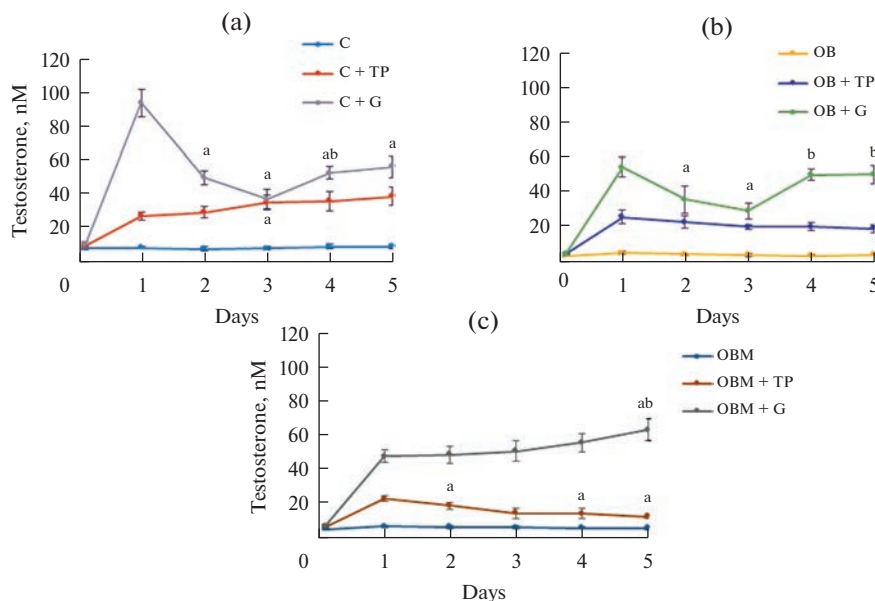


Рис. 2. Уровни тестостерона в сыворотке крови в течение пятидневного введения ТП03 и ХГЧ самцам крыс с ожирением (b), в том числе леченных метформином (c), в сравнении с таковыми в контрольной группе (c). Различия по сравнению с первым днем введения (^a) и с третьим днем введения препаратов (^b) статистически значимы при $p < 0.05$. Обозначения групп как на рис. 1.

Таблица 3. Значения интегрированной площади под кривой “концентрация тестостерона (нМ)—время (минуты/дни)” ($AUC_{1-5(часы)}/AUC_{1-5(дни)}$) при однократном или пятидневном введении ТП03 и ХГЧ контрольным крысам и животным с ожирением, в том числе леченным метформином (в усл. ед.).

Группа	$AUC_{1-5(часы)}$, усл. ед.	$AUC_{1-5(дни)}$, усл. ед.
К	39.0 ± 2.6	37.5 ± 3.6
К + ТП	106.9 ± 7.1^a	136.9 ± 15.8^a
К + Г	$296.2 \pm 17.0^{a,d}$	217.6 ± 9.2^a
ОЖ	23.0 ± 2.4^a	19.3 ± 2.5^a
ОЖ + ТП	$97.8 \pm 11.2^{a,b}$	$88.6 \pm 7.3^{a,b,c}$
ОЖ + Г	$181.7 \pm 14.8^{a,b,c,d}$	$171.1 \pm 17.5^{a,b,d}$
ОЖМ	30.7 ± 2.6	28.3 ± 2.8
ОЖМ + ТП	$88.2 \pm 6.1^{a,b}$	$69.0 \pm 8.0^{a,b,c}$
ОЖМ + Г	$166.1 \pm 11.9^{a,b,c,d}$	$213.7 \pm 18.8^{a,b,d}$

Значения $AUC_{1-5(часы)}$ и $AUC_{1-5(дни)}$ — интегрированная площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)—время (часы/дни)”, включающая временной промежуток от 11.00 до 15.00 (три измерения — в 11.00, 13.00 и 15.00, введение препаратов — 10.00) или с первого по пятый дни введения (ежедневно в 13.00 через 3 ч после введения препаратов). Различия по сравнению с группами “К” (^a) и “ОЖ” (^b) статистически значимы при $p < 0.05$; различия между контрольными и ОЖ/ОЖМ крысами с обработкой ТП03 или ХГЧ (“К + ТП”/“ОЖ + ТП”, “К + ТП”/“ОЖМ + ТП”, “К + Г”/“ОЖ + Г”, “К + Г”/“ОЖМ + Г”) (^c) и с обработкой ТП03 и ХГЧ (“К + ТП”/“К + Г”, “ОЖ + ТП”/“ОЖ + Г”, “ОЖМ + ТП”/“ОЖМ + Г”) (^d) статистически значимы при $p < 0.05$. Различия между группами с лечением и без лечения МФ (“ОЖ + ТП”/“ОЖМ + ТП”, “ОЖ + Г”/“ОЖМ + Г”) ни в одном случае не были значимыми ($p > 0.05$). Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$.

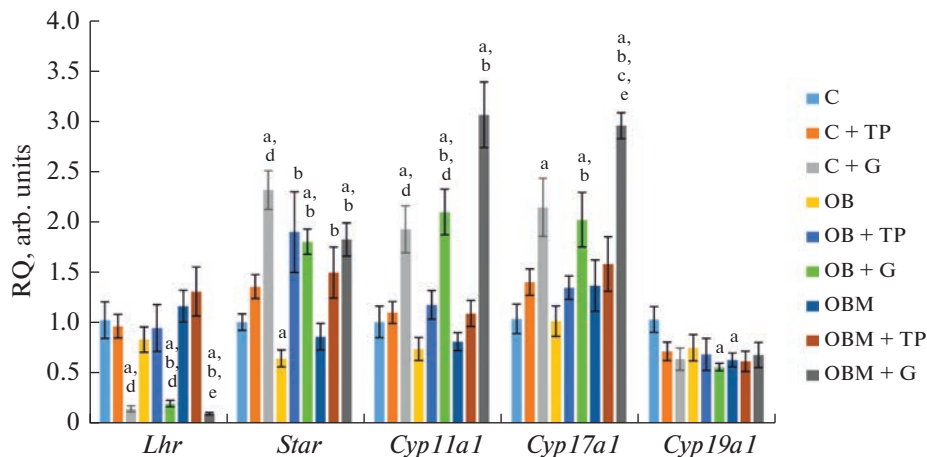


Рис. 3. Экспрессия генов, кодирующих ЛГР и стероидогенные белки, в семенниках крыс с ожирением, в том числе леченных метформином, после введения им ТПОЗ и ХГЧ, в сравнении с контрольной группой. Обозначения групп как на рис. 1. Различия по сравнению с группами “К” (^a) и “ОЖ” (^b) статистически значимы при $p < 0.05$; различия между группами “К + Г” и “ОЖМ + Г” (^c), между группами с обработкой ТПОЗ и ХГЧ (“К + ТП”/“К + Г”; “ОЖ + ТП”/“ОЖ + Г”; “ОЖМ + ТП”/“ОЖМ + Г”) (^d) или между группами с лечением и без лечения МФ (“ОЖ + ТП”/“ОЖМ + ТП”; “ОЖ + Г”/“ОЖМ + Г”) (^e) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$.

мым ТПОЗ повышал экспрессию гена *Star*, но слабо влиял на экспрессию генов, кодирующих ЛГР и другие стероидогенные белки. В то же время ХГЧ значительно (на 80–89%) подавлял экспрессию гена *Lhr*, но усиливал экспрессию генов стероидогенных белков, причем величина его эффекта у крыс с ожирением, в том числе леченных МФ, не уступала таковой в контроле, и эти данные согласуются со стероидогенными эффектами ЛГР-агонистов.

На заключительном этапе исследовали экспрессию гипофизарных генов, кодирующих рецептор гонадолиберина, через который этот релизинг-фактор осуществляет стимуляцию секреции и экспрессии гонадотропинов в гонадотрофах, а также β -субъединиц ЛГ и ФСГ, которые определяют специфичность гетеродимерных гонадотропинов, поскольку их α -субъединицы по первичной структуре идентичны. При ожирении и лечении крыс с ожирением МФ экспрессия изученных гипофизарных генов существенно не менялась по сравнению с контролем, но обработка МФ значимо снижала экспрессию гена *Gnrhr* в сравнении с группой ОЖ (рис. 4). ТПОЗ и ХГЧ снижали экспрессию генов *Gnrhr* и *LHbeta*, причем в случае гена *LHbeta* различия между контролем и группами “К + ТП” и “К + Г” были значимыми. В свою очередь, ингибирование экспрессии гена *FSHbeta* было показано только в случае воздействия ХГЧ на группы “К + Г” и “ОЖ + Г” (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У мужчин патологическое ожирение и другие метаболические расстройства, обусловленные нарушениями углеводного и липидного обмена, нарушенной толерантностью к глюкозе и инсулиновой резистентностью, ассоциированы с андрогенным дефицитом и репродуктивными дисфункциями, что требует разработки эффективных подходов для нормализации продукции тестостерона и восстановления репродуктивного потенциала [1–7]. Такие подходы могут быть использованы

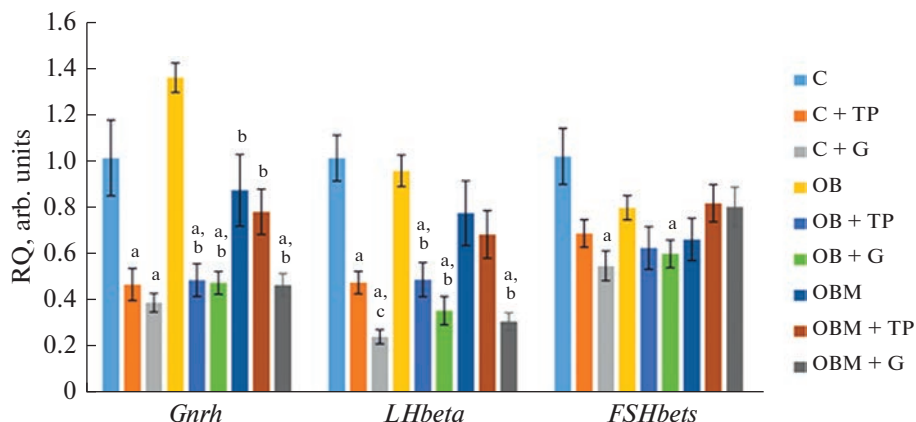


Рис. 4. Экспрессия генов гонадотропинов и рецептора гонадолиберина в гипоталамусе самцов крыс с ожирением, в том числе леченных метформином, после введения им ТПО3 и ХГЧ, в сравнении с таковой в контрольной группе животных.

Обозначения групп как на рис. 1. Различия по сравнению с группами “К” (^a) и “ОЖ” (^b) статистически значимы при $p < 0.05$; различия между группами “К + ТП” и “К + Г” (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, во всех группах $n = 6$.

превентивно, на ранних стадиях нарушений метаболического и гормонального статуса, для предотвращения тяжелых форм ожирения, метаболического синдрома и СД2, поскольку андрогенная недостаточность может быть не только следствием, но и триггером этих эндокринных расстройств [3, 8, 28]. В экспериментальных условиях для изучения нарушений тестикулярной функции при ожирении и поиска путей их восстановления наиболее подходящей является модель ДИО у грызунов, в том числе у крыс. Самцы крыс с ДИО имеют сниженный уровень тестостерона и нарушенный сперматогенез [3, 8, 29]. Эти данные в целом согласуются с нашими результатами, полученными на модели ожирения у самцов крыс, вызванного длительной (23 нед.) диетой, обогащенной насыщенными животными жирами. Нами продемонстрировано снижение у крыс с ожирением базового уровня тестостерона в крови и экспрессии белка StAR, катализирующего первую, скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза в семенниках, а также показано значимое ослабление стероидогенного эффекта ХГЧ при его однократном введении животным. В то же время в семенниках крыс с ожирением нами не было показано значимого изменения экспрессии генов, кодирующих ключевые стероидогенные ферменты — цитохромы CYP11A1 и CYP17A1 и фермент ароматазу (CYP19A1), осуществляющую конверсию андрогенов в эстрогены. Другие авторы на основе анализа транскриптома в семенниках андроген-дефицитных крыс Wistar с ожирением, индуцированным восьминедельной высокожировой диетой, показали повышение экспрессии гена ароматазы, результатом чего было снижение соотношения тестостерон/эстрадиол в семенниках и ухудшение сперматогенеза [30]. В этой связи следует отметить, что продолжительность ожирения, как и особенности диеты, существенно влияют на выраженность изменений андрогенного статуса и на паттерн экспрессии компонентов системы тестикулярного стероидогенеза. В нашем случае продолжительность диеты составила 23 нед., вследствие чего, как мы полагаем, длительное, хотя и умеренное снижение продукции тестостерона могло компенсаторно снизить экспрессию гена ароматазы, которая стимулируется повышенным уровнем андрогенов. Отсутствие повышения экспрессии гена ароматазы было показан-

но нами ранее в семенниках самцов крыс с моделью СД2 с ожирением, причем среди других генов тестикулярного стероидогенеза только экспрессия гена *Star* имела тенденцию к снижению, в то время как экспрессия генов, кодирующих цитохром CYP11A1 и дегидрогеназы HSD3b и HSD17b, не менялась, а экспрессия гена *Cyp17a1* была повышена [21]. Необходимо отметить, что при потреблении самцами крыс Sprague Dawley диеты с высоким содержанием холестерина, приводящей к сильно выраженной гиперхолестеринемии, в семенниках снижалась экспрессия не только гена *Star*, как в нашем случае, но и генов обоих цитохромов, CYP11A1 и CYP17A1 [31, 32], что указывает на зависимость изменений в системе тестикулярного стероидогенеза от природы и степени нарушений липидного метаболизма, в том числе уровня холестерина, предшественника тестостерона и других стероидных гормонов.

Ослабление стероидогенной функции было ассоциировано с такими метаболическими и гормональными нарушениями, как повышение массы тела и жировой ткани, нарушенная толерантность к глюкозе, инсулиновая и лептиновая резистентность, дислипидемия, которые в настоящее время рассматриваются как основные патогенетические факторы репродуктивных расстройств при ожирении, метаболическом синдроме и СД2 с ожирением [2, 29, 33, 34]. Одним из подходов для улучшения метаболического статуса при СД2 и метаболическом синдроме является длительная терапия МФ. При этом имеются сведения о том, что МФ способен также нормализовать репродуктивные функции, хотя не все авторы это подтверждают [23–26]. Нами и другими авторами ранее было показано, что обработка МФ грызунов с различными формами диабета восстанавливает продукцию тестостерона и нормализует сперматогенез [21, 33–38]. В настоящем исследовании нами установлено, что, наряду с нормализацией ряда метаболических и гормональных показателей, МФ восстанавливает базовый уровень тестостерона у самцов крыс с ожирением, но при этом существенно не влияет на экспрессию стероидогенных генов и на стероидогенные эффекты ХГЧ и аллостерического ЛГР-агониста ТП03. В этой связи необходимо отметить, что, как ранее было показано, терапия МФ повышала стероидогенный эффект ХГЧ и ТП03 при их однократном введении самцам крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотцина, у которых выраженность метаболических расстройств превосходила таковую у крыс с ожирением [21]. Можно полагать, что эффективность МФ терапии в отношении чувствительности системы тестикулярного стероидогенеза к стимулирующему действию ЛГР-агонистов зависит от тяжести метаболического расстройства и выявляется в условиях более выраженных метаболических и гормональных нарушений [24]. Большое значение может играть и стратегия применения МФ, включая дозу препарата и продолжительность терапии [24, 38].

Интересен тот факт, что уровень экспрессии гена рецептора гонадолиберина в гипофизе группы “ОЖМ” значимо снижался в сравнении с группой “ОЖ”, что может быть обусловлено повышением продукции гонадолиберина при обработке крыс МФ и компенсаторным снижением рецептора компонента гонадолиберин-компетентной системы в гонадотрофах. Так, известно, что МФ, подобно лептину, активирует проопиомеланокортин-экспрессирующие нейроны, вовлеченные в позитивную регуляцию синтеза и секреции гонадолиберина, и, напротив, ингибирует нейроны, экспрессирующие нейропептид Y и агути-подобный пептид, которые негативно влияют на высвобождение гонадолиберина [39–42]. Обработка ХГЧ существенно подавляла экспрессию генов, кодирующих рецептор гонадолиберина и β -субъединицы ЛГ и ФСГ в гонадотрофах, что обусловлено запуском отрицательных обратных связей, в том числе вследствие повышения уровня тестостерона в крови. В то же время ТП03, для которого был характерен сравнительно мягкий стероидогенный эффект, в меньшей степени влиял на экспрессию генов *LHbeta* и

FSHbeta, хотя и значимо снижал экспрессию гена рецептора гонадолиберина. Сравнительно давно ряд авторов, исследуя самцов крыс различного возраста, показали, что их обработка с помощью ХГЧ приводила к снижению экспрессии гена *LHbeta* в гипофизе и к значительному снижению уровня эндогенного ЛГ в крови, причем этот эффект зависел от дозы гонадотропина и степени повышения продукции андрогенов [43, 44].

В настоящем исследовании в семенниках всех изученных групп крыс с обработкой ХГЧ нами показано значительное подавление экспрессии гена, кодирующего ЛГР, что может быть обусловлено запуском даун-регуляции ЛГР при их длительной стимуляции экзогенными гонадотропинами с ЛГ-активностью [21, 44]. При этом ТПОЗ, как и другие ранее изученные нами аллостерические ЛГР-агонисты, слабо влияет на экспрессию ЛГР [20, 21]. Это может быть обусловлено их более высокой селективностью в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, поскольку мишенями ТПОЗ и его аналогов являются в основном цАМФ-зависимые сигнальные пути (ЛГР/ G_s -белок/аденилатциклаза/протеинкиназа А) [45, 46], в то время как другие пути, включая β -аррестиновые, ответственные за эндоцитоз и деградацию лиганд-активированных ЛГР, активируются аллостерическими ЛГР-агонистами в существенно меньшей степени [46, 47].

Таким образом, впервые показано, что ТПОЗ, аллостерический агонист ЛГР на основе тиено[2,3-*d*]-пиримидина, демонстрирует умеренно выраженный стимулирующий эффект на тестикулярный стероидогенез у самцов крыс с ДИО, не оказывая ингибирующего влияния на экспрессию гена ЛГР в семенниках и умеренно снижая экспрессию гена ЛГ в аденогипофизе. Если при однократном введении ТПОЗ ДИО-крысам его стероидогенный эффект сопоставим с таковым в контрольной группе, то при длительном (5 дней) введении он существенно ему уступает. Стероидогенный эффект ХГЧ при его однократном введении крысам с ожирением значимо ниже, чем таковой в контроле, но сопоставим с ним при длительном введении гонадотропина, и существенно превосходит стероидогенные эффекты ТПОЗ. В отличие от ТПОЗ, ХГЧ значительно снижает экспрессию ЛГР в семенниках и в большей степени ингибирует экспрессию гена ЛГ в гонадотрофах, что указывает на отчетливо выраженную активацию отрицательных обратных связей в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси при обработке животных ХГЧ. Длительная МФ терапия частично восстанавливает андрогенный статус, при этом существенно не влияя на экспрессию генов стероидогенеза в семенниках. В условиях МФ терапии стероидогенные эффекты обоих изученных ЛГР-агонистов не повышаются, что указывает на отсутствие потенцирующего влияния на них длительной МФ обработки. Полученные результаты указывают на перспективы применения аллостерических и ортостерических ЛГР-агонистов для стимуляции тестикулярного стероидогенеза и на эффективность длительной МФ терапии для нормализации продукции тестостерона при ДИО, что может быть транслировано в клинику для коррекции репродуктивных расстройств, ассоциированных с ожирением и метаболическим синдромом. При этом совместное применение МФ и ЛГР-агонистов при ДИО представляется нецелесообразным, в отличие от СД2 с ожирением и характерными для него более тяжелыми метаболическими и гормональными нарушениями.

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 эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол заседания № 2-4/2022 от 24.02.2022 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dandona P, Dhindsa S, Chaudhuri A, Bhatia V, Topiwala S, Mohanty P* (2008) Hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Curr Mol Med* 8: 816–828.
<https://doi.org/10.2174/156652408786733658>
2. *Fernandez CJ, Chacko EC, Pappachan JM* (2019) Male Obesity-related Secondary Hypogonadism – Pathophysiology, Clinical Implications and Management. *Eur Endocrinol* 15: 83–90.
<https://doi.org/10.17925/EE.2019.15.2.83>
3. *Hermoso DAM, Bizerra PFV, Constantin RP, Ishii-Iwamoto EL, Gilgioni EH* (2020) Association between metabolic syndrome, hepatic steatosis, and testosterone deficiency: evidences from studies with men and rodents. *Aging Male* 23: 1296–1315.
<https://doi.org/10.1080/13685538.2020.1764927>
4. *Louters M, Pearlman M, Solsrud E, Pearlman A* (2022) Functional hypogonadism among patients with obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Int J Impot Res* 34: 714–720.
<https://doi.org/10.1038/s41443-021-00496-7>
5. *Van Cauwenberghe J, De Block C, Vanderschueren D, Antonio L* (2023) Effects of treatment for diabetes mellitus on testosterone concentrations: A systematic review. *Andrology* 11: 225–233.
<https://doi.org/10.1111/andr.13318>
6. *Wagner IV, Oliver E, Dötsch J, Söder O* (2020) Adverse effects of metabolic disorders in childhood on adult reproductive function and fertility in the male. *J Pediatr Endocrinol Metab* 34: 13–23.
<https://doi.org/10.1515/jpem-2020-0276>
7. *Gualtieri P, Tarsitano MG, DE Santis GL, Romano L, Esposito E, DE Lorenzo A* (2022) Obesity in childhood: how to improve male adolescence incoming. *Minerva Endocrinol (Torino)* 47: 358–370.
<https://doi.org/10.23736/S2724-6507.21.03224-7>
8. *Baik M, Jeong JY, Park SJ, Yoo SP, Lee JO, Lee JS, Haque MN, Lee HJ* (2020) Testosterone deficiency caused by castration increases adiposity in male rats in a tissue-specific and diet-dependent manner. *Genes Nutr* 15: 14.
<https://doi.org/10.1186/s12263-020-00673-1>
9. *Zhang Y, Qi J, Zhao J, Li M, Zhang Y, Hu H, Wei L, Zhou K, Qin H, Qu P, Cao W, Liu E* (2023) Effect of Dietetic Obesity on Testicular Transcriptome in Cynomolgus Monkeys. *Genes (Basel)* 14: 557.
<https://doi.org/10.3390/genes14030557>
10. *Sánchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, García-Galiano D, Castaño JP, Luque RM, Romero-Ruiz A, Castellano JM, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M* (2014) Obesity-induced hypogonadism in the male: premature reproductive neuroendocrine senescence and contribution of Kiss1-mediated mechanisms. *Endocrinology* 155: 1067–1079.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1584>
11. *Fink J, Matsumoto M, Tamura Y* (2018) Potential application of testosterone replacement therapy as treatment for obesity and type 2 diabetes in men. *Steroids* 38: 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.08.002>
12. *Giagulli VA, Castellana M, Carbone MD, Pelusi C, Ramunni MI, De Pergola G, Guastamacchia E, Trigiani V* (2020) Weight loss more than glycemic control may improve testosterone in obese type 2 diabetes mellitus men with hypogonadism. *Andrology* 8: 654–662.
<https://doi.org/10.1111/andr.12754>
13. *Mongioi LM, Cimino L, Condorelli RA, Magagnini MC, Barbagallo F, Cannarella R, La Vignera S, Calogero AE* (2020) Effectiveness of a Very Low-Calorie Ketogenic Diet on Testicular Function in

- Overweight/Obese Men. *Nutrients* 12: 2967
<https://doi.org/10.3390/nu12102967>
14. *Caliber M, Saad F* (2021) Testosterone therapy for prevention and reversal of type 2 diabetes in men with low testosterone. *Curr Opin Pharmacol* 58: 83–89.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.04.002>
 15. *Jedamzik J, Bichler C, Felsenreich DM, Brugger J, Eichelter J, Nixdorf L, Krebs M, Itariu B, Langer FB, Prager G* (2022) The male patient with obesity undergoing metabolic and bariatric surgery: changes in testosterone levels correlate with weight loss after one-anastomosis gastric bypass and Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 30: S1550–7289(22)00830–00839.
<https://doi.org/10.1016/j.soard.2022.12.034>
 16. *Fernández-Balsells MM, Murad MH, Lane M, Lampropulos JF, Albuquerque F, Mullan RJ, Agrwal N, Elamin MB, Gallegos-Orozco JF, Wang AT, Erwin PJ, Bhasin S, Montori VM* (2010) Clinical review 1: Adverse effects of testosterone therapy in adult men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2560–2575.
<https://doi.org/10.1210/jc.2009-2575>
 17. *Ohlander SJ, Varghese B, Pastuszak AW* (2018) Erythrocytosis Following Testosterone Therapy. *Sex Med Rev* 6: 77–85.
<https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.04.001>
 18. *Bond P, Smit DL, de Ronde W* (2022) Anabolic-androgenic steroids: How do they work and what are the risks? *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1059473.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1059473>
 19. *Derkach KV, Dar'in DV, Lobanov PS, Shpakov AO* (2014) Intratesticular, intraperitoneal, and oral administration of thienopyrimidine derivatives increases the testosterone level in male rats. *Dokl Biol Sci* 459: 326–329.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614060040>
 20. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IY, Stepochkina AM, Shpakov AO* (2020) Comparative study of the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin and thieno[2,3-d]-pyrimidine-based allosteric agonist of luteinizing hormone receptor in young adult, aging and diabetic male rats. *Int J Mol Sci* 21: 7493.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
 21. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2021) The effects of separate and combined treatment of male rats with type 2 diabetes with metformin and orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor on steroidogenesis and spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23: 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
 22. *Shpakov AO* (2023) Allosteric Regulation of G-Protein-Coupled Receptors: From Diversity of Molecular Mechanisms to Multiple Allosteric Sites and Their Ligands. *Int J Mol Sci* 24: 6187.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076187>
 23. *Faure M, Bertoldo MJ, Khoeiry R, Bongrani A, Brion F, Giulivi C, Dupont J, Froment P* (2018) Metformin in Reproductive Biology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 675.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00675>
 24. *Shpakov AO* (2021) Improvement Effect of Metformin on Female and Male Reproduction in Endocrine Pathologies and Its Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 14: 42.
<https://doi.org/10.3390/ph14010042>
 25. *Fernández-García JC, Barrios-Rodríguez R, Asenjo-Plaza M, Ramos-Molina B, Molina-Vega M, Guzmán-Guzmán A, Moreno-León L, Yubero-Serrano EM, Rius-Díaz F, Valdés S, Martínez-González MA, Jiménez-Moleón JJ, Tinahones FJ* (2022) Metformin, testosterone, or both in men with obesity and low testosterone: A double-blind, parallel-group, randomized controlled trial. *Metabolism* 136: 155290.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155290>
 26. *Tseng CH* (2022) The Effect of Metformin on Male Reproductive Function and Prostate: An Updated Review. *World J Mens Health* 40: 11–29.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.210001>
 27. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochem Res* 43: 821–837.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
 28. *Song MJ, Choi JY* (2022) Androgen dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease: Role of sex hormone binding globulin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1053709.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1053709>
 29. *Hsia SM, Chiang YF, Chen HY, Ali M, Wang PS, Wang KL* (2022) Effect of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome on the Pituitary-Gonadal Axis in Male Rats. *Biomedicines* 10: 3009.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10123009>
 30. *El-Shehawi AM, El-Shazly S, Ahmed M, Alkafafy M, Sayed S, Farouk S, Alotaibi SS, Elseehy MM* (2020) Transcriptome Analysis of Testis from HFD-Induced Obese Rats (*Rattus norvegicus*)

- Indicated Predisposition for Male Infertility. *Int J Mol Sci* 21: 6493.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186493>
31. Yu C, Jiang F, Zhang M, Luo D, Shao S, Zhao J, Gao L, Zuo C, Guan Q (2019) HC diet inhibited testosterone synthesis by activating endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells. *J Cell Mol Med* 23: 3140–3150.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14143>
 32. Suleiman JB, Nna VU, Othman ZA, Zakaria Z, Bakar ABA, Mohamed M (2020) Orlistat attenuates obesity-induced decline in steroidogenesis and spermatogenesis by up-regulating steroidogenic genes. *Andrology* 8: 1471–1485.
<https://doi.org/10.1111/andr.12824>
 33. Barbagallo F, Condorelli RA, Mongioi LM, Cannarella R, Cimino L, Magagnini MC, Crafa A, La Vignera S, Calogero AE (2021) Molecular Mechanisms Underlying the Relationship between Obesity and Male Infertility. *Metabolites* 11: 840.
<https://doi.org/10.3390/metabo11120840>
 34. Hasan H, Bhushan S, Fijak M, Meinhardt A (2022) Mechanism of Inflammatory Associated Impairment of Sperm Function, Spermatogenesis and Steroidogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 897029.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.897029>
 35. Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M (2019) Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. *Andrology* 7: 110–123.
<https://doi.org/10.1111/andr.12567>
 36. Derkach KV, Bakhtyukov AA, Romanova IV, Zorina II, Bayunova LV, Bondareva VM, Yu Morina I, Kumar Roy V, Shpakov AO (2020) The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. *Andrologia* 52: e13816.
<https://doi.org/10.1111/and.13816>
 37. Derkach KV, Bakhtyukov AA, Morina IY, Romanova IV, Bayunova LV, Shpakov AO (2022) Comparative Study of the Restoring Effect of Metformin, Gonadotropin, and Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor on Spermatogenesis in Male Rats with Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 172: 435–440.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05409-2>
 38. Naghibi M, Tayefi Nasrabadi H, Soleimani Rad J, Gholami Farashah MS, Mohammadnejad D (2022) The effects of metformin and forskolin on sperm quality parameters and sexual hormones in type II diabetic male rats. *Andrologia* 54: 1605–1617.
<https://doi.org/10.1111/and.14426>
 39. Chau-Van C, Gamba M, Salvi R, Gaillard RC, Pralong FP (2007) Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 148: 507–511.
<https://doi.org/10.1210/en.2006-1237>
 40. Lee CK, Choi YJ, Park SY, Kim JY, Won KC, Kim YW (2012) Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats. *Diabetes Metab J* 36: 293–299.
<https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.4.293>
 41. Lv WS, Wen JP, Li L, Sun RX, Wang J, Xian YX, Cao CX, Wang YL, Gao YY (2012) The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats. *Brain Res* 1444: 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.01.028>
 42. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
 43. Huhtaniemi IT, Warren DW, Catt KJ (1985) Regulation of infant and developing rat testicular gonadotropin and prolactin receptors and steroidogenesis by treatments with human chorionic gonadotropin, gonadotropin-releasing hormone analogs, bromocriptine, prolactin, and estrogen. *Biol Reprod* 32: 721–732.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod32.4.721>
 44. Pakarinen P, Niemimaa T, Huhtaniemi IT, Warren DW (1994) Transcriptional and translational regulation of LH, prolactin and their testicular receptors by hCG and bromocriptine treatments in adult and neonatal rats. *Mol Cell Endocrinol* 101: 37–47.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90217-8)
 45. Shpakov AO, Dar'in DV, Derkach KV, Lobanov PS (2014) The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenyl cyclase systems in the rat testes. *Dokl Biochem Biophys* 456: 104–107.
<https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
 46. Derkach KV, Legkoduikh AS, Dar'in DV, Shpakov AO (2017) The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on tes-

- tosterone production in male rats. *Cell Tissue Biol* 11: 73–80.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17010035>
47. van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378: 503–514.
<https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>

Steroidogenic Effect of Luteinizing Hormone Receptor Agonists and Metformin in Male Rats with Androgenic Deficiency Caused by Diet-Induced Obesity

**A. A. Bakhtyukov^a, K. V. Derkach^{a, *}, I. A. Lebedev^a,
V. N. Sorokoumov^{a, b}, and A. O. Shpakov^a**

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

^b*Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: derkach_k@list.ru

In obese men, along with metabolic disorders and insulin resistance, testosterone levels are decreased and reproductive system functions are impaired. One of the ways to correct them may be the use of agonists of luteinizing hormone receptor (LHR) and antidiabetic drugs, but the mechanisms of their effect on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis have not been studied enough. The aim of the work was to study the effects of long-term MF therapy (5 weeks, 120 mg/kg) and five-day treatment with LHR agonists, such as human chorionic gonadotropin (hCG, 20 IU/rat/day, s.c.) and allosteric agonist TP03 (15 mg/kg/day, i.p.), on the blood testosterone levels and the expression of testicular and pituitary genes in male rats with long-term diet-induced obesity (DIO). TP03 moderately stimulated testosterone production in male rats with DIO without having an inhibitory effect on LHR expression in the testes and only weakly reducing the expression of the LH β -subunit gene in the pituitary gland. After a single administration into DIO-rats, the steroidogenic effect of TP03 was comparable to that in the control group, but after a five-day administration, it was significantly inferior to it. In DIO-rats, the steroidogenic effect of hCG after a single administration was lower than that in the control, but comparable to that after a five-day administration of hCG, and significantly exceeded the corresponding effects of TP03. Unlike TP03, hCG significantly reduced LHR expression in the testes and more pronouncedly inhibited LH expression in the pituitary gland. MF treatment restored the androgenic status without significantly affecting the expression of steroidogenesis genes in the testes. There was no increase in the steroidogenic effects of both LHR agonists in the MF-treated groups. The results obtained indicate the prospects for the use of TP03 and hCG to stimulate testicular steroidogenesis and the effectiveness of MF therapy to normalize testosterone production in DIO, which can be used to correct reproductive disorders in obesity. At the same time, in DIO, the combined use of MF and LHR agonists seems to be inappropriate.

Keywords: gonadotropin, allosteric agonist, luteinizing hormone receptor, metformin, obesity, androgen deficiency, testes

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ СПОНТАННОЙ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ
НА РАЗВИТИЕ АТРОФИИ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ В УСЛОВИЯХ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ**

© 2023 г. К. В. Сергеева¹, *, К. А. Шарло¹, В. Е. Калашников¹, О. В. Туртикова¹,
С. А. Тыганов¹, Б. С. Шенкман¹

¹*Институт Медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 27.07.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 04.09.2023 г.

Хорошо известно, что бездействие скелетных мышц млекопитающих приводит к прекращению их электрической активности и сопровождается атрофическими изменениями мышечных волокон. Однако неоднократно отмечалось, что начиная с 3-х суток функциональной разгрузки появляется спонтанная ритмическая нервно-мышечная активность, являющаяся результатом снижения экспрессии калий-хлоридного котранспортера KCC-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга. Снижение экспрессии KCC-2 и возникновение автономной электрической активности мышцы в условиях разгрузки может быть предотвращено введением нейролептика прохлорперазина. Таким образом, целью настоящего исследования было оценить структурные и сигнальные эффекты снижения спонтанной активности разгруженной камбаловидной мышцы крыс. Обнаружено, что ежедневное введение крысам прохлорперазина на фоне 7-суточного антиортостатического вывешивания предотвратило снижение содержания основных маркеров биогенеза рибосом (с-Мус, 18S рРНК и 28S рРНК), а также частично предотвратило уменьшение площади поперечного сечения быстрых и медленных мышечных волокон в камбаловидной мышце. Морфофункциональные изменения, вызванные снижением спонтанной активности разгруженной мышцы, сопровождались полным или частичным предотвращением активации экспрессии ключевых маркеров протеолитических систем (MuRF-1, MAFbx/atrogen-1, убиквитин). Таким образом, мы предполагаем, что именно спонтанная нервно-мышечная активность может являться фактором, углубляющим атрофические процессы в течение первой недели функциональной разгрузки.

Ключевые слова: скелетная мышца, гравитационная разгрузка, прохлорперазин, спонтанная активность, распад белка, убиквитинлигазы

DOI: 10.31857/S0869813923100102, **EDN:** XRLLUW

ВВЕДЕНИЕ

Камбаловидная мышца (*m. soleus*) млекопитающих демонстрирует электрическую активность (ЭМГ) в течение 11–16 ч в сутки [1]. Однако если устраняется опора задних конечностей, то активность этой мышцы резко снижается или полностью прекращается [2, 3]. Этот эффект наблюдается при невесомости, создаваемой в ходе полета по параболе Кепплера, или при отрыве задних ног от субстрата в модели вывешивания задних конечностей [4]. При использовании этой модели

электрическое и, очевидно, механическое “молчание” мышцы наблюдается в течение 2–3 сут [3]. Однако в дальнейшем применение в отношении камбаловидной мышцы термина “бездействие” (disuse) становится затруднительным. При регистрации ЭМГ начинают спонтанно появляться электрические сигналы, свидетельствующие о появлении и постепенном увеличении мышечной активности [2, 5, 6]. Эта электрическая активность, которую можно было бы назвать спонтанной нервно-мышечной активностью, непрерывно регистрируется и постепенно возрастает, достигая значений амплитуды, близких к контрольным к 14 суткам вывешивания. До сих пор остается неизвестным, какие изменения в процессе развития гипогравитационной атрофии, атонии и фенотипической трансформации, характерных для функциональной разгрузки, вносит спонтанная активность постуральной мышцы. В последнее время стало известно, что при гравитационной разгрузке, как и в экспериментальных моделях спинальной травмы, спонтанная активность является следствием снижения содержания калий-хлоридного котранспортера KCC2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга, приводящего к повышенной возбудимости спинальных мотонейронов [7–9]. Оказалось, что применение нейролептика прохлорперазина (PCPZ) позволяет предотвратить снижение уровня KCC-2 и тем самым снизить спонтанную электрическую активность постуральной мышцы. Таким образом, при использовании фармакологической коррекции, снизив интенсивность спонтанной электрической активности мышцы, можно оценить молекулярные последствия этой активности.

Целью настоящего исследования было оценить развитие структурной атрофии и сигнальные эффекты при редукции спонтанной активности разгруженной камбаловидной мышцы крысы с тем, чтобы выявить сигнальные последствия такой активности, наблюдаемой в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. В экспериментах использовали самцов крыс Вистар в возрасте 1.5–2 мес. и массой тела 180–200 г. Температуру в помещении вивария поддерживали на уровне 24°C и влажности 50% при 12/12-часовом цикле свет/темнота. Все крысы имели доступ к стандартной диете и воде. Эвтаназия животных проводилась посредством внутрибрюшинного введения 10%-ного раствора авертина (10 мл/кг). Крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой: группа виварного контроля (С); группа, подвергнутая разгрузке задних конечностей на протяжении 7 дней (HS); группа разгрузки, совмещенная с введением прохлорперазина (HS + PCPZ). Дималеатную соль прохлорперазина (#P9178; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) вводили два раза в день (каждая инъекция содержала 5 мг/кг в физиологическом растворе + 0.1% ДМСО). Применяемая доза рассчитывалась, исходя из эквивалента человеческой терапевтической дозы (112 мг/кг) [10]. Крысы из группы HS получали эквивалентный объем физиологического раствора + 0.1% ДМСО без прохлорперазина.

Механическая разгрузка производилась с использованием стандартной модели вывешивания задних конечностей (HS, hindlimb suspension) [4]. Вкратце, полоска клейкой ленты была прикреплена к хвосту животного, которое вывешивалось, пропуская ленту через шарнирный механизм, прикрепленный к металлической планке наверху клетки. Это позволяло передним конечностям животных касаться пола решетки и перемещаться по клетке для свободного доступа к пище и воде. Высота подвешивания регулировалась таким образом, чтобы задние конечности не касались какой-либо опорной поверхности.

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Белок	Последовательность праймеров
<i>MYC</i>	c-Myc	5'-TTGATGGGGATGACCCCTGAC-3' 5'-CTCGCCCAATCCTGTACCT-3'
<i>TRIM63</i>	MuRF-1	5'-GCCAATTTGGTGCTTTTGT-3' 5'-AAATTCAGTCCTCTCCCCGT-3'
<i>FBXO32</i>	MAFbx	5'-CTACGATGTTGCAGCCAAGA-3' 5'-GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'
<i>UBB</i>	Ubiquitin	5'-CACCAAGAAGGTCAAACAGGA-3' 5'-GCAAGAAGCTTTATTCAAAGTGCAA-3'
<i>RPL19</i>		5'-GTACCCCTTCCTCTTCCCTATGC-3' 5'-CAATGCCAACTCTCGTCAACAG-3'

фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы “Синтол” (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17.4 мкМ олиго-d(T)15, 1.3 мМ дНТФ, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл М-MLV-ревертазы, 5×-буфер для М-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, “Bio-Rad Laboratories”, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0.3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (pH 8.8), 0.06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, “Синтол”). В качестве референсного гена с помощью базы EST Database был выбран ген *rpl19*. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы. Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (“Santa Cruz”, США). При этом дополнительно использовались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (“Santa Cruz”, США), 10 мкг/мл аprotинина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл лейпептина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл пепстатина (“SIGMA”, США), “complete Mini Protease Inhibitor Cocktail” (Roche, Швейцария) 20 мкл, фосфоингибиторный коктейль (Santa Cruz, США) 40 мкл.

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β-меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы каждой группы загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную (НЦ) мембрану при 100 В и силе тока 150–250 мА при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в TBST (TBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре или блокирующем буфере EveryBlot. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: фосфорилированной (Thr180/Tyr182) p38 (“GeneTex”, GTX59567, 1 : 500, США), тотальной p38 (“Cell signalling”, #9212, 1 : 500, США), фосфорилированной (Ser9) GSK3β (“Cell signalling”, #9323, 1 : 1000, США), тотальной GSK3β (“Cell signalling”, #9315, 1 : 1000, США), фосфорилированной

(Ser641) GS (“Cell signalling”, #3891, 1 : 1000, США), тотальной GS (“Cell signalling”, #3893, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Thr183/Tyr185) JNK1/2 (“Thermo Fisher Scientific”, 44-682G, 1 : 1000, США), тотальной JNK1/2 (“Sigma-Aldrich”, SAB4200176, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Thr389) p70S6K (“Santa Cruz”, sc-11759, 1 : 2000, США), тотальной p70S6K (“Cell signaling”, #9202, 1 : 1000, США). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Jackson Immuno Research”, Великобритания) в разведении 1 : 25000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Иммунореактивные полосы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США) и количественно оценивали с помощью программного обеспечения Image Studio C-DiGit.

Анализ содержания рибосомальной РНК. Образцы РНК разводили в 2× денатурирующем буфере loading dye (Thermo fisher, США), после чего наносили на 1.2%-ный агарозный гель с добавлением бромистого этидия. Объем нанесения рассчитывали исходя из объема мышечной ткани, из которой был выделен образец РНК. Электрофорез проводился при напряжении 5 В на см длины между электродами в буфере TBE. Содержание РНК оценивали с помощью оптической плотности полос на геле, проанализированных на сканере Gel Doc (Bio-Rad, США).

Анализ площади поперечного сечения волокон. С помощью микротомы Leica CM1900 изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при –20°C. Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против тяжелых цепей миозина быстрого или медленного типов (МНСI и МНСII, Sigma, США) 1 : 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение часа (или при 4°C на ночь). Затем антитела отмывали в PBS 3 × 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением ×200. Анализ изображений проводился с помощью программы ImageJ. Измеряли площадь поперечного сечения по крайней мере 100 волокон, подсчитывали число волокон медленного и быстрого типов и их количественное соотношение.

Статистическая обработка данных. Все значения представлены как средние ± σ для восьми животных. Для проверки различий между группами, учитывая небольшой размер выборки, был использован непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим *post-hoc* анализом Данна. Значение *p* менее 0.05 расценивали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После 7 сут вывешивания мы не наблюдали значимой разницы в массе тела животных среди экспериментальных групп (табл. 2). Масса камбаловидной мышцы статистически значимо снижалась на 28 и 15% в группах HS и HS + PCPZ относительно группы контроля (табл. 2).

Площадь поперечного сечения (ППС) быстрых волокон снижалась в группах HS и HS + PCPZ на 44 и 34% соответственно. Схожим образом снижалась ППС медленных волокон на 38 и 20%. При этом мы наблюдали значимую разницу между двумя группами с вывешиванием задних конечностей (рис. 1).

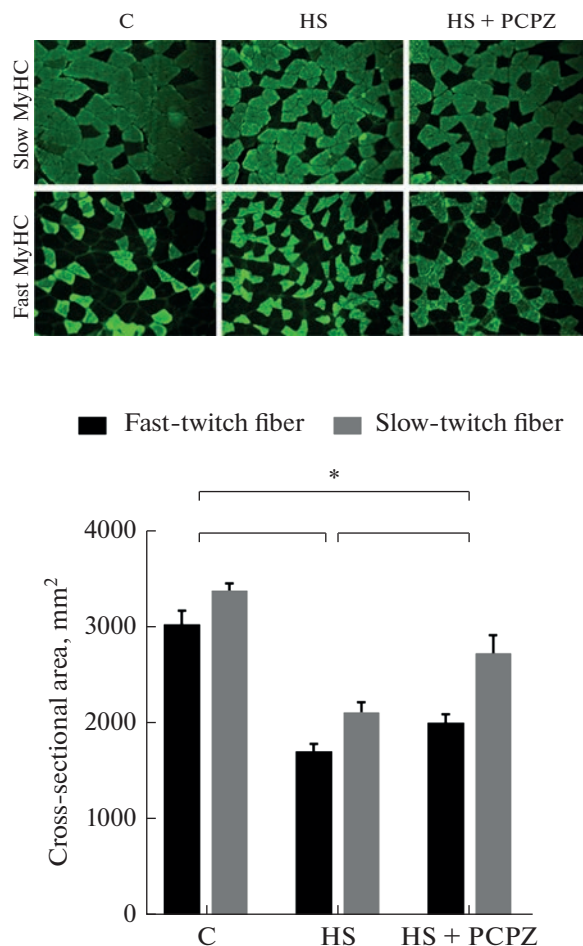


Рис. 1. Площадь поперечного сечения (cross-sectional area) быстрых (fast-twitch) и медленных (slow-twitch) волокон *m. soleus*. С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$. MyHC (myosin heavy chain) – тяжелые цепи миозина.

Статус фосфорилирования p70S6K – ключевого субстрата протеинкиназы mTORc1 – не имел различий между тремя исследуемыми группами (рис. 2).

Функциональная разгрузка привела к снижению содержания ключевых рибосомальных РНК (18S и 28S рРНК) в *m. soleus* крысы в группе 7-суточного вывешива-

Таблица 2. Масса тела животных и масса *m. soleus*

	С	HS	HS + PCPZ
Масса тела крыс, г	191.4 ± 2.4	198.5 ± 3.4	194.0 ± 6.6
Масса <i>m. soleus</i> , мг	92.9 ± 2.2	73.6 ± 1.7*	85.4 ± 3.6*

С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина.

Данные представлены как среднее ± σ. * – $p < 0.05$.

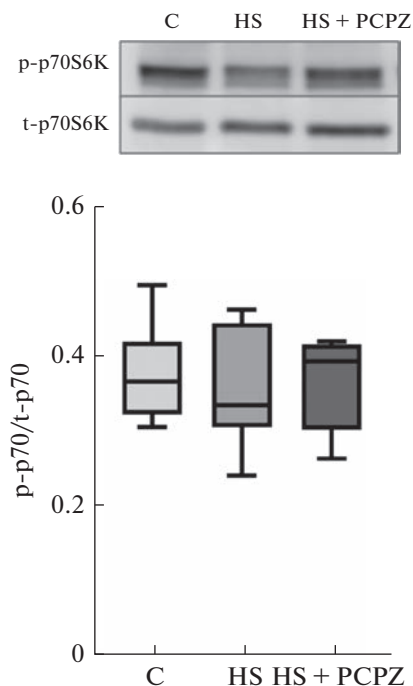


Рис. 2. Содержание фосфорилированной (Thr³⁸⁹) формы p70S6K в *m. soleus*. C — контроль; HS — вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ — вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * — $p < 0.05$.

ния по сравнению с контрольной группой (рис. 3а, б). Введение животным прохлорперазина предотвратило снижение 18S и 28S рРНК в *m. soleus* крысы (рис. 3а, б). Содержание мРНК транскрипционного фактора рибосомальных генов с-Мус демонстрировало сходную динамику: снижение в группе “чистого” вывешивания, но при этом существенный рост в группе вывешивания с препаратом (рис. 3с).

Ферментативная активность киназы гликогенсинтазы 3 β (GSK-3 β) в камбаловидной мышце крысы была значительно увеличена в обеих группах антиортостатического вывешивания, о чем свидетельствует снижение степени ее негативного фосфорилирования (рис. 4а). Активация GSK-3 β также подтверждается значительным увеличением фосфорилирования ее ключевого субстрата — гликогенсинтазы-1 (GS-1) (рис. 4б).

Содержание транскриптов убиквитинлигаз MuRF1, MAFbx и убиквитина было значительно повышено в группе с вывешиванием задних конечностей (рис. 5а–с). При этом введение прохлорперазина на фоне функциональной разгрузки позволило предотвратить увеличение экспрессии данных протеолитических маркеров (рис. 5а–с).

После 7 сут разгрузки наблюдалось значимое увеличение содержания фосфорилированной формы p38 на 160% в группе HS относительно контрольной группы. Введение прохлорперазина животным из группы HS + PCPZ предотвращало это увеличение (рис. 6а). Прохлорперазин также значимо снижал фосфорилирование JNK1/2 в группе вывешивания с препаратом (рис. 6б).

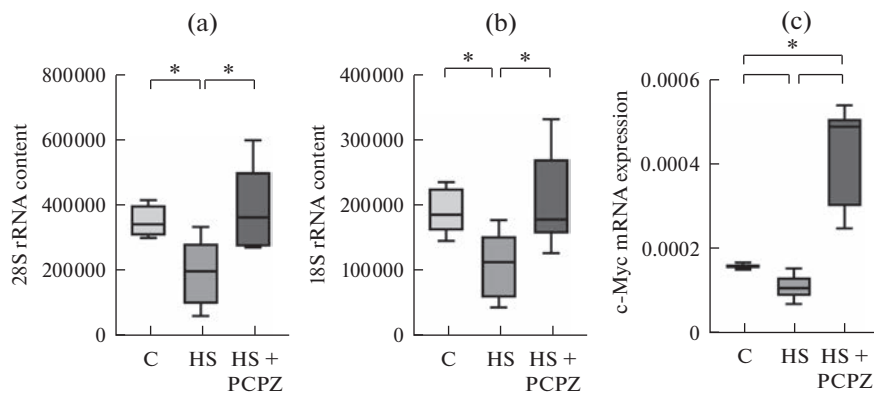


Рис. 3. Содержание 28S рРНК (а), содержание 18S рРНК (б) и экспрессия мРНК с-Мус в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

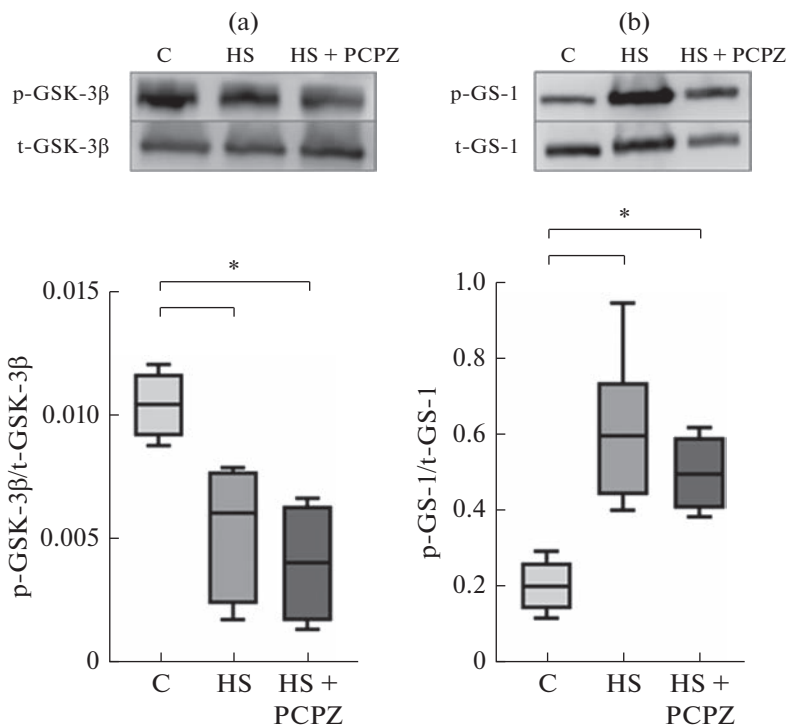


Рис. 4. Содержание фосфорилированной (Ser⁹) формы GSK3β (а) и фосфорилированной (Ser⁶⁴¹) формы GS-1 (б) в *m. soleus*. C – контроль; HS – вывешивание в течение 7 суток; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 суток с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

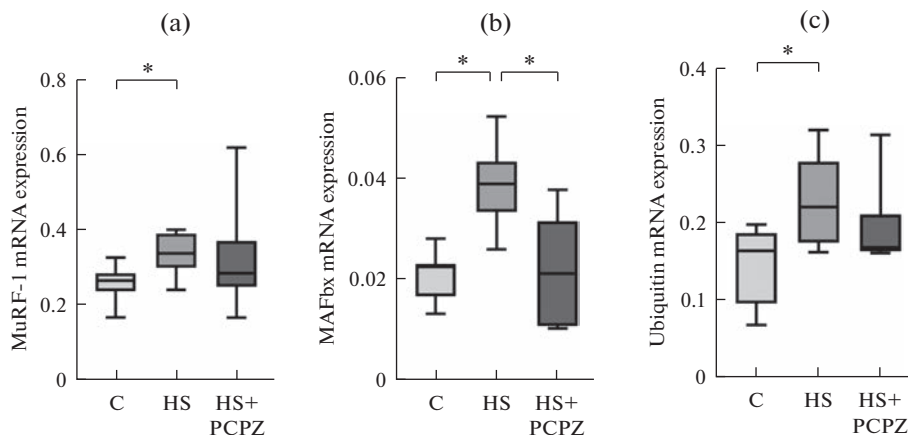


Рис. 5. Экспрессия мРНК показателей протеолиза MuRF-1 (а), MAFbx (б) и убиквитина (с) в *m. soleus*. С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

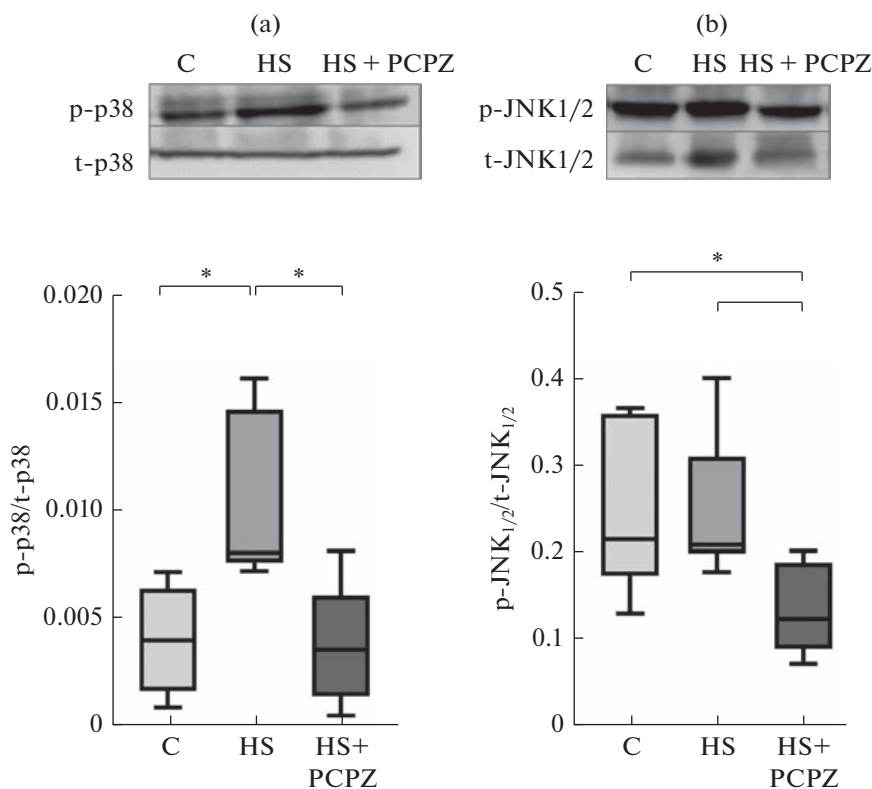


Рис. 6. Содержание фосфорилированной (Thr^{180/182}) формы p38 (а) и фосфорилированной (Thr^{183/185}) формы JNK1/2 (б) в *m. soleus*. С – контроль; HS – вывешивание в течение 7 сут; HS + PCPZ – вывешивание в течение 7 сут с ежедневным введением прохлорперазина. * – $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До сих пор никому не удавалось оценить физиологические, структурные, метаболические и сигнальные эффекты спонтанной нервно-мышечной активности на фоне опорной разгрузки постуральной мышцы, так как в арсенале исследователей не было инструментов, позволяющих устранить или существенно уменьшить эту активность. Однако, когда нам удалось связать такую активность на фоне опорной разгрузки со снижением белковой экспрессии калий-хлоридного котранспортера КСС-2 в нейронах поясничного отдела спинного мозга и с последующим значительным повышением возбудимости мотонейронов [9], появилась возможность существенно снизить спонтанную нервно-мышечную активность с помощью фармакологического воздействия, активирующего КСС-2. Такой эффект достигается при использовании нейролептика прохлорперазина или активатора КСС-2 животных CLP-257/290. При действии прохлорперазина удалось существенно снизить спонтанную нервно-мышечную активность у животных, подвергнутых опорной разгрузке с использованием модели вывешивания задних конечностей [9]. В настоящем исследовании оценивали атрофические изменения камбаловидной мышцы и изменения маркеров сигнальных путей анаболической и катаболической направленности в камбаловидной мышце у вывешенных животных с обычным уровнем спонтанной нервно-мышечной активности и у животных, получавших прохлорперазин и характеризующихся значительно сниженным уровнем спонтанной активности.

Согласно нашей первоначальной гипотезе, при устранении спонтанной активности на фоне функциональной разгрузки степень атрофии мышц должна быть глубже, а метаболические и сигнальные изменения должны быть более выраженными, чем у вывешенных животных, принимавших плацебо, электромиограмма которых демонстрирует повышенную активность. Именно такую тенденцию мы выявили при исследовании маркеров регуляции биогенеза митохондрий в камбаловидной мышце вывешенных крыс, получавших прохлорперазин (PGC-1 α , TFAM и др.) [11]. Снижение экспрессии этих маркеров оказалось более глубоким у животных, получавших прохлорперазин на фоне разгрузки, по сравнению с вывешенными животными без препарата.

В настоящем исследовании аналогичной тенденции при анализе сырой массы камбаловидной мышцы и площади поперечного сечения мышечных волокон не было отмечено. Напротив, у вывешенных животных, получавших прохлорперазин, снижение сырой массы и площади поперечного сечения мышечных волокон было менее выражено, чем у вывешенных животных, получавших плацебо. И эти различия между двумя группами были статистически значимы. Ранее в эксперименте с вывешиванием в попытке оценить роль спонтанной активности у вывешенных животных проводили денервацию камбаловидной и подошвенной мышцы в разных группах [12]. Денервация камбаловидной мышцы не привела к углублению атрофического ответа этой мышцы. Напротив, атрофия быстрой мышцы у денервированных животных была более выражена, чем у вывешенных животных, не подвергавшихся денервации. Поскольку при денервации прекращается не только импульсная регуляция мышечной активности, но и передача нейротрофических сигналов, которая более характерна для быстрых мышц, то углубление атрофии быстрой мышцы можно считать следствием прекращения этой передачи.

Этот эксперимент со всей очевидностью свидетельствует, что устранение нейрогенной импульсной регуляции мышечных сокращений на фоне функциональной разгрузки, как и в нашем эксперименте, не приводит к углублению атрофии. Мы обнаружили даже уменьшение ее выраженности. Причем это происходит в условиях большего “бездействия”, чем в условиях сохраняющейся спонтанной активности. Для того, чтобы приблизиться к пониманию причин этого парадокса, мы про-

анализировали состояние некоторых ключевых маркеров сигнальной регуляции белкового синтеза и распада.

Прежде всего исследовали уровень фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K, основной мишени и одновременно основного эффектора киназного комплекса mTORc1, ключевого фактора трансляционной эффективности, т.е. фактора, способного увеличить количества пептидных продуктов на одну рибосому в единицу времени [13]. Ранее при исследовании динамики этого показателя было обнаружено первоначальное повышение уровня фосфорилирования p70S6K после 12 и 24 ч вывешивания [14, 15] и последующее его снижение до уровня контроля после 7 сут вывешивания [14]. В настоящем исследовании в полном согласии с этими результатами после 7 сут воздействия у вывешенных животных уровень фосфорилирования рибосомальной киназы p70S6K не отличался от контрольного уровня. При этом различий между двумя группами вывешенных крыс (HS и HS + PCPZ) не было отмечено. Таким образом, можно считать, что прием прохлорперазина (и редукция спонтанной нервно-мышечной активности) не оказал влияния на ключевой параметр трансляционной эффективности камбаловидной мышцы. Естественно предположить, что снижение уровня фосфорилирования p70S6K в течение примерно пяти суток после первоначального повышения никак не обусловлено появлением после 2–3 сут спонтанной нервно-мышечной активности.

Совершенно иначе ведут себя параметры так называемой трансляционной емкости (т.е. параметры, способствующие биогенезу рибосом). Ранее в нашей лаборатории было показано, что уже в первые сутки вывешивания интенсивность экспрессии 18S и 28S рибосомальной РНК значимо снижается и поддерживается на уровне ниже контрольного как минимум до 7 сут вывешивания [16]. В настоящем исследовании у вывешенных животных, получавших плацебо, также наблюдали снижение экспрессии рибосомальных РНК. У животных, получавших прохлорперазин такого снижения не было обнаружено. Более того, у этих животных оказалась многократно повышенной экспрессия одного из центральных регуляторов транскрипции рибосомальных генов протоонкогенного белка с-Мус. Экспрессия с-Мус обычно регулируется β -катенином, активность которого может быть заблокирована некоторыми киназами, например, GSK3 β или IKK β [17, 18]. В нашем случае сниженный уровень негативного фосфорилирования GSK3 β по сайту Ser9 примерно одинаков у животных двух вывешенных групп. Однако про влияние спонтанной сократительной активности мышцы на киназную активность IKK β пока ничего не известно. Итак, мы можем констатировать, что именно спонтанная активность подавляет механизмы рибосомального биогенеза при разгрузке. При редукции этой активности уровень экспрессии маркеров трансляционной емкости не демонстрирует значимых отличий от контроля. Таким образом, способствуя снижению трансляционной емкости, спонтанная нервно-мышечная активность может оказаться фактором, углубляющим атрофические процессы в течение первой недели воздействия.

Что касается маркеров сигнальных путей катаболической направленности, то наиболее важными из них являются мРНК основных мышечных E3-убиквитин лигаз — MuRF1 и MAFbx/atrogin-1. Известно, что при вывешивании экспрессия мРНК этих важнейших ферментов значительно возрастает на 3-и и 7-е сутки воздействия [19, 20]. В нашем исследовании этот феномен был также воспроизведен для тех животных, которые в ходе вывешивания получали плацебо. У вывешенных животных, получавших прохлорперазин значимых изменений экспрессии мРНК по сравнению с виварным контролем не было. Поэтому не исключено, что повышенная экспрессия мышечных E3-убиквитин лигаз в данном случае является результатом спонтанной нервно-мышечной активности. Какие же конкретные механизмы, запущенные этой активностью, могут стимулировать экспрессию мРНК

MuRF1 и MAFbx/atrogen-1? В нашем предыдущем исследовании с таким же экспериментальным дизайном [11] у животных, получавших прохлорперазин в ходе разгрузки, наблюдали снижение уровня активных форм кислорода и снижение активности кальций-кальмодулин киназы II (что указывает на снижение содержания ионов кальция) по сравнению с группой вывешенных крыс, получавших плацебо. На этом основании мы предположили, что при возникновении спонтанной активности в камбаловидной мышце накапливаются активные формы кислорода и ионы кальция, способствующие активации митоген-активируемых протеинкиназ, а также сигнального пути NFκB, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию мРНК мышечных E3-убиквитинлигаз [21]. И действительно, в настоящем исследовании уровень фосфорилирования p38 у животных, получавших прохлорперазин, оказывался сниженным по сравнению с вывешенными животными, получавшими плацебо, что может свидетельствовать об активации p38 и JNK при спонтанной нервно-мышечной активности. Не исключено, что такая активация и приводит к повышенной экспрессии убиквитинлигаз и способствует углублению атрофического процесса.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что у крыс в условиях моделируемой гравитационной разгрузки при использовании прохлорперазина, способствующего активации калий-хлоридного котранспортера KCC-2 и существенно уменьшающего спонтанную электрическую активность постуральной камбаловидной мышцы, наблюдается достоверно меньшая выраженность атрофических изменений в мышце, чем при разгрузке без дополнительных воздействий. При этом почти не наблюдается снижения параметров рибосомального биогенеза и повышения экспрессии убиквитинлигаз по сравнению с интактным контролем. Установить точные причины наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным, так же, как и исключить вероятность того, что данные изменения являются следствием прямого специфического действия прохлорперазина на мышцу. Тем не менее, мы склонны придерживаться гипотезы, предполагающей некоторое углубление развития атрофии в результате генерации спонтанной нервно-мышечной ритмической активности. Возможно, что такое развитие событий обусловлено низкой амплитудой и непрерывным характером электрической импульсации (и, вероятно, сократительной активности).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование на животных проводили в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях (Совет Европы № 123, Страсбург, 1986 г.). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 638, от 18.04.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 22-15-00151).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — Б.С.Ш. Сбор данных — К.В.С., К.А.Ш., В.Е.К. Обработка данных — С.А.Т., К.В.С., К.А.Ш. Написание и редактирование манускрипта — Б.С.Ш., К.В.С., С.А.Т., К.А.Ш.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hodgson JA, Roy RR, Higuchi N, Monti RJ, Zhong H, Grossman E, Edgerton VR* (2005) Does daily activity level determine muscle phenotype? *J Exp Biol* 208 (Pt 19): 3761–3770. <https://doi.org/10.1242/jeb.01825>
2. *Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton VR* (1987) Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 96(3): 635–649. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90225-1)
3. *Kawano F, Nomura T, Ishihara A, Nonaka I, Ohira Y* (2002) Afferent input-associated reduction of muscle activity in microgravity environment. *Neuroscience* 114(4): 1133–1138. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00304-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00304-4)
4. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92(4): 1367–1377. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
5. *De-Doncker L, Kasri M, Picquet F, Falempin M* (2005) Physiologically adaptive changes of the L5 afferent neurogram and of the rat soleus EMG activity during 14 days of hindlimb unloading and recovery. *J Exp Biol* 208(Pt 24): 4585–4592. <https://doi.org/10.1242/jeb.01931>
6. *Baltina TV, Ereemeev AA, Pleshchinskii IN* (2006) The state of the contralateral neuromotor apparatus of the rat in conditions of unilateral tenotomy. *Neurosci Behav Physiol* 36(4): 385–389. <https://doi.org/10.1007/s11055-006-0029-5>
7. *Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L* (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* 16(3): 302–307. <https://doi.org/10.1038/nm.2107>
8. *Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ* (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30(2): 515–524. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00297-5)
9. *Kalashnikov VE, Tyganov SA, Turtikova OV, Kalashnikova EP, Glazova MV, Mirzoev TM, Shenkman BS* (2021) Prochlorperazine Withdraws the Delayed Onset Tonic Activity of Unloaded Rat Soleus Muscle: A Pilot Study. *Life* 11(11): 1161. <https://doi.org/10.3390/life11111161>
10. *Nair AB, Jacob S* (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *JBCP* 7(2): 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
11. *Sharlo KA, Lvova ID, Tyganov SA, Sergeeva KV, Kalashnikov VY, Kalashnikova EP, Mirzoev Kh M, Kalamkarov GR, Shevchenko TF, Shenkman BS* (2023) A Prochlorperazine-Induced Decrease in Autonomous Muscle Activity during Hindlimb Unloading Is Accompanied by Preserved Slow Myosin mRNA Expression. *Curr Issues Mol Biol* 45(7): 5613–5630. <https://doi.org/10.3390/cimb45070354>
12. *Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Kawano F, Wang XD, Higo Y, Terada M, Matsuoka Y, Roy RR, Edgerton VR* (2006) The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties. *Cells Tissues Organs* 182(3–4): 129–142. <https://doi.org/10.1159/000093963>
13. *Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J* (2009) Cell signaling in protein synthesis ribosome biogenesis and translation initiation and elongation. *Prog Mol Biol Transl Sci* 90: 53–107. [https://doi.org/10.1016/S1877-1173\(09\)90002-3](https://doi.org/10.1016/S1877-1173(09)90002-3)
14. *Mirzoev T, Tyganov S, Vilchinskaya N, Lomonosova Y, Shenkman B* (2016) Key Markers of mTORC1-Dependent and mTORC1-Independent Signaling Pathways Regulating Protein Synthesis in Rat Soleus Muscle During Early Stages of Hindlimb Unloading. *Cell Physiol Biochem* 39 (3): 1011–1020. <https://doi.org/10.1159/000447808>
15. *Chibalin AV, Benziane B, Zakyrjanova GF, Kravtsova VV, Krivoi, II* (2018) Early endplate remodeling and skeletal muscle signaling events following rat hindlimb suspension. *J Cell Physiol* 233(10): 6329–6336. <https://doi.org/10.1002/jcp.26594>
16. *Rozhkov SV, Sharlo KA, Shenkman BS, Mirzoev TM* (2022) The Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Regulation of Ribosome Biogenesis in Rat Soleus Muscle under Disuse Condi-

- tions. *Int J Mol Sci* 23(5): 2751.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052751>
17. Hu D, Bi X, Fang W, Han A, Yang W (2009) GSK3beta is involved in JNK2-mediated beta-catenin inhibition. *PloS One* 4(8): e6640.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006640>
 18. Sui Y, Liu Z, Park SH, Thatcher SE, Zhu B, Fernandez JP, Molina H, Kern PA, Zhou C (2018) IKKbeta is a beta-catenin kinase that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *JCI Insight* 3(2): e96660.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.96660>
 19. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294(5547): 1704–1708.
<https://doi.org/10.1126/science.1065874>
 20. Kachaeva EV, Shenkman BS (2012) Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J Biomed & Biotechnol* 2012: 493618.
<https://doi.org/10.1155/2012/493618>
 21. Zhang BT, Whitehead NP, Gervasio OL, Reardon TF, Vale M, Fatkin D, Dietrich A, Yeung EW, Allen DG (2012) Pathways of Ca²⁺ entry and cytoskeletal damage following eccentric contractions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 112(12): 2077–2086.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00770.2011>

The Effect of Spontaneous Neuromuscular Activity on the Development of Atrophy of the Functionally Unloaded *m. soleus*

K. V. Sergeeva^a, *, K. A. Sharlo^a, V. E. Kalashnikov^a, O. V. Turtikova^a,
 S. A. Tyganov^a, and B. S. Shenkman^a

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

*e-mail: Sergeeva_xenia@mail.ru

It is well known that the inactivity of mammalian skeletal muscles leads to the cessation of their electrical activity and is accompanied by atrophic changes in muscle fibers. However, it has been repeatedly noted that starting from the 3rd day of functional unloading, spontaneous rhythmic neuromuscular activity appears, which is the result of a decrease in the expression of the potassium chloride co-transporter KCC-2 in neurons of the lumbar spinal cord. A decrease in the expression of KCC-2 and the onset of autonomous electrical activity of the unloaded muscle can be prevented by the administration of the neuroleptic prochlorperazine. Thus, the aim of this study was to evaluate the structural and signaling effects of the reduced spontaneous activity of the unloaded *m. soleus*. It was found that daily administration of prochlorperazine to rats under conditions of 7-day simulated gravitational unloading prevented a decrease in the content of the main markers of ribosome biogenesis (c-Myc, 18S rRNA and 28S rRNA), and also partially prevented a decrease in the cross-sectional area of fast and slow muscle fibers in the *m. soleus*. Morphofunctional changes caused by a decrease of spontaneous activity of the unloaded muscle were accompanied by complete or partial prevention of activation of key proteolytic markers expression (MuRF-1, MAFbx/atrogen-1, ubiquitin). Thus, we assume that spontaneous neuromuscular activity may be a factor that augments muscle atrophy during the first week of functional unloading.

Keywords: skeletal muscle, gravitational unloading, prochlorperazine, spontaneous activity, protein breakdown, ubiquitinligase

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РЕАКТИВНОСТЬ ЭЭГ ВО ВРЕМЯ СЛУХОВОГО ВОСПРИЯТИЯ СЛОВ
У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО И МЛАДШЕГО ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

© 2023 г. М. А. Начарова¹, *, Д. В. Начаров², В. Б. Павленко¹

¹Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

*E-mail: alikina93@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2023 г.

После доработки 08.09.2023 г.

Принята к публикации 08.09.2023 г.

Проведен анализ связанных с событиями изменений спектра электроэнцефалограммы (ЭЭГ) во время слухового восприятия слов-существительных у 83 типично развивающихся детей в возрасте от 4 до 10 лет, в том числе 50 детей дошкольного возраста и 33 детей младшего школьного возраста. Выявлены межгрупповые различия — у детей дошкольного возраста в обработку слов в большей степени вовлечены нейронные системы, активность которых отражается в обширной десинхронизации альфа- и синхронизации тета-активности в лобных зонах левого полушария. Для реактивности ЭЭГ детей младшего школьного возраста свойственна двусторонняя и более выраженная тета-синхронизация, что указывает на повышенную интенсивность лексико-семантических операций, а также на снижение фоновой и рост вызванной тета-активности. У детей данной группы также наблюдалась синхронизация ЭЭГ в бета-диапазоне, представленная отдельными всплесками и наиболее выраженная в лобных отведениях, что характерно для более зрелых механизмов обработки речи. Результаты исследования важны для уточнения механизмов понимания речи у типично развивающихся детей дошкольного и младшего школьного возраста.

Ключевые слова: восприятие речи, дети дошкольного и школьного возраста, электроэнцефалограмма, тета-, альфа- и бета-активность

DOI: 10.31857/S0869813923100072, EDN: TDFUBW

ВВЕДЕНИЕ

Распознавание отдельных слов и ассоциирование их с конкретными объектами — это процесс, который возникает, как это экспериментально подтверждено, уже у полугодовалых младенцев [1] и активно развивается у детей раннего возраста [2]. Данный процесс лежит в основе формирования словарного запаса и адекватного речевого развития в целом [3, 4]. Исследования показывают, что развитие языковых способностей и созревание нейронных структур, лежащих в их основе, продолжается по меньшей мере до возраста 12 лет [5]. Нейрофизиологические механизмы становления рецептивной речи у детей активно изучаются с применением целого ряда методов, в том числе электроэнцефалографии. Было установлено, что процесс восприятия слов отражается в динамике мощности тета-, альфа- и бета-ритмов ЭЭГ, а также характеристиках компонентов связанных с событиями потенциалов (ССП), в частности N400 и P600 [5–7].

Одним из способов исследования процесса понимания слов является частотно-временной анализ ЭЭГ, в частности анализ связанных с событиями спектральных пертурбаций (СССП). Используя этот метод, можно определить изменения мощности ЭЭГ в различных частотных диапазонах во время выполнения языкового задания. Предполагается, что увеличение мощности в определенной частотной полосе связано с активацией дополнительных нейронных ансамблей, возбуждающихся на той же частоте [8]. Анализ СССП дает возможность оценить изменения классических ритмов ЭЭГ, функциональное значение которых достаточно хорошо изучено. Дополнительно отмечают, что этот метод позволяет обнаружить изменения в ЭЭГ, которые не выявляются при традиционном анализе ССП. Это преимущество подчеркнуто исследованием с участием детей школьного возраста [9], которое выявило при восприятии правильных и содержащих семантические ошибки предложений различия в реактивности тета-ритма, но не в параметрах ССП.

У детей и взрослых наиболее убедительно установлена связь процесса обработки слов с синхронизацией тета-ритма [5, 10–12]. Предполагается, что рост тета-активности с латентным периодом 150–200 мс от начала стимула связан с лексико-семантическими операциями поиска и извлечения слов из памяти при восприятии речевых сообщений [7]. Чем сложнее процесс этого поиска, тем больше растет мощность тета-ритма. Этим объясняют тот факт, что увеличение мощности указанного ритма больше при обработке псевдослов, чем реальных слов [13].

Несмотря на схожесть динамики тета-ритма при восприятии слов у детей и взрослых, появляется все больше свидетельств того, что амплитуда и топография тета-синхронизации меняются с возрастом [9]. Например, дети 10 лет во время чтения слов демонстрируют более выраженное по сравнению со взрослыми увеличение тета-активности в правом полушарии [14], а в 12-летнем возрасте правополушарная синхронизация тета-активности значительно уменьшается [7].

Наряду с синхронизацией тета-активности наблюдается десинхронизация альфа-ритма ЭЭГ, которая может отражать как активацию процессов внимания [15], так и специфически связанные с восприятием речи процессы [16]. Так, было показано, что восприятие речевых сигналов вызывает более значимую десинхронизацию альфа-ритма в центральных областях коры по сравнению с восприятием неречевых стимулов [17]. В то же время некоторыми исследователями был обнаружен рост мощности мю- и альфа-ритма в центральных, теменных и затылочных регионах в процессе восприятия предложений у детей 2–3 [18] и 10–12 лет [5]. Данный феномен связывают с активацией процессов рабочей памяти при восприятии целостного речевого сообщения.

Также отмечается увеличение мощности бета-ритма в обширных областях неокортекса, которое, как предполагают [10, 11, 19, 20], отражает поддержание активного состояния нейронных сетей, участвующих в процессах восприятия речи. В отдельных исследованиях [16] выявлен как рост мощности бета-ритма в височных и теменных областях, так и ее снижение над моторными областями неокортекса. Указанное снижение связывают с процессами активации моторного репертуара речи.

В то время как реактивность ЭЭГ во время восприятия речи у взрослых относительно хорошо изучена [10–12, 16], исследования с участием детей по-прежнему немногочисленны. Кроме этого, в большинстве работ изучается процесс чтения слов и предложений у детей школьного возраста [7, 21]. Такое исследование невозможно провести у детей более раннего возраста в связи с отсутствием у них навыка чтения. Однако выявление изменений в становлении процесса восприятия речи у детей дошкольного возраста является актуальным в связи с ростом числа детей с речевыми нарушениями [22].

Целью настоящего исследования является анализ СССП во время слухового восприятия слов у типично развивающихся детей 4–10 лет, а также выявление возможных различий реакций ЭЭГ у детей дошкольного и младшего школьного возрастов. В качестве экспериментальной ситуации выбрано пассивное прослушивание слов, которое может выполняться детьми с нарушениями речи, испытывающими трудности в выполнении сложной инструкции.

Основываясь на результатах работ других авторов, можно предположить, что, как и у более старших детей и взрослых, восприятие слов участниками исследования 4–10 лет отражается в росте мощности тета-активности, а также преобладании десинхронизации альфа-ритма. Однако поскольку дети 7–10 лет, уже посещающие школу, могут использовать иные, более зрелые стратегии для успешной обработки речевых сигналов, чем дошкольники 4–6 лет, паттерны СССП этих возрастных групп будут существенно отличаться.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика выборки. В исследовании приняли участие 83 типично развивающихся ребенка (55 мальчиков и 28 девочек), представленных двумя группами — 50 детей дошкольного возраста (4–6 лет, средний возраст 5.2 ± 1.2 года, 31 мальчик и 19 девочек) и 33 — младшего школьного возраста (7–10 лет, средний возраст 8.6 ± 1.9 года, 24 мальчика и 9 девочек). Все дети были правшами, имели нормальные или приближающиеся к нормальным показатели зрения и слуха. В указанные группы не были включены дети с массой тела при рождении менее 2.5 кг, с наличием генетических заболеваний, а также те дети, в ЭЭГ которых во время клинических обследований были выявлены эпизоды эпилептиформной активности. Дети дали устное, а их родители — письменное согласие на участие в эксперименте, с процедурой которого они были заранее ознакомлены.

Регистрацию ЭЭГ проводили с помощью электроэнцефалографа Нейрон-Спектр-3 (“Нейрософт”, Россия) монополярно в соответствии с международной системой 10–20 в лобных (Fp_1 , Fp_2 , Fz , F_3 , F_4 , F_7 , F_8), центральных (Cz , C_3 , C_4), височных (T_3 , T_4 , T_5 , T_6), теменных (Pz , P_3 , P_4) и затылочных (O_1 , O_2) отведениях. В качестве референтного использовался объединенный ушной электрод. Сопротивление электродов не превышало 5 кОм. Частота дискретизации составляла 500 Гц.

Испытуемых просили сидеть спокойно, глядя перед собой, и внимательно слушать аудиозапись речи. При этом использовали акустические колонки, находящиеся на расстоянии около двух метров от ребенка. Громкость звука в этой области в среднем составляла 85 дБ. В качестве стимулов были подобраны 30 часто употребляемых конкретных слов-существительных, знакомых детям четырех лет (мяч, яблоко, карандаш и т.п.). Средняя продолжительность слов составляла 296 ± 84 мс, а межстимульный интервал — 4500–5500 мс. Перед началом регистрации ЭЭГ несколько слов воспроизводили в тестовом режиме с целью дать возможность ребенку освоиться с таким способом предъявления речевых сигналов и убедиться, что он не повторяет слов вслух.

Анализ ЭЭГ-данных проводили с помощью программы EEGLAB (<http://www.sccn.ucsd.edu/eeglab/>). Записи ЭЭГ были отфильтрованы в диапазоне от 1 до 50 Гц, артефакты удалялись с помощью метода анализа независимых компонент. Непрерывную запись ЭЭГ разбивали на эпохи длительностью 4000 мс, соответствующие моментам предъявления стимулов. Предстимульный (фоновый) интервал имел длительность 1000 мс, постстимульным интервалом являлся отрезок времени длительностью 3000 мс от момента начала предъявления слова. СССП ЭЭГ выявляли с помощью частотно-временного анализа на основе вейвлета Морле. Показатели СССП рассчитывали как логарифм отношения мощностей ритми-

ческих диапазонов постстимульной и предстимульной ЭЭГ. Отрицательные значения СССР соответствуют десинхронизации ЭЭГ и отмечены на графиках синим цветом, положительные значения — синхронизации, отмечены на графиках красным цветом. Частотное разрешение составило 0.6 Гц. Временное разрешение составило 14.7 мс и рассчитывалось как отношение длительности анализируемого интервала (3000 мс с учетом исключения краевых эффектов) и количества отсчетов (200 отсчетов). В качестве тета-, альфа- и бета-активности у детей дошкольного возраста рассматривали активность в частотных диапазонах 3–7, 7–12, 13–25 Гц, а у школьников — 3–8, 8–13, 13–30 Гц [23].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ MATLAB и набора инструментов EEGLAB.

Для оценки значимости связанных с прослушиванием слов реакций ЭЭГ в общей выборке детей дошкольного и младшего школьного возраста и внутри каждой из групп использовали многофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (repeated measures ANOVA) с факторами СИТУАЦИЯ (два уровня — до и после предъявления слов), ЛОКУС (19 отведений ЭЭГ), ЧАСТОТА (52 значения от 1 до 30 Гц). Анализ выполнялся для каждого из 170 временных отсчетов постстимульной ЭЭГ, в качестве данных предстимульной ЭЭГ использовалось усредненное значение данных 30 отсчетов предстимульной ЭЭГ. Для дальнейшего анализа использовали только те временные интервалы, в которых общий эффект взаимодействия всех трех факторов достигал уровня статистической значимости ($p < 0.05$ с учетом поправки Хьюнха–Фельдта). Для попарных сравнений СССР до и после стимула использовали апостериорные t -тесты ($p < 0.01$).

Одним из достоинств программы EEGLAB является возможность межгруппового сравнения СССР с помощью пермутационной статистики (статистики перестановок). Пермутационная статистика рекомендована для анализа больших наборов данных, таких как результаты частотно-временного анализа ЭЭГ, поскольку может использоваться вне зависимости от соответствия распределения данных тому или иному закону, относительно надежна при анализе экспериментов с участием небольшого количества испытуемых, не требует применения дополнительных поправок [24]. Пермутационная статистика была применена нами при оценке различий СССР в группах детей дошкольного и младшего школьного возраста. Для каждого канала и точки частотно-временной области на основе метода перестановок генерировалась искусственная выборка, сформированная в результате случайных перестановок данных исходной выборки (дети дошкольного и младшего школьного возрастов), рассчитывалась t -статистика для полученной выборки. Путем повторения данной операции 2000 раз формировалось нулевое распределение, состоящее из 2000 статистик искусственно сгенерированных выборок. Далее статистики исходных выборок сравнивались с полученным нулевым распределением. Значимыми считались различия при $p < 0.01$ — в этом случае статистики исходной выборки входили в 0.5% наибольших или 0.5% наименьших значений нулевого распределения [25]. В противном случае принималась нулевая гипотеза, делался вывод об отсутствии различий данных в группах детей разных возрастов в определенном отведении и точке частотно-временной области. Дополнительная коррекция на множественные измерения не проводилась, однако интерпретировались частотно-временные кластеры, содержащие не менее 50 пикселей. Преимущества проведения расчетов для каждой точки частотно-временной области заключается в учете возможного различия в распределении параметров ЭЭГ на разных частотах и в разные временные промежутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ связанных с событием спектральных пертурбаций общей выборки детей 4–10 лет. Анализ СССП у всех 83 типично развивающихся детей дошкольного и младшего школьного возраста позволил оценить общий паттерн реактивности ЭЭГ при восприятии ими слов-существительных. Было выявлено увеличение мощности ЭЭГ по сравнению с фоновым уровнем в диапазоне тета-активности во временном интервале 200–800 мс после начала стимула в лобных, центральных и височных отведениях, наиболее выраженное в отведениях Fp_1 , F_7 , F_8 (рис. 1). Наблюдалась десинхронизация активности в альфа- и бета-диапазонах, наиболее выраженная в лобных и центральных зонах.

Дисперсионный анализ с повторными измерениями в группе детей 4–10 лет выявил значимое влияние взаимодействия факторов СИТУАЦИЯ, ЛОКУС и ЧАСТОТА для временных промежутков 0–103, 308–1102 мс.

Результаты апостериорного анализа в группах детей 4–10 и 4–6 лет представлены в табл. 1.

Анализ связанных с событием спектральных пертурбаций в группе детей дошкольного возраста. Анализ СССП в группе типично развивающихся детей 4–6 лет показал увеличение мощности ЭЭГ в диапазоне тета-активности, наиболее выраженное в отведениях Fp_1 , F_7 , F_8 (рис. 2а). Наблюдалась десинхронизация активности в альфа- и бета-диапазонах, наиболее выраженная в лобных и центральных зонах.

Дисперсионный анализ с повторными измерениями в группе детей 4–6 лет выявил значимое влияние взаимодействия факторов СИТУАЦИЯ, ЛОКУС и ЧАСТОТА для временного промежутка 1617–1764 мс.

Несмотря на выраженную синхронизацию тета-активности в лобных и височных локусах левого полушария, применение поправки Хьюнха–Фельдта показало, что различия с предстимульной активностью не достигли уровня статистической значимости. Зарегистрирована достигающая уровня статистической значимости десинхронизация альфа- и бета-активности (табл. 1).

Анализ связанных с событием спектральных пертурбаций в группе детей младшего школьного возраста. Во время прослушивания слов в группе детей младшего школьного возраста зарегистрирована синхронизация ЭЭГ в тета-диапазоне в лобных, центральных, теменных и височных отведениях; синхронизация альфа- и бета-активности (рис. 2б).

Дисперсионный анализ с повторными измерениями в группе детей 7–10 лет не выявил значимое влияние взаимодействия факторов СИТУАЦИЯ, ЛОКУС и ЧАСТОТА, что может быть связано с относительно небольшим объемом выборки и коррекцией уровня значимости с применением поправки Хьюнха–Фельдта.

Сравнение связанных с событием спектральных пертурбаций ЭЭГ в группах детей дошкольного и младшего школьного возраста. Во время восприятия слов в группах детей дошкольного и младшего школьного возраста выявлены значимые различия между реактивностью ЭЭГ в тета-, альфа- и бета-диапазонах (рис. 2).

В группе детей школьного возраста в отведении F_4 регистрируется более выраженная синхронизация тета-активности через 108–380 мс по сравнению с показателями в группе детей дошкольного возраста ($p < 0.01$). Аналогичные изменения зарегистрированы в отведениях Fp_1 во временном интервале 1055–1200 мс и в Fp_2 через 1130–1218 мс после начала стимула. В отведении C_3 через 10–250 мс и P_4 через 610–740 мс наблюдается синхронизация тета-активности, тогда как у детей дошкольного возраста – десинхронизация. В отведении T_3 на промежутке 1850–2050 мс и в локусе T_5 через 1150–1300 и 2200–2500 мс регистрируется десинхронизация тета-активности, сменяющая предшествующую синхронизацию, тогда как у детей дошкольного возраста продолжается синхронизация тета-активности.

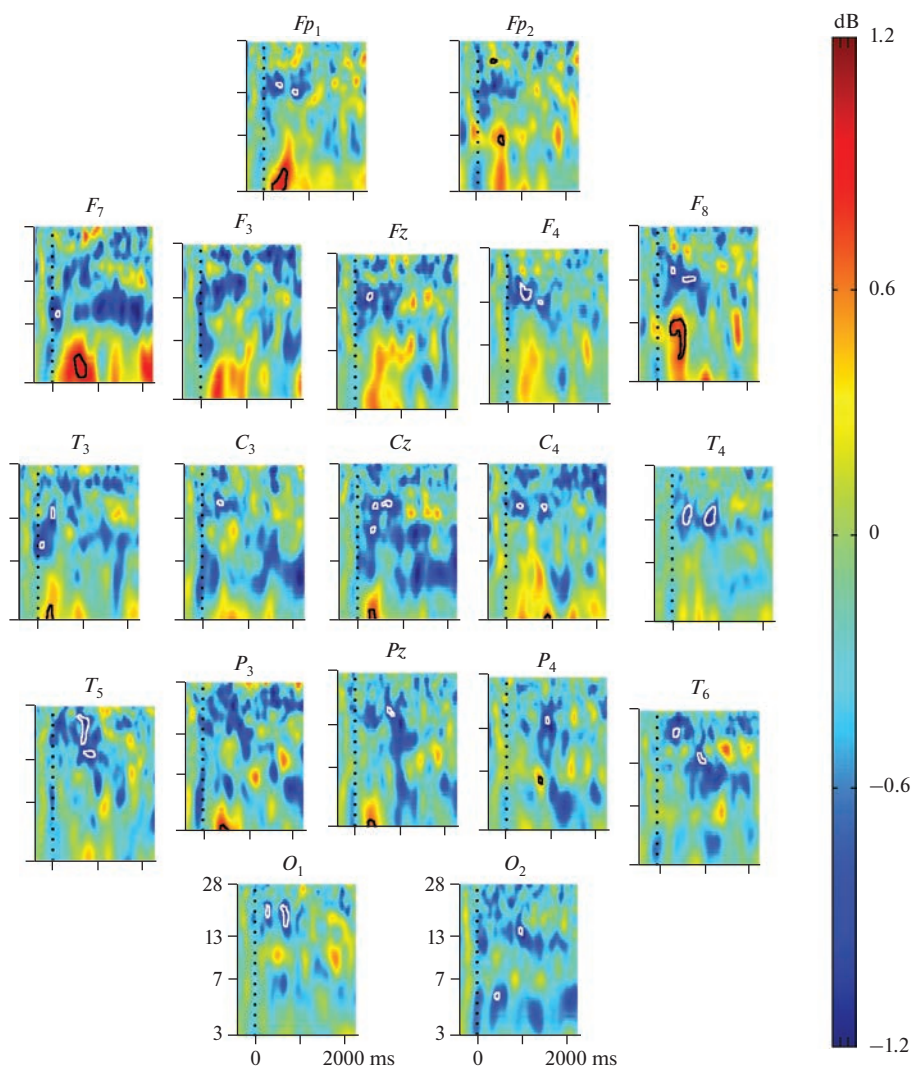


Рис. 1. Связанные с прослушиванием слов спектральные пертурбации в 19 отведениях ЭЭГ у 83 типично развивающихся детей в возрасте 4–10 лет. Каждый фрагмент рисунка соответствует временному промежутку от –500 до 2500 мс от начала стимула (момент 0) и диапазону частот от 3 до 28 Гц. Закрытыми белыми линиями выделены участки графика со статистически значимым снижением, черными – повышением мощности ЭЭГ относительно предстимульного интервала. Шкала в правой части рисунка отражает логарифм отношения мощностей постстимульной и предстимульной ЭЭГ в дБ.

В группах детей дошкольного и младшего школьного возраста выявлены значимые различия в реактивности альфа-ритма во время восприятия слов в отведениях Fp_1 , Fp_2 , Fz , F_4 , F_7 , F_8 , T_5 , C_4 , P_3 , O_2 . У детей дошкольного возраста наблюдалась десинхронизация альфа-активности, тогда как у детей школьного возраста – синхронизация.

Значимые различия в реактивности бета-ритма выявлены в отведениях Fp_1 , Fp_2 , Fz , F_3 , F_4 , F_7 , F_8 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , Cz , C_3 , C_4 , P_3 , O_1 , O_2 . У детей дошкольного возраста наблюдалась десинхронизация бета-активности, тогда как у детей школьного возраста – синхронизация.

Таблица 1. Отведения ЭЭГ и временные интервалы (мс), в которых выявлены статистически значимые, связанные с прослушиванием слов спектральные пертурбации

Реактивность ЭЭГ	Отведения	Реактивность в группе 4–10 лет, мс	Реактивность в группе 4–6 лет, мс
Синхронизация тета-активности	Fp_1	308–704	
	Fp_2	601–675	
	F_7	702–938	
	F_8	366–703	
	Cz	335–496	
	C_4	1070–1102	
	Pz	350–584	
	P_3	454–660	
	P_4	894–909	
	T_3	308–367	
Десинхронизация тета-активности	C_3	0–45	
	O_2	513–615	
Десинхронизация альфа-активности	Fp_1		1690–1764
	F_7	28–103	1617–1764
	F_8	630–923	
	Cz	352–441	1617–1764
	T_3	0–103	
	T_6		1617–1690
Синхронизация бета-активности	Fp_2	439–542	
Десинхронизация бета-активности	Fp_1	308–396, 733–880	1617–1764
	Fz	365–511	
	F_4	337–645, 850–908	
	F_8	320–438, 657–949	
	Cz	394–525, 657–876	
	C_3	469–557	
	C_4	410–527, 1026–1102	
	Pz	803–1102	
	P_4	1022–1102	
	T_3	337–366	
	T_4	308–527, 803–1102	
	T_5	770–1022	
	T_6	441–588, 1020–1102	
	O_1	337–469, 733–952	
	O_2	1099–1102	

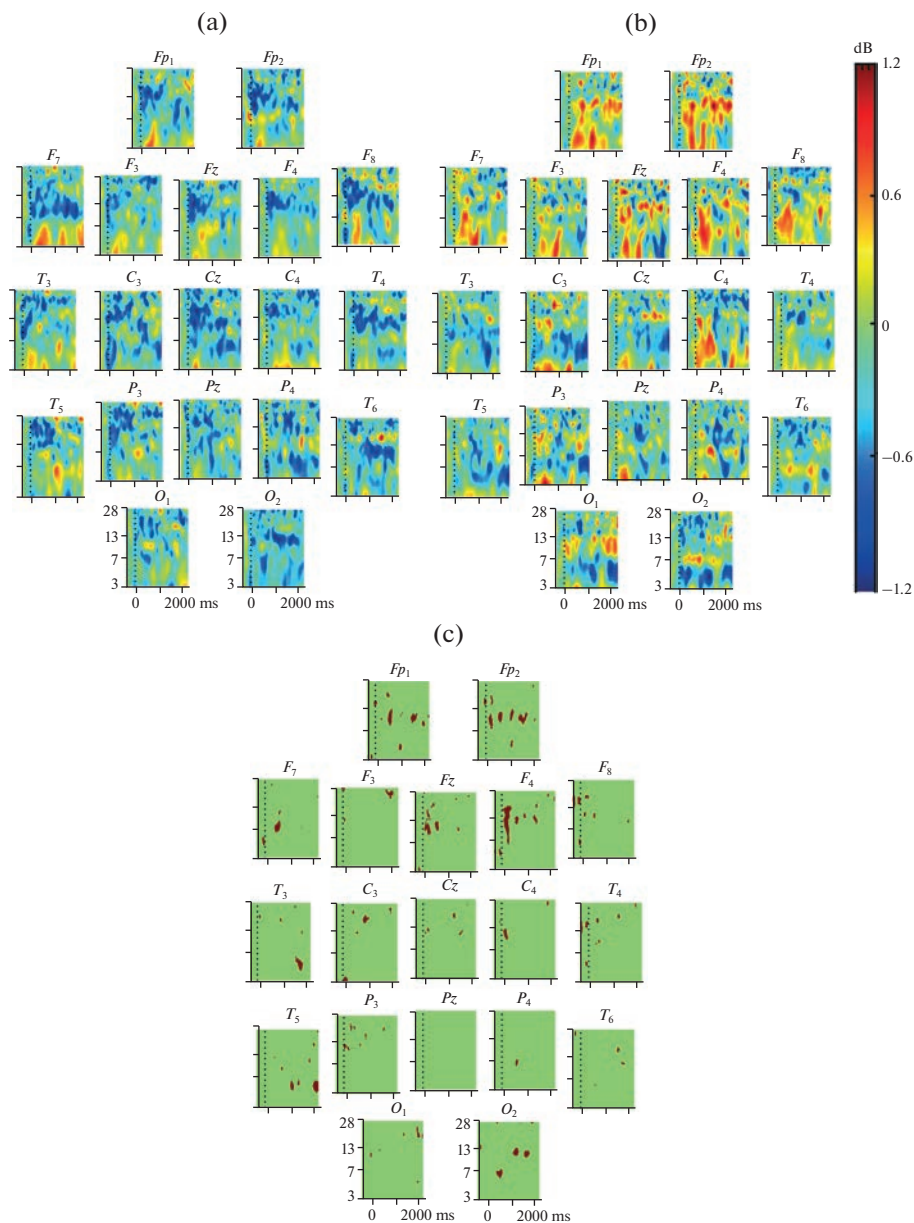


Рис. 2. Связанные с прослушиванием слов спектральные пертурбации в 19 отведениях ЭЭГ у 53 типично развивающихся детей в возрасте 4–6 лет (а), 30 типично развивающихся детей в возрасте 7–10 лет (б), межгрупповые различия, $p < 0.01$ (с). Каждый фрагмент рисунка соответствует временному промежутку от –500 до 2500 мс от начала стимула (момент 0) и диапазону частот от 3 до 28 Гц. Шкала отражает логарифм отношения мощностей постстимульной и предстимульной ЭЭГ в дБ. Межгрупповые различия при $p < 0.01$ выделены темным цветом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования подтвердили данные о более широкой пространственной представленности процессов синхронизации ЭЭГ в тета-диапазоне во время восприятия слов у детей по сравнению со взрослыми [5, 7]. Так, значимый рост мощности тета-активности у детей 4–10 лет наблюдается не только в лобных и теменных отведениях левого полушария, но и в височных и центральных зонах обоих полушарий (рис. 1). Аналогичные особенности динамики ЭЭГ в тета-диапазоне, в частности менее локализованная тета-синхронизация, представленная как в левом, так и в правом полушариях, обнаружены во время обработки речи у детей в ряде других исследований [7, 26–28].

При разделении детей 4–10 лет на группы дошкольного (4–6 лет) и младшего школьного возраста (7–10 лет), как и предполагалось, были выявлены различия в паттернах ЭЭГ во время слухового восприятия слов (рис. 2). У детей дошкольного возраста наиболее выраженная тета-синхронизация происходила в лобных и височных отведениях левого полушария (рис. 2а). У детей 7–10 лет тета-синхронизация была более выраженной и затрагивала не только зоны левого полушария, но и правосторонние области (рис. 2б).

Большее вовлечение правого полушария в процессы восприятия речи в группе школьников по сравнению с детьми дошкольного возраста оказалось неожиданным результатом. Действительно, хотя в исследованиях динамики ЭЭГ в процессе восприятия слов у детей 8–12 лет и подчеркивается роль правого полушария [7], авторы указывают на значительное снижение правосторонней синхронизации тета-активности у более старших из обследованных детей. Следует отметить, что в указанной работе, как и в большинстве исследований, применявших анализ СССП при восприятии речи, дети школьного возраста читали слова, тогда как в нашем исследовании исследовалось слуховое восприятие слов. Несмотря на то, что нейронные сети чтения и слухового восприятия речи частично перекрываются, прослушивание слов требует дополнительного анализа просодических компонентов речи, обработка которых в большей степени происходит в правом полушарии [29–31].

В целом, большую выраженность СССП в тета-диапазоне у детей школьного возраста, по сравнению с дошкольниками, можно объяснить следующим образом. Поскольку увеличение мощности тета-ритма при восприятии речи связывают, как уже отмечалось, с лексико-семантическими операциями поиска и извлечения слов из памяти [7], рост тета-активности может указывать на большую интенсивность указанных операций у старших детей. Кроме того, различия в выраженности СССП в тета-диапазоне у детей дошкольного и младшего школьного возраста могут быть следствием разного уровня предстимульной (фоновой) тета-активности. В ряде исследований [13, 32] фоновую активность в тета-диапазоне рассматривают как “тоническую”, а ее изменения, связанные с обработкой стимула, как “фазическую” активность. Чем ниже тоническая тета-активность, тем выше готовность к восприятию информации, успешнее выполнение когнитивных операций. Амплитуда тонической тета-активности снижается у детей по мере взросления, отражая процесс созревания головного мозга [33, 34]. Таким образом, большая реактивность у детей школьного возраста в тета-диапазоне, отражающая фазическую активность, может быть обусловлена более низким уровнем предстимульной тонической тета-активности у детей этой группы.

В нашем исследовании особенностью реактивности ЭЭГ у детей 4–6 лет явилась хорошо выраженная десинхронизация в альфа-диапазоне, наблюдающаяся практически во всех отведениях. Поскольку десинхронизация альфа-ритма отражает активацию соответствующих зон неокортекса [15], в том числе обеспечивающих процессы как произвольного, так и непроизвольного внимания, можно предполо-

жить, что детям этой группы при восприятии речи требуется привлекать больший, чем младшим школьникам, объем соответствующих мозговых ресурсов. Кроме этого, десинхронизация ЭЭГ в указанном частотном диапазоне, развивающаяся над двигательными областями коры, может быть связана с активацией у дошкольников моторных артикуляционных зон [35]. Поскольку по нашим наблюдениям при предварительном тестовом предъявлении сигналов именно дошкольники чаще стремились повторять слова вслух, они, вероятно, в большей степени опирались на механизмы внутреннего проговаривания слов, чем дети более старшего возраста.

У детей 7–10 лет десинхронизация альфа-активности носила менее выраженный характер и была не столь широко представлена в анализируемых отведениях. Мы предполагаем, что данная группа участников исследования, следуя инструкции внимательно слушать слова, в большей степени использовала ресурсы достаточно развитого в этом возрасте произвольного, чем непроизвольного внимания. Именно преобладание процессов произвольного внимания может приводить к более локальному вовлечению зон мозга в процесс обработки слов. Обращает на себя внимание и усиление мощности в альфа-диапазоне в лобных областях коры у младших школьников. Как показано у взрослых испытуемых [36], для выполнения задач, вовлекающих рабочую память, характерна синхронизация альфа-ритма в лобных зонах. Такую синхронизацию объясняют торможением ряда нейронных цепей, благодаря чему, в то время, когда выполняется непрерывная задача по извлечению информации из памяти, лобные области меньше вовлекаются в новые действия. Во время восприятия речевых сигналов поступающие звуки также запускают каскад операций извлечения из памяти, которые делают доступными фонологические, синтаксические и семантические свойства отдельных слов [11]. Таким образом, большая мощность ЭЭГ в альфа-диапазоне в лобных областях коры у детей 7–10 лет по сравнению с дошкольниками может указывать на формирование более зрелых, сходных с таковыми у взрослых, нейрофизиологических механизмов извлечения информации из памяти при восприятии речи.

Особо можно выделить десинхронизацию в альфа-диапазоне ЭЭГ, выявленную в центральных зонах неокортекса. Такая десинхронизация наблюдалась в отведениях Cz и C3 как в группе дошкольников, так и у младших школьников, причем, межгрупповых различий найдено не было. Десинхронизацию в указанных отведениях при восприятии речи рассматривают как реакцию разновидности альфа-ритма — мю-ритма, и ассоциируют с активацией моторных зон мозга, участвующих не только в процессах продукции речи, но и в ее понимании [35, 37–39]. Также вовлечение моторных зон в процесс восприятия слов-существительных может быть вызвано активацией моторного репертуара [16, 40], связанного с этими словами (мяч — пинать, бросать, ловить; карандаш — рисовать, держать, сжимать и т. д.).

Только в группе детей школьного возраста во время прослушивания слов наблюдалась синхронизация бета-ритма, представленная отдельными всплесками и наиболее выраженная в лобных отведениях (рис. 2b). Всплески бета-ритма, длящиеся всего несколько сотен миллисекунд, выявлены у взрослых при выполнении задач, требующих участия рабочей памяти [41]. Как считают, они отражают мгновенное обновление или реактивацию содержимого памятного следа. Вслед за другими авторами, сравнивавшими паттерны ЭЭГ при восприятии речи у детей и взрослых [5], мы также предполагаем, что по мере процесса взросления обработка речи у детей все в большей степени вовлекает мозговые механизмы, функционирование которых проявляется в реактивности бета-ритма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ динамики ЭЭГ при восприятии слов у всей выборки детей дошкольного и младшего школьного возраста выявил увеличение мощности в диапазоне тета-активности во временном интервале 200–800 мс после начала стимула в лобных, центральных и височных отведениях обоих полушарий. Усиление тета-осцилляций сочеталось с двусторонней десинхронизацией активности в альфа- и бета-диапазонах, наиболее выраженной в лобных и центральных зонах.

У детей 4–6 лет процесс обработки слов отражается в охватывающей большинство отведений десинхронизации альфа-активности, более выраженной, чем у детей школьного возраста. Такие особенности паттерна реактивности ЭЭГ могут быть связаны с большим вовлечением ресурсов головного мозга для обеспечения требуемых процессов внимания, а также с активацией у дошкольников моторных артикуляционных зон.

Для реакций ЭЭГ детей 7–10 лет при восприятии слов свойственна более выраженная, чем у дошкольников, двусторонняя тета-синхронизация. Такие особенности реактивности ЭЭГ указывают на повышенную интенсивность лексико-семантических операций поиска и извлечения слов из памяти. Кроме того, у детей данной группы наблюдалась синхронизация бета-колебаний, представленная отдельными вспышками и наиболее выраженная в лобных отведениях. Таким образом, обработка речи у детей младшего школьного возраста частично вовлекает характерные для взрослых мозговые механизмы, функционирование которых проявляется в реактивности бета-осцилляций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным комитетом по биоэтике Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (Симферополь), протокол заседания комитета № 10 от 4 ноября 2019 г.

Информированное согласие. Каждый родитель участника исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

М.А.Н. — набор и обработка данных, написание статьи. Д.В.Н. — обработка данных, написание статьи. В.Б.П. — планирование исследования, написание статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского, ФГАОУ ВО “КФУ им. В.И. Вернадского”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tincoff R, Jusczyk PW* (2012) Six-month-olds comprehend words that refer to parts of the body. *Infancy* 17(4): 432–444.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-7078.2011.00084.x>

2. *Valleau MJ, Konishi H, Golinkoff RM, Hirsh-Pasek K, Arunachalam S* (2018) An eye-tracking study of receptive verb knowledge in toddlers. *J Speech Lang Hear Res* 61(12): 2917–2933. https://doi.org/10.1044/2018_JSLHR-L-17-0363
3. *Fernald A, Marchman VA* (2012) Individual differences in lexical processing at 18 months predict vocabulary growth in typically developing and late-talking toddlers. *Child Dev* 83: 203–222. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2011.01692.x>
4. *Ference J, Curtin S* (2015) The ability to map differentially stressed labels to objects predicts language development at 24 months in 12-month-olds at high risk for autism. *Infancy* 20: 242–262. <https://doi.org/10.1111/infa.12074>
5. *Schneider JM, Abel AD, Ogiela DA, McCord C, Maguire MJ* (2018) Developmental differences in the neural oscillations underlying auditory sentence processing in children and adults. *Brain Lang* 186: 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2018.09.002>
6. *Panda EJ, Emami Z, Valiante TA, Pang EW* (2021) EEG phase synchronization during semantic unification relates to individual differences in children's vocabulary skill. *Dev Sci* 24(1): e12984. <https://doi.org/10.1111/desc.12984>
7. *Maguire MJ, Schneider JM, Melamed TC, Ralph YK, Poudel S, Raval VM, Mikhail D, Abel AD* (2022) Temporal and topographical changes in theta power between middle childhood and adolescence during sentence comprehension. *Dev Cogn Neurosci* 53: 101056. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2021.101056>
8. *Nunez PL, Srinivasan R* (2006) *Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG*. Oxford Univer Press. New York.
9. *Schneider J, Maguire M* (2018) Developmental differences in the neural correlates supporting semantics and syntax during sentence processing. *Dev Sci* 22(4): e12782. <https://doi.org/10.1111/desc.12782>
10. *Bastiaansen M, Hagoort P* (2015) Frequency-based segregation of syntactic and semantic unification during online sentence level language comprehension. *J Cogn Neurosci* 27(11): 2095–2107. https://doi.org/10.1162/jocn_a_00829
11. *Bastiaansen M, Van der Linden M, ter Keurs M, Dijkstra T, Hagoort P* (2005) Theta responses are involved in lexico-semantic retrieval during language processing. *J Cogn Neurosci* 17: 530–541. <https://doi.org/10.1162/0898929053279469>
12. *Lam NHI, Schoffelen JM, Uddén J, Hultén A, Hagoort P* (2016) Neural activity during sentence processing as reflected in theta, alpha, beta, and gamma oscillations. *NeuroImage* 142: 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.007>
13. *Klimesch W, Doppelmayr M, Wimmer H, Schwaiger J, Röhm D, Gruber W, Hutzler F* (2001) Theta band power changes in normal and dyslexic children. *Clin Neurophysiol* 112(7): 1174–1185. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(01\)00545-4](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(01)00545-4)
14. *Spironelli C, Angrilli A* (2010) Developmental aspects of language lateralization in delta, theta, alpha and beta EEG bands. *Biol Psychol* 85(2): 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.07.011>
15. *Wang L, Bastiaansen M* (2014) Oscillatory brain dynamics associated with the automatic processing of emotion in words. *Brain and Language* 137: 120. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2014.07.011>
16. *Saltuklaroglu T, Bowers A, Harkrider AW, Casenhiser D, Reilly KJ, Jenson DE, Thornton D* (2018) EEG mu rhythms: rich sources of sensorimotor information in speech processing. *Brain and Language* 187: 141. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2018.09.005>
17. *Thornton D, Harkrider AW, Jenson D, Saltuklaroglu T* (2018) Sensorimotor activity measured via oscillations of EEG mu rhythms in speech and non-speech discrimination tasks with and without segmentation demands. *Brain Lang* 187: 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2017.03.011>
18. *Belalov VV, Bazanova OM, Mikhailova AA, Dyagileva YuO, Pavlenko VB* (2020) EEG mu rhythm reactivity during speech perception in children aged from two to three years: influence of rearing conditions. *IP Pavlov J Higher Nervous Activity* 70(2): 193–205. <https://doi.org/10.31857/S0044467720020045>
19. *Lewis AG, Wang L, Bastiaansen M* (2015) Fast oscillatory dynamics during language comprehension: Unification versus maintenance and prediction? *Brain Lang* 148: 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2015.01.003>
20. *Lewis AG, Schoffelen JM, Schriefers H, Bastiaansen M* (2016) A predictive coding perspective on beta oscillations during sentence-level language comprehension. *Front Hum Neurosci* 10: 85. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00085>
21. *Schneider JM, Abel AD, Momsen J, Melamed TC, Maguire MJ* (2021) Neural oscillations reveal differences in the process of word learning among school-aged children from lower socioeco-

- onomic status backgrounds. *Neurobiol Lang* (Camb) 2(3): 372.
https://doi.org/10.1162/nol_a_00040
22. Степаненко ДГ, Сагутдинова ЭШ (2010) О классификациях нарушения речи в детском возрасте. *Клин мед* 2: 32–43. [Stepanenko DG, Sagutdinova ESh (2010) About speech/ language disorders classifications in childhood. *Klin Med* 2: 32–43. (In Russ)].
 23. Jiang Z, Waters AC, Liu Y, Li W, Yang Y (2017) Event-related theta oscillatory substrates for facilitation and interference effects of negative emotion on children's cognition. *Int J Psychophysiol* 116: 26.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2017.02.012>
 24. Craig AR, Fisher WW (2019) Randomization tests as alternative analysis methods for behavior-analytic data. *J Exp Anal Behav* 111(2): 309–328.
<https://doi.org/10.1002/jeab.500>
 25. Maris E, Oostenveld R (2007) Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neurosci Methods* 164(1): 177–190.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
 26. Brauer J, Friederici AD (2007) Functional neural networks of semantic and syntactic processes in the developing brain. *J Cogn Neurosci* 19(10): 1609–1623.
<https://doi.org/10.1162/jocn.2007.19.10.1609>
 27. Friederici AD, Brauer J, Lohmann G (2011) Maturation of the language network: from inter-to intrahemispheric connectivities. *PLoS One* 6(6): e20726.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020726>
 28. Holland SK, Vannest J, Mecoli M, Jacola LM, Tillema JM, Karunanayaka P, Schmithorst VJ, Yuan W, Plante E, Byars AW (2007) Functional MRI of language lateralization during development in children. *Int J Audiol* 46(9): 533–551.
<https://doi.org/10.1080/14992020701448994>
 29. Walenski M, Europa E, Caplan D, Thompson CK (2019) Neural networks for sentence comprehension and production: An ALE-based meta-analysis of neuroimaging studies. *Human Brain Mapping* 40(8): 2275.
<https://doi.org/10.1002/hbm.24523>
 30. Stroganova TA, Komarov KS, Goiaeva DE, Obukhova TS, Ovsianikova TM, Prokofyev AO, Orekhova EV (2021) The effect of periodicity and “vowelness” of a sound on cortical auditory responses in children. *IP Pavlov J Higher Nervous Activity* 71(4): 563–577.
<https://doi.org/10.1007/s11055-022-01253-z>
 31. Stankova EP, Guillemard DM, Galperina EI (2020) Morpho-functional basis of complex sentence processing in adults and children. *Human Physiol* 46(3): 332–342.
<https://doi.org/10.1134/S0362119720030135>
 32. Klimesch W (1999) EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev* 29(2-3): 169–195.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00056-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00056-3)
 33. Cellier D, Riddle J, Petersen I, Hwang K (2021) The development of theta and alpha neural oscillations from ages 3 to 24 years. *Dev Cogn Neurosci* 50: 100969.
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2021.100969>
 34. Meng X, Sun C, Du B, Liu L, Zhang Y, Dong Q, Georgiou GK, Nan Y (2022) The development of brain rhythms at rest and its impact on vocabulary acquisition. *Dev Sci* 25(2): e13157.
<https://doi.org/10.1111/desc.13157>
 35. Oliveira DS, Saltuklaroglu T, Thornton D, Jenson D, Harkrider AW, Rafferty MB, Casenhiser DM (2021). Mu rhythm dynamics suggest automatic activation of motor and premotor brain regions during speech processing. *J Neurolinguist* 60: 101006.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroling.2021.101006>
 36. Sauseng P, Klimesch W, Doppelmayr M, Pecherstorfer T, Freunberger R, Hanslmayr S (2005) EEG alpha synchronization and functional coupling during top-down processing in a working memory task. *Hum Brain Mapp* 26(2): 148–155.
<https://doi.org/10.1002/hbm.20150>
 37. Smalle EH, Rogers J, Mottonen R (2015) Dissociating Contributions of the Motor Cortex to Speech Perception and Response Bias by Using Transcranial Magnetic Stimulation. *Cereb Cortex* 25(10): 3690–3698.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhu218>
 38. Liebenthal E, Möttönen R (2018) An interactive model of auditory-motor speech perception. *Brain Lang* 187: 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.bandl.2017.12.004>
 39. Knyazev GG (2022) Coding the meaning in brain activity. *IP Pavlov J Higher Nervous Activity* 72(6): 800–825.
<https://doi.org/10.31857/S004446772206003X>

40. *Arévalo AL, Baldo JV, Dronkers NF* (2012) What do brain lesions tell the human mirror neuron system and us about theories of embodied semantics? *Cortex* 48(2): 242–254.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2010.06.001>
41. *Spitzer B, Haegens S* (2017) Beyond the Status Quo: A Role for Beta Oscillations in Endogenous Content (Re)Activation. *eNeuro* 4(4): ENEURO.0170–17.2017.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0170-17.2017>

Words Listening Related Electroencephalography Reactivity in Children of Preschool and Primary School Age

M. A. Nacharova^{a, *}, D. V. Nacharov^b, and V. B. Pavlenko^a

^a*Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

^b*Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

^{*}*e-mail: alikina93@gmail.com*

An analysis was made of event-related changes in the electroencephalogram (EEG) spectrum during the auditory perception of nouns in 83 typically developing children aged 4 to 10 years, including 50 children of preschool age and 33 children of primary school age. Following intergroup differences were revealed: in preschool children, neuronal systems are more involved in word processing, the activity of which is reflected in extensive desynchronization of alpha and synchronization of theta activity in the frontal zones of the left hemisphere. The EEG reactivity of primary school children is characterized by bilateral and more pronounced theta synchronization, which indicates an increased intensity of lexico-semantic operations, as well as a decrease in the background and an increase in the evoked theta activity. In children of this group, EEG synchronization in the beta range was also observed, represented by separate flashes and most pronounced in the frontal leads, which is typical for more mature speech processing mechanisms. The study results are important for clarifying the mechanisms of speech understanding in typically developing preschool and primary school age children.

Keywords: speech perception, preschool and primary school age children, EEG, theta activity, alpha activity, beta activity

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КРЫС В ГОРАХ И НА РАВНИНЕ
НА РАЗВИТИЕ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА
И ЯЗВООБРАЗОВАНИЕ В ЖЕЛУДКЕ**

© 2023 г. Т. Т. Подвигина^{1, *}, О. П. Комкова¹, О. В. Ветровой^{1, 2},
Н. И. Ярушкина¹, Л. П. Филаретова¹

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: podviginatt@infran.ru

Поступила в редакцию 13.08.2023 г.

После доработки 17.09.2023 г.

Принята к публикации 19.09.2023 г.

Гипоксия может корректировать развитие диабета и его осложнений у животных и человека, а диабет усугубляет язвообразование в желудке. Однако влияние гипоксии на язвообразование в желудке при диабете остается неизвестным. Задача работы состояла в сравнении влияния содержания крыс в горах при умеренной естественной гипоксии и на равнине на развитие диабета 1-го типа и язвообразование в желудке. Через 2 нед. после акклиматизации крыс к гипоксии (Приэльбрусье, 2125 м над уровнем моря) им вводили стрептозотцин (СТР, 50 или 70 мг/кг) или его растворитель. Одновременно крыс на равнине инъектировали СТР (или растворителем) в тех же дозах. Спустя 2 нед. на фоне 24-часового голодания крысам как в горах, так и на равнине, вводили индометацин (35 мг/кг), что приводило к образованию эрозий в слизистой оболочке желудка через 4 ч. Введение СТР (50 и 70 мг/кг) вызывало дозозависимое увеличение уровня глюкозы в крови у крыс как в горах, так и на равнине, что свидетельствует о развитии диабета разной степени тяжести. У крыс на равнине введение СТР (50 и 70 мг/кг) приводило к дозозависимому увеличению площади эрозий, индуцированных индометацином, по сравнению с контрольными животными (растворитель СТР). У крыс в горах наблюдалось усугубление повреждений слизистой оболочки желудка, вызванное индометацином, как у контрольных крыс (растворитель СТР), так и у животных со СТР-индуцированным диабетом по сравнению с повреждениями у крыс соответствующих групп на равнине. Наибольшее усиление проульцерогенного действия СТР в горах наблюдалось при его введении в дозе 70 мг/кг. Таким образом, постоянная умеренная гипоксия может приводить к усилению язвообразования в желудке, вызванного индометацином, у крыс с диабетом 1-го типа, и кроме того, сама по себе усугублять ульцерогенное действие индометацина.

Ключевые слова: горы, гипоксия, равнина, стрептозотцин, диабет, индометацин, эрозии желудка, крысы

DOI: 10.31857/S0869813923100096, EDN: QRCCBD

ВВЕДЕНИЕ

Диабет относится к числу заболеваний, приводящих к ранней инвалидности и смертности, при этом распространенность диабета во всем мире неуклонно растет.

Количество пациентов с сахарным диабетом в 2021 г. достигло 537 млн человек [1]. В Российской Федерации общая численность пациентов с диабетом к началу 2023 г. составила почти 5 млн человек (3.31% населения) [2].

Пропорционально росту распространенности диабета увеличивается и численность пациентов с тяжелыми сопутствующими осложнениями этого заболевания [3]. Ретинопатия, нефропатия, нейропатия — среди известных тяжелых последствий диабета [3]. Диабет является одной из ведущих причин слепоты [4], почечной недостаточности [5], сердечных приступов, инсульта [6], ампутации нижних конечностей [7].

Гипергликемия, развивающаяся при диабете, связана либо с неспособностью вырабатывать инсулин из-за потери бета-клеток поджелудочной железы (диабет 1-го типа) или из-за резистентности к инсулину (диабет 2-го типа). Несмотря на различие в этиологии заболевания, хроническая гипергликемия остается ключевой проблемой для всех типов диабета [3] и соответственно на нее направлены лечебные воздействия.

Превалирующими являются медикаментозные способы лечения диабета. Инсулиновая терапия, основанная на контроле уровня глюкозы в крови с помощью экзогенного инсулина, является доминирующим подходом при лечении диабета у человека и животных [8–12]. В настоящее время проводятся исследования, в которых ведется поиск более эффективных способов использования инсулина, среди них — способ его интраназального введения [13]. К числу перспективных подходов, направленных на лечение диабета, относятся также целенаправленная доставка антидиабетических факторов; заместительная терапия β -клетками путем трансплантации островковой ткани, терапия на основе генов и стволовых клеток, иммунотерапия и автоматизированное лечение с помощью искусственной поджелудочной железы и другие [14–17].

Наряду с использованием медикаментозных способов лечения диабета и его последствий, все большее внимание в настоящее время уделяется и немедикаментозным подходам. Общеизвестно, что физические упражнения, в частности бег, доступный и животным, и людям, ослабляет развитие диабета и сопутствующих осложнений [18, 19].

Среди разработок немедикаментозных подходов выделяется гипоксия. В литературе обсуждается вопрос о влиянии гипоксии на течение диабета. При этом данные противоречивы, что во многом объясняется разными моделями гипоксии: от апноэ во время сна [20], которое оказывает негативное влияние на организм, до искусственной гипоксии в барокамере, влияние которой зависит от используемой модели. Наиболее часто применяется периодическая гипоксия. Условия исследования в этой модели могут различаться по степени гипоксии, по продолжительности применения ежедневной гипоксии и по длительности ежедневного пребывания в камере (от минут до часов). Используют как нормобарическую (при нормальном давлении в камере снижают содержание кислорода в смеси газов), так гипобарическую гипоксию (снижение давления в камере, что приближает эту модель к условиям гор). Несмотря на эти различия в условиях исследований, имеется целый ряд работ, в которых показан корректирующий эффект периодической гипоксии на показатели метаболического синдрома и диабета 1-го и 2-го типа как у людей [21, 22], так и у животных [23, 24]. Для пациентов с диабетом более эффективным подходом к облегчению болезни считается сочетание гипоксии с физическими упражнениями [21, 25–27]. В экспериментах на крысах при метаболическом синдроме и диабете обнаружен позитивный эффект периодической гипоксии на сопутствующие осложнения сердечно-сосудистой системы [28, 29], почек [23], печени [23].

Исследования на людях проведены не только при искусственной гипоксии, в частности в барокамерах, но и при естественной — пребывании в горах. Обнаружен корректирующий эффект гипоксии на развитие диабета при длительной акклима-

тизации людей к среднегорью в сочетании с физической нагрузкой [26, 27]. Кроме того, показано, что в популяции населения, проживающего в горах Чили [30] или Китая [31], процент заболевания диабетом значительно ниже, чем по стране в целом. Эксперименты на животных, проведенные в условиях акклиматизации к гипоксии в горах, единичны [32], и они не связаны с диабетом и/или язвообразованием.

Диабет нарушает функционирование всех систем организма, в том числе и желудочно-кишечного тракта. Хотя термин “диабетическая гастропатия” [33], на наш взгляд, остается не таким распространенным как ретинопатия, нефропатия, нейропатия [3], но тем не менее, гастропатия при диабете — это не только патология, но и угроза жизни. При диабете усугубляется чувствительность слизистой оболочки желудка к повреждающим воздействиям в результате чего увеличивается риск язвообразования в желудке [33–39]. Язвообразование в желудке само по себе остается серьезной клинической проблемой [40], эта проблема значительно усугубляется для пациентов с диабетом [39], и, следовательно, требует разработки эффективных подходов к ее решению. Наши научные интересы связаны с исследованием язвообразования в желудке при диабете у экспериментальных животных, которые проводятся в разных аспектах [18, 34, 35, 41, 42], в том числе и в направлении поиска немедикаментозных подходов для профилактики и лечения язвообразования при диабете. В связи с этим нас интересовал вопрос, может ли такой немедикаментозный подход, как гипоксия, оказывающая влияние на развитие и течение диабета, влиять и на язвообразование в желудке.

Нам не удалось найти данных литературы о влиянии гипоксии на слизистую оболочку желудка при диабете. При этом мы нашли немногочисленные сведения о влиянии гипоксии самой по себе (без диабета) на слизистую оболочку желудка крыс. Согласно этим данным, гипоксия не только не оказывает позитивного влияния на чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным воздействиям, а наоборот, приводит к негативным эффектам. В частности, было показано ulcerогенное действие на желудок тяжелой гипоксии в барокамере самой по себе [43, 44].

Настоящая работа является первой по исследованию влияния гипоксии на язвообразование в желудке у животных с диабетом. Работа выполнена с использованием естественной умеренной гипоксии среднегорья.

Задача настоящей работы состояла в сравнении влияния содержания крыс в горах при умеренной естественной гипоксии и на равнине на развитие стрептозототин-индуцированного диабета и язвообразование в желудке.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Спрейг-Дули массой 240–270 г из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии РАН” (Колтуши, Ленинградская обл.). Для сравнительного исследования влияния содержания крыс в горах и на равнине на развитие стрептозототин-индуцированного диабета и язвообразование в желудке были использованы две группы крыс. Одна группа крыс была транспортирована в условия среднегорья: Приэльбрусье (п. Терскол). При транспортировке в Терскол наземным транспортом, которая заняла 2 дня, крысы находились при постоянном доступе к воде и пище. После прибытия на экспериментальную станцию в Терскол животные в течение двух недель акклиматизировались к умеренной естественной гипоксии условий среднегорья на высоте 2125 м над уровнем моря (что соответствует примерно 77% от нормоксического парциального давления кислорода [32]). Одновременно другая группа крыс, оставшаяся на равнине (Колтуши), после перемещения из институтского вивария в лабораторный также в течение двух недель адаптировалась к условиям лабораторного вива-

рия (соответственно это группа неакклиматизированных к гипоксии животных). И в горах, и на равнине крысы содержались по 5 особей в клетке в стандартных лабораторных условиях: температура 21–22°C, световой режим 12 ч:12 ч (включение света в 8 ч, выключение в 20 ч).

Диабет 1-го типа был индуцирован введением стрептозотоцина (СТР) (Sigma-Aldrich, Германия). Введение СТР является широко распространенной экспериментальной моделью инсулин-зависимого диабета [45].

Для развития диабета 1-го типа разной степени тяжести СТР вводили в двух дозах: 50 или 70 мг/кг (3 мл/кг), внутривентриально. Контрольным крысам вводили растворитель СТР: 0.1 М цитратный буфер (pH 5.0) в таком же объеме.

В качестве ulcerогенного стимула использовали нестероидный противовоспалительный препарат (НСПВП) — индометацин (ИМ) (Sigma-Aldrich, Германия), который вводили в дозе 35 мг/кг (5 мл/кг) подкожно предварительно голодавшим 24 ч крысам. Выбор ИМ для ulcerогенеза определялся клинической значимостью: использование НСПВП в клинике является одной из наиболее распространенных причин повреждения желудочно-кишечного тракта [39, 46]. Согласно результатам наших предыдущих исследований, введение ИМ в данной дозе приводит к образованию хорошо видимых геморрагических эрозий в слизистой оболочке желудка через 4 ч после его введения [47]. Контрольным животным вводили растворитель ИМ (физиологический раствор с каплей Твина) в таком же объеме.

Через две недели после акклиматизации крыс к гипоксии в горах или адаптации к лабораторным условиям на равнине животные каждой группы были разделены на четыре подгруппы. Введение препаратов каждой подгруппе осуществлялось в следующей комбинации: 1) растворитель СТР + растворитель ИМ; 2) растворитель СТР + ИМ, 3) СТР в дозе 50 мг/кг + ИМ, 4) СТР в дозе 70 мг/кг + ИМ. Первая, контрольная, подгруппа (растворитель СТР + растворитель ИМ) была создана для сравнения базального уровня кортикостерона и связанных с ним показателей (относительная масса надпочечников и тимуса) у крыс, находящихся в горах и на равнине. Кроме того, с использованием этой контрольной группы проверяли возможность влияния гипоксии самой по себе (без диабета и ИМ) на слизистую оболочку желудка.

Для наблюдения за развитием диабета в динамике у крыс определяли уровень глюкозы в крови и массу тела. Глюкозу измеряли в капле крови, взятой из хвостовой вены крыс до введения СТР и после его введения на 3-й, 7-й, 13-й (до голода) дни и на 14-й день (после голода). Массу тела крыс измеряли перед введением СТР (1-й день), на 13-й и 14-й дни после введения СТР. На 13-й день после тестирования уровня глюкозы и взвешивания у всех крыс убирали пищу, оставляя при этом воду. После 24-часового голодания на 14-й день крысам трех подгрупп (за исключением 1-й подгруппы: растворитель СТР + растворитель ИМ) вводили ИМ в ulcerогенной дозе (35 мг/кг) и убирали воду. Через 4 ч после введения ИМ или его растворителя крыс декапитировали.

После декапитации собирали пробы крови для определения уровней кортикостерона и глюкозы в крови, извлекали желудок для оценки состояния его слизистой оболочки, а также тимус и надпочечники для определения их массы. Площадь эрозий оценивали на основании фотографий желудков с помощью модифицированной компьютерной программы Image J [48]. Оценивали относительную (по отношению к массе тела) массу тимуса и надпочечников. Содержание глюкозы определяли с помощью тест-полосок системы (One Touch Ultra, США). Уровень кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора реагентов “Кортикостерон крыса/мышь-ИФА” (“ХЕМА”).

Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Данные были проанализированы с помощью программы MedCalc 12.7.0.0. (Статистика для

биомедицинских исследований, MedCalc Software, Бельгия). Двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (Repeated measures ANOVA) использовали для анализа данных об изменении уровня глюкозы. Сравнение площадей язв, уровней кортикостерона и соматических показателей осуществлялось с помощью теста Kruskal–Wallis. Различия между группами считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение СТР в дозах 50 и 70 мг/кг крысам, находящимся как на равнине, так и в горах, привело к дозозависимому увеличению уровня глюкозы в крови, что свидетельствует о развитии диабета разной степени тяжести. Повышенный уровень глюкозы наблюдался уже через 3 дня после введения СТР (50 или 70 мг/кг), и в этой временной точке после введения СТР в определенной дозе не было обнаружено достоверных отличий между уровнями глюкозы у крыс, находящихся в условиях среднегорья и на равнине (рис. 1а, б). На 13-й день исследования после введения СТР в дозе 70 мг/кг уровень глюкозы у крыс в горах также достоверно не отличался от такового у крыс на равнине. Однако на 13-й день после введения СТР в дозе 50 мг/кг уровень глюкозы у крыс, находящихся в горах, был достоверно ниже уровня глюкозы у крыс на равнине. Рис. 1с демонстрирует эти различия в уровнях глюкозы в горах и на равнине.

На 14-й день после 24-часового голодания наблюдалось падение уровня глюкозы ниже исходного базального уровня (до введения СТР) как в горах ($p < 0.001$), так и на равнине ($p < 0.001$). Однако снижение уровня глюкозы в горах было больше по сравнению с уровнем на равнине (рис. 2), при этом были обнаружены также отличия между уровнями глюкозы внутри групп, находящихся в горах и на равнине (Kruskal–Wallis test, $p < 0.001$): у крыс с введением СТР в дозе 70 мг/кг (на равнине) и в дозе 50 мг/кг (в горах) уровни глюкозы были выше по сравнению с соответствующим контролем (рис. 2). Обращаем внимание на наиболее ярко выраженную разницу в средних уровнях глюкозы у крыс в среднегорье и равнине в подгруппах с введением СТР в дозе 70 мг/кг. Данные, представленные на рис. 2, являются детализацией временной точки 14-й день на рис. 1а, б.

Введение СТР в двух дозах (50 и 70 мг/кг) крысам, находящимся на равнине, привело к дозозависимому увеличению площади эрозий в слизистой оболочке желудка, индуцированных ИМ, по сравнению с этим показателем у контрольных животных с введением растворителя СТР (рис. 3). В сравнении с крысами на равнине у животных, акклиматизированных в течение двух недель к условиям среднегорья, наблюдалось усугубление повреждений слизистой оболочки желудка, вызванное ИМ, причем не только у крыс с диабетом, но и у контрольных животных (рис. 3), т.е. проульцерогенный эффект наблюдался при этом независимо от того, вводили СТР или нет. Наиболее ярко это усугубление проявилось у контрольных животных и у крыс с введением СТР в дозе 70 мг/кг: средняя площадь эрозий у контрольных крыс и крыс с введением СТР в дозе 70 мг/кг в горах существенно превышала площадь эрозий в соответствующих группах на равнине. При этом важно отметить, что крысы подгруппы с введением СТР в дозе 70 мг/кг в горах отличались максимальной средней площадью ИМ-индуцированных эрозий, резко превышающей таковую у всех других подгрупп (рис. 3). Введение СТР в дозе 50 мг/кг крысам в горах, хотя и приводило к большей площади эрозий по сравнению с таковой у крыс на равнине (СТР 50 мг/кг), однако не вызывало достоверных различий по сравнению с этим показателем у контрольных крыс (введение растворителя СТР), находящихся также в горах (рис. 3). У контрольных крыс 1-й подгруппы

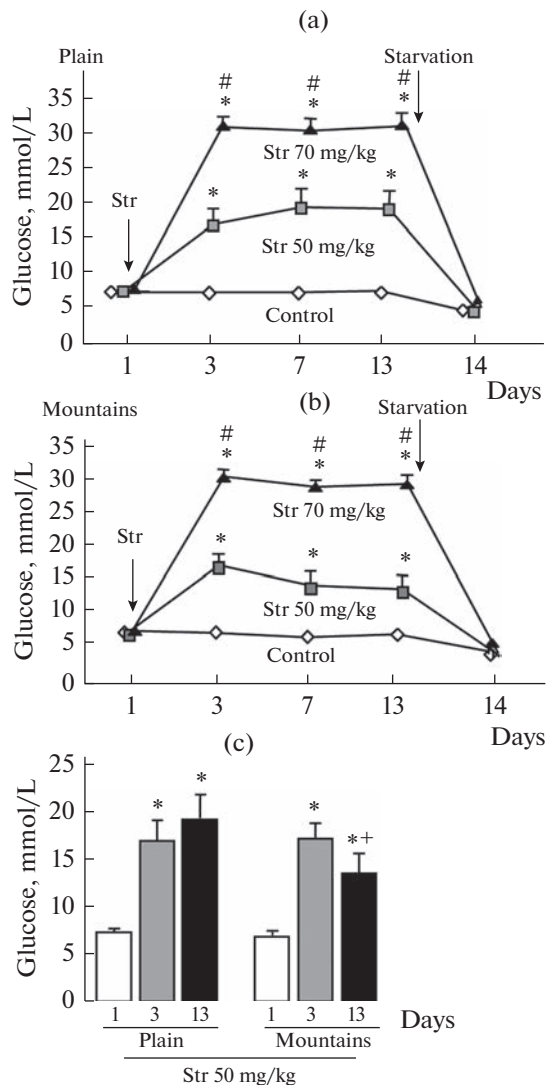


Рис. 1. Динамика уровней глюкозы в крови у крыс, находящихся на равнине (а) и в горах (б) после введения СТР или его растворителя. (с) – Сравнение уровней глюкозы в горах и на равнине. На (а, б) – Контроль – введение растворителя СТР; СТР 50, СТР 70 – введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг. Repeated measures Anova: (а) – group $F_{2,40} = 42.75$ ($p < 0.001$); time $F_{4,40} = 113.7$ ($p < 0.001$); group $\times$ time $F_{8,40} = 496.64$ ($p < 0.001$); (б) – group $F_{2,40} = 71.62$ ($p < 0.001$); time $F_{4,40} = 158.7$ ($p < 0.001$); group $\times$ time $F_{4,40} = 42.19$ ($p < 0.001$). Достоверность отличий между группами в каждой временной точке при $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test): * – от контроля (равнина или горы), # – от дозы СТР 50 мг/кг (равнина или горы), + – от соответствующего значения в группе “Равнина”. Количество случаев (n) в группе 10–15.

(растворитель СТР + растворитель ИМ), также подвергнутых 24-часовому голоданию, не было обнаружено эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка.

Средние базальные уровни кортикостерона у контрольных крыс (растворитель СТР + растворитель ИМ) в горах и на равнине достоверно не отличались друг от друга и составляли 12.5 ± 1.3 ($n = 5$) и 16.4 ± 2.1 мкг/дл ($n = 5$) соответственно.

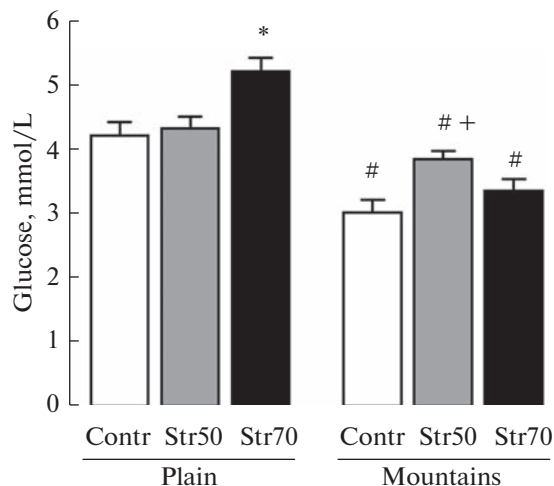


Рис. 2. Средние уровни глюкозы в крови после 24 ч голодания (через 4 ч после введения индометацина) у крыс, находящихся на равнине и в горах, на 14-й день после введения СТР или его растворителя. Контр (контроль) – введение растворителя СТР; СТР 50, СТР 70 – введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг. Достоверность отличий при $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test): * – от всех групп, # – от соответствующей группы на равнине, + – от контроля (горы). Количество случаев (n) в группе 10–15.

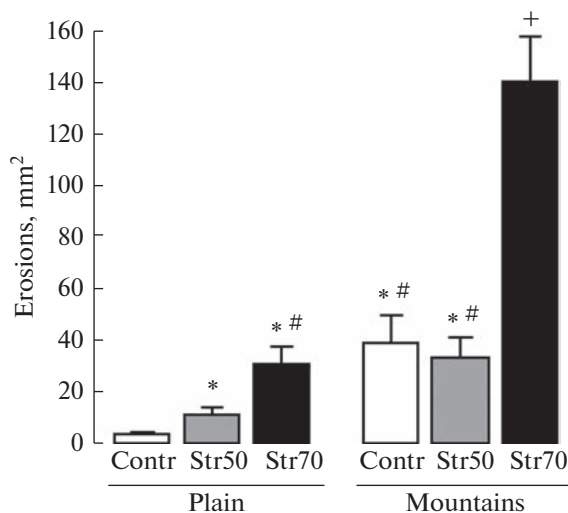


Рис. 3. Средняя площадь эрозий слизистой оболочки желудка, индуцированных введением индометацина (35 мг/кг, подкожно), у крыс после введения СТР или его растворителя в горах и на равнине. Контр (контроль) – введение растворителя СТР; СТР 50, СТР 70 – введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг. Достоверность отличий при $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test): * – от контроля (равнины), # – от дозы СТР 50 мг/кг (равнины), + – от всех групп. Количество случаев (n) в группе 5–13.

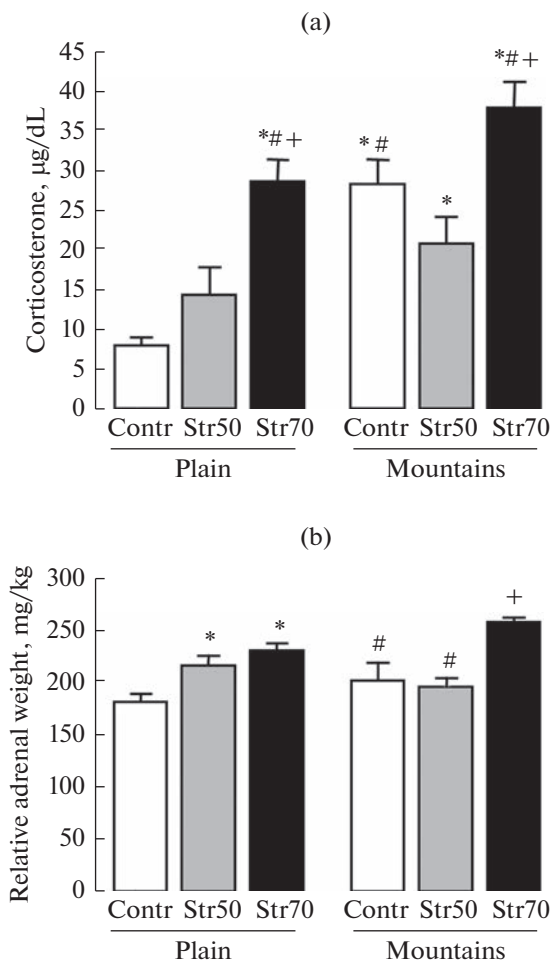


Рис. 4. Средние уровни кортикостерона в плазме крови (а) и относительная масса надпочечников (б) через 4 ч после введения индометацина у крыс с предварительным введением СТР (или его растворителя). Контр (контроль) – введение растворителя СТР; СТР 50, СТР 70 – введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг. Достоверность отличий при $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test): (а) – * от контроля (равнины), # – от дозы СТР 50 мг/кг (равнины), + – от дозы СТР 50 мг/кг (горы); (б) – * от контроля (равнины), # – от дозы СТР 70 мг/кг (равнины), + – от всех групп. Количество случаев (n) в группе 5–13 (а); 5 – 8 (б).

Не было выявлено также достоверных различий у крыс в горах и на равнине по средним показателям относительной массы надпочечников (19.3 ± 1.4 ($n = 5$) и 18.7 ± 1.4 мг/100 г ($n = 5$) соответственно) и тимуса (242.6 ± 31.6 ($n = 5$) и 235 ± 12.8 мг/100 г ($n = 5$) соответственно).

На рис. 4а представлены средние уровни кортикостерона у крыс разных подгрупп через 4 ч после введения ИМ. После введения СТР в дозе 70 мг/кг средний уровень кортикостерона в плазме крови у крыс на равнине был достоверно повышен по сравнению с уровнем у контрольных животных (рис. 4а). Кроме этого увеличения, ярко выраженные изменения уровня кортикостерона наблюдались у контрольных животных (растворитель СТР + ИМ) в горах: средний уровень кортико-

стерона у них в горах значительно превышал таковой у подобной подгруппы контрольных крыс на равнине и не отличался от высокого уровня кортикостерона, выявленного у крыс на равнине после введения СТР в дозе 70 мг/кг (рис. 4а). В то же время уровни кортикостерона у крыс в горах после введения СТР в обеих дозах достоверно не отличались как от высокого уровня в своей контрольной подгруппе, так и от соответствующих уровней гормона (после введения СТР) на равнине (рис. 4а).

Введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг привело к увеличению относительной массы надпочечников на равнине (рис. 4б). В условиях среднегорья наблюдалось еще большее увеличение относительной массы надпочечников у крыс после введения СТР в дозе 70 мг/кг по сравнению с этим показателем у крыс, находящихся на равнине, а также по сравнению с этим показателем у контрольных крыс и у животных с введением СТР в дозе 50 мг/кг в своей подгруппе (рис. 4б).

У контрольных животных (растворитель СТР + ИМ), находящихся в горах и на равнине не выявлено достоверных различий в приросте массы тела. У животных, находящихся на равнине, введение СТР в дозах 50 и 70 мг/кг привело к дозозависимому снижению прироста массы тела за 13 дней исследования после введения СТР по сравнению с этим показателем у контрольных крыс (растворитель СТР + ИМ). У крыс, акклиматизированных к условиям среднегорья, после введения СТР в дозе 50 мг/кг наблюдался достоверно больший прирост массы тела по сравнению с этим показателем у крыс на равнине (также после введения СТР в дозе 50 мг/кг), причем прирост массы тела в горах не отличался от такового в своей контрольной группе (рис. 5а). После введения СТР в дозе 70 мг/кг у крыс в горах прирост массы тела был минимальным по сравнению с таковым у всех других подгрупп в горах и на равнине.

Относительная масса тимуса у всех подгрупп крыс в горах не отличалась от относительной массы тимуса крыс, находящихся на равнине (рис. 5б). Как в горах, так и на равнине относительная масса тимуса у крыс после введения СТР в дозе 70 мг/кг была снижена по сравнению с этим показателем у контрольных крыс (растворитель СТР + ИМ) и у животных после введения СТР в дозе 50 мг/кг (рис. 5б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате сравнительного изучения влияния условий содержания крыс в горах (высота 2125 м над уровнем моря) и на равнине на развитие СТР-индуцированного диабета и на язвообразование в желудке был выявлен новый факт, свидетельствующий о повышении чувствительности слизистой оболочки желудка к повреждающему действию ИМ в условиях среднегорья как у контрольных крыс (растворитель СТР), так и у животных со СТР-индуцированным диабетом по сравнению с этим показателем у крыс, находящихся на равнине.

Наиболее ярко выраженное различие проявилось в резком усилении проульцерогенного действия СТР, введенного в дозе 70 мг/кг, у крыс, находящихся в условиях среднегорья. У этих животных наблюдалась максимальная средняя площадь ИМ-индуцированных эрозий по сравнению с таковой у всех других подгрупп, а также минимальный прирост массы тела. Резкое повышение чувствительности слизистой оболочки желудка к ульцерогенному действию ИМ в условиях среднегорья выявлено и у контрольных крыс без диабета: средняя площадь эрозий у этих животных в несколько раз превышала таковую у крыс на равнине и была сопоставима со средней площадью эрозий у крыс на равнине после введения СТР в дозе 70 мг/кг.

Одной из возможных причин повышения чувствительности слизистой оболочки к ульцерогенному действию ИМ у крыс в горах может являться гипоксия, поскольку известно, что для поддержания защитной функции слизистой оболочки желудка

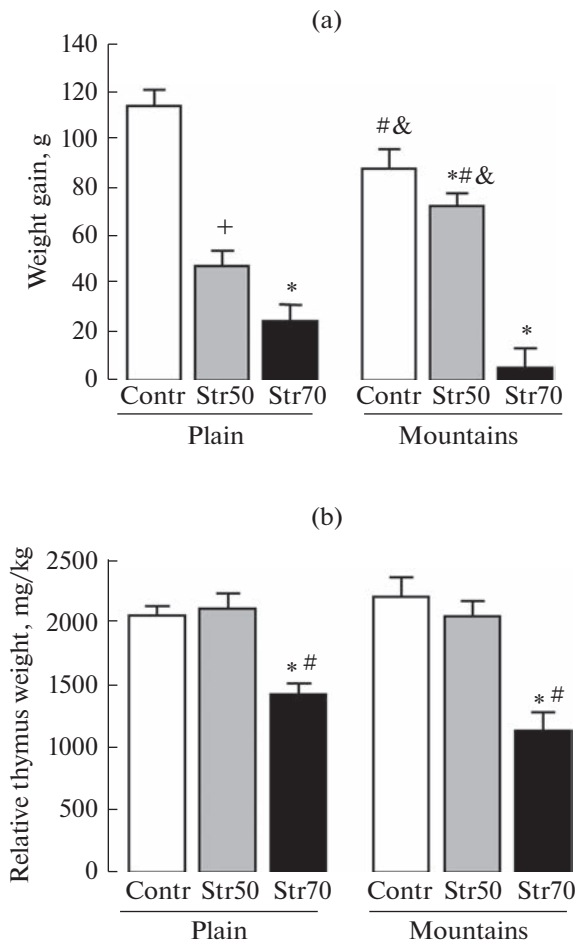


Рис. 5. Влияние пребывания крыс в горах и на равнине на прирост массы тела (а) и относительную массу тимуса (б) после введения СТР или его растворителя. Контр (контроль) — введение растворителя СТР; СТР 50, СТР 70 — введение СТР в дозе 50 или 70 мг/кг. Прирост массы тела рассчитывали у каждого животного как разность между массой тела на 1-й и 13-й день после введения СТР (до голода). Тимус был извлечен через 4 ч после введения ИМ на 14-й день после введения СТР у предварительно голодавших 24 ч крыс. Достоверность отличий при $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test): (а) — * от контроля (равнины), # — от дозы СТР 70 мг/кг (равнины); & — от дозы СТР 70 мг/кг (горы); + — от всех групп; (б) — * от контроля (равнины и горы), # — от дозы СТР 50 мг/кг (равнины и горы). Количество случаев (n) в группе 10–15 (а); 5–8 (б).

необходимо ее нормальное снабжение кислородом [49]. Полученные нами данные о проульцерогенном влиянии гипоксии на желудок самой по себе (без диабета) находятся в соответствии с результатами немногочисленных работ об ульцерогенном действии гипоксии в камере. Было показано, что жесткая гипоксия в камере, соответствующая пребыванию крыс на высоте 5000 м и продолжающаяся 6 дней, сама по себе приводит к появлению эрозий слизистой оболочки желудка [43]. Согласно нашим результатам, даже умеренная естественная гипоксия на высоте 2125 м над уровнем моря, но продолжающаяся 2 недели, может оказывать проульцерогенное

действие в условиях ИМ-индуцированного язвообразования. Из данных литературы известно, что продолжительность гипоксии влияет на степень изъязвления слизистой оболочки желудка. Показана зависимость ulcerогенного влияния постоянной достаточно жесткой гипоксии (10% кислорода) от продолжительности (1, 7, 14 и 21 день) пребывания крыс в камере [44]. Представленные данные о влиянии гипоксии на желудок (в камере), как и результаты нашей работы, получены в условиях постоянной гипоксии. Данных о влиянии периодической гипоксии на желудок в литературе нам найти не удалось.

Согласно полученным данным, гипоксия может вносить свой вклад в усугубление ИМ-индуцированных эрозий у крыс как без диабета, так и с диабетом. При анализе причин усугубления именно ИМ-индуцированных эрозий у крыс следует принимать во внимание, что введение ИМ приводит к дефициту важнейших гастропротективных факторов простагландинов [50], дефицит этот в условиях гипоксии может быть особенно опасен из-за предотвращения реализации возможных адаптивных реакций.

Критически важными для адаптивного ответа на гипоксию являются факторы, индуцируемые гипоксией (HIF), факторы транскрипции [51]. В качестве основного механизма позитивного влияния гипоксии на показатели метаболического синдрома и диабета рассматривается повышение образования HIF1a и HIF2a, приводящего к увеличению экспрессии ростовых факторов, способствующих ангиогенезу, а также других белков для адаптации организма к гипоксии [22, 23, 28, 52]. Существует мнение, что индуцированная гипергликемией репрессия HIF при диабете может быть одной из причин осложнений при этой патологии [53]. Хотя при рассмотрении механизмов влияния гипоксии самой по себе на функционирование разных систем организма роль HIF достаточно активно обсуждается, в отношении его влияния на язвообразование в желудке данные немногочисленны. Показан вклад HIF в заживление язв желудка у крыс за счет увеличения экспрессии ростовых факторов и усиления ангиогенеза [54, 55].

В настоящее время хорошо известным эффектом СТР-индуцированного диабета (без гипоксии), продемонстрированным в настоящей работе и в наших предыдущих исследованиях [34, 41, 42], является его проульцерогенный/ульцерогенный эффект на желудок [33, 36–38, 45]. Впервые об этом сообщили, обнаружив спонтанное язвообразование в желудке у крыс со СТР-индуцированным диабетом после их голодания [56]. Позднее Takeuchi и соавт. подтвердили этот факт (на модели СТР-индуцированного диабета, СТР 70 мг/кг, с 18-часовым голоданием) и дополнительно показали, что резкое падение уровня глюкозы в крови во время голодания диабетических крыс может являться причиной появления повреждений в желудке [45]. В последующие годы это было подтверждено другими исследователями [57, 58], которые, кроме того, обнаружили, что гипогликемия, развивающаяся вследствие 24-часового голодания у крыс с диабетом, приводит к значительной потере гликопротеинов, входящих в состав слизи [58], и, следовательно, истощению защитного слоя слизи, что, в свою очередь, способствует ульцерогенезу. Исходя из этих данных, можно предположить, что наблюдающееся в наших экспериментах достоверно большее снижение уровня глюкозы после 24 ч голодания у крыс в горах по сравнению со снижением у крыс на равнине, также могло вносить свой вклад в усугубление ульцерогенного действия ИМ в горах, в том числе и за счет большего дефицита гликопротеинов в этих условиях. Полученные нами результаты о проульцерогенном действии диабета на ИМ-индуцированные эрозии в желудке хорошо согласуются с данными литературы о проульцерогенном эффекте диабета при действии других ульцерогенных стимулов: стрессоров [59], ишемии-реперфузии [60]. Помимо негативного влияния на формирование повреждений слизистой оболочки желудка, диабет еще и замедляет их заживление [33, 37, 61].

Поскольку отсутствуют данные о сочетанном влиянии диабета и гипоксии на язвообразование в желудке и соответственно механизмах такого влияния, то при обсуждении возможных механизмов выявленных нами совместных эффектов, мы опираемся на данные о механизмах раздельного действия диабета и гипоксии. Интенсивное изучение возможных механизмов проульцерогенного действия диабета проводилось японскими исследователями Takeuchi и соавт., в результате чего было показано, что при СТР-индуцированном диабете (70 мг/кг) у крыс существенно ослабляются ключевые защитные механизмы слизистой оболочки желудка. В условиях диабета страдают ключевые факторы защиты кровоснабжение слизистой оболочки желудка [62] и слизисто-бикарбонатный барьер [61]. Выявлено, что ухудшение кровотока у крыс с диабетом связано с дисфункцией капсаицин-чувствительных афферентных нейронов (по выражению авторов, их диабетической десенситизацией) [62], которые, как известно, вносят важный вклад в гастропротекцию за счет поддержания кровотока [63]. При дисфункции капсаицин-чувствительных афферентных нейронов у крыс с диабетом ухудшается кровоток и снабжение тканей не только нутриентами, но и кислородом, что особенно опасно в условиях гипоксии. При этом следует помнить, что дополнительно к диабету и гипоксии в наших экспериментальных условиях существует еще и индуцированный ИМ дефицит простагландинов, который также сильно сказывается на ослаблении защитных механизмов слизистой оболочки. Все это, на наш взгляд, вносит вклад в то ярко выраженное усугубление ИМ-индуцированного изъязвления слизистой оболочки желудка, которое мы наблюдали у крыс с диабетом (СТР 70 мг/кг) в горах.

В горы крысы транспортировались. На наш взгляд, маловероятно, что выявленные в работе эффекты на язвообразование в желудке обусловлены этой транспортировкой, а не пребыванием крыс в горах. Во-первых, после транспортировки до введения СТР прошло две недели, во время которых крысы адаптировались к новым условиям среднегорья. Во-вторых, базальный уровень кортикостерона (без введения ИМ) не отличался у животных, находящихся на равнине и в горах. Более того, если даже обсуждать влияние стрессорного прекондиционирования, в качестве которого можно рассматривать транспортировку крыс, на язвообразование, то, согласно результатам наших исследований, стрессорное прекондиционирование оказывает гастропротективный эффект и не приводит к усугублению ИМ-индуцированного образования эрозий в желудке даже при ежедневном непредсказуемом предъявлении сильных стрессоров разной модальности в течение 14 дней [64–66]. Приведенные факты свидетельствуют в пользу того, что выявленные негативные различия связаны с условиями среднегорья и гипоксией.

Помимо негативных влияний условий среднегорья, в нашей работе выявлено и их позитивное влияние: через две недели после введения СТР в дозе 50 мг/кг обнаружено снижение уровня глюкозы в крови у крыс, находящихся в горах, по сравнению с таковым у крыс на равнине. Об общем позитивном влиянии условий среднегорья на организм крыс, которым вводили СТР в дозе 50 мг/кг, может свидетельствовать сохранение у них такого же прироста массы тела, как и у контрольных животных в горах, а также и увеличение прироста массы тела по сравнению с этим показателем у крыс на равнине. Кроме того, следует отметить, что именно у этой подгруппы крыс не наблюдалось усугубления ульцерогенного действия ИМ по сравнению с таковым у контрольных крыс (растворитель СТР), также находящихся в горах.

Введение СТР привело к дозозависимому повышению уровня глюкозы в крови у крыс, содержащихся как на равнине, так и в горах. Различия в развитии тяжести диабета после введения СТР в разных дозах (50 и 70 мг/кг) как в горах, так и на равнине, выявлены и по другим исследованным показателям. Пользуясь терминологией, используемой в работе [67], можно считать, что в нашем случае введение СТР

в дозе 50 мг/кг индуцировало “мягкий диабет 1-го типа”, а введение в дозе 70 мг/кг — “острый диабет 1-го типа”. Согласно полученным нами результатам, акклиматизация крыс к гипоксии в условиях среднегорья может смягчать развитие “мягкого диабета 1-го типа” и сопутствующих осложнений, и, наоборот, усугублять сопутствующие осложнения “острого диабета 1-го типа”.

Данные, характеризующие развитие диабета после введения СТР в дозе 70 мг/кг, полученные в нашей работе, соответствуют общепринятым в литературе критериям диабета 1-го типа [34, 36, 37, 42, 62].

Одним из признаков диабета, индуцированного СТР (70 мг/кг), является повышение уровня кортикостерона в крови у крыс, что было показано в наших предыдущих работах [34, 68] и подтверждено в настоящей работе. После введения СТР в дозе 70 мг/кг уровень кортикостерона в плазме крови у крыс (через 4 ч после введения ИМ) на равнине был повышен по сравнению с уровнем у контрольных животных. Существенные различия между среднегорьем и равниной по уровню кортикостерона обнаружены только у контрольных крыс (с введением ИМ): показано достоверное повышение среднего уровня кортикостерона в крови у крыс, находящихся в горах, по сравнению с этим показателем у крыс на равнине. Поскольку базальный уровень кортикостерона (без введения ИМ) не отличался у животных, находящихся на равнине и в горах, можно предположить, что повышенный уровень кортикостерона каким-то образом связан с сочетанным действием ИМ и гипоксии. Увеличенная масса надпочечников после введения СТР в дозе 70 мг/кг у крыс в горах по сравнению с этим показателем у крыс на равнине свидетельствует об усилении процессов, связанных с синтезом кортикостерона у этих животных.

Большинство работ, в которых выявлен позитивный эффект гипоксии на развитие диабета и сопутствующих осложнений, проведены в условиях периодической (прерывистой) гипоксии [22–24, 28, 29, 52]. Периодическая гипоксия используется также и для коррекции патологий, не связанных с диабетом. Кондиционирование периодической гипоксией, как немедикаментозным системным вмешательством, уменьшает повреждение головного мозга после инсульта, и может применяться для профилактики и функционального восстановления [69]. Прерывистая гипоксическая тренировка рассматривается в качестве способа повышения адаптационного потенциала, выносливости и работоспособности мозга [70]. Потенциал прерывистой гипоксии остается высоким, в том числе и для наших исследований.

Настоящая работа является первой из известных нам экспериментальных работ по исследованию влияния гипоксии на язвообразование в желудке при диабете. Значимость ее еще связана и с использованием естественной гипоксии в горах, что мы рассматриваем как редкую возможность. Работы по акклиматизации животных к гипоксии в горах единичны и связаны с изучением влияния гипоксии на функцию нервной системы [32]. В использованной нами естественной модели умеренной гипоксии, вызванной пребыванием крыс в горах на высоте 2125 м, показан проульцерогенный эффект гипоксии при ИМ-индуцированном язвообразовании не только у крыс с диабетом, но и у контрольных животных. Таким образом, постоянная умеренная гипоксия может приводить к усилению ИМ-индуцированного язвообразования в желудке у крыс с диабетом 1-го типа, и кроме того, сама по себе усугублять ульцерогенное действие ИМ.

С практической точки зрения эти результаты свидетельствуют о том, что людям с проблемами желудочно-кишечного тракта следует соблюдать осторожность (избегать голодания, применения НСПВП) при пребывании в горах даже в условиях умеренной гипоксии.

Перспектива этой работы видится в поиске режимов прерывистой гипоксии, при которых могут быть выявлены корректирующие эффекты гипоксии на развитие диабета и язвообразования в желудке, индуцированное стимулами разной мо-

дальности. При этом рациональным кажется и исследование сочетанного действия гипоксии и бега, гастропротективное действие которого выявлено в наших предыдущих исследованиях [18, 71].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводились с соблюдением этических стандартов, утвержденных правовыми актами Российской Федерации, принципов Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по содержанию и использованию животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 03/11 от 11.03.2021).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030 гг.), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.П.Ф., Т.Т.П.), проведение эксперимента (О.П.К., Т.Т.П., О.В.В.), обработка данных (Н.И.Я., О.П.К.), написание и редактирование рукописи (Т.Т.П., Л.П.Ф., Н.И.Я.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН: Т.И. Колбасовой, Л.А. Афанасьевой за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 183. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2021.109119>
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Видулова ОК, Железнякова АВ, Исаков МА, Сазонова ДВ, Мокрышева НГ (2023) Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. *Сахарный диабет* 26(2): 104–123. [Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, Mokrysheva NG (2023) Diabetes mellitus in the Russian Federation: dynamics of epidemiological indicators according to the Federal Register of Diabetes Mellitus for the period 2010–2022. *Diabetes mellitus* 26(2): 104–123. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/DM13035>
3. Reynolds L, Luo Z, Singh K (2023) Diabetic complications and prospective immunotherapy. *Front Immunol* 14: 1219598. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1219598>
4. Mahmood T, Fahim MF, Ahsan S, Qidwai U, Memon MS (2023) Ocular Complications Associated With Diabetes And The Risk Of Sustainable Blindness; A Real World Analysis. *J Pak Med Assoc* 73: 1453–1456. <https://doi.org/10.47391/JPMA.8001>
5. Vučić Lovrenčić M, Božičević S, Smirčić Duvnjak L (2023) Diagnostic challenges of diabetic kidney disease. *Biochem Med* 33(3): 030501. <https://doi.org/10.11613/BM.2023.030501>

6. Mosenzon O, Cheng AYY, Rabinstein AA, Sacco S (2023) Diabetes and Stroke: What Are the Connections? *J Stroke* 25: 26–38.
<https://doi.org/10.5853/JOS.2022.02306>
7. Armstrong DG, Tan T-W, Boulton AJM, Bus SA (2023) Diabetic Foot Ulcers: A Review. *JAMA* 330: 62.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.2023.10578>
8. Home P (2021) The evolution of insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract* 175: 108816.
<https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2021.108816>
9. Phadtare P, Patil D, Desai S (2023) Nanotechnology: Newer Approach in Insulin Therapy. *Pharm Nanotechnol* 11: 3–9.
<https://doi.org/10.2174/2211738510666220928111142>
10. Sakurai T, Kubota S, Kato T, Yabe D (2023) Advances in insulin therapy from discovery to β cell replacement. *J Diabetes Investig* 14: 15–18.
<https://doi.org/10.1111/JDI.13902>
11. Захарова ИО, Баюнова ЛВ, Деркач КВ, Илясов ИО., Шпаков АО, Аврова НФ (2022) Влияние интраназально вводимых инсулина и ганглиозидов на метаболические показатели и активность инсулиновой системы в печени крыс с сахарным диабетом 2-го типа. *Журн эвол биохим физиол* 58(2): 141–154. [Zakharova IO, Bayunova LV, Derkach KV, Ilyasov IO, Shpakov AO, Avrova NF (2022) Influence of intranasally insulin and gangliosides on metabolic parameters and of activity of the insulin system in the liver of rats with type 2 diabetes. *J Evol Biochem Physiol* 58(2): 141–154. (In Russ)].
12. Деркач КВ, Бахтукоев АА, Басова НЕ, Бондарева ВМ, Шпаков АО (2022) Интраназально вводимый инсулин, но не С-пептид проинсулина, нормализует гормональные показатели и экспрессию гипоталамических генов у самцов крыс с диабетом 2-го типа и ожирением. *Интерграт физиол* 3(1): 41–57. [Derkach KV, Bakhtuykov AA, Basova NE, Bondareva VM, Shpakov AO (2022) Intranasally insured insulin, but not proinsulin C-peptide, normalizes hormonal parameters and expression of hypothalamic genes in male rats with type 2 diabetes and obesity. *Integrat Physiol* 3(1): 41–57. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-41-57>
13. Shpakov AO, Zorina II, Derkach KV (2023) Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium. *Int J Mol Sci* 24(4): 3278.
<https://doi.org/10.3390/IJMS24043278>
14. Chuzho N, Mishra N, Tandon N, Kumar N (2023) Therapies for Type 1 Diabetes: Is a Cure Possible? *Curr Diabetes Rev* 19(7): e021222211565.
<https://doi.org/10.2174/1573399819666221202161259>
15. Li Y, He C, Liu R, Xiao Z, Sun B (2023) Stem cells therapy for diabetes: from past to future. *Cytotherapy* S1465-S3249(23)00129-9.
<https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2023.04.012>
16. Geng L, Lam KSL, Xu A (2020) The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nat Rev Endocrinol* 16: 654–667.
<https://doi.org/10.1038/S41574-020-0386-0>
17. Bazhan NM, Jakovleva TV, Kazantseva AY, Kostina NE, Orlov PE, Balybina NY, Baranov KO, Makarova EN (2023) Studying sex differences in responses to fibroblast growth factor 21 administration in obese mice consuming a sweet-fat diet. *Vavilov Zhurn Genet Selekt* 27: 333–341.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-23-40>
18. Podvigina T, Yarushkina NI, Filaretova LP (2022) Effects of Running on the Development of Diabetes and Diabetes-Induced Complications. *J Evol Biochem Physiol* 58(1): 174–192.
<https://doi.org/10.31857/S0869813922020078>
19. Zaharieva DP, Riddell MC (2023) Advances in Exercise and Nutrition as Therapy in Diabetes. *Diabetes Technol Ther* 25: S146–S160.
<https://doi.org/10.1089/DIA.2023.2509>
20. Ota H, Fujita Y, Yamauchi M, Muro S, Kimura H, Takasawa S (2019) Relationship Between Intermittent Hypoxia and Type 2 Diabetes in Sleep Apnea Syndrome. *Int J Mol Sci* 20(19): 4756.
<https://doi.org/10.3390/IJMS20194756>
21. Kindlovits R, Pereira AMDS, Sousa AC, Viana JL, Teixeira VH (2022) Effects of Acute and Chronic Exercise in Hypoxia on Cardiovascular and Glycemic Parameters in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *High Alt Med Biol* 23: 301–312.
<https://doi.org/10.1089/HAM.2022.0029>
22. Serebrovskaya TV, Portnychenko AG, Drevytska TI, Portnichenko VI, Xi L, Egorov E, Gavalko A V., Naskalova S, Chizhova V, Shatylo VB (2017) Intermittent hypoxia training in prediabetes patients: Beneficial effects on glucose homeostasis, hypoxia tolerance and gene expression. *Exp Biol Med* 242: 1542–1552.
<https://doi.org/10.1177/1535370217723578>

23. Tian YM, Liu Y, Wang S, Dong Y, Su T, Ma HJ, Zhang Y (2016) Anti-diabetes effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia through improving liver insulin resistance in diabetic rats. *Life Sci* 150: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2016.02.053>
24. Cui F, Guan Y, Guo J, Tian YM, Hu HF, Zhang XJ, Zhang Y (2018) Chronic intermittent hypobaric hypoxia protects vascular endothelium by ameliorating autophagy in metabolic syndrome rats. *Life Sci* 205: 145–154.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.05.008>
25. Żebrowska A, Jastrzebski D, Sadowska-Krepa E, Sikora M, Di Giulio C (2019) Comparison of the Effectiveness of High-Intensity Interval Training in Hypoxia and Normoxia in Healthy Male Volunteers: A Pilot Study. *Biomed Res Int* 2019: 7315714.
<https://doi.org/10.1155/2019/7315714>
26. De Mol P, Fokkert MJ, De Vries ST, De Koning EJP, Dikkeschei BD, Gans ROB, Tack CJ, Bilo HJG (2012) Metabolic effects of high altitude trekking in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35: 2018–2020.
<https://doi.org/10.2337/DC12-0204>
27. Schobersberger W, Schmid P, Lechleitner M, von Duvillard SP, Hörtnagl H, Gunga HC, Klingler A, Fries D, Kirsch K, Spiesberger R, Pokan R, Hofmann P, Hoppicher F, Riedmann G, Baumgartner H, Humpeler E (2003) Austrian Moderate Altitude Study 2000 (AMAS 2000). The effects of moderate altitude (1700 m) on cardiovascular and metabolic variables in patients with metabolic syndrome. *Eur J Appl Physiol* 88: 506–514.
<https://doi.org/10.1007/S00421-002-0736-8>
28. Akat F, Fişıcılar H, Durak A, Tuncay E, Dursun AD, Çelikkan FT, Sabuncuoğlu B, Turan B, Baştuğ M (2018) Intermittent hypoxia induces beneficial cardiovascular remodeling in left ventricular function of type 1 diabetic rat. *Anatol J Cardiol* 19: 259–266.
<https://doi.org/10.14744/ANATOLJCARDIOL.2018.00236>
29. Güzel D, Dursun AD, Fişıcılar H, Tekin D, Tanyeli A, Akat F, Çelikkan FT, Sabuncuoğlu B, Baştuğ M (2016) Effect of intermittent hypoxia on the cardiac HIF-1/VEGF pathway in experimental type 1 diabetes mellitus. *Anatol J Cardiol* 16: 76–83.
<https://doi.org/10.5152/AKD.2015.5925>
30. Santos JL, Pérez-Bravo F, Carrasco E, Calvillán M, Albala C (2001) Low prevalence of type 2 diabetes despite a high average body mass index in the Aymara natives from Chile. *Nutrition* 17: 305–309.
[https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00551-7)
31. Peng W, Li K, Yan AF, Shi Z, Zhang J, Cheskin LJ, Hussain A, Wang Y (2022) Prevalence, Management, and Associated Factors of Obesity, Hypertension, and Diabetes in Tibetan Population Compared with China Overall. *Int J Environ Res Public Health* 19(14): 8787.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH19148787>
32. Rybníková EA, Zenko MY, Barysheva VS, Vetrovoy O (2020) Acclimatization to Middle Altitude Hypoxia Masks the Symptoms of Experimental Posttraumatic Stress Disorder, but Does Not Affect Its Pathogenetic Mechanisms. *Bull Exp Biol Med* 168: 614–617.
<https://doi.org/10.1007/S10517-020-04763-3>
33. Szlachcic A, Majka J, Strzałka M, Szmyd J, Pajdo R, Piak-Belowska A, Kwiecien S, Brzozowski T (2013) Experimental healing of preexisting gastric ulcers induced by hormones controlling food intake ghrelin, orexin-A and nesfatin-1 is impaired under diabetic conditions. A key to understanding the diabetic gastropathy? *J Physiol Pharmacol* 64(5): 625–637.
34. Подвигина ТТ, Филаретова ЛП (2020) Чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам и активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(2): 176–188. [Podvigina TT, Filaretova LP (2020) Sensitivity of the gastric mucosa to ulcerogenic factors and the activity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system in the development of streptozotocin-induced diabetes. *Russ J Physiol* 106(2): 176–188. (In Russ)].
35. Podvigina TT, Bagaeva TR, Bobryshev PY, Filaretova LP (2011) High sensitivity of gastric mucosa to ulcerogenic effect of indomethacin in rats with diabetes. *Bull Exp Biol Med* 152: 43–46.
<https://doi.org/10.1007/S10517-011-1449-Y>
36. Takeuchi K, Hatazawa R, Korolkiewicz R, Tashima K (2006) Alterations in gastric mucosal homeostasis under diabetic conditions. In: *Pathophysiological and biochemical analysis of lifestyle related or intractable diseases – Target validation for drug therapy*. Nishino T, Takeuchi K (Eds). Research Signpost. Kerala. 49–77.
37. Konturek PC, Brzozowski T, Burnat, Szlachcic A, Koziel J, Kwiecien S, Konturek SJ, Harsch IA (2010) Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. *J Physiol Pharmacol* 61(4): 429–436.
38. Morsy MA, Ashour OM, Fouad AA, Abdel-Gaber SA (2010) Gastroprotective effects of the insulin sensitizers rosiglitazone and metformin against indomethacin-induced gastric ulcers in Type 2

- diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37: 173–177.
<https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2009.05250.X>
39. *AbdelAziz EY, Tadros MG, Menze ET* (2021) The effect of metformin on indomethacin-induced gastric ulcer: Involvement of nitric oxide/Rho kinase pathway. *Eur J Pharmacol* 892: 173812.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173812>
40. *Idris M, Smiley A, Patel S, Latifi R* (2022) Risk Factors for Mortality in Emergently Admitted Patients with Acute Gastric Ulcer: An Analysis of 15,538 Patients in National Inpatient Sample, 2005–2014. *Int J Environ Res Public Health* 19(23): 16263.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH192316263>
41. *Подвигина ТТ, Багаева ТР, Филаретова ЛП* (2016) Гастропротективный эффект кортикотропин-рилизинг фактора в модели стрептозототин-индуцированного диабета у крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 102(11): 1352–1362. [*Podvigina TT, Bagaeva TR, Filaretova LP* (2016) Gastroprotective effect of corticotropin-releasing factor in a model of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Russ J Physiol* 102(11): 1352–1362. (In Russ)].
42. *Подвигина ТТ, Багаева ТР, Морозова ОЮ, Филаретова ЛП* (2011) Чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенному действию индометацина в разные сроки развития стрептозототин-индуцированного диабета у крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 97(9): 957–967. [*Podvigina TT, Bagaeva TR, Morozova OY, Filaretova LP* (2011) Sensitivity of the gastric mucosa to the ulcerogenic action of indomethacin at different stages of the development of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Russ J Physiol* 97(9): 957–967. (In Russ)].
43. *Yang M, Yang Z, Li Y, Su S, Li Z, Lu D* (2022) Mechanism of Traditional Tibetan Medicine Grubthobridkr Alleviated Gastric Ulcer Induced by Acute Systemic Hypoxia in Rats. *Biomed Res Int* 2022: 4803956.
<https://doi.org/10.1155/2022/4803956>
44. *Syam AF, Simadibrata M, Wanandi SI, Hernowo BS, Sadikin M, Rani AA* (2011) Gastric ulcers induced by systemic hypoxia. *Acta Med Indones* 43(4): 243–248.
45. *Takeuchi K, Ueshima K, Ohuchi T, Okabe S* (1994) Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 39: 626–634.
<https://doi.org/10.1007/BF02088352>
46. *Teixeira DF, Santos AM, Oliveira AMS, Nascimento Júnior JAC, Frank LA, Santana Souza MT De, Camargo EA, Serafini MR* (2021) Pharmaceuticals agents for preventing NSAID-induced gastric ulcers: a patent review. *Expert Rev Clin Pharmacol* 14: 677–686.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1909475>
47. *Filaretova LP, Morozova OY, Yarushkina NI* (2021) Peripheral corticotropin-releasing hormone may protect the gastric mucosa against indometacin-induced injury through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol* 72: 1–10.
<https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.06>
48. *Солнушкин СД, Чихман ВН* (2018) Компьютерная обработка биологических изображений. *Биомед радиоэлектрон* 2: 35–40. [*Solnushkin SD, Chikhman VN* (2018) Computer processing of biological images. *Biomed Radioelectron* 2: 35–40. (In Russ)].
49. *Fournell A, Schwarte LA, Kindgen-Milles D, Müller E, Scheeren TWL* (2003) Assessment of microvascular oxygen saturation in gastric mucosa in volunteers breathing continuous positive airway pressure. *Crit Care Med* 31: 1705–1710.
<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000063281.47070.53>
50. *Filaretova L, Tanaka A, Komoike Y, Takeuchi K* (2002) Selective cyclooxygenase-2 inhibitor induces gastric mucosal damage in adrenalectomized rats. *Inflammopharmacology* 10(4-6): 413–422.
51. *Suresh MV, Balijepalli S, Solanki S, Aktay S, Choudhary K, Shah YM, Raghavendran K* (2023) Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Its Role in Lung Injury: Adaptive or Maladaptive. *Inflammation* 46: 491–508.
<https://doi.org/10.1007/S10753-022-01769-Z>
52. *Serebrovska TV, Portnychenko AG, Portnichenko VI, Xi L, Egorov E, Antoniuk-Shcheglova I, Nas-kalova S, Shatylo VB* (2019) Effects of intermittent hypoxia training on leukocyte pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK-1) mRNA expression and blood insulin level in prediabetes patients. *Eur J Appl Physiol* 119: 813–823.
<https://doi.org/10.1007/S00421-019-04072-2>
53. *Catrina SB, Zheng X* (2021) Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia* 64: 709–716.
<https://doi.org/10.1007/S00125-021-05380-Z>
54. *Hashimoto H, Akimoto M, Maeda A, Shigemoto M, Yamashita K* (2004) Relation of hypoxia-inducible factor-1 α to vascular endothelial growth factor and vasoactive factors during healing of gastric ulcers. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S407–S409.
<https://doi.org/10.1097/01.FJC.0000166305.79055.AD>

55. *Tarnawski AS, Ahluwalia A* (2021) The Critical Role of Growth Factors in Gastric Ulcer Healing: The Cellular and Molecular Mechanisms and Potential Clinical Implications. *Cells* 10(8): 1964. <https://doi.org/10.3390/CELLS10081964>
56. *Russell J, Ward J, Becci M, Mir GN* (1987) Spontaneous gastric ulceration in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. *Gastroenterology* 92: 1605.
57. *Vador N, Jagtap AG, Damle A* (2012) Vulnerability of Gastric Mucosa in Diabetic Rats, Its Pathogenesis and Amelioration by Cuminum cyminum. *Indian J Pharm Sci* 74: 387–396. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.108413>
58. *Igarashi S, Kume E, Narita H, Kinoshita M* (2000) Food deprivation depletes gastric mucous glycoprotein in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 84: 51–55. <https://doi.org/10.1254/JJP.84.51>
59. *Korolkiewicz R, Tashima K, Kubomi M, Kato S, Takeuchi K* (1999) Increased susceptibility of diabetic rat gastric mucosa to food deprivation during cold stress. *Digestion* 60: 528–537. <https://doi.org/10.1159/000007702>
60. *Tashima K, Fujita A, Takeuchi K* (2000) Aggravation of ischemia/reperfusion-induced gastric lesions in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci* 67: 1707–1718. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00754-2)
61. *Takeuchi K, Takehara K, Tajima K, Kato S, Hirata T* (1997) Impaired healing of gastric lesions in streptozotocin-induced diabetic rats: effect of basic fibroblast growth factor. *J Pharmacol Exp Ther* 281(1): 200–207.
62. *Tashima K, Korolkiewicz R, Kubomi M, Takeuchi K* (1998) Increased susceptibility of gastric mucosa to ulcerogenic stimulation in diabetic rats—role of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Br J Pharmacol* 124: 1395–1402. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0701974>
63. *Holzer P, Livingston EH, Guth PH* (1991) Sensory neurons signal for an increase in rat gastric mucosal blood flow in the face of pending acid injury. *Gastroenterology* 101: 416–423. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90020-L](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90020-L)
64. *Комкова ОЮ, Подвигина ТТ, Филаретова ЛП* (2017) Трансформация гастропротективно-го эффекта стресса в проульцерогенные последствия: разработка экспериментальных моделей. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 103(2): 182–192. [*Komkova OYu, Podvigina TT, Filaretova LP* (2017) Transformation of the gastroprotective effect of stress into proulcerogenic consequences: development of experimental models. *Russ J Physiol* 103(2): 182–192. (In Russ)].
65. *Filaretova L* (2017) Gastroprotective Effect of Stress Preconditioning: Involvement of Glucocorticoids. *Curr Pharm Des* 23: 3923–3927. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170215145125>
66. *Filaretova LP, Bagaeva TR, Amagase K, Takeuchi K* (2008) Contribution of glucocorticoids to protective influence of preconditioning mild stress against stress-induced gastric erosions. *Ann NY Acad Sci* 1148: 209–212. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.005>
67. *Деркач КВ, Бондарева ВМ, Шпаков АО* (2017) Совместное интраназальное введение инсулина и С-пептида проинсулина крысам с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа восстанавливает у них метаболические показатели. *Успехи геронтол* 30(6): 851–858. [*Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO* (2017) Co-administration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. *Adv Gerontol* 30(6): 851–858. (In Russ)].
68. *Zelena D, Filaretova L, Mergl Z, Barna I, Tóth ZE, Makara GB* (2006) Hypothalamic paraventricular nucleus, but not vasopressin, participates in chronic hyperactivity of the HPA axis in diabetic rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 290: 243–250. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00118.2005>
69. *Yuan H, Liu J, Gu Y, Ji X, Nan G* (2022) Intermittent hypoxia conditioning as a potential prevention and treatment strategy for ischemic stroke: Current evidence and future directions. *Front Neurosci* 16: 1067411. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.1067411>
70. *Rybnikova EA, Naliyaeva NN, Zenko MY, Baranova KA* (2022) Intermittent Hypoxic Training as an Effective Tool for Increasing the Adaptive Potential, Endurance and Working Capacity of the Brain. *Front Neurosci* 16: 941740. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.941740>
71. *Yarushkina NI, Komkova OP, Filaretova LP* (2020) Influence of forced treadmill and voluntary wheel running on the sensitivity of gastric mucosa to ulcerogenic stimuli in male rats. *J Physiol Pharmacol* 71: 1–13. <https://doi.org/10.26402/JPP.2020.6.04>

**Comparison of the Effect of Keeping Rats in the Mountains and on the Plain
on the Development of Streptozotocin-Induced Diabetes and Gastric Ulceration**

**T. T. Podvigina^{a, *}, O. P. Komkova^a, O. V. Vetrovoy^{a, b},
N. I. Yaruskina^a, and L. P. Filaretova^a**

^a*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia*

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

^{*}*e-mail: podviginatt@infran.ru*

Hypoxia can correct the development of diabetes and its complications in animals and humans, and diabetes exacerbates the gastric ulceration. However, the effect of hypoxia on the gastric ulceration in diabetes remains unknown. The task of the work was to compare the effect of keeping rats in the mountains under moderate natural hypoxia and on the plains on the development of type 1 diabetes and the gastric ulceration. Two weeks after the rats acclimatized to hypoxia (Elbrus region, 2125 m above sea level), they were injected with streptozotocin (STR, 50 or 70 mg/kg) or its vehicle. Simultaneously, rats on the plains were injected with STR (or its vehicle) at the same doses. Indomethacin (IM, 35 mg/kg) was administered two weeks after STR or its vehicle injection in rats after 24 h of fasting, both in the mountains and on the plains, which led to the gastric erosion formation 4 h later. The injection of STR (50 and 70 mg/kg) caused a dose-dependent increase in blood glucose levels in rats both in the mountains and on the plains, which indicates the development of diabetes of varying severity. In rats on the plains the administration of STR (50 and 70 mg/kg) led to a dose-dependent increase in the area of erosions induced by IM compared with those in control animals (STR vehicle). In rats in the mountains, an aggravation of gastric mucosal injury caused by IM was observed, both in control rats (STR vehicle) and in animals with STR-induced diabetes, compared with the gastric injury in rats of the corresponding groups on the plains. The greatest increase in the proulcerogenic effect of STR in the mountains was observed when it was administered at a dose of 70 mg/kg. Thus, persistent moderate hypoxia may lead to an increase in IM-induced gastric ulceration in rats with type 1 diabetes, and, in addition, by itself exacerbate the ulcerogenic effect of IM.

Keywords: mountains, hypoxia, plains, streptozotocin, diabetes, indomethacin, gastric erosions, rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ
В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ НА АГРЕССИВНОСТЬ
И СЕКСУАЛЬНУЮ МОТИВАЦИЮ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС ВИСТАР**

© 2023 г. И. В. Павлова¹, *, Н. Д. Брошевицкая¹

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

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

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 01.09.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Как известно, стрессы в раннем онтогенезе способны оказывать влияние на тревожно-депрессивное, оборонительное и социальное поведение, а также на иммунную и гормональную реактивность взрослых животных. Модель раннего провоспалительного стресса предполагает активацию иммунной системы с помощью введения бактериального липополисахарида (ЛПС) в первые дни постнатального онтогенеза. Каково влияние введения ЛПС в раннем онтогенезе на агрессивность и сексуальную мотивацию взрослых особей неизвестно. Патологическая агрессивность и нарушения в сексуальном поведении характерны для многих психоневрологических заболеваний, поэтому исследование предпосылок для их возникновения высоко актуально. На 3-й и 5-й день после рождения крысам вводили либо ЛПС в дозе 50 мкг/кг (группа ЛПС), либо физиологический раствор (группа ФИЗ, контроль). Анализировали агрессивное поведение взрослых крыс в тесте резидент–интродер после недельной социальной изоляции, а также сексуальное предпочтение самцов или самок в трехкамерном тесте. Поведение крыс сопоставляли с базовым уровнем кортикостерона и интерлейкина-1β в сыворотке крови. У самцов группы ЛПС по сравнению с контролем было больше нападений на интродера в тесте резидент–интродер, причем число атак не уменьшалось к концу эксперимента. У самцов группы ЛПС увеличивалось время взаимодействия с самкой на стадии диэструс в тесте на социальное предпочтение самцов и самок. У самок не наблюдалось изменений в агрессивном поведении после введения ЛПС в раннем онтогенезе. Базовый уровень интерлейкина-1β был выше у самцов, а кортикостерона – у самок, различий между группами ЛПС и ФИЗ по биохимическим показателям обнаружено не было. Полученные результаты свидетельствуют, что у взрослых самцов после раннего провоспалительного стресса по сравнению с контролем происходило увеличение агрессивности, спровоцированной социальной изоляцией, а также сексуальной мотивации, т.е. об изменении мотивационно-эмоциональной составляющей в социальном поведении.

Ключевые слова: ранний провоспалительный стресс, липополисахарид, агрессивность, сексуальное предпочтение самцов или самок, кортикостерон, интерлейкин-1β

DOI: 10.31857/S0869813923100084, EDN: TWMEHG

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что стресс в раннем возрасте может не только оказать негативное влияние на поведение взрослых особей, но и привести к серьезным нарушениям в развитии гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной системы организма [1–3]. В экспериментах на животных в качестве модели так называемого “раннего провоспалительного стресса” применяется активация иммунной системы с помощью инъекции бактериального липополисахарида (ЛПС). ЛПС является составным компонентом внешней части мембраны грамотрицательных бактерий, и его введение приводит к развитию болезненного состояния и высвобождению большого числа эндогенных провоспалительных медиаторов (цитокины, хемокины и др.) [4]. Считается, что первая постнатальная неделя является важной для развития гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [5] и особенно для установления функциональных связей гиппокампа, с помощью которых осуществляется отрицательная обратная связь для регуляции уровня кортикостерона. Введение ЛПС в этот критический период имеет наибольшие последствия для дальнейшего развития организма, и во многих работах инъекция осуществляется на 3-й и 5-й постнатальный день [3, 5, 6, 8].

Данные о влиянии раннего провоспалительного стресса на социальное поведение немногочисленны и противоречивы. Постнатальное системное введение ЛПС (на 3-й и 5-й постнатальные дни) либо не влияло на социальное взаимодействие [3], либо приводило к уменьшению времени социальных контактов у взрослых животных [6], что происходило за счет контактов, инициируемых интактными животными, а не крысами, получавшими ЛПС [7]. Мотивация к социальному взаимодействию у крыс после раннего введения ЛПС, наоборот, возрастала [8], о чем свидетельствовало увеличение времени взаимодействия у крыс группы ЛПС с незнакомой крысой в двухкамерном тесте. Кроме того, введение ЛПС в раннем онтогенезе приводило к более частому социальному доминированию у взрослых крыс в тесте в трубе, при этом у крыс победителей наблюдался повышенный уровень интерлейкина-1бета (ИЛ-1бета) в крови [8]. Как сказывается активация иммунной системы в раннем онтогенезе на агрессивность у взрослых животных, неизвестно. В литературе имеются сведения о связи иммунной системы с агрессивным поведением [9, 10]. На линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии [11, 12]. Похожие данные были получены и при исследовании пациентов с депрессией, которые демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов [13]. На основании этих данных можно было предположить, что ранний провоспалительный стресс будет приводить к увеличению агрессивности.

Показано, что неонатальный иммунный стресс нарушает репродуктивную физиологию и сексуальное поведение [14, 15]. В то же время некоторые виды стрессов в раннем возрасте (недостаток строительного материала для гнезда, изоляция от матери) повышают сексуальную мотивацию у самцов [16, 17]. Неизвестно, может ли активация иммунной системы в раннем возрасте повлиять на сексуальную мотивацию.

Патологическая агрессивность и нарушения в сексуальном поведении характерны для многих психоневрологических заболеваний, поэтому исследование предположений о их возникновении в экспериментах на животных является актуальной задачей. Целью нашей работы было изучение влияния раннего провоспалительного стресса на агрессивное поведение и сексуальное предпочтение у взрослых крыс Вистар. В задачи исследования входило сопоставление поведения взрослых крыс в группах с введением ЛПС или физиологического раствора в раннем онтогенезе в

тесте резидент—интродер, в трехкамерном тесте на сексуальное предпочтение, а также анализ базового уровня кортикостерона и ИЛ-1бета в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы животных. В экспериментах использовали 99 крыс Вистар в возрасте от 3 до 150 дней (48 самцов и 51 самка). Крысята были выведены в виварии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии от родителей, полученных из филиала “Столбовая” Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства”, Россия. В возрасте 25 дней крысят отсаживали от матери, и в дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и стандартному корму.

На 3-й и 5-й постнатальный день (ПНД) половине крысят из помета вводили бактериальный ЛПС (от *Escherichia coli* serotype 026: B6, Sigma Chemical) в дозе 50 мг/кг в объеме 10 мкл/г (группа ЛПС, 50 крысят). Доза была выбрана в соответствии с данными литературы [3, 5, 6, 8] и не вызывала увеличения смертности среди крысят. Во время этой процедуры крысят отлучали от матери на 15–20 мин, взвешивали на электронных весах и вводили подкожно ЛПС в холку с помощью инсулинового шприца. Крысят группы ЛПС дополнительно метили с помощью подкожного введения у основания хвоста 10 мкл черной краски (фирма Dynamic Color, цвет Triple Black), используемой для татуировок у людей. Другой половине крысят из помета в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10 мкл/г (группа ФИЗ, контроль, всего 49 крысят). При введении веществ старались уравнивать число самцов и самок в группах ЛПС и ФИЗ. Разделение пометов делали с целью ослабить влияние генетического фактора на результаты экспериментов. Таким образом, было сформировано четыре группы крыс: самцы группы ФИЗ (24 крысы), самцы группы ЛПС (24 крысы), самки группы ФИЗ (25 крыс) и самки группы ЛПС (26 крыс).

Тест резидент—интродер. Внутривидовое агрессивное поведение оценивали у взрослых крыс на 120–130-й ПНД при помощи теста “резидент—интродер”, перед которым уровень агрессии повышали путем содержания крыс в социальной изоляции в течение недели в индивидуальных клетках размером 35 × 55 × 20 см. Использовали усовершенствованный протокол тестирования грызунов, описанный в работе [18], который позволял исследовать агрессию как у самцов, так и самок. Тест резидент—интродер проводили в домашней клетке, в которую к резиденту подсаживали взрослую незнакомую более молодую (2.5–3 мес.) и меньшую по массе тела крысу—интродера того же пола. Далее проводили видеорегистрацию поведения обеих крыс в течение 10 мин. Тест резидент—интродер проходил в затемненной комнате с уровнем освещенности 20–25 люкс. При этом фиксировали следующие параметры: латентность и число нападений, инициируемых резидентом, которые заканчивались либо позой подчинения интродера на спине, либо дракой; число и латентность стойек напротив оппонента (боксирование); число и длительность преследований интродера с аногенитальным обнюхиванием; случаи агрессивного груминга со стороны резидента, сопровождающиеся вокализацией интродера; число “сексуальных атак” со стороны резидента. Сексуальные атаки у самцов и самок выражались во взбирании резидента на интродера сзади, за которым у самцов следовал груминг гениталий. Каждый интродер использовался в экспериментах один, максимум два раза только в случае, если первый резидент был неагрессивным.

Тест на сексуальное предпочтение. У 22 самцов на 130–140-й ПНД проводился тест на сексуальное предпочтение в камере (120 × 80 × 35 см), состоящей из трех равных отсеков (40 × 80 × 35 см), соединенных между собой дверками. Уровень

освещенности камеры достигал 100–120 люкс. В каждом боковом отсеке размещались цилиндры (диаметр 20 см) с боковыми стенками, сделанными из сетки с ячейками 10×10 мм, в одном цилиндре помещался незнакомый интактный самец (отсек с самцом), в другом — самка на стадии диэструс (отсек с самкой). Стадию диэструса определяли по присутствию лейкоцитов во влагалищном мазке, взятом утром в день опыта [19]. В качестве “гостя” использовали самок только на определенной стадии цикла, чтобы избежать влияния стадий эстрального цикла на результаты эксперимента. Исследуемая крыса в начале опыта сажалась в средний стартовый отсек, носом в сторону сплошной стены. Время тестирования составляло 10 мин. Видеорегистрацию поведения проводили с помощью программы Medi-oсruser, а построение трэков движения крысы и их анализ — с помощью программы EthoVision XT (Noldus). При обработке подсчитывали число заходов и время пребывания в отсеке с самцом и с самкой, число и длительность взаимодействия с самцом и с самкой (нос крысы находился в непосредственной близости от сетки цилиндра с самцом или самкой), пройденную дистанцию и скорость в разных отсеках, а также рассчитывали коэффициенты предпочтения $K_{\text{предп.}} = (T_{\text{взаим. с самкой}} - T_{\text{взаим. с самцом}}) / (T_{\text{взаим. с самкой}} + T_{\text{взаим. с самцом}})$, где $T_{\text{взаим.}}$ — время взаимодействия. Из анализа были исключены две крысы, которые после ухода из стартового отсека все время тестирования находились только в одном отсеке.

Иммуноферментный анализ крови. Забор крови проводили у крыс на 90–100-й ПНД до начала поведенческих тестов. Для этого крыс наркотизировали с помощью изофлуранового ингаляционного наркоза (Аэрран), на кончике хвоста делали косые надрезы скальпелем и собирали периферическую кровь в объеме 0.7–1 мл в микропробирки с добавленным гепарином (10 мкл). Затем кровь центрифугировали 15 мин при 1500 g для получения сыворотки и отбирали аликвоты объемом 50 и 150 мкл. Аликвоты сыворотки хранили при -80°C до проведения иммуноферментного анализа.

Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками кортикостерон методом конкурентного иммуноферментного анализа. Содержание провоспалительного интерлейкина-1бета (ИЛ-1бета) в сыворотке крови определяли с помощью наборов производства R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. При дальнейшей статистической обработке из выборки исключали экстремумы.

Статистическая обработка результатов. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова. Если анализируемый параметр удовлетворял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел *factorial ANOVA*, *One-Way ANOVA* и *Repeated measures ANOVA*. При *post-hoc* анализе применяли *Newman–Keuls test*. Анализировали влияние факторов ПОЛ (самцы, самки), ГРУППА (ЛПС, ФИЗ), ВИД ОТСЕКА (с самцом, с самкой). При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали непараметрические методы анализа. При сравнении двух групп применяли Mann–Whitney *U* Test. При сравнении долей использовали критерий χ^2 (2×2 Table). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 \leq p < 0.1$. Данные на рисунках представлены в виде средних значений $\pm$ ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест резидент–интродер. Сопоставление с помощью Mann–Whitney *U* Test в группах ФИЗ и ЛПС различных показателей поведения показало, что число напа-

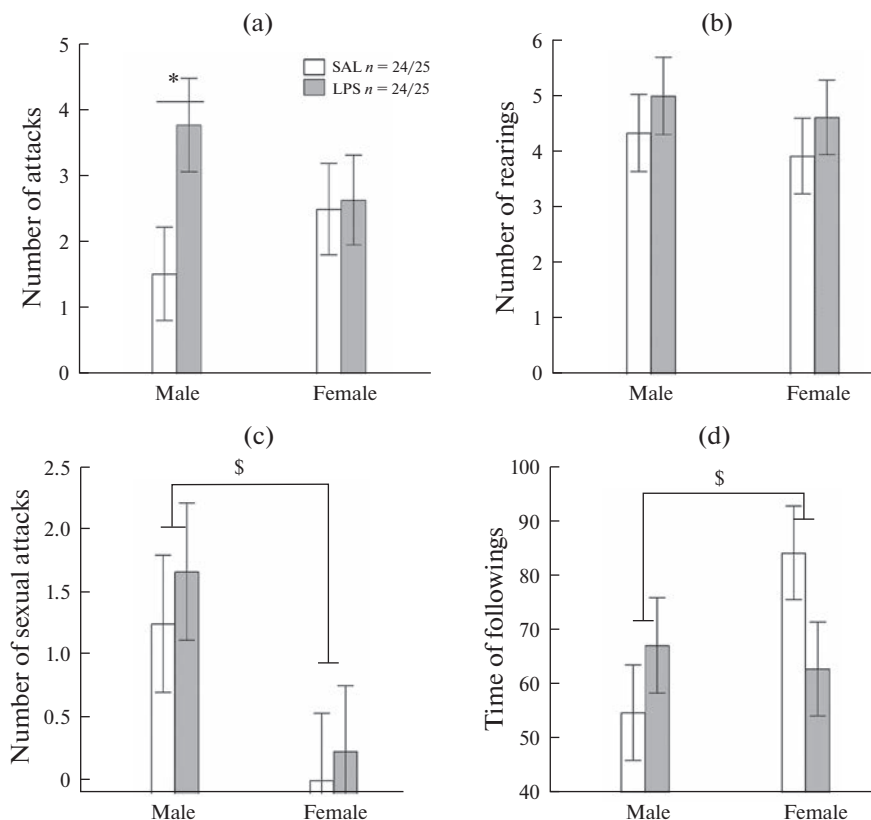


Рис. 1. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте резидент–интродер. (a–d) – сопоставление различных показателей поведения в группах ЛПС и ФИЗ. * – статистически значимые различия между ЛПС и ФИЗ группами ($p < 0.05$), \$ – различия между самцами и самками ($p < 0.05$, Mann–Whitney U Test). n – число крыс в группе самцы/самки.

дений резидента на интродера было больше у самцов группы ЛПС (в среднем 3.7 атак), чем у самцов группы ФИЗ (1.4 атаки, $U = 184.5$, $Z = -2.134$, $p = 0.028$), число нападений у самок из групп ЛПС и ФИЗ не отличалось (2.4 и 2.5 атаки, $U = 315.5$, $Z = -0.179$, $p = 0.858$) (рис. 1a). Число стоек друг напротив друга (рис. 1b), число случаев агрессивного груминга, число сексуальных атак (рис. 1c) не различалось у крыс в группах ФИЗ и ЛПС, как у самцов, так и самок. Половые различия были обнаружены по числу сексуальных атак (рис. 1c) и времени преследования с аногенитальным обнюхиванием (рис. 1d). У самцов число сексуальных атак было больше (1.5 атаки, $U = 969$, $Z = 3.15$, $p = 0.002$), а время преследования меньше (61 с, $U = 921$, $Z = -1.98$, $p = 0.047$), чем у самок (0.1 атаки и 74 с соответственно).

Анализ гистограмм распределения крыс самцов в зависимости от числа нападений за опыт (рис. 2a) показал, что количество агрессивных самцов, совершавших от 2 до 17 нападений на интродера за опыт, было больше в группе ЛПС (75%) по сравнению с группой ФИЗ (33%, $\chi^2 = 8.39$, $p = 0.004$). Анализ гистограмм распределения самок в зависимости от числа нападений за опыт не обнаружил различий в числе агрессивных животных (не менее двух нападений) в группах ФИЗ (44%) и ЛПС (42%) (рис. 2b). Анализ гистограмм распределения нападений у самцов в за-

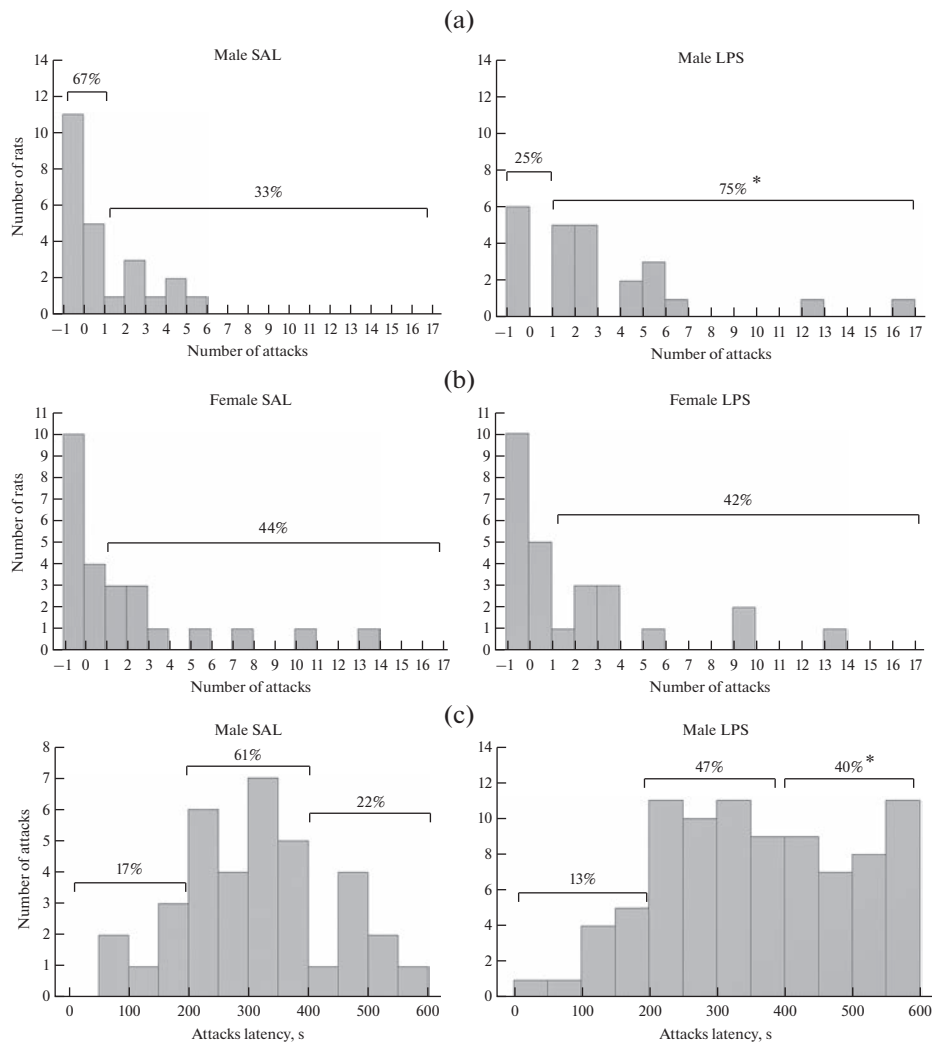


Рис. 2. Гистограммы распределения крыс в зависимости от числа атак на интродера (а, б) и гистограммы распределения атак в зависимости от их латентности (с). * — статистически значимые различия между процентными соотношениями в группах ЛПС и ФИЗ ($p < 0.05$, критерий χ^2 , 2×2 Table).

висимости от их латентности (рис. 2с), показал, что максимальное число нападения наблюдалось в интервале от 200 до 400 с как в группе ФИЗ (61%), так и ЛПС (47%). В конце опыта с 400 до 600 с число нападения у самцов группы ФИЗ уменьшалось до 22%, а в группе ЛПС было больше (40%, $\chi^2 = 3.97$, $p = 0.046$). Таким образом, тест резидент–интродер показал увеличение числа агрессивных крыс самцов в группе ЛПС, при этом уровень агрессии не снижался к концу эксперимента.

Тест сексуального предпочтения. Анализ поведения самцов в трехкамерном тесте на сексуальное предпочтение с помощью Repeated measures ANOVA выявил взаимодействие факторов ВИД ОТСЕКА $\times$ ГРУППА во влиянии на время нахождения в отсеке ($F_{1, 18} = 7.554$, $p = 0.013$), на время взаимодействия ($F_{1, 18} = 13.222$, $p = 0.002$) и на пройденную дистанцию ($F_{1, 18} = 9.578$, $p = 0.006$) в отсеках с самцом и самкой.

Post hoc анализ показал, что самцы ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой больше времени находились в отсеке с самкой (рис. 3а, б), больше времени взаимодействовали с самкой (рис. 2с) и проходили большую дистанцию в этом отсеке (рис. 2д). Эти показатели не отличались в отсеке с самцом у крыс ЛПС и ФИЗ групп. Коэффициенты предпочтения были выше у самцов ЛПС группы, чем у ФИЗ группы (рис. 2е, $F_{1,18} = 10.944$, $p = 0.004$, One Way ANOVA). Эти данные свидетельствуют о большем предпочтении самок у самцов ЛПС группы, чем у самцов ФИЗ группы, что может свидетельствовать о большей сексуальной мотивации у животных после раннего провоспалительного стресса.

Биохимические показатели крови. Фактор ГРУППА не оказал влияния на уровень кортикостерона и ИЛ-1 бета в сыворотке крови (Factorial ANOVA), что свидетельствовало об отсутствии различий по данным показателям в группах ЛПС и ФИЗ (рис. 4а, 4б). Фактор ПОЛ влиял на уровень ИЛ-1бета ($F_{1,74} = 12.15$, $p = 0.001$) и кортикостерона ($F_{1,85} = 6.03$, $p = 0.016$). У самцов был более высокий уровень ИЛ-1бета, чем у самок, а у самок был более высокий уровень кортикостерона, чем у самцов (рис. 4а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе введение ЛПС в раннем онтогенезе привело к изменениям уровня агрессии у взрослых крыс. У самцов группы ЛПС по сравнению с группой ФИЗ наблюдалось больше нападений на интродуров, в данной группе возрастало число агрессивных крыс, совершавших не менее двух нападений на интродера в тесте, причем число нападений не уменьшалось к концу опыта, а держалось на высоком уровне все время наблюдения. В настоящей работе использовали модификацию теста резидент–интродер после недельной социальной изоляции, что позволяло анализировать поведение не только самцов, но и самок. Известно, что социальная изоляция, даже кратковременная, приводит к увеличению агрессивности крыс [20–22]. Агрессия после социальной изоляции вызывает активацию областей мозга, которые контролируют межсамцовую агрессию – медиальной и латеральной орбитофронтальной коры, передней цингулярной коры, медиальной и базолатеральной миндалины, гипоталамической области атак, паравентрикулярного ядра гипоталамуса и др. [22]. Вентролатеральная часть вентромедиального гипоталамуса (VMHvl) является ключевой структурой для запуска агрессивного поведения [23]. Можно предположить, что нейровоспаление, возникающее в ответ на ранний провоспалительный стресс, вызывает существенные изменения в функционировании этих областей мозга и особенно гипоталамической области атак. Суммарный эффект от введения ЛПС в раннем онтогенезе и кратковременной социальной изоляции дает увеличение агрессивности у самцов группы ЛПС.

В литературе имеются только единичные работы по влиянию раннего провоспалительного стресса на агрессивное поведение. Введение ЛПС на 3-й и 5-й ПНД сирийским хомякам привело к увеличению агрессивности у взрослых самок в отношении самцов при размножении [24]. Изоляция от матери в раннем онтогенезе также может вызвать агрессивное поведение в подростковом возрасте [25]. Ранее мы показали, что самцы группы ЛПС чаще оказывались победителями, чем самцы группы ФИЗ в тесте на социальное доминирование в трубе [8]. Данные по доминированию и агрессивности согласуются между собой, поскольку агрессию обычно проявляют доминантные особи [26, 27].

В тесте на сексуальное предпочтение было обнаружено большее предпочтение самок у самцов группы ЛПС по сравнению с контролем, что свидетельствовало об увеличении сексуальной мотивации у животных после активации иммунной системы в раннем онтогенезе. Большое число однополых сексуальных атак в тесте

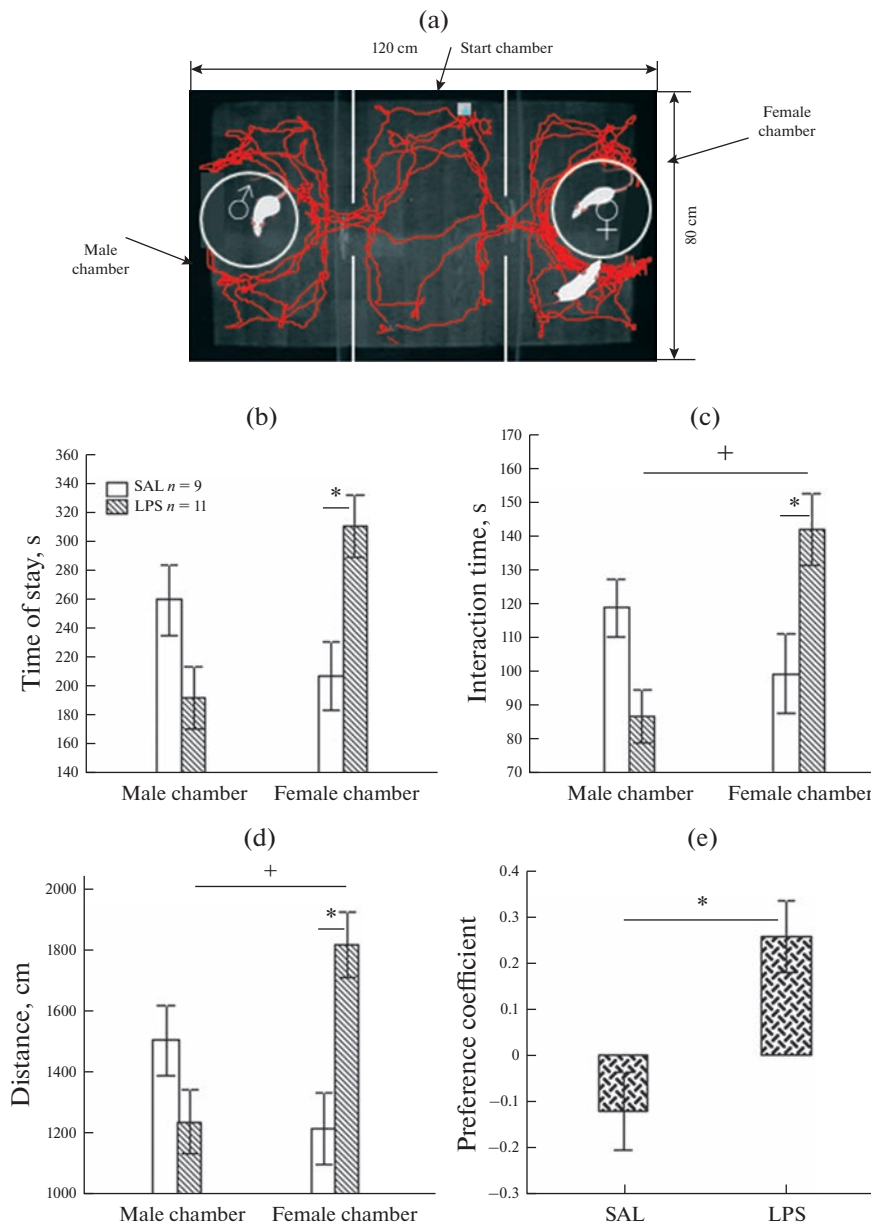


Рис. 3. Влияние раннего провоспалительного стресса на сексуальное предпочтение самцов и самок. (a) — изображение камеры с тремя отсеками для теста сексуальных предпочтений, в отсеке для самцов в сетчатом цилиндре находится самец, в отсеке для самок — самка в стадии диэструса, траектория движения экспериментального самца показана красным цветом. (b–e) — сравнение различных показателей поведения в группах ФИЗ и ЛПС. * — статистически значимые различия между группами ФИЗ и ЛПС, + — между отсеками внутри группы ($p < 0.05$, на (b–d) — Repeated measures ANOVA, post hoc анализ, Newman–Keuls test, на (e) — One Way ANOVA). n — количество крыс в группе.

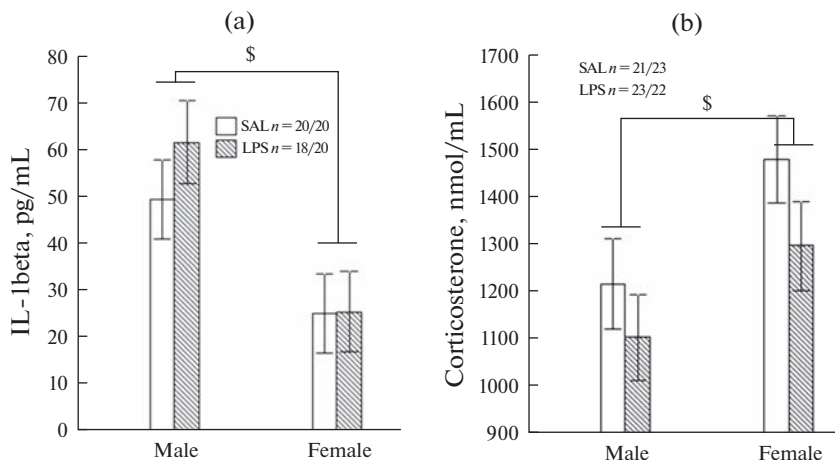


Рис. 4. Усредненные по группам данные по базовому уровню ИЛ-1бета (а) и кортикостерона (б). n — число самцов/самок в группе. \$ — различия между самцами и самками ($p < 0.05$, Factorial ANOVA).

резидент—интродер также может говорить о возрастании сексуальной мотивации. У самцов группы ФИЗ предпочтение отсека с самкой в нашей работе не проявлялось, это, возможно, было связано с тем, что использовали не рецептивных самок на стадии диэструс. В норме самцы предпочитали рецептивных самок в стадии эструс по сравнению с овариоэктомизированными самками [17].

В литературе имеются сведения об увеличении сексуальной мотивации под влиянием различных стрессов в раннем онтогенезе. Так, например, стресс в виде недостатка строительного материала для гнезда в раннем онтогенезе приводил к увеличению времени, проводимого в отсеке с противоположным полом в трехкамерном тесте на сексуальное предпочтение [16]. Возрастание сексуальной мотивации после стресса изоляции от матери в раннем онтогенезе могло проявляться и в виде уменьшения латентностей копулятивного поведения самцов [17]. С другой стороны, в литературе имеются сведения о негативном влиянии стрессов в раннем онтогенезе на сексуальное поведение и репродуктивную физиологию как самцов, так и самок. Введение ЛПС на 3-й и 5-й ПНД приводило у самок хомяков к нарушению эстрального цикла и уменьшению числа яйцеклеток [24]. Введение ЛПС на 10-й и 25-й день приводило к задержке полового созревания у самцов и уменьшению сексуального поведения у самцов и самок крыс [15, 28]. Ранний стресс в виде изоляции от матери на несколько часов со 2-ого по 10-й ПНД также мог приводить к нарушениям в сексуальном поведении самцов, проявляющихся в большей латентности взбирания на самку, уменьшении животных с эякуляцией [29]. Нарушения в сексуальном поведении самок после раннего провоспалительного стресса связывают с уменьшением экспрессии рецепторов прогестерона в гипоталамусе [15].

В целом, увеличение доминантности [8], агрессивности и сексуальной мотивации у самцов крыс, переживших ранний провоспалительный стресс, дает животным, по-видимому, конкурентные преимущества в эволюционном плане. Это может быть связано с тем, что нами использовалась минимальная доза ЛПС (50 мкг/кг) из применяемых в исследованиях (50—1000 мкг/кг) на крысах в таком раннем возрасте. Негативные последствия, оказываемые на тревожно-депрессивное поведение, после такой активации иммунной системы практически исчезали во взрослом возрасте [30].

В нашей работе мы не выявили различий в базовом уровне кортикостерона и ИЛ-1бета у крыс в группах ЛПС и ФИЗ. Важно отметить, что кровь брали перед кратковременной социальной изоляцией, предшествующей тесту резидент—интродер. Ранее в нашей работе было показано, что самцы группы ЛПС имеют более высокий уровень ИЛ-1бета по сравнению с группой ФИЗ после стрессирующих воздействий в виде теста вынужденного плавания [30]. Для появления агрессивного поведения, вероятно, более важным является увеличение уровня ИЛ-1бета в ответ на социальную изоляцию и социальные конфликты, чем базовый уровень данного цитокина. У животных и людей, проявляющих агрессивность, показан увеличенный уровень провоспалительных цитокинов после социального стресса [11–13]. Наличие корреляции между соотношением провоспалительных/противовоспалительных цитокинов и агрессией позволила ряду авторов высказать гипотезу о связи агрессии с изменениями в уровне цитокинов [10].

В заключение необходимо отметить, что ранний провоспалительный стресс оказывал влияние только на самцов в тесте резидент—интродер. Сходные половые различия наблюдали ранее при анализе влияния введения ЛПС в раннем возрасте на социальное доминирование и взаимодействие [8]. Более выраженные изменения в тревожно-депрессивном поведении также происходили у самцов под влиянием введения ЛПС в раннем онтогенезе [30]. Большая уязвимость самцов к влиянию ЛПС объясняется тем, что нейровоспалительный процесс протекает по-разному у самцов и самок [31]. У самцов и самок может различаться набор выделяемых цитокинов, их локализация и клеточный источник при нейровоспалении. У самцов микроглия считается вероятным клеточным источником, опосредующим нейровоспалительный прайминг, выделение цитокинов увеличивается после дополнительного стресса. У самок при этом не происходит увеличение выделения цитокинов из микроглии [32]. Кроме того, известно, что эстрогены самок способны оказывать противовоспалительное действие. Эстрогены ускоряют протекание воспалительного процесса в сторону его деактивации, большая роль при этом отводится противовоспалительному IL-4 [33]. Эстрогены способны затормозить выработку провоспалительных цитокинов [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пережитый провоспалительный стресс в раннем онтогенезе оказывал существенное влияние на эмоционально-мотивационную составляющую социального поведения взрослых крыс. Самцы оказались наиболее чувствительными к данному негативному воздействию. Введение ЛПС в дозе 50 мкг/кг на 3-й и 5-й ПНД приводило к увеличению агрессивности у взрослых самцов по сравнению с контролем в тесте резидент—интродер после недельной социальной изоляции, а также вызывало увеличение сексуальной мотивации в тесте на сексуальное предпочтение. Полученные данные важны для понимания предпосылок возникновения патологической агрессивности и нарушений в сексуальном поведении, которые характерны для многих психоневрологических заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU) и положения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии о работе с экспериментальными животными.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по теме “Фундаментальные нейробиологические механизмы поведения, памяти и обучения в норме и при патологии” (номер государственной регистрации АААА-А17-117-92040002-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.В.П. — идея, планирование экспериментов, обработка материала, написание статьи.
Н.Д.Б. — подготовка групп животных, проведение экспериментов, обработка результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cristino LMF, Chaves Filho AJM, Custódio CS, Vasconcelos SMM, de Sousa FCF, Sanders LLO, de Lucena DF, Macedo DS (2022) Animal model of neonatal immune challenge by lipopolysaccharide: a study of sex influence in behavioral and immune/neurotrophic alterations in juvenile mice. *Neuroimmunomodulation* 29: 391–401.
<https://doi.org/10.1159/000522055>
2. Juruena MF, Bourne M, Young AH, Cleare AJ (2021) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction by early life stress. *Neurosci Lett* 759: 136037.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136037>
3. Custódio CS, Mello BSF, Filho AJMC, de Carvalho Lima CN, Cordeiro RC, Miyajima F, Réus GZ, Vasconcelos SMM, Barichello T, Quevedo J, de Oliveira AC, de Lucena DF, Macedo DS (2018) Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. *Mol Neurobiol* 55(5): 3775–3788.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0616-1>
4. Alexander C, Rietschel ET (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7: 167–202.
5. Shanks N, Meaney MJ (1994) Hypothalamic-pituitary-adrenal activation following endotoxin administration in the developing rat: a CRH-mediated effect. *J Neuroendocrinol* 6(4): 375–383.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00596.x>
6. MacRae M, Kenkel WM, Kentner AC (2015) Social rejection following neonatal inflammation is mediated by olfactory scent cues. *Brain Behav Immun* 49: 43–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.026>
7. Kentner AC, Khan U, MacRae M, Dowd SE, Yan S (2018) The effect of antibiotics on social aversion following early life inflammation. *Physiol Behav* 194: 311–318.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.006>
8. Broshevitskaya ND, Pavlova IV, Zaichenko MI (2022) Early proinflammatory stress affects the social behavior of adult rats: effects of sex and the basal level of interleukin 1-beta in the blood. *Neurochem J* 16: 302–310.
<https://doi.org/10.1134/S1819712422030023>
9. Кудрявцева НН (2013) Нейробиология агрессии: мыши и люди. Новосибирск. Наука-Центр. [Kudryavtseva NN (2013) Neurobiology of aggression: mice and humans. Novosibirsk. Nauka-Center. (In Russ)].
10. Das S, Deuri SK, Sarmah A, Pathak K, Baruah A, Sengupta S, Mehta S, Avinash PR, Kalita KN, Hazarika J (2016) Aggression as an independent entity even in psychosis – the role of inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol* 292: 45–51.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.012>
11. Idova GV, Markova EV, Gevorgyan MM, Alperina EL, Zhukov EN (2016) Changes in production of cytokines by C57Bl/6J mouse spleen during aggression provoked by social stress. *Bull Exp Biol Med* 160: 679–682.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3248-y>
12. Alperina E, Idova G, Zhukova E, Zhanaeva S, Kozhemyakina R (2019) Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression. *Neurosci Lett* 692: 193–198.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.012>
13. Takahashi A, Flanigan ME, McEwen BS, Russo SJ (2018) Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. *Front Behav Neurosci* 12: 56.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00056>

14. Sylvia KE, Demas GE (2017) Overcoming neonatal sickness: Sex-specific effects of sickness on physiology and social behavior. *Physiol Behav* 179: 324–332.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.002>
15. Mayila Y, Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yano K, Yanagihara R, Tokui T, Minato S, Takeda A, Sachiko Endo S, Maeda T, Irahara M (2020) The reduction in sexual behavior of adult female rats exposed to immune stress in the neonatal period is associated with reduced hypothalamic progesterone receptor expression. *Gen Comp Endocrinol* 288: 113360.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113360>
16. Davis LK, Bolton JL, Hanson H, Guarraci FA (2020) Modified limited bedding and nesting is a model of early-life stress that affects reproductive physiology and behavior in female and male Long-Evans rats. *Physiol Behav* 224: 113037.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113037>
17. Greisen MH, Bolwig TG, Husum H, Nedergaard P, Wortwein G (2005) Maternal separation affects male rat copulatory behaviour and hypothalamic corticotropin releasing factor in concert. *Behav Brain Res* 158: 367–375.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.018>
18. Tonelli LH, Katz M, Kovacsics CE, Gould TD, Joppy B, Hoshino A, Hoffman G, Komarow H, Posolache TT (2009) Allergic rhinitis induces anxiety-like behavior and altered social interaction in rodents. *Brain Behav and Immunity* 23: 784–793.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.02.017>
19. Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E (2005) Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* 146: 1650–1673.
<https://doi.org/10.1210/en.2004-1142>
20. Oliveira VEM, Neumann ID, de Jong TR (2019) Post-weaning social isolation exacerbates aggression in both sexes and affects the vasopressin and oxytocin system in a sex-specific manner. *Neuropharmacology* 156: 107504.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.019>
21. Biro L, Toth M, Sipos E, Bruzsik B, Tulogdi A, Bendahan S, Sandi C, Haller J (2017) Structural and functional alterations in the prefrontal cortex after post-weaning social isolation: relationship with species-typical and deviant aggression. *Brain Struct Funct* 222: 1861–1875.
<https://doi.org/10.1007/s00429-016-1312-z>
22. Toth M, Tulogdi A, Biro L, Soros P, Mikics E, Halle Jr (2012) The neural background of hyperemotional aggression induced by post-weaning social isolation. *Behav Brain Res* 233: 120–129.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.025>
23. Hashikawa Y, Hasikawa K, Falkner AL, Lin D (2017) Ventromedial hypothalamus and the generation of aggression. *Front System Neuroscie* 11: 1–13.
<https://doi.org/10.2289/fnsys.2017.00094>
24. Sylvia KE, Ramos PB, Demas GE (2018) Sickness-induced changes in physiology do not affect fecundity or same-sex behavior. *Physiol Behav* 184: 68–77.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.11.002>
25. Shin SY, Han SH, Woo R-S, Jang SH, Min SS (2016) Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. *Neuroscience* 316: 221–231.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.041>
26. Yang CR, Bai YY, Ruan CS, Zhou HF, Liu D, Wang XF, Shen LJ, Zheng HY, Zhou XF (2015) Enhanced aggressive behaviour in a mouse model of depression. *Neurotox Res* 27: 129–142.
<https://doi.org/10.1007/s12640-014-9498-4>
27. Barabas AJ, Lucas JR, Erasmus MA, Cheng HW, Gaskill BN (2021) Who's the boss? Assessing convergent validity of aggression-based dominance measures in male laboratory mice, *Mus Musculus*. *Front Vet Sci* 8: 695948.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.695948>
28. Mayila Y, Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Yano K, Yanagihara R, Tokui T, Kato T, Kuwahara A, Irahara M (2018) The reduction in sexual behavior induced by neonatal immune stress is not related to androgen levels in male rats. *Int J Dev Neurosci* 71: 163–171.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.08.003>
29. Rhees RW, Lephart ED, Eliason D (2001) Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res* 123: 1–10.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00381-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00381-8)
30. Broshevitskaya N, Pavlova I, Zaichenko M, Gruzdeva V, Grigoryan GA (2021) Effects of early pro-inflammatory stress on anxiety and depression-like behavior in rats of different ages. *Neurosci Behav Physiol* 51: 390–401.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01083-5>

31. Grigoryan GA (2020) Sex differences in behaviour and biochemical markers in animals in response to neuroinflammatory stress. *Uspehi Physiol Nauk* 51: 18–32.
<https://doi.org/10.31857/S0301179820010051>
32. Fonken LK, Frank MG, Gaudet AD, D'Angelo HM, Daut RA, Hampson EC, Ayala MT, Watkins LR, Maier SF (2018) Neuroinflammatory priming to stress is differentially regulated in male and female rats. *Brain Behav Immun* 70: 257–267.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.005>
33. Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A (2015) Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Sci Rep* 5: 15224.
<https://doi.org/10.1038/srep15224>
34. Najjar F, Ahmad M, Lagace D, Leenen FHH (2018) Sex differences in depression-like behavior and neuroinflammation in rats post MI: role of estrogens. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315: H1159–H1173.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00615.2017>

Influence of Immune System Activation in Early Ontogenesis on Aggressiveness and Sexual Motivation in Adult Wistar Rats

I. V. Pavlova^a, * and N. D. Broshevitskaya^a

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

*e-mail: pavlovfml@mail.ru

Stresses in early ontogenesis can influence anxiety-depressive, defensive and social behavior, as well as the immune and hormonal reactivity of adult animals. The model of early proinflammatory stress assumes activation of the immune system by the introduction of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in early ontogenesis. Whether neonatal LPS stress impacts aggressive behavior or sexual motivation is still unknown. Pathological aggressiveness and disorders in sexual behavior are characteristic of many neuropsychiatric diseases, therefore, the study of the prerequisites for their occurrence is highly relevant. On the 3rd and 5th day after birth, the rats were injected with either LPS at a dose of 50 mcg/kg (LPS group) or saline solution (SAL group, control). The aggressive behavior of adult rats in the resident-intruder test after a week of social isolation was analyzed, as well as the sexual preference of males or females in a three-chamber test. The behavior of rats was compared with baseline levels of corticosterone and interleukin-1beta in blood serum. The males of the LPS group compared with the control had more attacks on the intruder in the resident-intruder test, and the number of attacks did not decrease by the end of the experiment. The males of the LPS group had an increased interaction time with the female at the diestrus stage in the social preference test of males and females. There were no changes in aggressive behavior in females after the administration of LPS in early ontogenesis. The baseline level of interleukin-1beta was higher in males, and corticosterone was higher in females, there were no differences between the LPS and PHYS groups in biochemical parameters. The results obtained indicate an increase in aggressiveness provoked by social isolation, as well as sexual motivation in adult males after early pro-inflammatory stress, i.e., a change in the motivational and emotional component in social behavior.

Keywords: early pro-inflammatory stress, lipopolysaccharide, aggression, sexual preference, corticosterone, interleukin-1β

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ ФАЗЫ РАССЛАБЛЕНИЯ СЕРДЦА У КРЫС

© 2023 г. В. И. Капелько¹, А. А. Абрамов¹, В. Л. Лакомкин¹. *

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

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

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 22.09.2023 г.

Скорость и глубина расслабления миокарда определяют наполнение левого желудочка (ЛЖ) в раннюю диастолу. Для анализа фазы расслабления был использован метод логарифмирования падения давления в ЛЖ у крыс. Постепенное ускорение расслабления было обнаружено при переходе от изоволюмической фазы к ауковольюмической фазе непосредственно перед открытием атриовентрикулярных клапанов. Постоянная скорости расслабления в этой фазе была обратно пропорциональна значениям минимального диастолического давления ЛЖ и конечного систолического объема ЛЖ. Результаты показывают, что постепенное ускорение расслабления происходит за счет выпрямления пружинистой структуры коннектина (титина), которая сжимается во время сокращения.

Ключевые слова: миокард, ауковольюмическая фаза, коннектин (титин)

DOI: 10.31857/S0869813923100060, **EDN:** VBONMG

ВВЕДЕНИЕ

Диастола сердца является важнейшей фазой сердечного цикла, она определяет степень растяжения саркомеров и силу последующего сокращения. Принято делить диастолу на 4 периода — изоволюмическое расслабление, фазы быстрого наполнения, диастаза и фазу относительно медленного наполнения при сокращении предсердий. Скорость изоволюмического расслабления определяет уровень минимального диастолического давления в левом желудочке (ЛЖ) и тем самым — скорость и величину быстрого наполнения ЛЖ при открытии атриовентрикулярных клапанов. При хронической сердечной недостаточности (ХСН) человека нарушение расслабления миокарда является серьезной проблемой [1], оно является также ключевым показателем диастолической дисфункции [2].

Расслабление миокарда представляет собой сложный процесс, в котором выделяют активный и пассивный компоненты. Активный компонент — это процесс поглощения Ca^{++} из миофибрилл главным образом в саркоплазматический ретикулум через кальциевую АТФазу SERCA2a. Он происходит с затратой АТФ, так как Ca^{++} транспортируется внутрь против высокого концентрационного градиента и требует около 30% энергии, затрачиваемой при сокращении [3]. Кроме того, удаление Ca^{++} из миоплазмы происходит также при участии натрий-кальциевого обменника сарколеммы (NCX), но этот компонент слабо выражен у крыс и мышей [4]. Пассивный компонент обеспечивает постепенное восстановление исходной

длины саркомеров, он определяется свойствами сократительных белков [5]. Это, в частности, подтверждается тем, что в большинстве экспериментальных работ показано, что скорость снижения переходного процесса кальция обычно медленнее, чем скорость расслабления [6].

Подавляющее большинство работ по исследованию расслабления посвящено изучению активного компонента, поскольку он в значительной мере определяет глубину расслабления [7]. Поскольку максимальная скорость снижения давления ($-dP/dt$) зависит от величины максимального давления в ЛЖ ($P_{\max}$), было предложено характеризовать этот процесс индексом расслабления, представлявшим отношение $-dP/dt/P_{\max}$ [8]. Этот показатель был стабилен в пределах нормального $P_{\max}$, но уменьшался при высоком $P_{\max}$. Вскоре был разработан другой критерий — константа времени расслабления (τ), определяемая на основе логарифмирования кривой падения давления в ЛЖ [9]. Эксперименты на изолированных трабекулах отчетливо показали ускорение расслабления при увеличении частоты сокращений [10, 11]. В условиях *in vivo* это позволяет сердцу обеспечить достаточное наполнение желудочков при укороченной диастолической паузе. Однако эта закономерность у мышей и крыс *in vivo* проявляется гораздо слабее из-за ограниченного диапазона увеличения частоты сокращений. Также в этих условиях τ мало зависит от частоты сокращений, систолического давления в ЛЖ, диастолического и конечно-систолического объема ЛЖ, повышения концентрации Ca^{++} , но значительно уменьшается под влиянием норадреналина [12] или изопротеренола. Это согласуется с известными данными о способности катехоламинов ускорять поглощение Ca^{++} из миофибрилл в саркоплазматический ретикулум.

Различные способы оценки изоволюмического расслабления были применены [13], но заключительная фаза расслабления не привлекала широкого внимания. Полагают, что моноэкспоненциальный характер кривой падения давления сохраняется до завершения расслабления [9], но уже давно в опытах на сердцах морских свинок [14] и сердцах собак *in vivo* [15] было обнаружено ускоренное падение давления в этой фазе, совпадающее с начинающимся увеличением камеры ЛЖ. Эта фаза диастолы, в отличие от изоволюмической, получила название “ауксоволюмической”, поскольку расслабление происходит при переменном объеме ЛЖ. Расчет константы скорости расслабления (величины, обратной τ) на основе логарифмирования кривой давления, показал ее более высокую чувствительность к инотропным факторам по сравнению с константой в изоволюмической фазе. Однако отсутствие конкретных данных о соотношении давления и объема ЛЖ в ауксоволюмической фазе из-за отсутствовавших тогда технических возможностей ограничило возможности анализа. Только после создания высокочувствительных датчиков, позволяющих одновременно регистрировать объем ЛЖ и давление в нем с высоким временным разрешением, стало возможным проанализировать их соотношение в начальной фазе диастолы. Цель данной работы состояла в детальном анализе всей кривой расслабления и динамики начального наполнения ЛЖ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

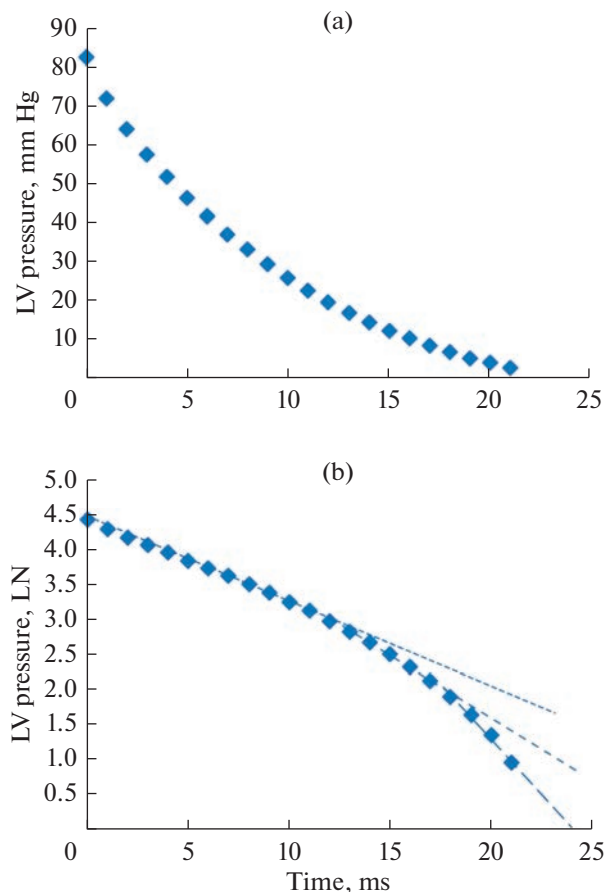


Рис. 1. Динамика падения давления в ЛЖ в обычной (а) и логарифмированной (б) шкале. 1 и 2 – изоволюмическая фаза, 3 – аукововолюмическая фаза. Крутизна наклона при X характеризует константу скорости расслабления каждого участка.

Под золеиловым наркозом (5 мг/кг) выполняли катетеризацию ЛЖ при помощи стандартного PV-катетера FTH-1912B-8018, вводимого через правую сонную артерию, и усилителя ADV500 (Transonic, Канада). Использовали программное обеспечение LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия), позволявшее рассчитывать более 20 параметров сократительной функции в ходе сердечного цикла. В целях уменьшения притока к сердцу выполняли кратковременное пережатие нижней полой вены [12]. Для статистической обработки результатов измерений использовали алгоритмы, предоставляемые программой Microsoft Excel (2013). Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

Расчет констант расслабления. Для анализа используется участок давления в ЛЖ, начинающийся от момента пика скорости падения давления, который близко совпадает с моментом закрытия аортальных клапанов. Если бы расслабление на всем протяжении было экспоненциальным, то при натуральном логарифмировании кривой давления, представленной на рис. 1а, была бы прямая линия. Однако на рис. 1б видно постепенное увеличение наклона кривой, отчетливо

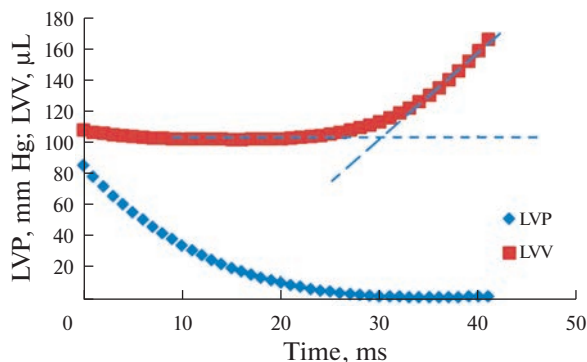


Рис. 2. Динамика падения давления в ЛЖ (внизу, ДЛЖ) и прироста объема ЛЖ (вверху, ОЛЖ). Шкала на ординате представляет величины давления (мм рт. ст.) и объема ЛЖ (мкл).

видны 3 степени наклона. В каждом участке происходит подбор линии тренда с вычислением величины достоверности аппроксимации R^2 не меньше 0.999. Наклон линии тренда на этих трех участках характеризуется величинами: 1) $y = -0.115x$ ($R^2 = 0.999$); 2) $y = -0.1569x$ ($R^2 = 0.9991$); 3) $y = -0.2102x$ ($R^2 = 0.9992$). Соответственно начальная изоволюмическая константа расслабления равна 115 с^{-1} , вторая изоволюмическая константа — 157 с^{-1} , а ауксоволюмическая константа — 210 с^{-1} . Обратная величина (1000/константа наклона) характеризует константу времени расслабления (τ), и цифры приобретают обратное значение: 8.7, 6.4 и 4.7 мс. В большинстве опытов логарифмированная кривая разделяется на 3 участка, лишь в некоторых из них — на 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 показана динамика падения давления в ЛЖ и динамика изменения его объема в периоде от максимума скорости снижения давления, который обычно наблюдается при уровне давления 80–90 мм рт. ст. Отчетливо видно, что небольшое увеличение объема ЛЖ на 20 мкл примерно через 10 мс сменяется более крутым увеличением объема после открытия атриовентрикулярных клапанов. Таким образом, длительность ауксоволюмической фазы в данном опыте составила около 10 мс.

Расчет константы скорости расслабления по способу, изложенному в методике, позволяет проследить динамику ее изменения в течение всей фазы падения давления в ЛЖ (рис. 3). Выделено 4 участка, первый заканчивается, когда давление снижается примерно до 20 мм рт. ст., а последний — в ауксоволюмической фазе — наступает на уровне около 8 мм рт. ст., при этом ее величина почти в 2 раза меньше начальной. Следовательно, скорость снижения давления в ауксоволюмической фазе возрастает почти вдвое по сравнению с начальной изоволюмической фазой.

В среднем из 16 опытов константа скорости начальной изоволюмической фазы (ИКР1) составляла $103 \pm 5 \text{ с}^{-1}$, а константа скорости ауксоволюмической фазы (АКР) — $183 \pm 7 \text{ с}^{-1}$, т.е. скорость падения давления в ауксоволюмической фазе была выше в 1.8 раза. Конец первоначального экспоненциального расслабления отмечен на уровне 34 ± 2 мм рт. ст., а начало ауксоволюмической фазы отмечено на уровне 11 ± 1 мм рт. ст. Фракция выброса была равна $65 \pm 2\%$, а минимальное давление в ЛЖ 0.2 ± 0.4 мм рт. ст.

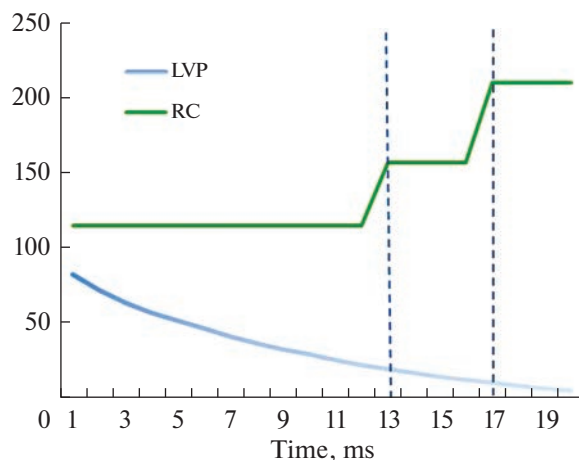


Рис. 3. Иллюстрация динамики снижения давления в ЛЖ (ДЛЖ) и константы скорости расслабления (КР) в течение расслабления в опыте, представленном на рис. 1.

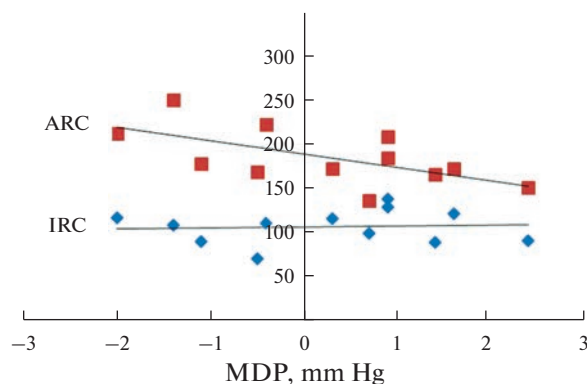


Рис. 4. Взаимосвязь между минимальным диастолическим давлением в ЛЖ (МДД) и константами ауксоволюмической (АКР) и изоволюмической (ИКР) релаксации (s-1) в отдельных экспериментах.

Было отмечено, что более высокие значения АКР наблюдались при более низком минимальном диастолическом давлении в ЛЖ. На рис. 4 показаны эти взаимосвязи, можно видеть, что разница между АКР и ИКР при отрицательном минимальном диастолическом давлении в ЛЖ определенно выше по сравнению с соответствующим значением при положительном минимальном диастолическом давлении в ЛЖ. В этих экспериментах была установлена отрицательная корреляция между АКР и минимальным давлением в ЛЖ ($r = -0.62$).

Также была отмечена тенденция ассоциации более высоких значений АКР с более низким конечным систолическим объемом ЛЖ. Для исследования этой связи были выполнены опыты, в которых конечносистолический объем ЛЖ уменьшали посредством кратковременного пережатия нижней полой вены. В этих опытах ($n = 11$) уменьшение конечносистолического объема среднем на $30 \pm 5\%$ сочеталось с увеличением АКР на $21 \pm 5\%$. Таким образом, ускоренное расслабление в ауксоволю-

мической фазе сочетается с меньшим конечносистолическим объемом и минимальным давлением в ЛЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы подтвердили наши прежние данные об относительном ускорении снижения давления в конечной фазе расслабления [14, 15]. Определена длительность ауковольумической фазы — около 10 мс, что составляет примерно 6% общей длительности цикла для сердца крыс. Ускоренное расслабление в этой фазе естественно сочетается с более глубоким падением давления, что увеличивает градиент между предсердием и ЛЖ и способствует более быстрому наполнению ЛЖ. По существу, АКР является количественной мерой феномена присасывания (suction), возникающего вследствие эластической отдачи (elastic recoil) ЛЖ и впервые наблюдавшегося в изолированных сердцах черепах [16] и собак [17].

Логарифмическая кривая падения давления в ЛЖ характеризуется наличием по крайней мере 3 моноэкспоненциальных участков с возрастающей крутизной. Если бы основу процесса расслабления составляла бы только скорость поглощения Ca^{++} из миофибрилл, то расслабление было бы экспоненциальным на всем протяжении. Однако скорость расслабления всегда превышает скорость размыкания актомиозиновых связей [5], что указывает на включение другого компонента.

Сейчас не вызывает сомнений, что данный процесс осуществляется благодаря распрямлению пружиноподобной структуры коннектина (титина) — белка, соединяющего концы миозиновых нитей с границей саркомера — линией Z [18, 19]. Гигантская пружиноподобная структура коннектина является главным детерминантом пассивного напряжения ЛЖ в диастоле [20]. Структура коннектина сжимается во время сокращения, и чем больше саркомеры сжимаются, тем больше будет упругая сила, возвращающая их в исходное положение. В результате восстанавливающая сила, обеспечивающая феномен присасывания в ранней диастоле, прямо пропорциональна пассивной упругости кардиомиоцитов [19]. Обработка изолированных миоцитов трипсином, разрушающим только коннектин и не влияющая на сократительные белки, снижает упругость мышцы как при растяжении, так и при восстановлении прежней длины [18].

Наличие двух изоформ коннектина — более податливой изоформы N2BA и более упругой N2B ставит вопрос об их функциональном назначении. Очевидно, что сравнительно легко растяжимая изоформа N2BA обеспечивает растяжение ЛЖ при его наполнении в диастоле. В таком случае естественно предполагать, что упругая изоформа N2B, сжимаемая при сокращении, будет распрямлять саркомеры во время расслабления. В экспериментах на миоцитах с различным соотношением изоформ было установлено, что скорость восстановления исходной длины коррелирует с профилем экспрессии изоформ в миоцитах, экспрессирующих высокие уровни изоформы N2B, имеющей наибольшую восстанавливающую жесткость [1, 19, 20]. В одной из последних работ, выполненной на полностью расслабленных кардиомиоцитах из сердца человека, было установлено, что расслабление происходило быстрее при повышенной упругости миофибрилл [21]. Кроме того, содержание изоформы N2B в миокарде наивысшее у мышей и крыс [22], характеризующихся гораздо более высокой частотой сокращений, при которой очень важно обеспечивать высокую скорость расслабления для сохранения диастолической паузы.

Наши данные позволяют предполагать, что включение коннектина в этот процесс начинается во второй половине расслабления и усиливается по мере дальнейшего удаления Ca^{++} из миофибрилл, достигая максимума в ауковольумической

фазе. Очевидно, чем сильнее будет сжата пружина коннектина, тем выше будет АКР (и короче tau). Наши данные о наличии обратной связи между КСО и АКР согласуются с таким представлением, ведь меньший конечносистолический объем ЛЖ возникает при более сильном укорочении саркомеров. И напротив, при увеличении конечносистолического объема, сопряженного с уменьшением фракции выброса, пружиноподобная структура коннектина будет сжиматься меньше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано постепенное ускорение падения давления в ходе расслабления. Оно достигает максимума в ауковольюмической фазе, когда возникает феномен “восстанавливающей силы”, обеспечивающий увеличение камеры ЛЖ еще до открытия митральных клапанов. Весьма вероятно, что ускорение расслабления реализуется благодаря распрямлению более упругой изоформы коннектина N2B, и, таким образом, величина ауковольюмической константы расслабления (или tau) может характеризовать состояние данной изоформы коннектина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 18. III. 1986), положениями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Вашингтон, округ Колумбия, 2011) и другими нормами международного права, регулирующими содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования. Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ “НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова” МЗ РФ (протокол заседания № 2, от 20.03.2023 г).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 23-15-00275).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Janssen PML* (2019) Myocardial relaxation in human heart failure: Why sarcomere kinetics should be center-stage. Arch Biochem Biophys 661: 145–148.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.011>
2. *Bukowski MJ, Cavanaugh B, Abbo A, Chung CS* (2023) Mechanical Control of Relaxation using Intact Cardiac Trabeculae. J Vis Exp 17: 192.
<https://doi.org/10.3791/64879>
3. *Eisner DA, Caldwell JL, Trafford AW, Hutchings DC* (2020) The Control of Diastolic Calcium in the Heart: Basic Mechanisms and Functional Implications. Circ Res 126: 395–412.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119>

4. *Biesiadecki BJ, Davis JP, Ziolo MT, Janssen PML* (2014) Tri-modal regulation of cardiac muscle relaxation; intracellular calcium decline, thin filament deactivation, and cross-bridge cycling kinetics. *Biophys Rev* 6(3-4): 273–289.
<https://doi.org/10.1007/s12551-014-0143-5>
5. *Langer SF, Schmidt HD* (2003) Influence of preload on left ventricular relaxation in isolated ejecting hearts during myocardial depression. *Exp Clin Cardiol* 8: 83–90.
6. *Janssen PML, Stull LB, Marban E* (2002) Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H499–H507.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00595.2001>
7. *Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH* (2004) Diastolic heart failure—abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 350: 1953–1959.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa032566>
8. *Meerson FZ, Kapelko VI* (1975) The significance of the interrelationship between the intensity of the contractile state and the velocity of relaxation in adapting cardiac muscle to function at high work load. *J Mol Cell Cardiol* 7(11): 793–806.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(75\)90131-5](https://doi.org/10.1016/0022-2828(75)90131-5)
9. *Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML* (1976) Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 58: 751–760.
<https://doi.org/10.1172/JCI108522>
10. *Капелько ВИ, Горина MC* (1987) Кальциевая регуляция сокращения и расслабления миокарда. В кн: Регуляция сократительной функции и метаболизма миокарда. М. Наука. 79–112. [*Kapel'ko VI, Gorina MS* (1987) Calcium regulation of myocardial contractility function and myocardial relaxation. In: Regulation of contractile function and myocardial metabolism. M. Nauka. 79–112. (In Russ)].
11. *DeSantiago J, Maier LS, Bers DM* (2002) Frequency-dependent acceleration of relaxation in the heart depends on CaMKII, but not phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 34(8): 975–984.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2034>
12. *Vitale G, Ferrantini C, Piroddi N, Scellini B, Pioner JM, Colombini B, Tesi C, Poggesi C* (2021) The relation between sarcomere energetics and the rate of isometric tension relaxation in healthy and diseased cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 42: 47–57.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09566-2>
13. *Langer SFJ* (2002) Differential laws of left ventricular isovolumic pressure fall. *Physiol Res* 51(1): 1–15.
14. *Капелько ВИ, Новикова НА* (1986) Изо- и ауково-объемные константы расслабления сердца при оценке его инотропизма. Бюлл Всесоюзн кардиол научн центра АМН СССР 1: 37–45. [*Kapel'ko VI, Novikova NA* (1986) Isovolumic and auxovolumic constants of cardiac relaxation in evaluating its inotropism. *Biull Vsesoiuz Kardiol Nauchn Tsentra AMN SSSR* 1: 37–45. (In Russ)].
15. *Orlova TsR, Kapel'ko VI* (1986) Rate constants of left ventricular relaxation: the effect of inotropic and mechanical factors. *Cardiology* 26(6): 79–83.
16. *Katz LN* (1930) The role played by the ventricular relaxation process in filling the ventricle. *Am J Physiol* 95: 542–553.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1930.95.3.542>
17. *Brecher GA* (1956) Experimental evidence of ventricular diastolic suction. *Circ Res* 4: 513–518.
<https://doi.org/10.1161/01.res.4.5.513>
18. *Helmes M, Trombitás K, Granzier H* (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79: 619–626.
<https://doi.org/10.1161/01.res.79.3.619>
19. *Preetha N, Yiming W, Helmes M, Fukuda N, Labeit S, Granzier H* (2005) Restoring force development by titin/connectin and assessment of Ig domain unfolding. *J Muscle Res Cell Motil* 26: 307–317.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9037-2>
20. *Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H* (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105: 631–638.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>
21. *Chen M-P, Kiduko SA, Saad NS, Canan BD, Kilic A, Mohler PJ, Janssen PML* (2020) Stretching single titin molecules from failing human hearts reveals titin's role in blunting cardiac kinetic reserve. *Cardiovasc Res* 116: 127–137.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvz043>
22. *Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H* (2000) Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86: 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>

Analysis of Relaxation Phase in the Rat Heart**V. I. Kapelko^a, A. A. Abramov^a, and V. L. Lakomkin^{a, *}***^aNational Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Healthcare, Russian Federation, Moscow, Russia***e-mail: v.lakomkin@yandex.ru*

The rate and depth of myocardial relaxation determine left ventricular (LV) filling in early diastole. To analyze the relaxation phase, the method of logarithm of LV pressure fall in rats was used. A gradual acceleration of relaxation was found during the transition from the isovolumic phase to the auxovolumic phase, immediately before the opening of the atrioventricular valves. The relaxation rate constant in this phase has been inversely correlated with the values of the minimum LV diastolic pressure and LV endsystolic volume. The results suggest that the gradual acceleration of relaxation is due to the straightening of the spring-like structure of connectin (titin), which is compressed during contraction.

Keywords: myocardium, auxovolumic phase, connectin (titin)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЛЕГОЧНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ ОСЛАБЛЯЕТ
ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫЕ РЕАКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ
АЛЬФА-1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В БОЛЬШОМ КРУГЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ**

© 2023 г. А. А. Абрамов^{1, *}, В. Л. Лакомкин¹, **Е. В. Лукошкова¹**, А. В. Просвирнин¹,
В. И. Капелько¹, В. С. Кузьмин^{1, 2}

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова,
Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: ferk_88@list.ru

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 22.09.2023 г.

Принята к публикации 25.09.2023 г.

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) сопровождается подъемом давления в малом круге кровообращения, изменением его чувствительности к регуляторным факторам; для ЛАГ характерна активация симпатического отдела нервной и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем. Изменение чувствительности сосудов системного круга кровообращения (СКК) к проконстрикторным воздействиям при ЛАГ не исследовано. В работе изучали вазоконстрикторные реакции в СКК при хронической монокроталиновой модели ЛАГ у крыс. Регистрировали среднее артериальное давление (САД) на фоне двойной автономной блокады при введении агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов ($\alpha 1$ -АР) фенилэфрина (ФЭ) у бодрствующих крыс исходно и через 4 нед. после введения монокроталина (МКТ). Регистрацию САД при действии ФЭ проводили также на фоне ангиотензина-II (АП II). Оценивали максимальную величину ($A_{\max}$) изменения САД и наибольшее время полувозвращения САД ($T_{\Delta \text{САД}1/2}$) к исходному уровню у крыс после введения ФЭ. У крыс ЛАГ через 4 нед. ($n = 6$) после введения МКТ не наблюдалось значимого изменения $A_{\max}$, однако $T_{\Delta \text{САД}1/2}$ оказывалось значительно меньше, чем у контрольных животных. АП II приводит к увеличению $A_{\max}$ и $T_{\Delta \text{САД}1/2}$ у контрольных крыс. Однако у крыс с ЛАГ потенциация ангиотензином $A_{\max}$ и $T_{\Delta \text{САД}1/2}$ не обнаруживается. Таким образом, у животных с ЛАГ снижается способность артерий большого круга поддерживать тонус в ответ на активацию $\alpha 1$ -АР. ЛАГ подавляет способность АП II стимулировать симпатические ответы в СКК. Впервые *in vivo* на системном уровне продемонстрировано, что ремоделирование и изменение функционального состояния малого круга кровообращения приводит к перестройке регуляции сосудистого тонуса в большом круге кровообращения.

Ключевые слова: легочная артериальная гипертензия, вазоконстрикторные ответы, $\alpha 1$ -адренорецепторы, ангиотензин II, регуляция тонуса артерий

DOI: 10.31857/S0869813923100023, **EDN:** XDTYSI

ВВЕДЕНИЕ

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) является заболеванием, которое сопровождается обструктивными изменениями в сосудистом русле малого круга кро-

вообращения, приводящими к росту правожелудочкового систолического давления, гипертрофии правого желудочка, увеличению легочного сосудистого сопротивления, нарушению циркуляции и оксигенации крови в малом круге кровообращения [1]. Большая часть как клинических, так и фундаментальных работ направлены на изучение механизмов формирования функциональных и структурных изменений в малом круге кровообращения, включая сосудистое русло легочных артерий, легочных вен, правый желудочек сердца. Однако к настоящему моменту накапливаются данные, свидетельствующие в пользу того, что множественные патологические изменения в большом круге кровообращения сопутствуют ЛАГ. За пределами легочного круга кровообращения ЛАГ манифестирует в форме нарушенной поток-зависимой дилатации в ряде системных артерий [2], недостаточности церебральной циркуляции [3], сниженного почечного кровотока [4], миопатий, ассоциированных с уменьшением плотности микроциркуляторного русла [5]. Эти изменения, вероятно, обусловлены нарушениями нейрогуморального контроля и изменениями чувствительности элементов большого круга кровообращения к циркулирующим регуляторным факторам.

Хорошо известно, что при ЛАГ тонус симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС) повышен [6]. Патологическую активацию симпатического отдела ВНС рассматривают как часть так называемого “нейрогуморального дисбаланса”, наблюдаемого при ЛАГ, который сопровождается изменениями “системной гемодинамики” [7].

Автономный нервный контроль и регуляция гемодинамики со стороны ренин-альдостерон-ангиотензиновой системы (РААС) тесно переплетены: повышенная продукция ангиотензина II (АТII) и активность РААС при ЛАГ вследствие роста легочного сосудистого сопротивления и падения ударного объема, способствует АТII-опосредованному усилению высвобождения норадреналина (НА) [8–10]. Предполагается, что симпатический отдел ВНС, как и РААС, вовлечены в патогенез ЛАГ и в проявления ЛАГ в большом круге [11]. Однако эти эффекты изучены в аспекте дисфункции и адренергической дисрегуляции правого и левого желудочков сердца за счет сдвига профиля экспрессии и вовлечения сигнальных путей $\beta_1/2/3$ -адренорецепторов миокарда [12].

В большинстве артерий большого круга кровообращения симпатическая стимуляция приводит к вазоконстрикции за счет активации адренорецепторов α_1 -типа (α_1 -АР) гладкомышечных клеток (ГМК) стенки сосудов [13]. Известно, что АТII потенцирует и амплифицирует вазоконстрикцию, вызванную норадреналином и опосредованную стимуляцией α_1 -АР [14–17]. Тем не менее остается неизвестным,

Список сокращений: МКТ – монокроталин; ЛАГ – легочная артериальная гипертензия; САД – системное артериальное давление; ФЭ – фенилэфрин; АТ-II – ангиотензин-II; $A_{\max}$ – максимально возможная величина изменения САД; $T_{\Delta MAP1/2}$ – наибольшая длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню; НП – нитропруссид Na; ВНС – вегетативная нервная система; ДБ – двойная блокада вегетативной нервной системы атропином и атенололом; ЧСС – частота сердечных сокращений; ЛЖ – левый желудочек сердца; ПЖ – правый желудочек сердца; УО – ударный объем левого желудочка сердца; СКК – системный круг кровообращения; GC-A – рецептор к ANP с гуанилатциклазной активностью; NPRC – “клиренс” рецептор к ANP; PKG I – протеинкиназа G I; RGS 2-P – фосфорилированный регулятор G-белок-сопряженных рецепторов – ингибитор рецепторов ангиотензина (AT1-P); PDE3A – фосфодиэстераза 3A; α_1 -I-AR – α_1 -адренорецептор; SERCA – саркоплазматический Ca^{2+} транспортер-АТФаза; RhoA – малая ГТФаза семейства RAS; ROS – активные формы кислорода; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BNP – мозговой натрийуретический пептид; CNP – натрийуретический пептид С-типа; ГМК – гладкомышечная клетка; NO – оксид азота; цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; НАДН – никотинамиддинуклеотид фосфат; АТ/ЕТ – отношение длительности периода ускорения потока (АТ) к длительности фазы изгнания (ЕТ) крови; ФВ – фракция выброса ЛЖ; ТсПЖ – толщина стенки правого желудочка; TAPSE (индекс сократимости ПЖ) – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана; УСД – устройство прямого хронического сосудистого доступа, имплантируемое подкожно крысе; VABR3T/25 – ответная часть к УСД; 375/D/22 – шарнир; CM375BS – противовес; BSA – бычий сывороточный альбумин.

изменяется ли при ЛАГ системная гемодинамика в результате перестройки чувствительности сосудистого русла большого круга кровообращения к регуляторным факторам.

Помимо РААС и ВНС, целый спектр системных регуляторных механизмов при ЛАГ может вносить вклад в “нейрогуморальный дисбаланс”. Например, при ЛАГ наблюдается рост уровня альдостерона и вазопрессина в плазме крови [18], что приводит к избыточной реабсорбции Na^+ и гиперволемии [19]. Известно, что ЛАГ сопровождается значительным повышением секреции натрийуретических пептидов (NP), изменением профиля и уровня экспрессии его рецепторов в ГМК [20], т.е. перестройкой регуляторной “оси” NP. Повышение уровня NP, вероятно, направлено на компенсацию эффектов РААС и вазопрессина.

Дисфункция эндотелия и снижение продукции вазодилататорных факторов, в первую очередь оксида азота (NO), в системных и коронарных артериях типично для ЛАГ [5, 21]. ЛАГ-ассоциированное снижение продукции NO, вероятно, связано как с изменением транскрипционной активности [22], так и с АТII-индуцированной продукцией активных форм кислорода НАДФН-оксидазами [23, 24]. Таким образом, ЛАГ может приводить к многообразной и малопредсказуемой перестройке тесно взаимодействующих факторов, вовлеченных в регуляцию кровообращения. Механизмы и результирующие изменения реактивности сосудистого русла большого круга, обусловленные ЛАГ, практически не исследованы.

В данной работе исследуется, в какой степени вазоконстрикторные и дилаторные реакции сосудов большого круга, вызванные симпатической стимуляцией, АТII или донорами NO, оказываются изменены при ЛАГ. Функциональные реакции сосудистого русла большого круга кровообращения исследованы *in vivo* с использованием хронической монокроталиновой модели легочной артериальной гипертензии на примере крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Работа выполнена с использованием крыс (самцы стока Wistar, 2–4 мес., 290 ± 30 г, 25 животных). В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными. Перед экспериментами животных содержали в виварии в течение 2 нед. в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*. В течение 5 нед. после вживления катетеров и индукции ЛАГ животных содержали в тех же условиях, но в индивидуальных клетках.

Катетеризация

Для хронической регистрации артериального давления и инфузии вазоактивных соединений крыс контрольной и экспериментальной групп наркотизировали (золетил-100, в.б., 0.1 мл на 100 г массы тела животного). Крысам вживляли 3 сосудистых комбинированных полиуретановых катетера (Instechlabs, США): артериальный катетер (внутрисосудистая часть 4.5–5.5 см, ВТПУ-027(0.4 × 0.7 мм, 2 Fr), внесосудистая часть — ВТПУ-040 (0.6 × 1 мм, 3 Fr)) вживляли в левую бедренную артерию, 2 венозных катетера (внутрисосудистая часть 5–5.5 см, ВТПУ-027, 0.4 × 0.7 мм, 2 Fr) с дополнительной удлиненной силиконовой оболочкой — BTSIL-037 (для минимизации повреждения эндокарда) через левую яремную вену вводили в правое предсердия. Катетеризацию осуществляли стандартным способом. Катетеры подключали к трехканальному устройству прямого хронического сосудистого доступа (УСД, VABR3B/22, Instechlabs, США), которое имплантировали на холку

в сформированный под кожей карман. Осуществляли постоперационную анти-септическую обработку (стрептоцид, повидон-йод); в течение трех (пяти дней в случае гематурии) дней в период восстановления крысам вводили гентамицин (0.1 мл/100 г, в.б.).

Регистрация среднего артериального давления

Среднее артериальное давление (САД) регистрировали в модифицированной установке для работы с бодрствующими животными прямым методом. САД считывали как частное площади под кривой давления за один кардицикл и его длительности [25]. Регистрацию САД осуществляли в одно и то же время суток в условиях приглушенного освещения и максимально возможного исключения стрессирующих факторов в “домашних” клетках, адаптированных для длительной регистрации давления и синхронной внутривенной инфузии подвижным животным (Instechlabs, США), ответная часть – VABR3T/25, шарнир – 375/D/22, противовес – CM375BS. Для регистрации САД артериальный катетер и УСД подключали к датчику (Gould Statham 23PB, США) и мостовому усилителю (Biograph-4, Россия), сигнал от которого поступал на АЦП (National Instruments, США) и регистрировался на ПК при помощи ПО (National Instruments, LabView RunTime Engine) с частотой 10 КГц. Сигналы обрабатывали с помощью ПО (Data Acquisition, среда LabView, разработчик – Е.В. Лукошкова). Для предотвращения тромбообразования в артериальном катетере осуществляли его промывку 10%-ным раствором гепарина (5000 Ед) в физиологическом растворе (1–1.5 мкл/мин).

Индукция ЛАГ

Для индукции ЛАГ использовали стандартный подход [26], основанный на однократном введении монокроталина (МКТ, Sigma Aldrich, подкожно, 60 мг/кг, 0.3 мл). МКТ навешивали для каждого животного отдельно и растворяли в физиологическом растворе с титрованием 0.1 нормальной HCl до полного растворения осадка. Затем pH раствора МКТ доводили до 7 титрованием 0.2 нормальной NaOH. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор (0.3 мл). В эксперимент животных брали по окончании периода восстановления через 6 сут после вживления катетеров. ЛАГ индуцировали только у тех животных, которые через 6 сут после вживления катетеров демонстрировали нормальный уровень среднего артериального давления (100 ± 10 мм рт. ст.), ЧСС покоя 360 ± 30 уд./мин, ректальную температуру $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, а также суточный объем потребляемой жидкости (30 ± 10 мл).

Верификация ЛАГ методом эхокардиографии

Формирование экспериментальной ЛАГ верифицировали стандартным способом [27, 28] на основе ультразвуковых (УЗИ) признаков гипертрофии правого желудочка (ПЖ) и изменения функциональных показателей правого и левого желудочков (ЛЖ) сердца. УЗИ сердца проводили до инъекции МКТ, а затем на 14-й и 28-й день после введения МКТ (УЗИ аппарат Visual Sonics VEVO 1100 с линейным датчиком MS250, диапазон частот 12–24 МГц). Использовался лево- и правосторонний парастернальный доступ для построения позиций по длинной (1) и короткой (2) оси левого желудочка, по короткой оси на уровне основания сердца (3), по длинной оси легочного ствола (4). Определяли толщину свободной стенки ПЖ и диаметр легочной артерии.

При УЗИ-доплерографии измеряли систолический временной интервал АТ/ЕТ для правого желудочка как отношение длительности периода ускорения потока (АТ) к длительности фазы изгнания (ЕТ) крови. Индекс сократимости ПЖ

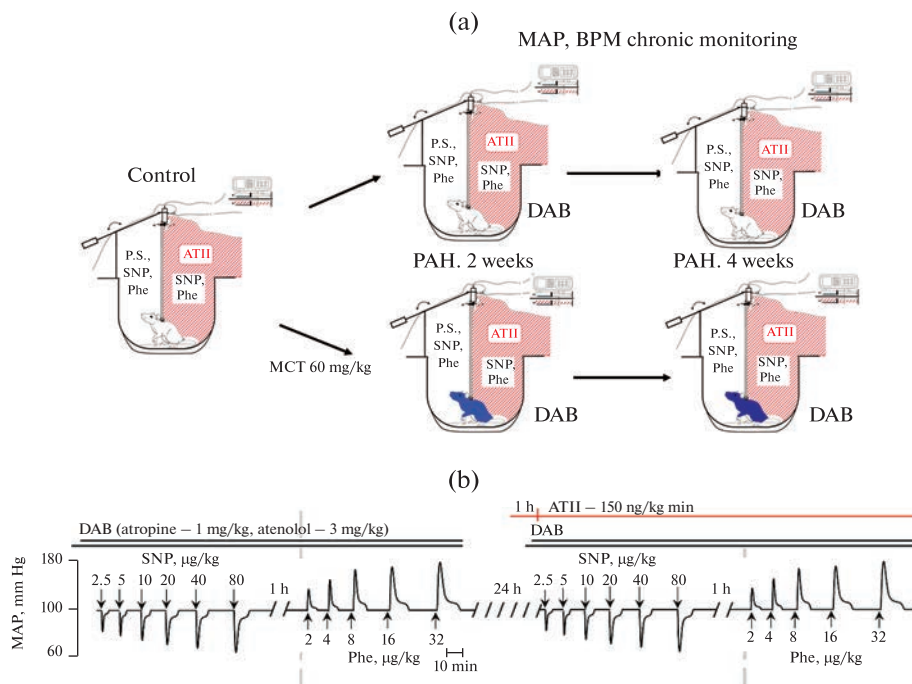


Рис. 1. Моделирование ЛАГ (а) и схема (б) индукции вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения. Синий цвет – формирующаяся ЛАГ (2 нед.), фиолетовый цвет – сформированная ЛАГ (4 нед.). Красная штриховка – инфузия ангиотензина II.

(TAPSE) оценивали (в М-режиме) по амплитуде систолической экскурсии трикуспидального кольца стандартным способом [29].

При эхокардиографическом исследовании (ЭХО-КГ) также определяли (В-режим) конечный диастолический и систолический объемы левого желудочка; рассчитывали фракцию выброса (ФВ) и ударный объем (УО) ЛЖ.

Инфузия вазоактивных соединений и протоколы экспериментов

Инфузию вазоактивных соединений осуществляли через внутривенные катетеры, подключенные к УСД при помощи шприцевых программируемых инфузионных помп (Harvard Apparatus Pump 11 Elite Infusion/Withdrawal, США) со шприцами Hamilton 1002 TLL (2.5 мл, байонетный затвор).

По окончании постоперационного периода восстановления, а также на 14-й и 28-й (рис. 1а) день после инъекции МКТ после 30-минутного периода адаптации и контрольной записи САД, животным вводили нитропруссид натрия (НП, Sigma Aldrich) в последовательно возрастающих дозах от 2.5 до 80 мкг/кг в объеме 0.3 мл за 3 мин с интервалами 10 или 20 мин (рис. 1б).

Не менее чем через 1 ч после окончания введения НП, стабилизации САД и промывки катетера осуществляли введение агониста $\alpha 1$ -АР фенилэфрина (ФЭ, Sigma Aldrich) в последовательно возрастающих дозах от 2 до 32 мкг/кг в объеме 0.3 мл за 1 мин с интервалами 10–20 мин. Инфузию ФЭ и НП осуществляли на фоне предварительно индуцированной двойной автономной блокады (ДАБ) атенололом (3 мг/кг, в.в) и атропином (1 мг/кг, в.в), осуществляемой для подавления барорецепторного изменения ЧСС в ответ на введение вазоактивных соединений.

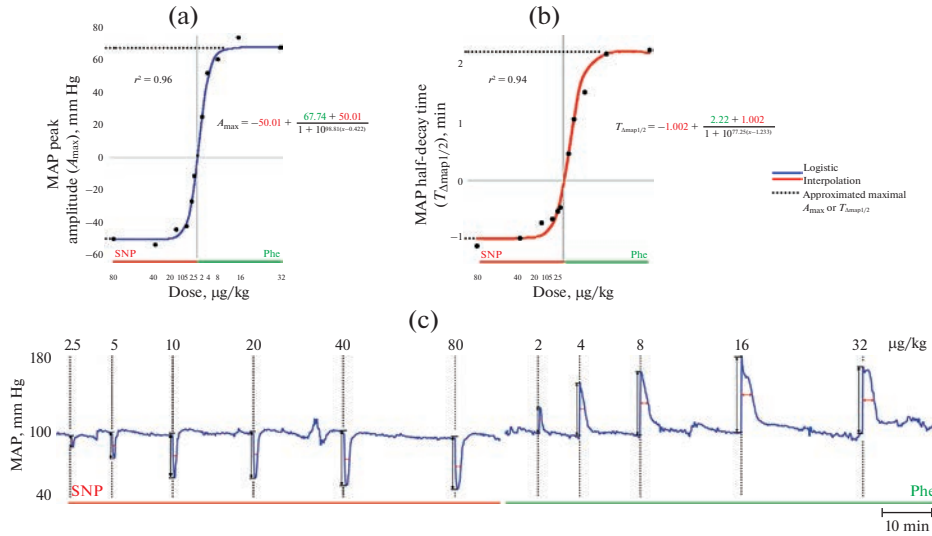


Рис. 2. Репрезентативные примеры кривых зависимости амплитуды вазоконстрикторного ответа (а) или длительности периода “полуовращения” САД ($T_{\Delta CAD1/2}$) (б) от дозы фенилэфрина у контрольных крыс (4 нед., группа “контроль/ДАБ”). На вставках показаны регрессионные уравнения. Красным и зеленым цветом указаны асимптотические максимальные значения амплитуды и длительности периода полуовращения САД к исходному уровню. (с) — оригинальная запись изменения САД при действии фенилэфрина (ФЭ) и нитропруссиде натрия (НП), использованная для построения репрезентативных кривых на а и б, амплитуда ответа отмечена черными вертикальными стрелками, длительность периода “полуовращения” САД ($T_{\Delta CAD1/2}$) — горизонтальными красными стрелками.

В части экспериментов, на следующие сутки после введения НП и ФЭ, повторяли эксперимент, но на фоне непрерывной инфузии ангиотензина II (150 нг/кг мин, разведен в 0.1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина), которую начинали за 60 мин до введения первой дозы НП (рис 1а, б). Для параллельной инфузии АПГ использовали второй внутривенный катетер.

Оценка динамики вазоконстрикторных ответов в большом круге

Вычисляли максимальную возможную величину (амплитуду, $A_{\max}$) изменения САД и наибольшую длительность периода полуовращения САД ($T_{\Delta CAD1/2}$) к исходному уровню у крыс в ответ на введение НП или ФЭ. Для каждого эксперимента, используя индивидуальные значения амплитуды изменения САД или индивидуальные значения времени полуовращения САД, определяемые при введении каждой дозы вазоактивного соединения (рис. 2с), методом аппроксимации [30, 31] с помощью четырехпараметрической логистической кривой вида:

$$y(x) = c + \frac{d - c}{1 + 10^{b(x - \bar{e})}},$$

где $\bar{e}$ — абсцисса точки перегиба кривой, b — коэффициент наклона, c — нижняя асимптота, d — верхняя асимптота, получали регрессионную кривую.

В качестве $A_{\max}$ или $T_{\Delta CAD1/2}$ использовали асимптотические значения (равные коэффициентам c , d) регрессионной кривой (рис. 2а, б) для минимизации вариабельности межиндивидуальной ширины диапазона реакций САД, а также вариабельности полумаксимальной эффективной концентрации вазоактивных соединений.

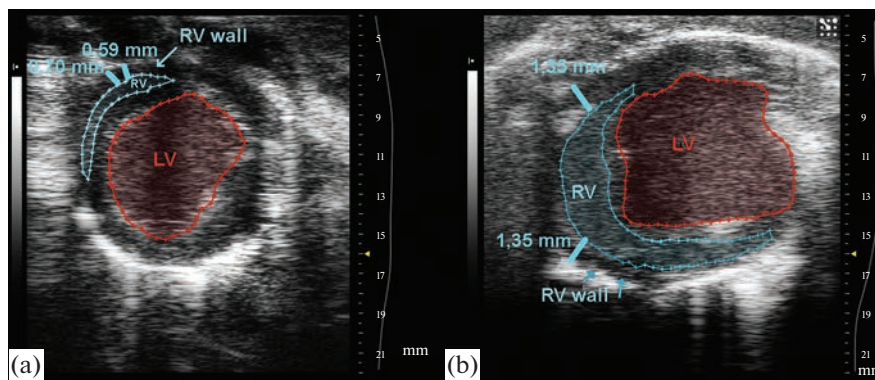


Рис. 3. Оценка толщины стенки правого желудочка (RV) при УЗИ сердца. (a) – репрезентативный пример УЗИ-изображения стенки правого желудочка крысы исходно. (b) – то же, что и на (a), для крысы через 4 нед. после инъекции монокроталина и индукции ЛАГ. Голубой линией показана толщина стенки правого желудочка, определяемая по короткой оси. Левый желудочек на уровне средних сегментов левого желудочка в момент окончания диастолы.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили в среде R [32, 33]. Подготовка данных осуществлялась средствами пакета tidyverse [34]. Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью теста Фридмана для связанных выборок, либо теста Краскелла–Уоллеса для несвязанных (оба теста – непараметрическая альтернатива однофакторной ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов (Вилкоксона для связанных выборок, Манна–Уитни для несвязанных выборок) для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми, а также внесением поправки Холма. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Статистические тесты проводились с помощью пакета rstatix [35]. Данные представлены как медиана $\pm$ абсолютное отклонение медианы за исключением репрезентативных записей. Визуализация данных выполнена средствами пакетов ggplot2 [36], gghalves [37] и patchwork [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические и функциональные признаки ЛАГ у крыс после введения МКТ

Однократная инъекция МКТ приводила к возникновению морфологических и функциональных признаков формирования ЛАГ у крыс. Толщина стенки правого желудочка (ТсПЖ) увеличивалась от 0.651 ± 0.076 до 0.9 ± 0.15 и 0.9 ± 0.27 мм через 2 и 4 нед. после введения МКТ ($n = 7$, $p < 0.01$) соответственно (рис. 3). Синхронно с изменениями ТсПЖ, увеличивался диаметр легочной артерии: от 2.46 ± 0.13 до 2.8 ± 0.19 мм через 2 нед. и до 3.4 ± 0.37 мм ($n = 7$, $p < 0.01$) через 2 и 4 нед. после введения МКТ соответственно.

Индекс сократимости ПЖ (TAPSE) снижался до 1 ± 0.13 и 1.1 ± 0.15 от 1.3 ± 0.15 мм ($n = 7$, $p < 0.01$) соответственно к 2 и 4 нед. после инъекции МКТ. Отношение АТ/ЕТ у крыс через 2 и 4 нед. после введения МКТ снижался от 0.3 ± 0.05 до 0.23 ± 0.07 и 0.21 ± 0.04 ($n = 7$, $p < 0.01$) через 2 и 4 нед. после введения МКТ, что указывает на прогрессирующий рост сосудистого сопротивления в малом круге кровообращения.

При формировании ЛАГ у крыс не происходило значимого изменения ударного объема и фракции выброса левого желудочка: УО до введения МКТ и через 4 нед. после его инъекции составляло 280 ± 35 и 310 ± 38 мкл ($n = 7, p > 0.1$); ФВ до введения МКТ — $67 \pm 9\%$; через 4 нед. — $72 \pm 8\%$ ($n = 7, p > 0.1$).

Максимальная величина изменения САД при действии фенилэфрина у крыс ЛАГ

В контрольной группе животных через 4 нед. после начала эксперимента САД в условиях покоя составляло 105 ± 11 мм рт. ст. ($n = 6$). У крыс с ЛАГ через 4 нед. после введения МКТ ($n = 8$) САД мало отличалось от такового у контрольных животных (109 ± 14 мм рт. ст., $p > 0.1$). В контрольных условиях введение ФЭ на фоне ДАБ приводило быстрому дозозависимому, но транзиторному увеличению САД. Болюсное введение ФЭ в дозах 2–32 мкг/кг вызывало рост САД, пиковое значение которого (от 100 ± 1 до 180 ± 12 мм рт. ст. при действии 32 мкг/кг ФЭ) достигалось за 3–5 с и сопровождалось возвратом артериального давления к исходному уровню за 25–280 с ($n = 6$, рис. 4а). Максимальная возможная величина изменения САД ($A_{\max}$) у контрольных животных значимо не менялась в течение 4 нед. и составляла 61 ± 13 (исходно), 75 ± 13.6 мм рт. ст. (4 нед., $n = 6, p > 0.05$). Такой же тип реакции в ответ на болюсное введение ФЭ наблюдался у животных с ЛАГ. После введения МКТ (4 нед.) $A_{\max}$ не менялся: исходно этот параметр в данной группе животных составлял 67.7 ± 1.3 , а через 4 нед. 71.2 ± 12.8 мм рт. ст. ($p > 0.05$). Максимальная возможная величина изменения САД у крыс с ЛАГ и контрольных животных статистически значимо не различалась ($p > 0.05$).

Длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню при действии фенилэфрина у крыс с ЛАГ

У контрольных животных максимальная длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню ($T_{\Delta\text{САД}1/2}$) после его транзиторного роста, вызванного ФЭ на фоне ДАБ составляла 1.33 ± 0.11 мин в первый день (исходно) или 1.75 ± 0.21 мин ($n = 6$) через 4 нед. после начала эксперимента (рис. 4б, 5а). У крыс с ЛАГ через 4 нед. ($n = 5$) после введения МКТ $T_{\Delta\text{САД}1/2}$ оказывался в три раза меньше (0.42 ± 0.12 мин, $n = 5, p = 0.019$), чем у контрольных крыс. Уменьшение $T_{\Delta\text{САД}1/2}$ у крыс с ЛАГ по сравнению с контрольными животными наблюдалось для всего диапазона протестированных доз ФЭ (2–32 мкг/кг, рис. 4б).

Влияние ангиотензина-II на время полувозвращения и максимальную величину изменения САД, вызванного фенилэфрином

Ангиотензин незначительно усиливал рост САД, вызванный ФЭ у контрольных животных: $A_{\max}$ на фоне АП II составлял 80.5 ± 11.3 мм рт. ст. (4 нед., $n = 6, p > 0.1$). У крыс с ЛАГ АП II вызывал противоположный эффект — ослабление прессорного ответа, вызванного ФЭ: $A_{\max}$ составлял 31.8 ± 6.5 мм рт. ст. (4 нед. после введения МКТ, $n = 5, p = 0.01$).

У контрольных животных АП II вызывал увеличение длительности периода полувозвращения САД к исходному уровню после введения 2–32 мкг/кг ФЭ (рис. 4б); на фоне АП II $T_{\Delta\text{САД}1/2}$ возрастал до 1.75 ± 0.53 мин (4 нед. после начала эксперимента, $n = 6, p = 0.02$).

У животных группы “ЛАГ/ДАБ” до введения МКТ ангиотензин вызывал увеличение $T_{\Delta\text{САД}1/2}$ на $77.3 \pm 6.5\%$ ($n = 6, p = 0.009$) по сравнению с таковым, наблюдаемым без АП II. Однако через 4 нед. после введения МКТ у животных данной группы, сформировавшей ЛАГ, АП II не оказывал усиливающего действия на прессор-

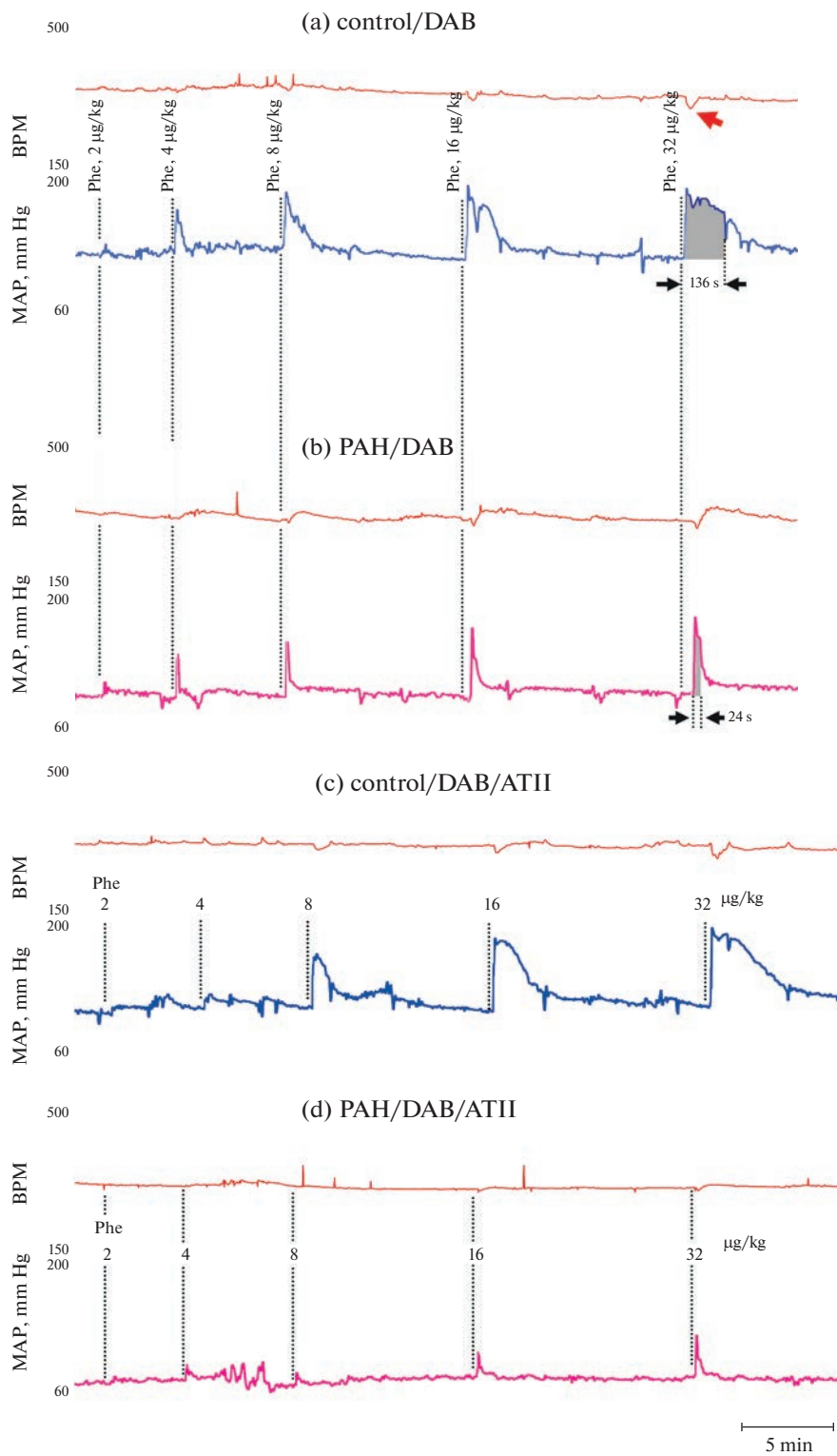


Рис. 4. Репрезентативные примеры вазоконстрикторных ответов, возникающих в русле большого круга кровообращения после активации $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином у контрольных крыс и крыс с ЛАГ. (a) — среднее артериальное давление (САД, в каждой панели *снизу*) и ЧСС (в каждой панели *сверху*) у контрольных крыс с двойной автономной блокадой (ДАБ) через 4 нед. после начала эксперимента (“контроль/ДАБ”) при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2–32 мкг/кг). (b) — САД и ЧСС у крыс с ЛАГ (4 нед.) на фоне ДАБ (“ЛАГ/ДАБ”) при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (4 нед. после введения МКТ, ФЭ, 2–32 мкг/кг). (c) — САД и ЧСС у контрольных крыс (4 нед.) на фоне ДАБ (“контроль/ДАБ/АТII”) при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2–32 мкг/кг) при непрерывной внутриартериальной инфузии ангиотензина II (АТII, 150 нг/кг мин). (d) — САД и ЧСС у крыс с ЛАГ (4 нед.) на фоне ДАБ (“ЛАГ/ДАБ/АТII”) при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2–32 мкг/кг) при непрерывной внутриартериальной инфузии ангиотензина II (АТII, 150 нг/кг мин).

ные эффекты ФЭ. Более того, величина $T_{\Delta\text{САД}1/2}$, наблюдаемая на фоне инфузии ангиотензина II у крыс с ЛАГ, составляла всего 0.34 ± 0.05 мин ($n = 5$) или только $82 \pm 7\%$ от таковой, регистрируемой без АТII (рис. 4d, рис. 5b).

Длительность периода полувозвращения и максимальная величина изменения САД, вызванного нитропруссидом натрия у крыс с ЛАГ

В контрольных условиях введение нитропруссида натрия (НП 2.5–80 мкг/кг) на фоне ДАБ приводило к быстрому, транзиторному, дозозависимому снижению САД. Максимальная возможная величина снижения САД у контрольных животных не менялась в течение 4 нед. и составляла 51 ± 7 мм рт. ст. ($n = 6$). Такое же снижение САД наблюдалось у крыс через 4 нед. после введения МКТ: A_{max} составляло 53 ± 8 мм рт. ст. ($n = 5$, $p > 0.1$). Кроме того, ЛАГ не влияла на длительность периода восстановления исходного уровня САД после его снижения, вызванного

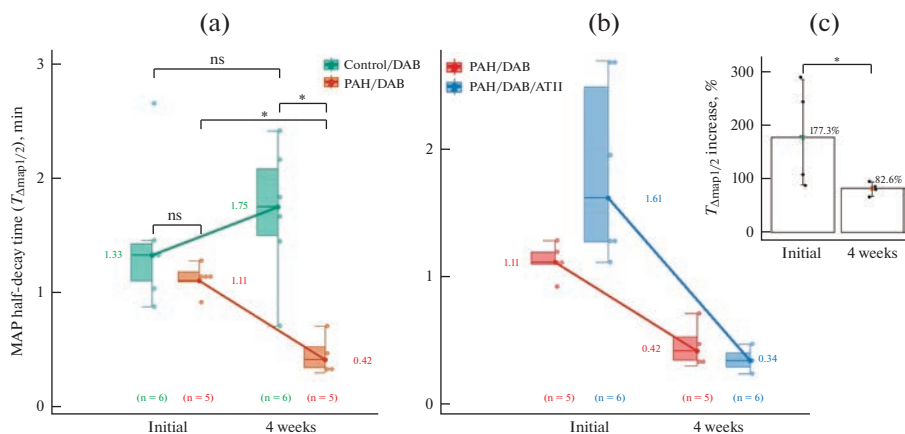


Рис. 5. (a) — наибольшая длительность периода полувозвращения САД ($T_{\Delta\text{САД}1/2}$) к исходному уровню после вазоконстрикторной реакции, вызванной введением фенилэфрина (ФЭ) у контрольных крыс (“контроль/ДАБ”) и крыс с ЛАГ (“ЛАГ/ДАБ”, до введения и через 4 нед. после введения МКТ). (b) — то же, что на (a), но у крыс с ЛАГ до (“ЛАГ/ДАБ”) и после инфузии ангиотензина II (АТII, “ЛАГ/ДАБ/АТII”). (b) — прирост $T_{\Delta\text{САД}1/2}$, вызываемый АТII в контроле и при ЛАГ. ns — не значимо; * — $p < 0.05$ (двухфакторная ANOVA с апостериорными сравнениями).

НП: $T_{\Delta\text{САД}1/2}$ у контрольных крыс и крыс через 4 нед. после введения МКТ оказывалась практически одинаковой — 1.1 ± 0.08 ($n = 6$) и 1.05 ± 0.08 ($n = 5$) соответственно. Ангиотензин II не вызывал заметного изменения реакции САД (A_{max} и $T_{\Delta\text{САД}1/2}$), вызванной введением НП как у контрольных животных, так и у крыс с ЛАГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые проведено исследование реактивности сосудистого русла большого круга кровообращения *in vivo* в хронической модели ЛАГ. Впервые показано, что ЛАГ вызывает изменение вазоконстрикторных ответов в системном круге кровообращения, индуцированных активацией $\alpha 1$ -адренорецепторов: ЛАГ уменьшает длительность прессорной реакции, ослабляет способность сосудов большого круга поддерживать тонус и САД на высоком уровне. Впервые прямо продемонстрировано, что легочная гипертензия приводит к изменению чувствительности сосудов большого круга к ангиотензину II; при ЛАГ АП II не усиливает вазоконстрикторные эффекты, обусловленные стимуляцией $\alpha 1$ -АР, но наоборот, уменьшает величину констрикторного ответа в большом круге кровообращения. В то же время в нашей работе показано, что NO-зависимая вазодилатация и снижение САД в большом круге в хронической модели ЛАГ остаются неизменными. Это наблюдение позволяет предположить, что ЛАГ оказывает преимущественное влияние на отдельные компоненты регуляции сосудистого тонуса в большом круге.

В наших экспериментах у крыс с ЛАГ уровень САД не отличался от такового у контрольных животных, а эффекты вазодилататора оставались неослабленными. В работе впервые *in vivo* на системном уровне продемонстрировано, что ремоделирование и изменение функционального состояния малого круга кровообращения приводит к перестройке именно регуляции сосудистого тонуса в большом круге кровообращения, хотя тонус артерий, уровень САД, а также пассивные свойства сосудистой стенки, связанные с их жесткостью, могут оставаться незатронутыми.

Как указано выше, ЛАГ сопровождается нарушениями кровотока в целом ряде органов за пределами малого круга кровообращения [5]. “Нейрогуморальный дисбаланс”, нарушение адренергической/симпатической регуляции сосудистого тонуса, индуцированное ЛАГ, может служить причиной дисфункции тканей, питаемых сосудами большого круга кровообращения.

Хроническая активация симпатического отдела ВНС, усиление секреции норадреналина симпатическими постганглионарными волокнами, а также активация РААС, типичные для ЛАГ, могут приводить к изменению “реактивности” ГМК стенки артерий большого круга кровообращения, связанной с перестройкой механизмов реализации адренергических сигналов.

Комбинированная активация норадренергической “оси”, РААС и других регуляторных систем, приводит к усилению целого ряда негативных обратных связей, компенсирующих и предотвращающих проконстрикторное действие ЛАГ в большом круге. Такие компенсаторные эффекты, возможно, предотвращают чрезмерный рост базального уровня САД в большом круге, а также приводят к выявленному нами ослаблению реакции на $\alpha 1$ -адренергическую стимуляцию. На спекулятивном уровне можно предположить, что к таким компенсаторным механизмам относится система натрийуретических пептидов. Существует значительный объем данных, подтверждающих повышение уровня секреции натрийуретических пептидов всех трех известных типов (ANP, BNP, CNP) при ЛАГ. Как указано выше, причиной усиления продукции NP предсердными кардиомиоцитами при ЛАГ является гипертрофия, увеличение концентрации Na^+ в плазме, перерастяжение стенки правого предсердия, правожелудочковая гипертрофия [39].

Известно, что ГМК экспрессируют так называемые “клиренс”-рецепторы — NPR-C, основной функцией которых считается удаление из кровотока натрийуретического пептида. Установлено, что экспрессия NPR-C находится под контролем сигнальных каскадов, сопряженных с адренорецепторами [40].

В настоящее время показано, что ГМК стенки артерий экспрессируют не только “клиренс”-, но также рецепторы натрийуретических пептидов А- и В-типа (GC-A и GC-B соответственно). Известно, что эти рецепторы являются рецепторами-гуанилатциклазами [41] и активация рецептора GC-A приводит накоплению в цитоплазме цГМФ, стимуляции протеинкиназы G первого типа (PKG-I). Среди множества мишеней PKG-I в ГМК обнаруживаются Ca-АТФаза саркоплазматического ретикулума (SERCA), фосфодиэстераза PDE3A, а также так называемый регулятор G-белок-сопряженных рецепторов (RGS-2). Фосфорилирование SERCA и PDE3A протеинкиназой G приводит к увеличению скорости удаления кальция из цитоплазмы и снижению $[Ca^{2+}]_i$, а также к повышению базального уровня $[cAMF]_i$. Указанные процессы ускоряют расслабление ГМК и, вероятно, лежат в основе наблюдаемых в наших экспериментах феноменов — уменьшения длительности периода полувозвращения САД ($T_{\Delta САД 1/2}$), т.е. к ускорению релаксации САД после вазоконстрикторного эффекта, вызванного фенилэфрином (в результате стимуляции $\alpha 1$ -АР) у крыс с ЛАГ (рис. 6). Снижение уровня экспрессии или подавление активности NPR-C при ЛАГ может повышать активность натрийуретических пептидов и ослаблять эффекты проконстрикторных факторов.

При ЛАГ наблюдается повреждение и дисфункция эндотелия в малом круге кровообращения. Такой же эффект ЛАГ можно предположить для большого круга кровообращения. Проконстрикторное влияние ЛАГ в большом круге также может реализовываться за счет “перехвата” и инактивации NO активными формами кислорода, продукцию которых НАДФН-оксидазами стимулирует АП II. Таким образом, антиконстрикторное поток- и NO-зависимое действие эндотелия при ЛАГ может быть снижено. Как указано выше, в нашей модели ЛАГ САД в покое у контрольных крыс и крыс через 4 нед. после индукции ЛАГ оставалось на сопоставимом уровне.

Более того, в наших экспериментах наблюдается ослабление проконстрикторных реакций в большом круге. Эти результаты позволяют предположить, что, по меньшей мере, в нашей модели ЛАГ, эндотелий-зависимая регуляция в большом круге нарушена незначительно. Однако наблюдаемое отсутствие изменения САД может быть обусловлено установлением некоего баланса, возникающего в результате АФК-зависимого подавления продукции NO с одной стороны, и повышением чувствительности ГМК к NO с другой стороны.

В наших экспериментах введение донора NO приводило к одинаковому снижению САД у контрольных крыс и крыс с ЛАГ; в нашей модели ЛАГ не влияет на длительность периода восстановления САД после его снижения, вызываемого донором оксида азота. Таким образом, увеличения чувствительности сосудистого русла непосредственно к самому NO не наблюдалось. Спекулятивно, феномен сохранения нормального уровня САД может быть объяснен повышением секреции натрийуретического пептида С-типа (CNP) и рассмотрением его эффектов, опосредованных рецепторами NPR-B. Известно, что экспрессия и секреция CNP крайне высока в сосудистом эндотелии [42]; высвобождаемый конститутивно или в ответ на увеличение напряжения сдвига [43, 44] CNP стимулирует накопление cGMP, как и другие натрийуретические пептиды, в эндотелиальных клетках и ГМК. Известно, что активация сигнального каскада CNP/NPR-B/cGMP/PKG приводит к вазодилатации и/или антиконстрикторным эффектам [45]. Кроме того, известно, что CNP может стимулировать NO-синтазу и соответственно синтез NO несколькими путями [46]. Экспрессия CNP при ЛАГ может повышаться и корре-

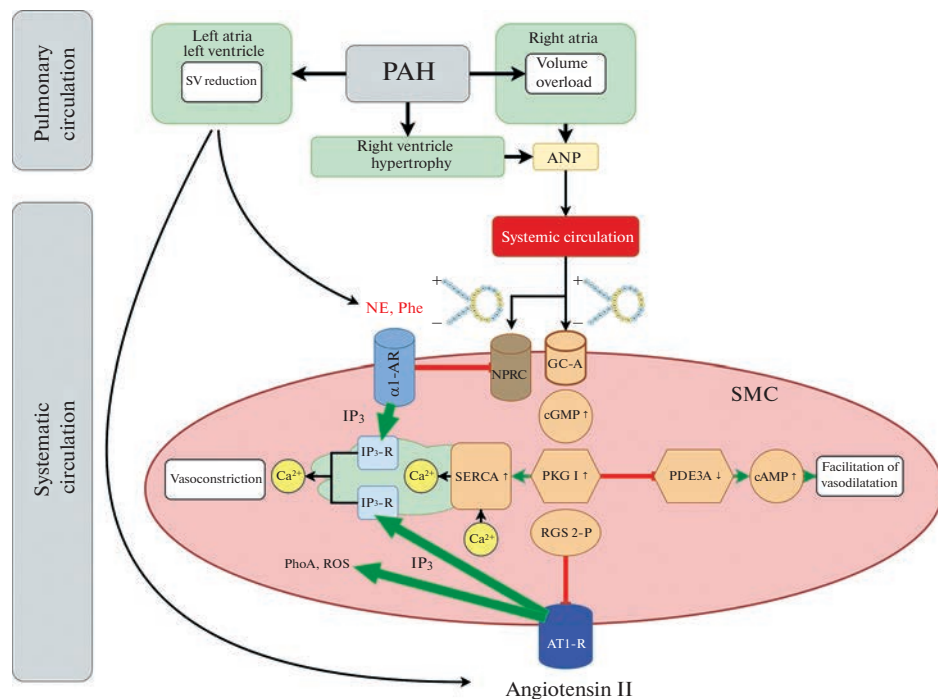


Рис. 6. Предполагаемый механизм ослабления вазоконстрикторных ответов, вызванных активацией $\alpha 1$ -АР и рецепторов АТII в сосудистом русле большого круга кровообращения при легочной артериальной гипертензии. УО – ударный объем; ANP – предсердный натрийуретический пептид; GC-A – рецептор ANP, обладающий гуанилатциклазной активностью; NPRC – “клиренс”-рецептор ANP; PKG I – протеинкиназа G I; RGS 2-P – фосфорилированный регулятор G-белок-сопряженных рецепторов – ингибитор рецепторов ангиотензина (AT1-R); PDE3A – фосфодиэстераза 3A; альфа-1-АР – адренорецепторы $\alpha 1$ -типа; SERCA – кальциевая АТФаза саркоплазматического ретикулюма; RhoA – малая ГТФаза семейства Ras; ROS – активные формы кислорода.

лирует с дисфункцией почек [47]. Гипотетически, CNP, высвобождаемый локально в эндотелии, может являться фактором, компенсирующим недостаточность потоков-зависимой дилатации при ЛАГ.

Хорошо известно, что уровень ангиотензина II при ЛАГ повышен. В текущей работе показано, что эффекты АТII, одного из наиболее значимых проконстрикторных медиаторов, изменены в большом круге кровообращения при ЛАГ. Ангиотензин II уменьшает $A_{\max}$ и $T_{\Delta \text{CAD}1/2}$ у животных с ЛАГ. Таким образом, ЛАГ подавляет и, возможно, инвертирует потенцирующее действие АТII на прессорные реакции, вызванные ФЭ в большом круге кровообращения. В основе данного эффекта может лежать несколько механизмов, включающих изменение уровня экспрессии рецепторов АТII в ГМК артерий, разобщение сигнальных каскадов $\alpha 1$ -АР и рецепторов АТII, подавление их синергизма. Ранее показано, что PKG-I-зависимое фосфорилирование белка RGS-2 приводит к его активации. Фосфорилированный RGS-2 ингибирует рецепторы ангиотензина первого типа за счет прямого взаимодействия с N-концевой областью [20, 48]. Гипотетически, ослабление либо инверсию потенцирующего действия АТII при ЛАГ можно объяснить ANP/RGS-зависимым ингибированием рецепторов ангиотензина.

В итоге, ремоделирование легочного сосудистого русла, сопровождаемое ростом давления, приводит к изменениям системной гемодинамики. Эти изменения могут быть обусловлены не только гипертрофией желудочкового миокарда, но и проявляться в форме дисрегуляции сосудистого русла большого круга.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, принципам национального стандарта ГОСТП 53434-2009, директивой 2010/63/еу Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также в соответствии с требованиями этического комитета ФГБУ “НМИЦ кардиологии” МЗ РФ, протокол комиссии по биоэтике ИЭК ФГБУ “НМИЦ Кардиологии” №1 от 26.03.2018 (председатель комиссии д.м.н. проф. Е.В. Арзамасцев, секретарь Е.Л. Левицкая).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 22-15-00189).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — А.А.А., В.И.К., В.С.К. Проведение экспериментов — А.А.А., В.Л.Л., А.В.П. Анализ данных — А.А.А., А.В.П., Е.В.Л. Написание и редактирование манускрипта — А.А.А., Кузьмин В.С.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8: 443–455.
<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.87>
2. Peled N, Shitrit D, Fox BD, Shlomi D, Amital A, Bendayan D, Kramer MR (2009) Peripheral arterial stiffness and endothelial dysfunction in idiopathic and scleroderma associated pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol* 36: 970–975.
<https://doi.org/10.3899/jrheum.081088>
3. Malenfant S, Brassard P, Paquette M, Le Blanc O, Chouinard A, Nadeau V, Allan PD, Tzeng Y-C, Simard S, Bonnet S, Provencher S (2017) Compromised Cerebrovascular Regulation and Cerebral Oxygenation in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Heart Assoc* 6: e006126.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006126>
4. Nickel NP, O’Leary JM, Brittain EL, Fessel JP, Zamanian RT, West JD, Austin ED (2017) Kidney dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 7: 38–54.
<https://doi.org/10.1086/690018>
5. Nickel NP, Yuan K, Dorfmueller P, Provencher S, Lai Y-C, Bonnet S, Austin ED, Koch CD, Morris A, Perros F, Montani D, Zamanian RT, de Jesus Perez VA (2020) Beyond the Lungs: Systemic Manifestations of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 201: 148–157.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0656CI>
6. Velez-Roa S, Ciarka A, Najem B, Vachiery J-L, Naeije R, van de Borne P (2004) Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation* 110: 1308–1312.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000140724.90898.D3>
7. Maron BA, Leopold JA, Hemnes AR (2020) Metabolic syndrome, neurohumoral modulation, and pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol* 177: 1457–1471.
<https://doi.org/10.1111/bph.14968>
8. Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P (2002) Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension* 40: 348–354.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000028001.65341.aa>

9. *Fabiani ME, Sourial M, Thomas WG, Johnston CI, Johnston CI, Frauman AG* (2001) Angiotensin II enhances noradrenaline release from sympathetic nerves of the rat prostate via a novel angiotensin receptor: implications for the pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *J Endocrinol* 171: 97–108.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1710097>
10. *Reid IA* (1992) Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol* 262: E763–E778.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.262.6.E763>
11. *Maron BA, Leopold JA* (2014) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 4: 200–210.
<https://doi.org/10.1086/675984>
12. *Vaillancourt M, Chia P, Sarji S, Nguyen J, Hoftman N, Ruffenach G, Eghbali M, Mahajan A, Umar S* (2017) Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 18.
<https://doi.org/10.1186/s12931-017-0679-6>
13. *Langer SZ, Hicks PE* (1984) Alpha-adrenoreceptor subtypes in blood vessels: physiology and pharmacology. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 4: S547–S558.
<https://doi.org/10.1097/00005344-198406004-00001>
14. *Hu ZW, Shi XY, Okazaki M, Hoffman BB* (1995) Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268: H1006–H1014.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.3.H1006>
15. *Malik KU, Nasjletti A* (1976) Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circ Res* 38: 26–30.
<https://doi.org/10.1161/01.res.38.1.26>
16. *Purdy RE, Weber MA* (1988) Angiotensin II amplification of alpha-adrenergic vasoconstriction: role of receptor reserve. *Circ Res* 63: 748–757.
<https://doi.org/10.1161/01.res.63.4.748>
17. *Vittorio TJ, Fudim M, Wagman G, Kosmas CE* (2014) Alpha-1 adrenoceptor-angiotensin II type 1 receptor cross-talk and its relevance in clinical medicine. *Cardiol Rev* 22: 51–55.
<https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e31829ce723>
18. *Bansal S, Badesch D, Bull T, Schrier RW* (2009) Role of vasopressin and aldosterone in pulmonary arterial hypertension: A pilot study. *Contemp Clin Trials* 30: 392–399.
<https://doi.org/10.1016/j.cct.2009.04.003>
19. *Samavat S, Ahmadpoor P, Samadian F* (2011) Aldosterone, hypertension, and beyond. *Iran J Kidney Dis* 5: 71–76.
20. *Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K, Kangawa K* (2011) Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models. *FEBS J* 278: 1830–1841.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08116.x>
21. *Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M* (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43: 13S–24S.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.029>
22. *Meloche J, Lampron M-C, Nadeau V, Maltais M, Potus F, Lambert C, Tremblay E, Vitry G, Breuils-Bonnet S, Bouché O, Charbonneau E, Provencher S, Paulin R, Bonnet S* (2017) Implication of Inflammation and Epigenetic Readers in Coronary Artery Remodeling in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37: 1513–1523.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309156>
23. *Dikalov SI, Nazarewicz RR* (2013) Angiotensin II-induced production of mitochondrial reactive oxygen species: potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 19: 1085–1094.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4604>
24. *Ding J, Yu M, Jiang J, Luo Y, Zhang Q, Wang S, Yang F, Wang A, Wang L, Zhuang M, Wu S, Zhang Q, Xia Y, Lu D* (2020) Angiotensin II Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A Pathway. *Front Physiol* 11: 566410.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566410>
25. *Boron WF, Boulpaep EL* (2012) *Medical Physiology, 2e Updated Edition E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences.
26. *Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ* (2012) The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 302: L363–L369.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>
27. *Spyropoulos F, Vitali SH, Touma M, Rose CD, Petty CR, Levy P, Kourembanas S, Christou H* (2020) Echocardiographic markers of pulmonary hemodynamics and right ventricular hyper-

- trophy in rat models of pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 10: 2045894020910976.
<https://doi.org/10.1177/2045894020910976>
28. Zhu Z, Godana D, Li A, Rodriguez B, Gu C, Tang H, Minshall RD, Huang W, Chen J (2019) Echocardiographic assessment of right ventricular function in experimental pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 9: 2045894019841987.
<https://doi.org/10.1177/2045894019841987>
 29. Islamova MR, Lazarev PV, Safarova AF, Kobalava ZD (2018) The Value of Right Ventricular Dysfunction and Right Ventricular – Pulmonary Artery Coupling in Chronic Heart Failure: The Role of Echocardiography. *Kardiologiya* 58: 82–90.
<https://doi.org/10.18087/cardio.2018.5.10124>
 30. An H, Landis JT, Bailey AG, Marron JS, Dittmer DP (2019) dr4pl: A Stable Convergence Algorithm for the 4 Parameter Logistic Model. *The R J* 11: 171–190.
<https://doi.org/10.32614/RJ-2019-003>
 31. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One* 10: e0146021.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
 32. R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
 33. RStudio Team (2020) RStudio: Integrated Development Environment for R.
 34. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019) Welcome to the tidyverse. *J Open Source Software* 4: 1686.
<https://doi.org/10.21105/joss.01686>
 35. Kassambara A (2020) rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests.
 36. Wickham H (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer Int Publ.
 37. Tiedemann F (2020) gghalves: Compose Half-Half Plots Using Your Favourite Geoms.
 38. Pedersen TL (2020) patchwork: The Composer of Plots.
 39. Yap LB (2004) B-type natriuretic Peptide and the right heart. *Heart Fail Rev* 9: 99–105.
<https://doi.org/10.1023/B:HREV.0000046364.68371.b0>
 40. Kishimoto I, Yoshimasa T, Suga S, Ogawa Y, Komatsu Y, Nakagawa O, Itoh H, Nakao K (1994) Natriuretic peptide clearance receptor is transcriptionally down-regulated by beta 2-adrenergic stimulation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 28300–28308.
 41. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K (1992) Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 130: 229–239.
<https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1309330>
 42. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H (1992) Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of “vascular natriuretic peptide system.” *J Clin Invest* 90: 1145–1149.
<https://doi.org/10.1172/JCI115933>
 43. Moyes AJ, Hobbs AJ (2019) C-type Natriuretic Peptide: A Multifaceted Paracrine Regulator in the Heart and Vasculature. *Int J Mol Sci* 20: 2281.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092281>
 44. Okahara K, Kambayashi J, Ohnishi T, Fujiwara Y, Kawasaki T, Monden M (1995) Shear stress induces expression of CNP gene in human endothelial cells. *FEBS Lett* 373: 108–110.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01027-c](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01027-c)
 45. Pernomian L, Prado AF, Silva BR, Azevedo A, Pinheiro LC, Tanus-Santos JE, Bendhack LM (2016) C-Type Natriuretic Peptide Induces Anti-contractile Effect Dependent on Nitric Oxide, Oxidative Stress, and NPR-B Activation in Sepsis. *Front Physiol* 7: 226.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00226>
 46. Andrade FA, Restini CBA, Grando MD, Ramalho LNZ, Bendhack LM (2014) Vascular relaxation induced by C-type natriuretic peptide involves the Ca²⁺/NO-synthase/NO pathway. *PLoS One* 9: e95446.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095446>
 47. Kaiser R, Grottemeyer K, Lepper P, Stokes C, Bals R, Wilkens H (2015) Associations of circulating natriuretic peptides with haemodynamics in precapillary pulmonary hypertension. *Respir Med* 109: 1213–1223.
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.02.014>
 48. Matsuzaki N, Nishiyama M, Song D, Moroi K, Kimura S (2011) Potent and selective inhibition of angiotensin AT1 receptor signaling by RGS2: roles of its N-terminal domain. *Cell Signal* 23: 1041–1049.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.023>

Pulmonary Arterial Hypertension Attenuates Vasoconstrictor Responses Caused by Activation of Alpha-1-Adrenoreceptors in the Systemic Circulation

A. A. Abramov^{a, *}, V. L. Lakomkin^a, E. V. Lukoshkov^a, A. V. Prosvirnin^a,
V. I. Kapelko^a, and V. S. Kuzmin^{a, b}

^a*Chazov National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Health
of the Russian Federation, Moscow, Russia*

^b*Moscow State University, Moscow, Russia*

**e-mail: ferk_88@list.ru*

Pulmonary arterial hypertension (PAH) accompanied by an arterial pressure increase in the pulmonary circulation, remodeling of pulmonary arteries and a change in its sensitivity to regulatory factors; PAH is accompanied by activation of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin-aldosterone system and increased production of atrial natriuretic peptide. The change in the sensitivity of the vessels of the systemic circulation (SC) to regulatory influences in PAH has not been investigated. Vasoconstrictor reactions in SC with monocrotaline (MCT) were studied in the work models of PAH in rats (Wistar, 350 ± 50 g, 4 months). Mean arterial pressure (MAP) was recorded against the background of a double autonomous blockade with the administration of the $\alpha 1$ -adrenergic receptor agonist ($\alpha 1$ -AR) phenylephrine (PE) to conscious rats at the start of experiment, then 2 and 4 weeks after the induction of PAH with MCT or saline injection for control animals. Registration of MAP under the action of PE was also performed during angiotensin-II (ATII) infusion. The maximal amplitude ($A_{\max}$) of the change in MAP and the longest half-return time of MAP ($T_{\Delta \text{MAP}1/2}$) to the baseline level in rats in response to the Phe injection were estimated. It was found that in response to PE, $A_{\max}$ did not change in rats with PAH, whereas in control animals it significantly increased. In rats with PAH 2 ($n = 6$) and 4 weeks after the induction of PAH with MCT, $T_{\Delta \text{MAP}1/2}$ is significantly less than in control rats. ATII leads to delayed changes in $T_{\Delta \text{MAP}1/2}$ in both control rats and rats with PAH. In rats with MAP, the potentiation with angiotensin $T_{\Delta \text{MAP}1/2}$ is significantly less than in control rats. Thus, in animals with PAH, the ability of the resistive arteries of the systemic circulation to maintain tone in response to the activation of $\alpha 1$ -AR decreases. In addition, PAH suppresses the ability of ATII to stimulate sympathetic responses in the SC. Firstly, *in vivo*, it has been demonstrated remodeling and changing the functional state of the pulmonary circulation leads to changes in the regulation of vascular tone of the systemic circulation.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, vasoconstrictor responses, $\alpha 1$ -adrenoreceptors, angiotensin II, regulation of arterial tone