

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 10
октябрь
2024



НАУКА
— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

От редактора специального выпуска

К столетию кафедры физиологии человека и животных МГУ

А. Е. Гайдуков, О. П. Бalezина 1535

Обзорные статьи

Роль димерных комплексов дофаминовых рецепторов в патогенезе депрессии

А. А. Герасимов, О. В. Смирнова 1541

Изучение функций мембранных рецепторов прогестерона с использованием их селективных лигандов

Т. А. Щелкунова 1559

Терапевтические эффекты инертных газов

И. А. Кабиольский, С. Д. Симоненко, Н. Ю. Сарычева, В. А. Дубынин 1582

Потенциал-зависимые кальциевые каналы в моторных синапсах млекопитающих – триггеры и модуляторы нервно-мышечной передачи

А. Е. Гайдуков, О. П. Бalezина 1602

Экспериментальные статьи

Влияние пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крысят в препубертатный и пубертатный периоды

А. В. Граф, А. С. Маклакова, М. В. Маслова, Я. В. Крушинская, А. А. Гусева, Н. А. Соколова 1639

Задержка внутриутробного развития не приводит к выраженным изменениям в регуляции сократительных ответов артерий крыс в раннем постнатальном периоде

А. А. Швецова, Е. К. Селиванова, Л. Д. Шилова, О. С. Тарасова, Д. К. Гайнуллина 1652

Молекулярный водород уменьшает среднее и систолическое артериальное давление и процессы воспаления в легких при разных формах гипертонии в экспериментах на крысах линии Wistar

М. М. Артемьева, Т. А. Куропаткина, В. В. Шишкина, Д. В. Серебряная, Д. А. Адашева, О. С. Медведев, Н. А. Медведева 1666

Связанная с движением десинхронизация сенсомоторных ритмов ЭЭГ у пациентов с гемипарезом в результате инсульта

А. С. Медведева, Н. В. Сыров, Л. В. Яковлев, Я. А. Алиева, Д. А. Петрова, Г. Е. Иванова, М. А. Лебедев, А. Я. Каплан 1683

Комплексное исследование эффектов беговой тренировки в колесе на нервную регуляцию частоты сердечных сокращений у крыс

А. А. Борзых, Е. К. Селиванова, А. С. Боровик, И. В. Кузьмин, О. Л. Виноградова, О. С. Тарасова 1701

- Повреждение мозга при фотоиндуцированной ишемии в условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета у мышей с нокаутом гена белка Паннексина 1
М. А. Николаенко, М. В. Гуляев, А. А. Волкова, Л. Р. Горбачева 1718
- Поведенческие и электрофизиологические особенности крыс линии WAG/RIJ с разными формами генетической эпилепсии
К. Р. Аббасова, С. М. Кужугет, Е. Т. Цыба 1733
- Влияние аналогов N-концевых фрагментов АКТГ/МСГ на уровень тревожности, болевую чувствительность и уровни нейротрофических факторов BDNF и VEGF в первичных культурах нейронов мозга крысы
Н. Ю. Глазова, Д. М. Манченко, Е. А. Себенцова, Л. А. Андреева, И. А. Гривенников, О. В. Долотов, Н. Ф. Мясоедов, Н. Г. Левицкая 1752
- Особенности гистологического строения ткани печени и поджелудочной железы самок крыс в модели билиарного панкреатита при гиперпролактинемии
Н. С. Сиротина, Т. М. Илиева, Д. В. Руденко, Ю. Б. Костенко, А. В. Курынина, Т. А. Балакина, О. В. Смирнова 1767
- Быстрая адаптивная регуляция системного кровообращения подавлена при легочной артериальной гипертензии в результате дисфункции барорефлекторного контроля сердечного ритма
А. А. Абрамов, В. Л. Лакомкин, Е. В. Лукошкова, А. В. Просвирнин, В. И. Капелько, В. С. Кузьмин 1777
-

CONTENTS

Special Issue Editor Note

- For the centenary of the Department of Human and Animal Physiology at Moscow State University
A. E. Gaydukov and O.P. Balezina 1535
-

Reviews

- The Role of Dopamine Receptor Dimer Complexes in the Pathogenesis of Depression
A. A. Gerasimov and O. V. Smirnova 1541
- Investigation the Functions of Membrane Progesterone Receptors Using their Selective Ligands
T. A. Shchelkunova 1559
- Therapeutic Effects of Noble Gases
I. A. Kabiolskiy, S. D. Simonenko, N. U. Sarycheva, and V. A. Dubynin 1582
- Voltage-Dependent Calcium Channels in Mammalian Motor Synapses – Triggers and Modulators of Neuromuscular Transmission
A. E. Gaydukov and O. P. Balezina 1602
-

Experimental articles

- Prenatal Hypoxia of Early Organogenesis Period Influence on Heart Rate Variability in Rats of Prepubescent and Pubertal Age
A. V. Graf, A. S. Maklakova, M. V. Maslova, Ya. V. Krushinskaya, A. A. Guseva, and N. A. Sokolova 1639
- Intrauterine Growth Restriction does not Lead to Pronounced Changes in the Regulation of Arterial Contractile Responses in Rats in the Early Postnatal Period
A. A. Shvetsova, E. K. Selivanova, L. D. Shilova, O. S. Tarasova, and D. K. Gaynullina 1652
- Molecular Hydrogen Reduces Mean and Systolic Blood Pressure in Various Forms of Hypertension, as well as Inflammatory Processes in Lung Tissue, in Wistar Rats
M. M. Artemieva, T. A. Kuropatkina, V. V. Shishkina, D. V. Serebryanaya, D. A. Adasheva, O. S. Medvedev, and N. A. Medvedeva 1666
- Event-Related Desynchronization of EEG Sensorimotor Rhythms in Hemiparesis Post-Stroke Patients
A. S. Medvedeva, N. V. Syrov, L. V. Yakovlev, Y. A. Alieva, D. A. Petrova, G. E. Ivanova, M. A. Lebedev, and A. Ya. Kaplan 1683
- Comprehensive Analysis of Voluntary Wheel Training Effects on Neural Control of The Heart Rate in Rats
A. A. Borzykh, E. K. Selivanova, A. S. Borovik, I. V. Kuzmin, O. L. Vinogradova, and O. S. Tarasova 1701

- Brain Damage in Photoinduced Ischemia under Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice with Pannexin 1 Protein Gene Knockout
M. A. Nikolaenko, M. V. Gulyaev, A. A. Volkova, and L. R. Gorbacheva 1718
- Behavioural and Electrophysiological Features of WAG/Rij Rats with Different Forms of Genetic Epilepsy
K. R. Abbasova, S. M. Kuzhuget, and E. T. Tsyba 1733
- The Effect of ACTH/MSH N-Terminal Fragment Analogs on the Anxiety Level, Pain Sensitivity and Levels Of Neurotrophic Factors BDNF and VEGF in Primary Neuronal Cultures of Rats
N. Yu. Glazova, D. M. Manchenko, E. A. Sebensova, L. A. Andreeva, I. A. Grivennikov, O. V. Dolotov, N. F. Myasoedov, and N. G. Levitskaya 1752
- Histological Features of the Hepatic and Pancreatic Structure of Female Rats in the Model of Biliary Pancreatitis with Hyperprolactinemia
N. S. Sirotina, T. M. Ilieva, D. V. Rudenko, I. B. Kostenko, A. V. Kurygina, T. A. Balakina, and O. V. Smirnova 1767
- Rapid Adaptive Regulation of Systemic Circulation is Suppressed in Pulmonary Arterial Hypertension as a Result of Dysfunction of Baroreflexive Heart Rate Control
A. A. Abramov, V. L. Lakomkin, E. V. Lukoshkova, A. V. Prosvirnin, V. I. Kapelko, and V. S. Kuzmin 1777
-
-

ОТ РЕДАКТОРА СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

К СТОЛЕТИЮ КАФЕДРЫ ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ
МГУ

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

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

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

Поступила в редакцию 22.10.2024 г.

После доработки 24.10.2024 г.

Принята к публикации 24.10.2024 г.

История физиологии человека и животных в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова неотделима от истории самого МГУ и насчитывает более 230 лет. Однако вплоть до XX века преподавание физиологии в МГУ происходило в рамках Медицинского факультета университета. Здесь работала яркая плеяда профессоров и ученых-физиологов, среди которых особое место занимает имя великого русского физиолога И. М. Сеченова, возглавлявшего медицинскую кафедру физиологии в МГУ на рубеже XIX–XX веков [1].

Бурные исторические события в России в начале XX века принесли изменения и в МГУ, от которого отделился медицинский факультет, а вместе с ним и кафедра физиологии. Но в 1924 году был принят решение о создании на физико-математическом факультете МГУ новой самостоятельной кафедры физиологии животных. Возглавил ее выдающийся отечественный электрофизиолог, заведующий кафедрой физиологии Казанского университета – профессор А. Ф. Самойлов. Он заложил основы научной и преподавательской деятельности кафедры физиологии человека и животных в МГУ. Деятельность новой кафедры физиологии формировалась и протекала в основном на базе образованного в 1930 году в МГУ биологического факультета. А. Ф. Самойлов активно занимался формированием коллектива, оборудовал кафедру для полноценной научной работы и учебного процесса, а также читал курс физиологии, который привлекал значительную аудиторию и содействовал наплыву студентов на физиологический цикл. В этом ему активно помогал его соратник и заместитель – профессор И. Л. Кан, который после смерти Самойлова руководил кафедрой вплоть до 1943 года, обеспечив вместе со следующим заведующим – профессором Х. С. Коштойнцем – ее функционирование на труднейшем начальном этапе Великой Отечественной войны.

Кафедрой физиологии человека и животных длительное время заведовали целый ряд блестящих ученых с мировым именем. Среди них – член-корреспондент РАН Х. С. Коштойнец, оставивший в наследие труды по эволюционной физиологии, профессор Б. А. Кудряшов, возглавлявший в составе кафедры лабораторию физиологии и биохимии свертывания крови (сейчас – лаборатория защитных систем крови его имени) и академик РАМН И. П. Ашмарин, руководивший масштабными исследованиями разнообразного физиологического действия регуляторных пептидов. В последние годы (2007–2023) кафедрой руководил ученик И. П. Ашмарина, заслуженный профессор МГУ А. А. Каменский, известный не только как ученый, но и прекрасный популяризатор биологии и физиологии, автор множества учебных пособий и учебников. В 2023 году новым заведующим кафедры стал молодой энергичный ученик академика РАН

Л. В. Розенштрауха (также выпускника кафедры физиологии человека и животных МГУ), профессор Д. В. Абрамочкин, признанный специалист в области электрофизиологии сердца.

За 100 лет из стен кафедры физиологии человека и животных вышло множество ярких ученых, составляющих славу советской и российской физиологии и не прерывавших связь с родной кафедрой. В их числе – академики АМН СССР И. Б. Збарский и Н. А. Юдаев, академики РАН Т. М. Турпаев, Л. В. Розенштраух, М. А. Островский, члены-корреспонденты РАН Л. М. Чайлахян и А. Л. Бызов, профессора Г. А. Бузников, В. А. Шатерников, Б. Н. Манухин, Б. С. Кулаев, В. Б. Кошелев. Современные выпускники кафедры также высоко востребованы, развивают физиологическую науку и преподают в разных уголках нашей страны и по всему миру.

Начиная с самого основания кафедры физиологии 100 лет назад научные исследования, проводимые на ней ее сотрудниками вместе с аспирантами и студентами, отличались разнообразием направлений, которые остаются базовыми на кафедре и продолжают успешно развиваться в настоящее время. Это электрофизиология сердца и синапсов, сравнительная и эволюционная физиология, физиология сердечно-сосудистой системы, физиология ЦНС, физиология и биохимия свертывания крови, физиология эндокринных процессов.

Наличие такого широкого спектра научных исследований – большая заслуга не только первых заведующих, но и талантливых и увлеченных профессоров кафедры: М. Г. Удельнова, М. В. Кирзона, В. Б. Розена, И. М. Родионова, А. Н. Смирнова, создавших и развивших свои научные школы и воспитавших множество учеников, значительная часть которых плодотворно работали и с успехом трудятся сейчас на кафедре физиологии человека и животных.

В последние годы значительное развитие на кафедре физиологии человека и животных получили разнообразные исследования физиологии сердца. Под руководством заведующего кафедрой профессора Д. В. Абрамочкина с большим успехом проводится изучение механизмов формирования и регуляции электрической активности миокарда млекопитающих и других позвоночных животных, а также нарушений электрогенеза сердца [2]. Группа, возглавляемая профессором В. С. Кузьминым, занимается электрофизиологией пейсмекеров и проводящей системы сердца. Акцент в исследованиях данной группы делается на раскрытие молекулярных механизмов, обеспечивающих изменения в ходе фило- и онтогенеза проводящей системы сердца и ее нейрогуморальной регуляции, а также на механизмах развития сердечных аритмий [3].

Помимо изучения разных аспектов функционирования сердца, на кафедре физиологии человека и животных ведутся масштабные исследования механизмов регуляции сердечно-сосудистой системы. Под руководством профессора О. С. Тарасовой и Д. К. Гайнуллиной с использованием целого арсенала разнообразных методов проводятся исследования механизмов регуляции системы кровообращения на разных этапах онтогенеза, при адаптации организма к условиям окружающей среды и развитии сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Под руководством профессора Н. А. Медведевой проводится изучение участия гуморальных факторов и эндотелия сосудов в регуляции артериального давления и сосудистого сопротивления в норме и патологии [5].

Много лет на кафедре группой, возглавляемой профессором О. П. Балезиной, с успехом ведутся исследования молекулярных механизмов, обеспечивающих разнонаправленные кальций-зависимые изменения квантовой секреции нейротрансмиттера в моторных синапсах при их разных функциональных состояниях. В настоящий момент под руководством О. П. Балезиной и А. Е. Гайдукова исследуется регуляторное влияние на нервно-мышечную передачу ретроградно действующих синаптических сигнальных молекул – продуктов созревания нейротрофинов и эндоканнабиноидов [6, 7].

При кафедре физиологии человека и животных уже 70 лет (с 1954 года) существует и успешно развивается лаборатория эндокринологии. В настоящий момент коллектив этой лаборатории под руководством профессора О. В. Смирновой проводит исследования молекулярных механизмов действия половых гормонов на репродуктивные органы млекопитающих и низших позвоночных [8]. Изучаются также взаимодействия на уровне сигнальных путей и мишеней гормонов, участвующих в регуляции водно-солевого обмена.

Более 30 лет назад с приходом на кафедру нового заведующего, академика И. П. Ашмарина начались исследования регуляторных пептидов, которые привели к созданию концепции их функционального континуума. Данное направление исследований развивается группой, возглавляемой профессором В. А. Дубыниным и Н. Г. Левицкой, которая изучает поведенческую и нейротропную активность регуляторных пептидов на моделях пре- и постнатальной патологий развития [9].

В последние десятилетия к традиционным для кафедры направлениям научных изысканий добавились и новые. Так, основными направлениями исследований лаборатории нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов, возглавляемой профессором А. Я. Капланом, являются изучение нейробиологических механизмов выделения значимых для человека событий из общего потока сенсорной информации в мозге, а также механизмов формирования мысленных образов движения и тактильных ощущений, как эти мысленные образы проявляются в физиологических показателях электрической и метаболической активности мозга и как с помощью этих образов модулируются пластические перестройки в мозговой ткани [10].

Другим новым для кафедры направлением являются проводимые под руководством Л. Р. Горбачевой исследования механизмов вовлечения сериновых протеаз и их рецепторов в процессы нейродегенерации, воспаления и репарации при ишемии, провоспалительных воздействиях и диабете [11].

Такие разнообразные по тематике научные исследования на кафедре физиологии человека и животных проводятся с участием ее студентов и аспирантов. Ежегодно на кафедру на конкурсной основе набирается около 15 студентов. Преподавателями и научными сотрудниками кафедры читаются для них базовые и регулярно модернизируемые специальные курсы. Наряду с уникальным Большим практикумом, обеспечивающим освоение студентами разнообразных современных методов, воссоздана и успешно функционирует уникальная учебно-научная база и летняя практика по сравнительной физиологии на Беломорской биологической станции МГУ. Все это обеспечивает высокий уровень образования на кафедре, позволяющий студентам эффективно вовлекаться в научную работу. В результате интенсивной научной деятельности кафедры в МГУ регулярно проходят защиты кандидатских и докторских диссертаций, выполненных на кафедре физиологии человека и животных.

К своему юбилею кафедра подходит в качестве сплоченного коллектива, способного принимать многочисленные вызовы времени и успешно развиваться.

Итак, кафедре физиологии человека и животных МГУ в октябре 2024 года исполняется 100 лет. Этому знаменательному событию посвящен юбилейный выпуск Российского физиологического журнала, собравшего текущие аналитические и экспериментальные работы сотрудников кафедры физиологии человека и животных и тесно связанных с кафедрой коллег из других научных учреждений и мест России.

Обзорные статьи этого номера журнала посвящены современному состоянию разнообразных актуальных проблем физиологии. А. Е. Гайдуковым и О. П. Балезиной рассматриваются разнообразные функциональные роли разных типов потенциал-зависимых кальциевых каналов в моторных синапсах млекопитающих [12]. Сотрудники лаборатории эндокринологии представили два обзора: Т. А. Щелкунова анализирует роль мембранных рецепторов прогестерона и экспериментальные подходы к их изучению [13], а А. А. Герасимов и О. В. Смирнова – современные представления об

участии димерных комплексов дофаминовых рецепторов в патогенезе депрессии [14]. Коллектив авторов под руководством В. А. Дубынина в своем обзоре рассматривает физиологические эффекты инертных газов [15].

Обширный набор представленных экспериментальных работ сотрудников кафедры посвящен исследованиям в области физиологии сердечно-сосудистой системы в норме и при патологиях. Изменение барорефлекторного контроля сердечного ритма при легочной артериальной гипертензии было предметом изучения коллектива авторов под руководством В. С. Кузьмина [16]. Определенному протективному влиянию водорода при легочной гипертензии посвящена работа коллектива авторов, возглавляемого Н. А. Медведевой [17]. Комплексная оценка негативного влияния пренатальной гипоксии в период раннего органогенеза на параметры функционирования сердечно-сосудистой системы у взрослых грызунов проведена воспитанниками профессора Н. А. Соколовой [18]. А. А. Швецова и Д. К. Гайнуллина с соавторами выявили, что задержка внутриутробного развития, обусловленная ограничением питания матери во время беременности, не приводит к ярко выраженным изменениям в регуляции тонуса системных сосудов в раннем постнатальном периоде [19]. О. С. Тарасова с коллегами демонстрируют, что бег крыс в колесе (экспериментальная модель аэробной тренировки в режиме произвольного выбора нагрузки у человека) сопровождается увеличением тонического и динамического показателей вагусной регуляции сердца, что проявляется в брадикардии, которая не связана с изменением собственной биоэлектрической активности синоатриального узла [20].

Сотрудники кафедры с коллегами представляют результаты своих разнообразных исследований и в области физиологии нервной системы. Нюансы поведенческих и электрофизиологических особенностей крыс с разными формами генетически-обусловленной эпилепсии представлены в работе авторов под руководством К. Р. Аббасовой [21]. Возглавляемые академиком Н. Ф. Мясоедовым и Н. Г. Левицкой сотрудники кафедры представляют данные о сравнительном воздействии синтетических меланокортинов на исследовательское поведение, уровень тревожности и болевую чувствительность грызунов и изменения уровня нейротрофических факторов в первичных культурах нейронов [22]. Проблеме влияния белка Rapx1 на выраженность ишемического поражения мозга и системное воспаление у мышей на фоне сочетания ишемии мозга и диабета посвящена статья коллектива авторов под руководством Л. Р. Горбачевой [23]. Сравнение пространственно-временных характеристик связанной с десинхронизацией (ССД) сенсомоторных ритмов ЭЭГ у пациентов с гемипарезом после инсульта при движениях паретичной и здоровой руками стало предметом изучения группы авторов под руководством А. Я. Каплана [24].

Н. С. Сиротина и О. В. Смирнова с соавторами выявили, что у самок крыс с повышенной концентрацией пролактина на фоне обструктивного холестаза развивается более тяжелая форма панкреатита с явно выраженным фиброзированием ткани поджелудочной железы [25].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ashmarin IP, Kopylova GN, Chudakov LI* (2001) The 225th anniversary of the Department of Human and Animal Physiology of the Moscow State University. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 87 (11):1465–1470.
2. *Abramochkin DV, Filatova TS, Pustovit KB, Voronina YA, Kuzmin VS, Vornanen M* (2022) Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 268:111204. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111204>.

3. *Kuzmin VS, Ivanova AD, Potekhina VM, Samoilova DV, Ushenin KS, Shvetsova AA, Petrov AM* (2021) The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development. *J Physiol.* 599 (11): 2803–2821. <https://doi.org/10.1113/JP280485>.
4. *Shvetsova AA, Khlystova MA, Makukha YA, Shateeva VS, Borzykh AA, Gaynullina DK, Tarasova OS* (2024) Reactive oxygen species augment contractile responses of saphenous artery in 10-15-day-old but not adult rats: Substantial role of NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 216: 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.03.005>.
5. *Kuropatkina T, Pavlova O, Gulyaev M, Pirogov Y, Khutorova A, Stvolinsky S, Medvedeva N, Medvedev O* (2022) Sex-Dependent Protective Effect of Combined Application of Solubilized Ubiquinol and Selenium on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Wistar Rats. *Antioxidants* (Basel). 11 (3): 549. <https://doi.org/10.3390/antiox11030549>.
6. *Bogacheva PO, Molchanova AI, Pravdivceva ES, Miteva AS, Balezina OP, Gaydukov AE* (2022) ProBDNF and Brain-Derived Neurotrophic Factor Prodomain Differently Modulate Acetylcholine Release in Regenerating and Mature Mouse Motor Synapses. *Front Cell Neurosci* 16:1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.866802>
7. *Tarasova E, Bogacheva P, Chernyshev K, Balezina O* (2024) Quantal size increase induced by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol requires activation of CGRP receptors in mouse motor synapses. *Synapse* 78 (1): e22281. <https://doi.org/10.1002/syn.22281>
8. *Pavlova NS, Gizatulina AR, Neretina TV, Smirnova OV* (2022) Expression of Opsin Genes in the Retina of Female and Male Three-Spined Sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L.: Effect of Fresh-water Adaptation and Prolactin Administration. *Biochemistry* (Moscow) 87 (3): 215–224. <https://doi.org/10.1134/S0006297922030038>.
9. *Filippenkov IB, Stavchansky VV, Glazova NY, Sebentsova EA, Remizova JA, Valieva LV, Levitskaya NG, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV* (2021) Antistress Action of Melanocortin Derivatives Associated with Correction of Gene Expression Patterns in the Hippocampus of Male Rats Following Acute Stress. *Int J Mol Sci.* 22(18):10054. <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>.
10. *Syrov N, Yakovlev L, Kaplan A, Lebedev M* (2024) Motor cortex activation during visuomotor transformations: evoked potentials during overt and imagined movements. *Cereb Cortex.* 34 (1): bhad440. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhad440>.
11. *Galkov M, Kiseleva E, Gulyaev M, Sidorova M, Gorbacheva L* (2020) New PAR1 Agonist Peptide Demonstrates Protective Action in a Mouse Model of Photothrombosis-Induced Brain Ischemia. *Front Neurosci.* 14: 335. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00335>.
12. *Гайдуков АЕ, Бalezina ОП* (2024) Потенциал-зависимые кальциевые каналы в моторных синапсах млекопитающих – триггеры и модуляторы нервно-мышечной передачи. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1602–1638. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100044>
13. *Щелкунова ТА* (2024) Изучение функций мембранных рецепторов прогестерона с использованием их селективных лигандов. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1559–1581. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100026>
14. *Герасимов АА, Смирнова ОВ* (2024) Роль димерных комплексов дофаминовых рецепторов в патогенезе депрессии. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1541–1558. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100013>
15. *Кабильский ИА, Симоненко СД, Сарычева НЮ, Дубынин ВА* (2024) Терапевтические эффекты инертных газов. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1582–1601. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100033>
16. *Абрамов АА, Лакомкин ВЛ, Лукошкова ЕВ, Просвирнин АВ, Капелько ВИ, Кузьмин ВС* (2024) Быстрая адаптивная регуляция системного кровообращения подавлена при легочной артериальной гипертензии в результате дисфункции барорефлекторного контроля сердечного ритма. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1777–1796. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100149>
17. *Артемова ММ, Куропаткина ТА, Шишкина ВВ, Серебряная ДВ, Адашева ДА, Медведев ОС, Меодевева НА* (2024) Молекулярный водород уменьшает среднее и систолическое артериальное давление и процессы воспаления в легких при разных формах гипертензии в экспериментах на крысах линии Wistar. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1666–1682. <https://doi.org/10.31857/S0869813924100073>

18. *Граф АВ, Маклакова АС, Маслова МВ, Крушинская ЯВ, Гусева АА, Соколова НА* (2024) Влияние пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крысят в препубертатный и пубертатный периоды. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1639–1651.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100051>
19. *Швецова АА, Селиванова ЕК, Шилова ЛД, Тарасова ОС, Гайнуллина ДК* (2024) Задержка внутриутробного развития не приводит к выраженным изменениям в регуляции сократительных ответов артерий крыс в раннем постнатальном периоде. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1652–1665.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100062>
20. *Борзых АА, Селиванова ЕК, Боровик АС, Кузьмин ИВ, Виноградова ОЛ, Тарасова ОС* (2024) Комплексное исследование эффектов беговой тренировки в колесе на нервную регуляцию частоты сердечных сокращений у крыс. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1701–1717.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100095>
21. *Аббасова КР, Кужусет СМ, Цыба ЕТ* (2024) Поведенческие и электрофизиологические особенности крыс линии WAG/Rij с разными формами генетической эпилепсии. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1733–1751.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100116>
22. *Глазова НЮ, Манченко ДМ, Себенцова ЕА, Андреева ЛА, Гривенников ИА, Долотов ОВ, Мясоедов НФ, Левицкая НГ* (2024) Влияние аналогов N-концевых фрагментов АКТГ/МСГ на уровень тревожности, болевую чувствительность и уровни нейротрофических факторов BDNF и VEGF в первичных культурах нейронов мозга крысы. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1752–1766.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100127>
23. *Николаенко МА, Гуляев МВ, Волкова АА, Горбачева ЛР* (2024) Повреждение мозга при фотоиндуцированной ишемии в условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета у мышей с нокаутом гена белка паннексина 1. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1718–1732.
<https://doi.org/10.31857/S08698139241000105>
24. *Медведева АС, Сыров НВ, Яковлев ЛВ, Алиева ЯА, Петрова ДА, Иванова ГЕ, Лебедев МА, Каплан АЯ* (2024) Связанная с движением десинхронизация сенсомоторных ритмов ЭЭГ у пациентов с гемипарезом в результате инсульта. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1683–1700.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100084>
25. *Сиротина НС, Илиева ТМ, Руденко ДВ, Костенко ЮБ, Курынина АВ, Балакина ТА, Смирнова ОВ* (2024) Особенности гистологического строения ткани печени и поджелудочной железы самок крыс в модели билиарного панкреатита при гиперпролактинемии. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110 (10): 1767–1776.
<https://doi.org/10.31857/S0869813924100138>

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ ДИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ДЕПРЕССИИ

© 2024 г. А. А. Герасимов^{1, *}, О. В. Смирнова¹

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

*E-mail: drewgerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.06.2024 г.

После доработки 18.07.2024 г.

Принята к публикации 30.07.2024 г.

В настоящем обзоре обсуждается олигомеризация рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCRs), позволяющая существенно расширить спектр функциональных возможностей клеток живых организмов путем модулирования внутриклеточных каскадов. Это обеспечивает разнообразие физиологических эффектов как в норме, так и при патологии. Рассмотрена структура и локализация в головном мозге одного из наиболее изученных гетеродимеров, комплекса D1-D2-рецепторов, и его сигнальные каскады, коррелирующие с развитием депрессивных расстройств. Проанализированы половые различия в функционировании данного гетеродимера, обсуждается вопрос о селективности бивалентных синтетических лигандов в отношении запуска определенных внутриклеточных каскадов, что делает их перспективной терапевтической мишенью для адресной терапии депрессивных расстройств. Заключительная часть обзора посвящена разнообразию гетеродимеров дофаминовых рецепторов с другими представителями семейства GPCR и их месту в патофизиологии депрессии.

Ключевые слова: GPCR, олигомеризация GPCRs, гетеродимерные комплексы, дофаминовый рецептор, депрессия

DOI: 10.31857/S0869813924100013, **EDN:** VSFVPE

ВВЕДЕНИЕ

Дофамин, как один из ключевых нейромедиаторов, играет существенную роль в регуляции мотивационно-эмоциональной сферы человека. Этот моноамин регулирует множество функций головного мозга, включая контроль и запуск произвольных движений, чувство удовлетворения и вознаграждения, циркадные ритмы, сознание и когнитивные способности. Открытие возможности образования гомо- и гетеромерных дофаминовых рецепторных комплексов позволило переосмыслить представления об особенностях передачи дофаминовых сигналов и функционировании дофаминовой системы в целом. Такая олигомеризация не только модифицирует работу канонических мономерных рецепторов, но и влияет на перераспределение активации связанных с ними внутриклеточных сигнальных каскадов. Тканеспецифическая экспрессия данных комплексов позволяет им выступать в качестве новых терапевтических мишеней для разработки более селективных и эффективных бивалентных лекарственных препаратов, обладающих ограниченным спектром побочных эффектов [1–3].

Основной гипотезой патофизиологии депрессивных расстройств, в частности, большого депрессивного расстройства, является моноаминовая гипотеза. Она предполагает, что депрессия вызвана изменением в головном мозге уровня моноаминов, включая серотонин, норадреналин и дофамин. Депрессия часто характеризуется ангедонией, то есть потерей чувства удовольствия и интереса от повседневных занятий и снижением мотивации, что выражается в дисфункции дофаминергической передачи, особенно в мезолимбической системе. Антидепрессанты с селективным действием к дофаминергическим транспортерам, такие как бупропион, увеличивают внеклеточное содержание дофамина в мозге, что поддерживает гипотезу о важности дофамина в терапии данного аффективного расстройства. Довольно часто депрессия сопровождается болезнью Паркинсона, также характеризующуюся нарушениями в дофаминергической передаче. Во всем мире примерно 35–42% пациентов с болезнью Паркинсона испытывают депрессивные симптомы, из которых 17–25% соответствуют критериям большого депрессивного расстройства, что значительно выше, чем 13.5% в общей популяции. Вместе с тем депрессия может предшествовать диагностированию болезни Паркинсона, что затрудняет ее распознавание из-за перекрытия симптомов, таких как уплощение эмоциональной реакции, нарушение сна, усталость, снижение аппетита и психомоторная заторможенность [4–6].

На этом фоне особый интерес представляет терапевтическая роль димеров в лечении депрессии. Димерные комплексы дофаминовых рецепторов открывают новые возможности для направленного воздействия на дофаминергическую систему. Исследования в этой области могут привести к разработке новых стратегий терапии и представляют перспективные способы для создания эффективных и безопасных антидепрессантов [3].

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCRs), являются крупнейшим семейством трансмембранных рецепторов, которые активируются разнообразным набором лигандов для передачи сигналов через ряд внутриклеточных каскадов. Согласно классическому представлению, мономерные формы GPCRs, связывая отдельные лиганды, могут активировать родственные им G-белки и функционально задействовать один или несколько эффекторных путей. Однако за последние два десятилетия накопилось большое количество доказательств, которые ставят под сомнение универсальность этого классического взгляда на взаимодействие “гормон – рецептор”. В настоящее время широко признано, что GPCRs могут существовать в виде гомодимеров или даже гомоолигомеров более высокого порядка. Более того, они также способны взаимодействовать с отдаленно родственными подтипами рецепторов с образованием гетероолигомеров. Обнаружение гетеромерных рецепторных комплексов открыло возможности для изучения новых механизмов генерации разнообразных сигнальных каскадов и функций GPCRs, которые ранее не были предсказаны [7, 8].

Олигомеризация GPCRs определяется как процесс образования макромолекулярных комплексов из нескольких функциональных единиц рецепторов (протомеров), обладающих биохимическими свойствами, отличными от свойств их индивидуальных компонентов. Это позволяет расширить и разнообразить диапазон функций, опосредованных отдельными клетками [9, 10].

Относительно структуры олигомеров GPCRs в последние годы был достигнут значительный прогресс в связи с развитием кристаллографических методов исследования. Полагают, что рецепторное взаимодействие, приводящее к олигомеризации, может происходить через несколько механизмов. Во-первых, протомеры могут напрямую взаимодействовать друг с другом через свои трансмембранные (ТМ) домены. Существует две модели такой олигомеризации: модель контактной димеризации, обуслов-

ленная формированием связей через участки на внешних поверхностях ТМ-доменов протомеров, и модель обмена доменами, при которой происходит перераспределение ТМ-доменов с потерей целостности отдельных протомеров. Однако последняя модель считается менее энергетически выгодной, поэтому предполагается, что димеры, полученные при перераспределении доменов, могут собираться в олигомеры более высокого порядка только посредством контактной димеризации. Во-вторых, они могут образовываться путем взаимодействия внеклеточных петель с образованием дисульфидных связей между остатками цистеина и, наконец, за счет внутриклеточных петель или С-конца посредством образования ионных связей [11, 12].

Известно, что существуют как конститутивные олигомеры, формирующиеся в процессе биогенеза рецепторов в эндоплазматическом ретикулуме, так и временно индуцированные комплексы, олигомеризация которых происходит на различных стадиях жизненного цикла рецепторов. Ряд GPCRs, такие как М-холиновый рецептор 1, формилпептидный рецептор, $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренергические рецепторы, проявляют динамическое равновесие на клеточной мембране [11]. Причем баланс между мономерной и олигомерной формами может быть смещен посредством воздействия различных факторов. Например, присутствие лиганда может индуцировать, усилить или ослабить димеризацию. Так, при наличии агонистов образование комплексов опиоидных дельта-рецепторов уменьшается, а антагонисты 5-HT₂CR дестабилизируют димеры этого рецептора, но индуцируют образование олигомеров. В некоторых случаях связывание лигандов с комплексом изменяло период полураспада взаимодействия между протомерами [13]. Более того, на примере рецептора нейротензина 1-го типа было продемонстрировано, что липидное окружение рецепторного комплекса также способно смещать равновесие. Неблагоприятное гидрофобное окружение приводит к чрезмерной димеризации, тогда как присутствие полиненасыщенных жирных кислот в мембране, наоборот, способствует снижению представленности димеров за счет более низких энтропийных затрат, требующихся для осуществления белок-липидного взаимодействия, по сравнению с насыщенными кислотами [14].

Также олигомерные комплексы GPCRs могут включать в свой состав ионные каналы, рецепторные тирозинкиназы, белки, модифицирующие активность рецепторов (RAMPs), или транспортеры медиаторов. Их аллостерические взаимодействия также обеспечивают динамическое равновесие данных комплексов, что имеет важное значение в обучении и формировании кратковременной и долговременной памяти [11, 15].

В последующих разделах данного обзора мы сконцентрируем внимание на вариантах олигомеризации дофаминовых рецепторов и возможных сигнальных каскадах, вовлеченных в механизмы развития депрессивных расстройств.

МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ

Несмотря на общую поддержку концепции олигомеризации, она по-прежнему вызывает споры в научных кругах. По этой причине для обеспечения достоверности полученных результатов необходимо использовать ряд методов для подтверждения не только физического образования олигомеров, но и изучения особенностей динамики молекулярных взаимодействий между отдельными протомерами [16].

Например, одними из наиболее распространенных биофизических методов являются резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) и резонансный перенос энергии биолюминесценции (BRET). Оба метода основаны на явлении передачи энергии между донорно-акцепторной парой фотоактивных молекул, которые различаются по своей природе в зависимости от применяемого подхода. Преимуществами этих методов являются возможность обнаружения димеризации в живых клетках, наблюдение

за динамикой взаимодействий белков в реальном времени, а также высокая чувствительность и специфичность обнаружения этих взаимодействий. Однако они зависят от правильного подбора донорно-акцепторных пар, которые потенциально могут влиять на функциональные свойства белков и ограничены по разрешению (до 10 нм), что может затруднять интерпретацию данных по изучению более слабых и дальних взаимодействий. Кроме того, с использованием феномена BRET стало возможным изучение сигнальных каскадов олигомерных комплексов, отличных от таковых у протомерных рецепторов. Так, в основе метода Receptor-HIT (Receptor-Heteromer Investigation Technology) лежит связывание фотоактивного донора с одним из рецепторов, а акцептора – с внутриклеточным белком (например, с β -аррестином), предположительно способным взаимодействовать только с олигомером. В ответ на сближение донора с акцептором происходит перенос энергии, сопровождающийся излучением светового сигнала. Этот сигнал указывает не только на близость двух рецепторов друг к другу, но и на вовлечение других белков в опосредованные олигомером сигнальные каскады в клетке [16–18].

Одним из первых биохимических подходов, предоставивших доказательство не просто колокализации GPCR, а их непосредственного взаимодействия, был метод совместной иммунопреципитации (co-IP), основанный на очистке белкового комплекса с помощью специфических антител против одного из протомеров. Олигомерный комплекс затем может быть визуализирован с помощью денатурирующего электрофореза с последующей идентификацией второго рецептора при проведении вестерн-блоттинга. В отличие от предыдущих методов, несомненным преимуществом данного подхода является прямое подтверждение физического взаимодействия белков. Однако в настоящее время метод критикуется за вероятность искажения реального наличия белок-белковых взаимодействий. Так как данный метод требует механической и химической обработки образцов, недостаточно прочные взаимодействия протомеров могут быть нарушены, что приведет к ложноотрицательному результату. Поэтому результаты, полученные с его помощью, не всегда могут точно отражать условия, характерные для живых клеток. Вместе с тем другой биохимический метод, нативный электрофорез в полиакриламидном геле (BN-PAGE), позволил разделить целевые белковые комплексы в условиях сохранения их нативной структуры благодаря применению слабых детергентов, что позволило исследовать их олигомерные состояния в условиях, уже близких к физиологическим [16, 19].

Еще одним методом для выявления взаимодействия между протомерами является анализ белковой комплементации (PCA). В основе данного подхода лежит разработка репортерных систем, состоящих из двух неактивных комплементарных фрагментов, соединенных с двумя рецепторами, предположительно обладающими сродством для образования гетеромерного комплекса. Сближение протомеров сопровождается взаимодействием репортеров и, как следствие, восстановлением функциональной активности исходного фермента, что может проявляться в изменении флуоресценции или его ферментативной активности в зависимости от выбранных систем. Преимуществом PCA является возможность изучения взаимодействий в живых клетках. Однако существенным недостатком является зависимость от используемого субстрата, который ввиду своего размера может существенно изменять пространственную конфигурацию исследуемых мишеней и вызывать потенциальные артефакты из-за рефолдинга белков [16].

Метод близкого лигирования *in situ* (PLA) также основан на распознавании целевого белкового комплекса с помощью разделенной репортерной системы, состоящей из пары антител, конъюгированных с короткими олигонуклеотидными последовательностями. Когда целевые протомеры находятся в непосредственной близости друг от друга (20–30 нм), введение соединительных олигонуклеотидов приводит к образованию кольцевой ДНК-матрицы. Эта матрица затем амплифицируется ДНК-полимеразой и гибридизуется с мечеными олигонуклеотидами, комплементарными ампликонам.

Полученные сигналы визуализируются и количественно оцениваются в виде дискретных пятен на флуоресцентном микроскопе. Несмотря на высокую чувствительность, связанную с возможностью использования вторичных конъюгатов, данный метод не может быть использован на живых клетках, так как требуется фиксация образцов. Кроме того, при изучении гетеромерных комплексов метод не может точно указать на прямое белок-белковое взаимодействие, поскольку рецепторы также могут взаимодействовать друг с другом косвенно через адапторные белки [20].

Кроме того, существует ряд микроскопических методов исследования, таких как флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF) и анализ пространственной интенсивности (SpIDA). TIRF позволяет наблюдать за отдельными мечеными молекулами, расположенными на поверхности или непосредственно под клеточной мембраной, и процессами, происходящими с ними, в то время как SpIDA направлен на измерение плотности молекул и их олигомерных состояний. По сравнению с традиционными биохимическими методами данные подходы не только позволяют провести оценку таргетных белков в нативных образцах, но также способны предоставить информацию о динамике молекулярного взаимодействия и сигналинга в клетке [21].

Каждый из методов обнаружения гетеромерных рецепторных комплексов имеет свои уникальные преимущества и ограничения. В связи с этим для наиболее точного и надежного изучения олигомеризации рецепторов рекомендуется использовать комбинацию нескольких подходов, что позволяет минимизировать недостатки каждого отдельного метода и получить более достоверные результаты. В дополнение к вышесказанному, благодаря методам компьютерного молекулярного моделирования, таким как молекулярная динамика и белок-белковый докинг, появилась возможность предсказать возможные трехмерные структуры исследуемых комплексов, что позволило использовать данные методы в качестве вспомогательного инструмента в экспериментальных исследованиях в изучении олигомеризации GPCR [21].

МОНОМЕРНЫЕ ДОФАМИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Одними из представителей семейства GPCRs являются дофаминовые рецепторы, которые активируются путем связывания со своим лигандом (дофамином) и передают сигнал для инициации внутриклеточных сигнальных путей за счет рекрутирования различных α -субъединиц G-белков, таких как Gs, Gi, Gq и G12/13. Физиологические эффекты дофамина обусловлены его влиянием на два подтипа рецепторов: семейства D1 (D1R и D5R) и семейства D2 (D2R, D3R и D4R), которые различаются по своему распределению в организме, аффинности и характеру передачи сигналов внутри клеток [3, 22, 23].

D1-подобные рецепторы сопряжены с Gas/olf-белками, связывание которых с аденилатциклазой (AC) опосредует усиление каскадного ответа cAMP/РКА (циклический аденозинмонофосфат/протеинкиназа А). Однако имеются данные о возможном связывании рецепторов семейства D1 с G α q/11-белками, способствующими повышению уровня внутриклеточного кальция, опосредованному активацией фосфолипазы C (PLC). Помимо этого, стимуляция D1-подобных рецепторов приводит к трансактивации многих рецепторных тирозинкиназ путем каскадов, приводящих к их фосфорилированию или увеличению поверхностной экспрессии за счет притока кальция [3, 24, 25].

В свою очередь, D2-подобные рецепторы сопряжены с Gai/o-субъединицами, вовлеченными в инактивацию AC, приводящую к снижению цитозольного уровня cAMP. Могут образовываться D2-подобные рецепторы различной длины – D2SR (D2-короткий) и D2LR (D2-длинный). Данные изоформы формируются в результате альтернативного сплайсинга 6-го экзона длиной 87 п. н. В результате D2L форма рецептора отличается от D2S дополнительной последовательностью из 29 аминокислотных

остатков в составе 3-й цитозольной петли (рис. 1). Каждый из вариантов D2Rs имеет свои различные физиологические свойства. D2SR экспрессируется пресинаптически как ауторецептор и регулирует фосфорилирование ключевого фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазы, тогда как D2LR расположен постсинаптически и включен в регуляцию фосфорилирования дофамин- и cAMP-регулируемого фосфопротеина (DARPP-32) [22, 24, 26].

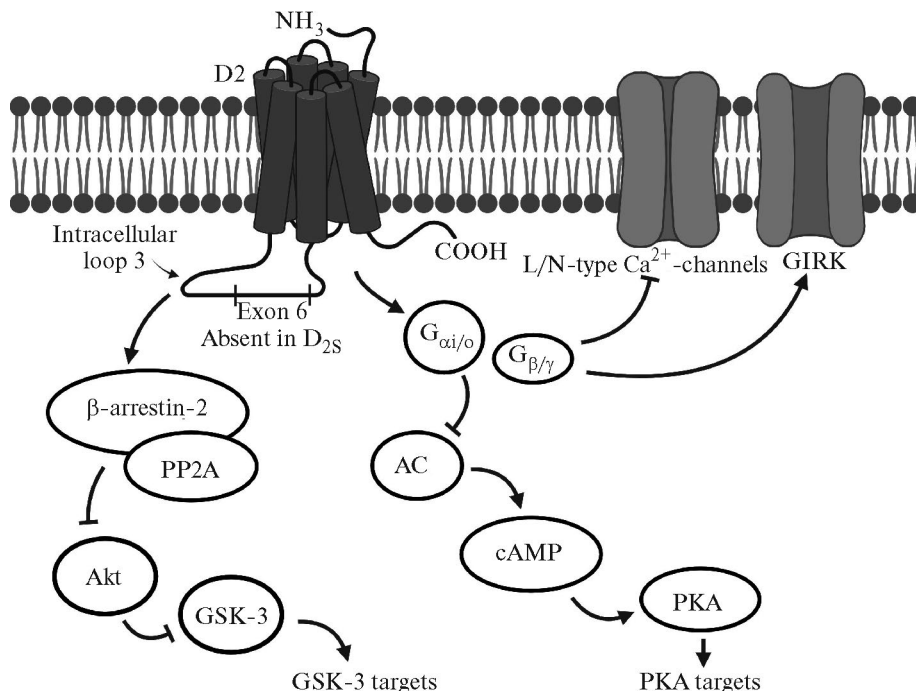


Рис. 1. Схематическое изображение изоформ D2Rs, получаемых вследствие альтернативного сплайсинга 6-го экзона на 3-й цитозольной петле, и сопряженных с ними внутриклеточных сигнальных каскадов (создано с помощью BioRender.com, по Juza et al., 2023 [26] с изменениями).

Более того, D2-подобные рецепторы могут передавать сигналы через Gβγ-субъединицы, регулируя активность калиевых каналов внутреннего выпрямления GIRK, а также кальциевых каналов L- и N-типа. В дополнение к регуляции внутриклеточного каскада через регуляцию уровня cAMP D2Rs также способны активировать более медленно начинающийся и обладающий более длительным действием независимый от G-белка сигнальный механизм, способствуя образованию сигнального комплекса, состоящего из протеинкиназы B (Akt), протеинфосфатазы-2A (PP2A) и β-аррестина 2. Образование этого комплекса приводит к инактивации Akt после дефосфорилирования ее остатка треонина 308 (Thr-308) с помощью PP2A. Инактивация Akt в ответ на DA приводит к активации киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3), которая, в свою очередь, опосредует проявление депрессивно-подобного поведения [27]. Данный путь будет важен для дальнейшего понимания механизма развития депрессивных расстройств на молекулярно-клеточном уровне. К тому же рекрутирование β-аррестина к D2R приводит к клатрин-опосредованной интернализации рецептора, что сопровождается

его деградаций через эндосомально-лизосомальную систему либо рециклированием на поверхность клетки [26].

Активность DA-рецепторов чрезвычайно сложна и регулируется множеством факторов в различных областях мозга, включая вентральную тегментальную область (VTA), прилежащее ядро, черную субстанцию, префронтальную кору (PFC), гиппокамп, миндалевидное тело, полосатое тело и латеральное хабенулярное ядро [28].

ГЕТЕРОМЕРНЫЙ КОМПЛЕКС D1-D2-РЕЦЕПТОРОВ

Как и в случае всех олигомерных рецепторных комплексов, для демонстрации физических взаимодействий в гетеродимерах дофаминовых рецепторов также применяются различные методы, такие как FRET, BRET и co-IP, принципы работы которых были упомянуты ранее [29]. Было показано, что образование гетеромерного комплекса D1-D2 происходит за счет электростатического взаимодействия между двумя аргининовыми остатками третьей цитоплазматической петли D2-рецептора и противоположно заряженной парой остатков глутаминовых кислот, расположенных в карбоксильном хвосте рецептора D1, представленного на его обеих изоформах. Примечательно, что в случае наличия замещений хотя бы в одном из остатков этих двух пар гетеродимер не образуется. В свою очередь, доказательств участия трансмембранных участков в образовании гетеромерного комплекса не было выявлено [30].

Методы co-IP и FRET позволили выявить образование гетеромерных комплексов D1-D2 в базальных ядрах мозга взрослой крысы (прилежащем ядре стриатума, скорлупе), а также в области дендритных шипиков на нейронах стриато-нигральных и стриато-паллидарных путей. Позднее группой тех же авторов с использованием PLA и на уровне мРНК для измерения коэкспрессии мРНК D1R и D2R была задокументирована экспрессия гетеродимера в различных субрегионах коры, в частности в грушевидной и орбитофронтальной коре, а также в подкорковых структурах, таких как миндалевидное тело, и в латеральном поводе [23, 31, 32].

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КАСКАДЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ КОМПЛЕКСОМ D1-D2-РЕЦЕПТОРОВ И ИХ СВЯЗЬ С ДЕПРЕССИЕЙ

Как было описано ранее, мономерные формы D1Rs и D2Rs не вовлечены непосредственным образом в регуляцию Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов. В то же время активация гетеромерного комплекса D1-D2 индуцирует высвобождение кальция через $\text{G}\alpha_q$ -зависимый путь. Данный каскад приводит к внутриклеточному высвобождению кальция из запасов эндоплазматического ретикула, чувствительных к активации рецепторов инозитолтрифосфата (IP3R), что приводит к активации и последующему аутофосфорилированию кальций/кальмодулинкиназы II α (CaMKII α) [22]. Hasbi с соавт. показали, что увеличенная активность как цитозольной, так и ядерной CaMKII α сопровождается увеличением продукции нейротрофического фактора мозга (BDNF), участвующего в синаптической функции и пластичности, активации синтеза белков, ответственных за созревание, дифференцировку и выживание нейронов [31, 33].

Из-за важной роли, которую играют как дофамин, так и BDNF в аспектах синаптической пластичности и выживания нейронов, любое нарушение равновесия в описанном внутриклеточном пути активации D1-D2 может иметь драматические последствия, приводящие к изменениям способности контролировать содержимое рабочей памяти, потенциально приводя к риску развития нервно-психических расстройств, в том числе и депрессии. Действительно, было высказано предположение, что правильное функционирование рабочей памяти основано на ингибирующем механизме, устраняющем не-

гативную информацию, которая больше не актуальна. В случае же отсутствия торможения, обрабатывающего различные навязчивые мысли, запускается “порочный круг” обдумывания пережитых событий, усиливающий состояние печали [34].

С помощью метода FRET было установлено, что с возрастом количество гетеродимерного комплекса в стриатуме возрастает при сохранении относительного уровня экспрессии генов, кодирующих D1Rs и D2Rs, что позволяет предположить смещение равновесия в сторону образования гетеромеров по сравнению с мономерными рецепторами у взрослых крыс. Во взрослом мозге сигнальный путь, опосредованный данным комплексом, регионально-специфичен и сильно ограничен. Неравномерность распределения наблюдалась уже на уровне самого полосатого тела, причем большее количество нейронов, экспрессирующих гетеромер D1-D2, наблюдалось в прилежащем ядре, чем в дорсальном полосатом теле, что связано с различием в функциональной активности данных отделов [33].

Прилежащее ядро получает глутаматергические проекции от медиальной и латеральной PFC, гиппокампа и миндалевидного тела, ингибирующий ГАМКергический сигнал от вентрального бледного шара, а также дофаминергическую иннервацию от VTA. Оно является основным посредником между лимбической и мезолимбической дофаминергической системами головного мозга [35]. Роль последней в патогенезе депрессии становится все более очевидной. Ангедония и потеря мотивации, характеризующиеся неспособностью воспринимать естественные вознаграждения, являются основными симптомами депрессии у людей, поэтому неудивительно, что нарушение регуляции мезолимбической системы связано с патофизиологией депрессивных расстройств. Проекционные шипиковые нейроны составляют около 95% всех клеток прилежащего ядра. Было показано, что часть этих нейронов, демонстрирующих комбинированный ГАМКергический/глутаматергический фенотип, способны экспрессировать гетеродимерные комплексы D1-D2-рецепторов. Отсюда следует, что их активация способна изменять экспрессию белков, участвующих в ГАМКергической и глутаматергической передаче [22, 36, 37]. В самом деле, второй мишенью САМКIIa являются субъединицы глутаматного AMPA-рецептора – GluA1 и GluN2B. Данные рецепторы принимают участие в процессах долговременной потенциации и депрессии, а нарушение процессов посттрансляционной модификации их субъединиц, в том числе и фосфорилирования/дефосфорилирования, контролирующих активность AMPARs, связывают с развитием множества аффективных расстройств. Было показано, что у мышей, нокаутированных по субъединице GluA1, наблюдается ангедония, у грызунов проявляющаяся в снижении потребления раствора сахарозы [38]. Накопление GluA1 в постсинапсе в результате ее фосфорилирования приводит к встраиванию Ca^{2+} -проводящих AMPA-рецепторов (CP-AMPARs) в мембрану, что приводит к активации альтернативного NMDA-зависимого пути повышения Ca^{2+} в клетках и также играющего важную роль в поддержании синаптической передачи и нейрональной пластичности [22, 39].

Наряду с этим было обнаружено, что и ГАМКергическая нейрональная передача значительно усиливается в прилежащем ядре при активации гетеродимера D1-D2, что связано с повышением экспрессии одной из изоформ фермента, катализирующего преобразование глутамата в ГАМК – глутаматдекарбоксилазы 67 (GAD67). Впоследствии повышенная ГАМКергическая передача вызывает ингибирование передачи сигналов дофамина, что приводит к ангедонии и другим симптомам депрессивно-подобного поведения (рис. 2) [2, 40].

В зависимости от исследуемой области мозга активация гетеродимерного комплекса и опосредованного им сигнального пути может оказывать различные воздействия на депрессивно- и тревожно-подобное поведение. Например, введение BDNF в мезолимбические области (VTA и прилежащее ядро) коррелировало с депрессивно-подобным поведением в тесте “Принудительное плавание”, что проявлялось в виде снижения латентного периода до иммобилизации, в отличие от антидепрессивного

эффекта BDNF в PFC и гиппокампе [41]. В культивируемых нейронах прилежащего ядра крыс-самцов активация гетеродимера D1-D2 приводила к увеличению продукции BDNF, что коррелировало с развитием депрессивных и анксиогенных эффектов в ряде поведенческих тестов [32].

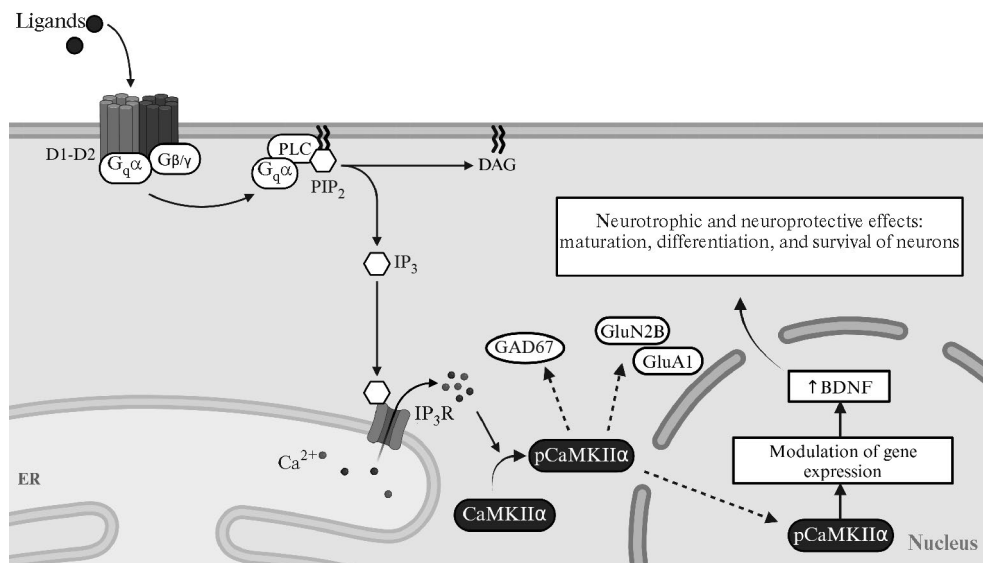


Рис. 2. Представление сигнального пути гетеродимерного комплекса D1-D2-рецепторов. Активация гетеродимера приводит к мобилизации внутриклеточного кальция посредством сигнального каскада, включающего транслокацию Gq-белка на плазматическую мембрану и активацию PLC. Кальций выступает в качестве активатора CaMKIIα, которая способна запускать экспрессию множества генов (например, BDNF), а также фосфорилировать другие мишени (субъединицы AMPARs, GAD67) (создано с помощью BioRender.com, по Hasbi с соавт., 2009, [33], с изменениями).

В недавнем исследовании также рассматривается роль гетеродимера D1-D2 в развитии послеродовой депрессии. Noogi с соавт. показали, что в модели депрессии, вызванной разлучением матери с потомством, наблюдается развитие депрессивно-подобного поведения у самок. Несмотря на то, что разлучение не вызывало значительных изменений в уровне гетеродимера D1-D2 в прилежащем ядре, была отмечена слабая корреляция между выраженностью депрессивно-подобного поведения и уровнем гетеродимера. Более того, полученные результаты указывают на то, что возрастание уровня гетеродимерного комплекса может быть связано с адаптивными поведенческими реакциями на стресс, вызванный разлучением, такими как усиление ухода за потомством [42].

Таким образом, можно предположить, что повышенная экспрессия гетеродимеров D1-D2 коррелирует с вероятностью развития депрессии, поэтому их разобщение с помощью дисруптивных пептидов может положительно сказаться на психическом состоянии человека. Так, в случае блокирования этого комплекса при внутрижелудочковом введении интерферирующего пептида Tat-D2LIL3-29-2 значительно сокращалось суммарное время иммобилизации в тесте “Принудительное плавание” и возрастала частота избегания раздражителя в тесте “Выученная беспомощность” у крыс. Это значит,

что гетеродимерные рецепторы D1-D2 действительно могут выступать в качестве новой фармакологической мишени для лечения депрессии и тревожных расстройств [43].

Однако стоит отметить, что для изучения внутриклеточных каскадов данного гетеродимера в качестве специфического агониста комплекса часто выступает SKF83595. Он критикуется многими исследовательскими группами, поскольку была продемонстрирована его значительная перекрестная реактивность в отношении других рецепторов [44]. Данный лиганд, наряду с SKF83959 и SKF83822, рассматривается как битопический, то есть способный связываться как с орто-, так и с аллостерическими сайтами на обоих протомерах димерного комплекса. Несмотря на высокую селективность в отношении димерного комплекса, было показано, что при связывании данные лиганды вызывают специфические конформационные изменения в комплексе, что способствует преобладанию определенного внутриклеточного сигнального пути над другими. В то же время такая избирательность в активации открывает новые возможности для разработки специфических терапевтических агентов [45, 46].

Помимо данных, полученных с использованием лиганда SKF83595, которые принимаются не всеми, было продемонстрировано увеличение количества гетеродимеров рецепторов D1-D2 в головном мозге пациентов, страдающих депрессией, а также у животных в ответ на повторное введение тетрагидроканабинола (ТГК). В отсутствие интраназального введения дизруптивного пептида TAT-D1 этот эффект сохранялся после прекращения приема ТГК, что еще раз подтверждает специфичность его разобщающего эффекта на гетеромер D1-D2. Повышение экспрессии гетеромера D1-D2 сопровождается увеличением сигнальной активности BDNF/TrkB, приводящей к увеличению экспрессии динофина и активации каппа-опиоидных рецепторов [47].

Важность используемого лиганда в изучении физиологических свойств рецепторных димеров подтверждается в недавнем исследовании белок-белкового взаимодействия с помощью биолюминесцентной системы с расщепленной нанолюциферазой *in vivo*. В работе было продемонстрировано, что по крайней мере два из шести исследованных антагонистов (спиперон и галоперидол) могут существенно снижать уровень гомодимера D2R, в то же время в отношении комплекса рецепторов A2A–D2L спиперон не оказал влияния на уровень димеризации этого гетеродимера [48].

ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КОМПЛЕКСОВ D1-D2-РЕЦЕПТОРОВ

Несмотря на существование огромного количества информации о роли дофаминовой системы в головном мозге, данные о половых различиях в функции дофамин, показывающие врожденное существование полового диморфизма в экспрессии и функционировании дофаминовых рецепторов, ограничены, а исследования половых различий в экспрессии и функции гетеромерного комплекса рецепторов D1-D2 практически полностью отсутствуют [49].

Однако есть исследования, демонстрирующие, что у самок нечеловекообразных приматов в хвостатом ядре и у крыс в полосатом теле наблюдается более высокая плотность гетеродимеров и выявляется большее количество нейронов, экспрессирующих эти комплексы. Хотя экспрессия D1R у самок ниже, чем у самцов, в случае экспрессии D2R различий между двумя полами не наблюдалось. Результаты также показали, что самки крыс были больше склонны к депрессивно- и тревожно-подобному поведению в тесте “Принудительное плавание” и “Приподнятый крестообразный лабиринт” после активации комплексов низкими дозами SKF83959. Данный эффект был нивелирован разрушением гетеродимера пептидом TAT-D1. Эти результаты позволяют предположить, что более высокий уровень гетеродимера D1-D2 и более низкая экспрессия D1R могут свидетельствовать об общем снижении внутреннего подкрепления, способ-

ствующем увеличению предрасположенности к депрессивно-подобному поведению у самок [32, 50].

При повторных инъекциях агониста гетеромерного комплекса SKF83959 увеличилась экспрессия BDNF и активность TrkB у самок в большей степени, нежели у самцов. Эти наблюдения указывают на то, что базальная сигнальная активность BDNF/TrkB более выражена в прилежащем ядре самок крыс по сравнению с самцами, и активация у них гетеродимера приводит к более усиленной внутриклеточной сигнализации по сравнению с самцами [32].

Важной нисходящей мишенью передачи сигналов BDNF/TrkB является Akt/GSK3-путь. Известно, что активация Akt критически зависит от фосфорилирования ее по остаткам Ser473 и Thr308. Было показано, что у самок крыс фосфорилирование фермента по данным остаткам существенно снижено. В связи с меньшей активностью Akt наблюдалось снижение фосфорилирования GSK3, поэтому последний фермент обладал повышенной активностью у самок по сравнению с самцами крыс. Однако наличие прямой связи между активированным гетеромерным комплексом D1-D2 и его влиянием на GSK3 еще не было установлено. Данный факт подкрепляется тем, что при введении SKF83959 активность Akt у самок крыс возрастала и в то же время снижалось количество фосфорилированной GSK3. Это позволяет предположить, что влияние SKF 83959 на GSK3 может быть опосредовано его влиянием на сигнальные каскады, отличные от пути с Akt [32].

В связи с более высокой плотностью гетеродимера D1-D2 и низкой экспрессией D1R в прилежащем ядре самок преобладающее воздействие на модуляцию активности Akt/GSK3 будет осуществляться через D2R посредством активации β arr2/Akt/PP2A-пути, описанного ранее. Напротив, у самцов крыс активность Akt/GSK3 регулируется через D1R посредством трансактивации рецепторной тирозинкиназы, приводящей к усилению передачи сигналов PI3K и последующему ингибированию GSK3 [25, 49].

Одной из основных мишеней GSK3 является β -катенин. Вместе они способны образовывать комплекс с рядом других белков, что в конечном счете ведет к фосфорилированию β -катенина и его дальнейшей деградации. Свободный β -катенин способен перемещаться в ядро и влиять на экспрессию множества генов, вовлеченных в патогенез депрессии. Половые различия в модуляции активности GSK3 сопровождаются изменениями в накоплении β -катенина. Поскольку активация гетеромера D1-D2 у самок крыс связана с активацией GSK3, то это приводит к снижению количества свободного β -катенина. И действительно, как у грызунов, так и у людей с депрессией была задокументирована сниженная активность β -катенина в нейронах прилежащего ядра (рис. 3) [24, 32].

Таким образом, можно полагать, что повышенная активность GSK3, обусловленная более высокой плотностью гетеродимера D1-D2 и низкой экспрессией D1R, приводит к снижению количества свободного β -катенина у самок крыс, что ведет к большей подверженности к депрессивно-подобному поведению у самок крыс. У самцов данный эффект нивелируется повышенным фосфорилированием GSK3 по PI3K/Akt-пути.

ВАРИАНТЫ ДИМЕРИЗАЦИИ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ С ДРУГИМИ РЕЦЕПТОРАМИ

После признания концепции рецепторных гетеромеров ученые начали уделять серьезное внимание изучению их функций в контексте патогенеза различных болезней. Дофаминовые рецепторы способны образовывать гетеромерные комплексы и с другими представителями GPCR. Была продемонстрирована гетеродимеризация для всех подтипов дофаминовых рецепторов [7].

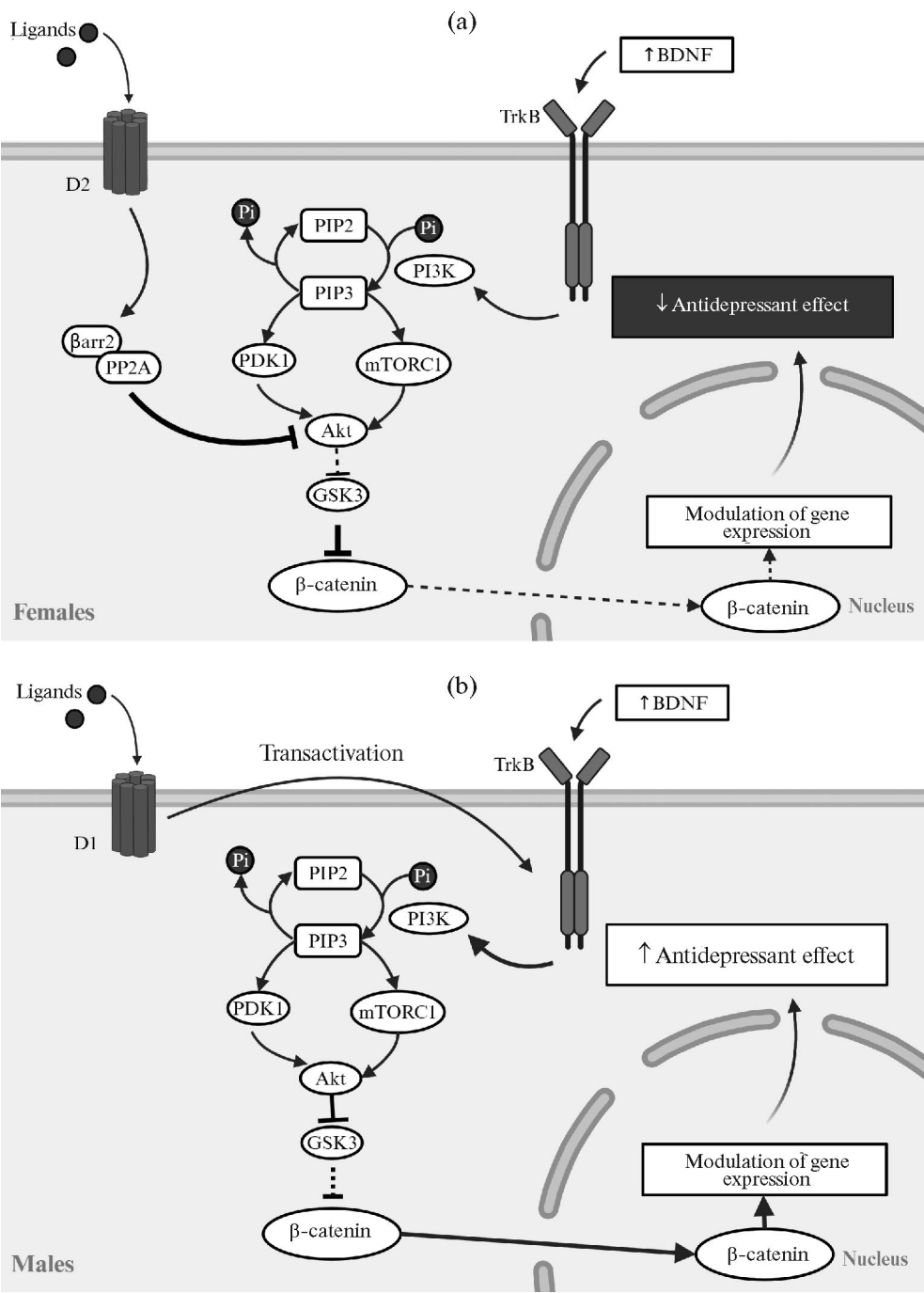


Рис. 3. Представление нисходящих мишеней передачи сигналов BDNF/TrkB в зависимости от пола (создано с помощью BioRender.com).

Например, была показана гетеродимеризация как D1R, так и D2R с рецепторами серотонина 5-HT1AR и 5-HT2AR, чья ассоциация вовлечена в развитие различных психических расстройств. Было продемонстрировано, что образование гетеромерного комплекса D1-5-HT2A повышается в различных моделях стресс-индуцированной депрессии [51].

Гетеродимеры рецепторов D2-5-HT1A активируют внутриклеточные сигнальные каскады, включая продукцию инозитолфосфатов и активацию внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK). Эти процессы могут быть связаны с изменениями в функционировании нейронов и передачей сигналов в мозге, что, в свою очередь, может влиять на развитие депрессивных симптомов. Исследования подтвердили наличие гетеродимеров D2-5-HT1A в префронтальной коре мышей. При обработке нейронов с колокализированными D2Rs и 5-HT1ARs низкой дозой клозапина и агонистом 5-HT1AR, 8-OH-DPAT наблюдалось значительное снижение продукции cAMP по сравнению с воздействием этой комбинации препаратов на клетки, экспрессирующие только один из этих рецепторов. Повышение продукции инозитолфосфатов и активация ERK после обработки данными препаратами контрансфицированными гетеродимерами D2-5-HT1A клеток указывает на активацию специфических сигнальных путей, отличных от таковых для одиночных рецепторов. Кроме того, различные антипсихотические препараты могут дифференциально регулировать уровень этих гетеродимеров, что подчеркивает их роль в механизмах действия данных препаратов при лечении депрессии [51, 52].

Недавнее исследование также раскрыло роль комплекса D1-5-HT1A в патофизиологии депрессии. Было продемонстрировано, что при коэкспрессии D1R и 5-HT2AR уровень фосфорилированного cAMP-элемент-связывающего белка (CREB) снижался, в то же время наблюдалось усиление активности ERK и снижение активности PI3K/Akt, что коррелировало с развитием депрессивно-подобного поведения у мышей. Кроме того, исследователи показали, что ингибитор гистондеацетилазы 3-го типа, MS-275, способен обратить антидепрессивное действие дизруптивного пептида на данный гетеродимер в ряде поведенческих тестов [53].

Основными функционально значимыми гетеромерами аденозиновых (ARs) и дофаминовых рецепторов являются комплексы рецепторов A2A-D2 и A1-D1, хотя также имеются данные о других возможных комбинациях, например, A2A-D3- и A2A-D4-рецепторов. Гетеромеризация приводит к образованию гетеротетрамеров, включающих по два A2A- и D2-рецептора. В реализации внутриклеточного каскада данного комплекса важную роль играет характер взаимодействия данных рецепторов, определяемый конформацией и своим окружением. В дополнение к этому существенную роль играет уровень внутриклеточного кальция, определяющий связывание двух различных нейрональных Ca^{2+} -связывающих белков, NCS-1 и CALN1, с гетеромером A2A-D2-рецепторов при низких и высоких концентрациях Ca^{2+} соответственно. Это, в свою очередь, будет как способствовать, так и противодействовать активации MAPK в зависимости от уровня внутриклеточного Ca^{2+} [54].

Анатомически комплексы рецепторов A2A-D2 в основном находятся в базальных ганглиях, особенно в стриатопаллидарных ГАМКергических нейронах дорсального стриатума, формирующих кортико-стриатальный путь, гипоактивация которого наблюдается при депрессии. Хотя для подтверждения участия данных комплексов в патофизиологии депрессивных расстройств требуются дальнейшие исследования, на сегодняшний день существует ряд убедительных доказательств этой связи. Так, применение галоперидола, классического антипсихотика с антагонистическим действием на D2Rs, способствовало предотвращению антидепрессант-подобной активности агониста A2AR в тесте “Принудительное плавание” [54, 55].

К тому же в стриатуме, а также в гиппокампе и префронтальной коре было показано взаимодействие локальной ренин-ангиотензиновой системы и дофаминергической системы мозга на уровне образования гетеродимера AT1-D2. Образование гетеродиме-

ров этих рецепторов приводит к изменению их функциональных свойств и внутриклеточной сигнализации, что оказывает значительное влияние на нейрофизиологические процессы, связанные в том числе и с депрессией [56].

Рядом других авторов было продемонстрировано существование и других гетеродимерных комплексов, активация которых сопровождалась смещением сигнальных каскадов. Например, с использованием синтетических бивалентных лигандов *in vitro* было продемонстрировано существование комплекса D2R и рецептора нейротензина 1-го типа (NTS1R), способных вызывать преимущественную активацию β -аррестина-2 в коэкспрессирующих оба типа рецепторов клетках [45].

В дополнение к комплексам, локализованным на нейронах, были обнаружены глиальные гетеромеры рецепторов D2-OXT и D2-A2A. Оба типа рецепторов колокализованы на астроцитах стриатума и играют важную роль в регуляции высвобождения глутамата. Исследования показали, что в присутствии окситоцина агонист D2-рецепторов, квинпирол, который сам по себе неэффективен при исследуемых концентрациях, ингибировал высвобождение глутамата. Это происходит потому, что окситоцин, связываясь с OXTR, повышает аффинность D2-рецепторов, позволяя им активироваться при низких концентрациях своих агонистов. Этот механизм особенно важен в условиях дефицита дофамина, характерного для депрессии. Активация рецепторов A2A-D2, помимо участия в регуляции глутаматергической передачи, может модулировать воспалительные процессы в головном мозге через высвобождение цитокинов, что также связано с риском развития депрессии [57, 58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного можно заключить, что олигомеризация дофаминовых рецепторов как внутри своего семейства, так и с другими представителями GPCRs приводит к модулированию внутриклеточных каскадов и связана с появлением разнообразных физиологических эффектов, лежащих в основе патогенеза множества заболеваний, в том числе и депрессивных расстройств. Дальнейшая разработка синтетических бивалентных лигандов гетеродимерных комплексов рецепторов дофамина представляет потенциальный интерес для адресной и избирательной терапии депрессивных расстройств. Она также дает возможность снизить нежелательные побочные эффекты, которые часто сопровождают традиционные антидепрессанты. Учитывая преимущества выбора олигомеров дофаминовых рецепторов в качестве терапевтической мишени, необходимо проведение дальнейших исследований для оценки безопасности и эффективности влияния бивалентных лигандов этих олигомеров на организм человека в целом.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Концепция (О. В. С.), написание текста (А. А. Г.), оформление рисунков (А. А. Г.), редактирование манускрипта (О. В. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Московского государственного университета № 121032300075-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaur S, Singh S, Jaiswal G, Kumar S, Hourani W, Gorain B, Kumar P (2020) Pharmacology of Dopamine and Its Receptors. *Front Pharmacol Neurotransmit*: 143–182.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-3556-7_5
2. Misganaw D (2021) Heteromerization of dopaminergic receptors in the brain: Pharmacological implications. *Pharmacol Res* 170: 105600.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105600>
3. Perreault ML, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2014) Heteromeric Dopamine Receptor Signaling Complexes: Emerging Neurobiology and Disease Relevance. *Neuropsychopharmacology* 39: 156–168.
<https://doi.org/10.1038/npp.2013.148>
4. Lubomski M, Davis RL, Sue CM (2020) Depression in Parkinson's disease: Perspectives from an Australian cohort. *J Affect Disord* 277: 1038–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.09.032>
5. Dean J, Keshavan M (2017) The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatry* 27: 101–111.
<https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
6. Szczypiński JJ, Gola M (2018) Dopamine dysregulation hypothesis: the common basis for motivational anhedonia in major depressive disorder and schizophrenia? *Rev Neurosci* 29: 727–744.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0091>
7. Maggio R, Aloisi G, Silvano E, Rossi M, Millan MJ (2009) Heterodimerization of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance. *Parkinsonism Relat Disord* 15: S2–S7.
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70826-0](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70826-0)
8. George SR, Kern A, Smith RG, Franco R (2014) Dopamine receptor heteromeric complexes and their emerging functions. *Progr Brain Res* 211: 183–200.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00008-8>
9. Johnson GP, Agwuegbo U, Jonas KC (2021) New insights into the functional impact of G protein-coupled receptor oligomerization. *Curr Opin Endocr Metab Res* 16: 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.08.005>
10. Ferré S, Ciruela F, Casadó V, Pardo L (2020) Oligomerization of G protein-coupled receptors: Still doubted? *Progr Mol Biol Translat Sci* 169: 297–321.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.11.006>
11. Hu S, Wang D, Liu W, Wang Y, Chen J, Cai X (2024) Apelin receptor dimer: Classification, future prospects, and pathophysiological perspectives. *Biochim Biophys Acta BBA – Mol Basis Dis* 1870: 167257.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167257>
12. Shah U, Pincas H, Sealfon SC, González-Maeso J (2020) Structure and function of serotonin GPCR heteromers. *Handbook Behav Neurosci* 31: 217–238.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00011-6>
13. Yeganeh-Hajjhmadi M, Moosavi-Saeed Y, Rostamzadeh F (2023) Apelin Receptor Dimerization and Oligomerization. *Curr Mol Pharmacol* 17: e180823219999.
<https://doi.org/10.2174/1874467217666230818113538>
14. Gahbauer S, Böckmann RA (2020) Comprehensive Characterization of Lipid-Guided G Protein-Coupled Receptor Dimerization. *J Phys Chem B* 124: 2823–2834.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00062>
15. Mirchandani-Duque M, Choucri M, Hernández-Mondragón JC, Crespo-Ramírez M, Pérez-Olives C, Ferraro L, Franco R, Pérez De La Mora M, Fuxe K, Borroto-Escuela DO (2024) Membrane Heteroreceptor Complexes as Second-Order Protein Modulators: A Novel Integrative Mechanism through Allosteric Receptor – Receptor Interactions. *Membranes* 14: 96.
<https://doi.org/10.3390/membranes14050096>
16. Faron-Górecka A, Szlachta M, Kolasa M, Solich J, Górecki A, Kuśmider M, Żurawek D, Dziedzicka-Wasylewska M (2019) Understanding GPCR dimerization. *Methods Cell Biol* 149: 155–178.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.005>
17. Johnstone EKM, See HB, Abhayawardana RS, Song A, Rosengren KJ, Hill SJ, Pflieger KDG (2021) Investigation of Receptor Heteromers Using NanoBRET Ligand Binding. *Int J Mol Sci* 22: 1082.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031082>
18. Dale NC, Johnstone EKM, Pflieger KDG (2022) GPCR heteromers: An overview of their classification, function and physiological relevance. *Front Endocrinol* 13: 931573.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.931573>
19. Odagaki Y, Borroto-Escuela DO (2019) Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissue. Humana Press.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8985-0>

20. Lujan R, Ciruela F (2021) Receptor and Ion Channel Detection in the Brain. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1522-5>
21. Guo H, An S, Ward R, Yang Y, Liu Y, Guo X-X, Hao Q, Xu T-R (2017) Methods used to study the oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. Biosci Rep 37: BSR20160547. <https://doi.org/10.1042/BSR20160547>
22. Zhao F, Cheng Z, Piao J, Cui R, Li B (2022) Dopamine Receptors: Is It Possible to Become a Therapeutic Target for Depression? Front Pharmacol 13: 947785. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.947785>
23. Vekshina NL, Anokhin PK, Veretinskaya AG, Shamakina IYu (2017) Heterodimeric D1-D2 dopamine receptors: a review. Biomed Khimiya 63: 5–12. <https://doi.org/10.18097/PBMC20176301005>
24. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Pharmacol Rev 63: 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
25. Iwakura Y, Nawa H, Sora I, Chao MV (2008) Dopamine D1 Receptor-induced Signaling through TrkB Receptors in Striatal Neurons. J Biol Chem 283: 15799–15806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801553200>
26. Juza R, Musilek K, Mezeiova E, Soukup O, Korabecny J (2023) Recent advances in dopamine D₂ receptor ligands in the treatment of neuropsychiatric disorders. Med Res Rev 43: 55–211. <https://doi.org/10.1002/med.21923>
27. Beaulieu J-M, Tirotta E, Sotnikova TD, Masri B, Salahpour A, Gainetdinov RR, Borrelli E, Caron MG (2007) Regulation of Akt Signaling by D₂ and D₃ Dopamine Receptors In Vivo. J Neurosci 27: 881–885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5074-06.2007>
28. Delva NC, Stanwood GD (2021) Dysregulation of brain dopamine systems in major depressive disorder. Exp Biol Med 246: 1084–1093. <https://doi.org/10.1177/1535370221991830>
29. Kim H, Nam M-H, Jeong S, Lee H, Oh S-J, Kim J, Choi N, Seong J (2022) Visualization of differential GPCR crosstalk in DRD1-DRD2 heterodimer upon different dopamine levels. Prog Neurobiol 213: 102266. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102266>
30. O'Dowd BF, Ji X, Nguyen T, George SR (2012) Two amino acids in each of D1 and D2 dopamine receptor cytoplasmic regions are involved in D1–D2 heteromer formation. Biochem Biophys Res Commun 417: 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.027>
31. Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2011) Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance. Mol Brain 4: 26. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-26>
32. Hasbi A, Nguyen T, Rahal H, Manduca JD, Miksys S, Tyndale RF, Madras BK, Perreault ML, George SR (2020) Sex difference in dopamine D1-D2 receptor complex expression and signaling affects depression- and anxiety-like behaviors. Biol Sex Differ 11: 8. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00285-9>
33. Hasbi A, Fan T, Alijanianam N, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF, George SR (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1–D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 21377–21382. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903676106>
34. Joormann J, Gotlib IH (2010) Emotion regulation in depression: Relation to cognitive inhibition. Cogn Emot 24: 281–298. <https://doi.org/10.1080/02699930903407948>
35. Фонсова НА, Сергеев ИЮ, Дубынин ВА (2016) Анатомия центральной нервной системы. Учебник для академического бакалавриата. М.; Изд-во Юрайт. [Fonsova NA, Sergeev IYU, Dubynin VA (2016) Anatomy of the Central Nervous System. A Textbook for Academic Bachelor's Degree. M. YUraйт. (In Russ)].
36. Koo JW, Chaudhury D, Han M-H, Nestler EJ (2019) Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. Biol Psychiatry 86: 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.020>
37. Fatima M, Ahmad MH, Srivastav S, Rizvi MA, Mondal AC (2020) A selective D2 dopamine receptor agonist alleviates depression through up-regulation of tyrosine hydroxylase and increased neurogenesis in hippocampus of the prenatally stressed rats. Neurochem Int 136: 104730. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104730>
38. Strickland JA, Austen JM, Sprengel R, Sanderson DJ (2021) The GluA1 AMPAR subunit is necessary for hedonic responding but not hedonic value in female mice. Physiol Behav 228: 113206. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113206>

39. *Dolgacheva LP, Tuleukhanov ST, Zinchenko VP* (2020) Participation of Ca^{2+} -Permeable AMPA Receptors in Synaptic Plasticity. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane And Cell Biology* 37: 175–187.
<https://doi.org/10.31857/S0233475520030044>
40. *Shen MYF* (2015) The role of the dopamine D1-D2 receptor heteromer in brain reward function: Relevance to drug addiction and depression. *Univer Toronto*. 1–223.
41. *Phillips C* (2017) Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plast* 2017: 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2017/7260130>
42. *Noori M, Hasbi A, Sivasubramanian M, Milenkovic M, George SR* (2020) Maternal Separation Model of Postpartum Depression: Potential Role for Nucleus Accumbens Dopamine D1–D2 Receptor Heteromer. *Neurochem Res* 45: 2978–2990.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03145-5>
43. *Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, Nobrega JN, Liu F* (2010) Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med* 16: 1393–1395.
<https://doi.org/10.1038/nm.2263>
44. *Dziedzicka-Wasylewska M, Polit A, Blasiak E, Faron-Górecka A* (2024) G Protein-Coupled Receptor Dimerization – What Next? *Int J Mol Sci* 25: 3089.
<https://doi.org/10.3390/ijms25063089>
45. *Botta J, Appelhans J, McCormick PJ* (2020) Continuing challenges in targeting oligomeric GPCR-based drugs. *Progr Mol Biol Translat Sci* 169: 213–245.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.11.009>
46. *Zhuang Y, Xu P, Mao C, Wang L, Krumm B, Zhou XE, Huang S, Liu H, Cheng X, Huang X-P, Shen D-D, Xu T, Liu Y-F, Wang Y, Guo J, Jiang Y, Jiang H, Melcher K, Roth BL, Zhang Y, Zhang C, Xu HE* (2021) Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell* 184: 931–942.e18.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.027>
47. *Hasbi A, Madras BK, George SR* (2023) Daily $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol and Withdrawal Increase Dopamine D1-D2 Receptor Heteromer to Mediate Anhedonia- and Anxiogenic-like Behavior Through a Dynorphin and Kappa Opioid Receptor Mechanism. *Biol Psychiatry Glob Open Sci* 3: 550–566.
<https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2022.07.003>
48. *Wouters E, Marin A, Dalton J, Giraldo J, Stove C* (2019) Distinct Dopamine D2 Receptor Antagonists Differentially Impact D2 Receptor Oligomerization. *Int J Mol Sci* 20: 1686.
<https://doi.org/10.3390/ijms20071686>
49. *Williams OOF, Coppolino M, George SR, Perreault ML* (2021) Sex Differences in Dopamine Receptors and Relevance to Neuropsychiatric Disorders. *Brain Sci* 11: 1199.
<https://doi.org/10.3390/brainsci11091199>
50. *Shen MYF, Perreault ML, Bambico FR, Jones-Tabah J, Cheung M, Fan T, Nobrega JN, George SR* (2015) Rapid anti-depressant and anxiolytic actions following dopamine D1–D2 receptor heteromer inactivation. *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 2437–2448.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.004>
51. *Mitroshina EV, Marasanova EA, Vedunova MV* (2023) Functional Dimerization of Serotonin Receptors: Role in Health and Depressive Disorders. *Int J Mol Sci* 24: 16416.
<https://doi.org/10.3390/ijms242216416>
52. *Shioda N, Imai Y, Yabuki Y, Sugimoto W, Yamaguchi K, Wang Y, Hikida T, Sasaoka T, Mieda M, Fukunaga K* (2019) Dopamine D_{2L} Receptor Deficiency Causes Stress Vulnerability through 5-HT_{1A} Receptor Dysfunction in Serotonergic Neurons. *J Neurosci* 39: 7551–7563.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0079-19.2019>
53. *Li W, Ali T, Mou S, Gong Q, Li N, Hao L, Yu Z-J, Li S* (2023) D1R-5-HT_{2A}R Uncoupling Reduces Depressive Behaviours via HDAC Signalling. *Neurotherapeutics* 20: 1875–1892.
<https://doi.org/10.1007/s13311-023-01436-7>
54. *Gonçalves MCB, Glaser T, Oliveira SLBD, Ulrich H* (2020) Adenosinergic-Dopaminergic Signaling in Mood Disorders: A Mini-Review. *J Caffeine Adenosine Res* 10: 94–103.
<https://doi.org/10.1089/caff.2020.0009>
55. *Ferré S, Bonaventura J, Zhu W, Hatcher-Solis C, Taura J, Quiroz C, Cai N-S, Moreno E, Casadó-Anguera V, Kravitz AV, Thompson KR, Tomasi DG, Navarro G, Cordomi A, Pardo L, Lluís C, Dessauer CW, Volkow ND, Casadó V, Ciruela F, Logothetis DE, Zwillig D* (2018) Essential Control of the Function of the Striatopallidal Neuron by Pre-coupled Complexes of Adenosine A_{2A}-Dopamine D₂ Receptor Heterotetramers and Adenylyl Cyclase. *Front Pharmacol* 9: 243.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00243>

56. Durdagi S, Erol I, Salmas RE, Aksoydan B, Kantarcioglu I (2019) Oligomerization and cooperativity in GPCRs from the perspective of the angiotensin AT1 and dopamine D2 receptors. *Neurosci Lett* 700: 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.028>
57. Amato S, Aversa M, Guidolin D, Ceccoli C, Gatta E, Candiani S, Pedrazzi M, Capraro M, Maura G, Agnati LF, Cervetto C, Marcoli M (2023) Heteromerization of Dopamine D2 and Oxytocin Receptor in Adult Striatal Astrocytes. *Int J Mol Sci* 24: 4677.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054677>
58. Cervetto C, Maura G, Guidolin D, Amato S, Ceccoli C, Agnati LF, Marcoli M (2023) Striatal astrocytic A2A-D2 receptor-receptor interactions and their role in neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology* 237: 109636.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109636>

The Role of Dopamine Receptor Dimer Complexes in the Pathogenesis of Depression

A. A. Gerasimov^{a,*}, and O. V. Smirnova^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

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

This abstract discusses the oligomerization of G protein-coupled receptors (GPCRs), which significantly expands the functional capabilities of cells in living organisms by modulating intracellular signaling pathways. This provides a variety of physiological effects in both normal and pathological states. The structure and localization in the brain of one of the most studied heterodimers, the D1-D2 receptor complex, and its signaling cascades, which correlate with the development of depressive disorders, are examined. Sexual differences in the functioning of this heterodimer are analyzed, and the issue of the selectivity of bivalent synthetic ligands in activating specific intracellular pathways is discussed, highlighting their potential as therapeutic targets for the targeted treatment of depressive disorders. The concluding part of the abstract addresses the diversity of dopamine receptor heterodimers with other members of the GPCR family and their role in the pathophysiology of depression.

Keywords: GPCR, GPCR oligomerization, heterodimer complexes, dopamine receptor, depression

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИХ СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ

© 2024 г. Т. А. Щелкунова^{1,*}

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

*E-mail: schelkunova-t@mail.ru

Поступила в редакцию 12.06.2024 г.

После доработки 13.09.2024 г.

Принята к публикации 22.09.2024 г.

Прогестерон играет ключевую роль в процессах репродукции в женском организме, оказывает эффекты в ЦНС и других тканях. Прогестины широко применяются в клинике в контрацепции и гормональной терапии. Классические эффекты прогестерона осуществляются через ядерные рецепторы, являющиеся лиганд-зависимыми транскрипционными факторами. С 2003 г. в центре внимания оказались мембранные рецепторы прогестерона (mPRs) семейства адипонектиновых рецепторов пяти подтипов. Их роль во многих нормальных и патологических процессах в организме остается неясной. Определение механизмов действия прогестерона осложняется тем, что активация разных типов рецепторов может вызывать противоположные эффекты. Поиск селективных лигандов mPRs является актуальной задачей, поскольку применение таких соединений позволяет дифференцировать эффекты прогестинов, опосредуемые разными типами рецепторов. В обзоре анализируется действие трех селективных лигандов mPRs, описанных и изученных в настоящее время. Один из них широко применяется в международных исследованиях, два других выявлены и используются в нашей работе. Рассматриваются достоинства и недостатки этих трех соединений и проведенные с их использованием исследования функций mPRs. В заключение оцениваются перспективы создания новых селективных лигандов mPRs с учетом особенностей структуры их лиганд-связывающего кармана. Мы обнаружили, что 3-кетогруппа прогестерона и его производных, принципиально необходимая для связывания с ядерными рецепторами стероидов, неважна для взаимодействия с mPRs. Наш вывод был подтвержден в исследовании, опубликованном в 2022 г., с использованием методов моделирования и мутационного анализа. Именно эта особенность структуры будет в дальнейшем служить основой для разработки синтеза эффективных и избирательно взаимодействующих с mPRs соединений.

Ключевые слова: прогестины, стероиды, мембранные рецепторы, ядерные рецепторы, селективные лиганды, сигнальные каскады

DOI: 10.31857/S0869813924100026, **EDN:** VSEZPP

ВВЕДЕНИЕ

Прогестерон – стероидный гормон, необходимый для осуществления репродуктивных функций в женском организме и для регуляции разнообразных процессов в клетках многих органов. Он оказывает свое действие через два типа рецепторов, а также может влиять на активность ряда сенсоров. Классические ядерные рецепторы проге-

стерона (nPR), являющиеся лиганд-зависимыми транскрипционными факторами, к настоящему времени хорошо изучены. Известны две основные формы этих рецепторов – А и В, являющиеся продуктами одного гена [1]. В 2003 г. был идентифицирован новый тип рецепторов прогестерона [2] – мембранные рецепторы прогестерона (mPRs) семейства адипонектиновых и прогестинового рецепторов, в настоящее время выявлено 5 подтипов этих рецепторов. Эти рецепторы обнаружены в репродуктивных и нерепродуктивных органах, в опухолевых тканях, в иммунных клетках. Оказалось, что действие прогестерона и его аналогов через разные типы рецепторов не только сильно различается, но может быть и противоположным. Действуя через ядерные рецепторы, прогестерон вызывал релаксацию миометрия матки. Действуя через mPRs, этот гормон стимулировал фосфорилирование легких цепей миозина в первичной культуре миометрия, вызывая сократительную активность этой ткани [3]. Предполагается также, что через разные рецепторы прогестина (прогестерон и его синтетические производные) могут оказывать противоположное действие на пролиферацию и гибель клеток, в том числе опухолевых, на процессы канцерогенеза [4, 5]. Поскольку эти гормоны широко используются в медицинской практике для гормональной терапии и контрацепции [6], огромное значение имеет поиск селективных лигандов определенного типа рецепторов. Селективные агонисты и антагонисты nPR установлены. Лиганды для mPRs, сочетающие высокое сродство к ним и полное отсутствие взаимодействия с nPR, пока не выявлены. Антагонисты mPRs также не обнаружены. В то же время на основании уже выявленных функций mPRs можно предполагать, что такие соединения перспективны в качестве иммуномодуляторов, потенциальных лекарств в лечении онкологических заболеваний, ожирения и диабета, болезней сосудов. В обзоре впервые суммированы результаты изучения эффектов и механизмов действия существующих в настоящее время селективных лигандов mPRs, используемых зарубежными и российскими авторами, а также подведены итоги изучения модификаций молекулы прогестерона, на основе которых ожидается прогресс в области получения соединений, избирательно и эффективно действующих через mPRs.

Рецепторы прогестерона

Классическое действие стероидных гормонов осуществляется через взаимодействие с ядерными рецепторами, в результате которого происходит конформационная перестройка, димеризация и связывание этих рецепторов с гормон-чувствительными элементами ДНК и корегуляторами, что приводит к изменению транскрипции генов-мишеней данной группы гормонов. Ядерные рецепторы прогестерона имеют доменную структурно-функциональную организацию. Существует две транскрипционно активных изоформы PR-A и PR-B, различающиеся фрагментом в 164 аминокислотных остатка с N-конца молекулы. Полноразмерная изоформа В состоит из N-концевого домена с двумя активационными функциями AF1 и AF3, центрального ДНК-связывающего домена с цинковыми пальцами, шарнирной области и лиганд-связывающего домена с AF2 около C-конца. Укороченная изоформа А не имеет AF3 и регулирует транскрипцию спектра генов-мишеней, существенно отличающихся от мишеней изоформы В. При появлении лиганда ядерные рецепторы, находящиеся в цитоплазме, связываются с ним, транслоцируются в ядро и осуществляют прямой контроль экспрессии генов [1].

Мембранные рецепторы прогестерона относятся к рецепторам прогестинового и адипонектинового семейства *adipoQ* (PAQR), в которое входит пять подтипов mPRs у позвоночных животных – mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8), mPR γ (PAQR5), mPR δ (PAQR6) и mPR ϵ (PAQR9), а также три рецептора адипонектина – AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3 (PAQRs 1, 2, 3) и два белка, ассоциированных с дифференцировкой моноцитов в макрофаги (MMDs, PAQRs 10, 11) [7,8]. Белки mPRs состоят из 330–377 аминокислотных остатков, имеют множественные трансмембранные домены, являются посредниками в быстрой активации прогестероном неклассических внутриклеточных сигнальных

путей, которые обычно не являются геномными, но могут в конечном итоге приводить к геномным ответам [7]. Эволюционно и структурно mPRs не связаны с рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCRs), однако изменение уровня цАМФ, эксперименты с ингибиторами активации G-белков, коиммунопреципитацией и анализом лигирования (*in situ* proximity ligation assays) доказали, что mPRs через G-белки активируют вторичную сигнализацию и клеточные реакции [8]. Обработка прогестероном увеличивала связывание [³⁵S]GTPγS с плазматическими мембранами клеток, экспрессирующими mPRs, что также указывало на активацию G-белков. Обработка нерадиоактивным GTPγS, коклюшным и холерным токсинами приводила к диссоциации G-белков от рецепторов, в результате чего уменьшалось количество мест связывания рецепторов и лигандов. Перечисленные методы обработки уменьшали связывание [3H]-прогестерона с mPRs, что указывает на их тесную связь с G-белками [7]. Идентичность активированных G-белков была определена иммунопреципитацией радиоактивно меченного GTPγS со специфическими антителами к α-субъединицам G-белков ингибирующего (Gi) и стимулирующего (Gs) типов. Подтипы mPRα, mPRβ, mPRγ активируют, как правило, ингибиторные G-белки, а mPRδ и mPRε – стимуляторные G-белки. Одним из исключений является связь mPRα со стимуляторным G (Golf) белком в сперме двух видов костистых рыб. Адипонектиновые рецепторы AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3 имеют семь трансмембранных доменов и обратную топологию N- и C- концов на мембране в сравнении с GPCRs. В отношении мембранных рецепторов прогестерона последние данные показывают, что mPRs имеют ту же внутриклеточную ориентацию N-концов, что и другие члены семейства PAQR (AdipoR1, AdipoR2, AdipoR3). А вот C-концы этих белков внутриклеточные, как у GPCRs, поскольку они имеют дополнительный восьмой трансмембранный домен. Схематические структуры всех пяти подвидов mPRs, как они представляются на данный момент, приведены в обзоре 2023 г. [8]. Однако нужны еще экспериментальные доказательства, полученные с помощью крио-ЭМ или рентгеновского анализа кристаллизованных белков mPR, для подтверждения их мембранной топологии. Для mPRα сайт-направленный мутагенез позволяет предполагать, что внутриклеточная C-концевая область этого рецептора участвует в связывании и активации G-белка [7]. Однако есть примеры, демонстрирующие, что не всегда действие прогестина через mPRs опосредовано G-белками. При использовании репортерной системы анализа с рекомбинантной экспрессией mPRs в клетках дрожжей, не содержащих G-белков, было показано, что прогестины активируют сигнализацию mPRs. Это предполагает, что G-белки не требуются для передачи сигнала mPRs в дрожжевой модели [9]. Также в ряде клеток, таких как нейрональные клетки PC12 и клетки рака яичников, активация mPRs не приводила к изменению уровня цАМФ. Но в данном случае сигнал может передаваться βγ-субъединицами G-белков, их участие на этом основании исключить нельзя. Взаимодействие mPRs с прогестинами во многих клетках позвоночных активирует сигнальные пути фосфатидилинозитол-3-киназы (Pi3k)/серин-треонинкиназы (Akt) и митоген-активируемых протеинкиназ (MAPkinase) через сигнализацию βγ-субъединиц G-белков. Множественные сигнальные каскады опосредуют эффекты прогестерона через активацию G-белков, зависящую от mPRs, часто в одних и тех же клетках позвоночных, включая пути аденилатциклазы/цАМФ/PKA, Pi3k/Akt, MAPkinase/ERK1/2/фосфодиэстеразы (PDE) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Кроме того, были идентифицированы внутриклеточные медиаторы сигнализации mPRs – белки JNK, mTOR, NFκB, Snail и CREB [7].

Обычно mPRs обнаруживаются на плазматической мембране клетки, их также выявляют в эндоплазматическом ретикулуме, поскольку это – место синтеза, сворачивания и хранения мембранных белков. После действия лиганда представленность mPRs на клеточной мембране снижается, поскольку они подвергаются быстрой клатрин-зависимой интернализации (эндоцитозу), за которой следует постепенное восстановление их уровня на поверхности клетки. [7]. Процесс экспорта рецепторов на мембрану жест-

ко регулируется взаимодействием с несколькими регуляторными белками с функциями шаперонов, аксессуарных белков и белков, модифицирующих активность рецептора. Адаптерные белки, один из типов вспомогательных белков, обычно связываются с мембранными рецепторами через фосфотирозинсвязывающий домен и часто регулируют их сигнальные пути. В настоящий момент появились доказательства того, что APPL1, VLDL-рецептор и PGRMC1 действуют как адаптерные и шаперонные белки для mPRs, хотя подробности молекулярных механизмов их действия пока отсутствуют [10–12].

Мембранный компонент рецептора прогестерона 1 (PGRMC1) является членом особого подсемейства белков, содержащих домен цитохрома b5 (Cytb5), и называемого семейством мембранно-ассоциированных прогестероновых рецепторов (MAPR). PGRMC1 имеет много различных функций, включая действие в качестве адаптера и шаперона. Это связывающий гем белок, который участвует в широком спектре функций клеток и тканей, включая активность цитохромов P450, гомеостаз гема, канцерогенез, женскую репродукцию и контроль качества белка [13]. Он взаимодействует с многочисленными белками: P-450, Scap, Insig, EGFR, PAIRBP1, рецептором инсулина, что приводит к их перемещению или стабилизации; участвует в регуляции синтеза и транспорта гема, в транспорте холестерина и синтезе из него прегненолона и прогестерона, выполняет важную роль в регуляции энергетического метаболизма [14]. Методами коиммунопреципитации и анализа лигирования для выявления белок-белковых взаимодействий получены доказательства, что PGRMC1 также действует как адаптер или шаперонный белок для mPR α . Это показано на клетках рака молочной железы MDA-MB-231, на человеческих гранулезных/лютеиновых клетках, в ооцитах данио-рерио [12, 15–17]. Результаты ряда работ показывают, что PGRMC1 образует рецепторный комплекс с mPR α , который необходим для локализации mPR α на клеточной мембране и mPR α -зависимой сигнализации в различных моделях клеток позвоночных. Однако молекулярные механизмы, регулирующие взаимодействия между mPR α и PGRMC1, остаются неясными.

Есть данные о взаимовлиянии разных типов рецепторов прогестерона. Так, активация mPRs усиливает действие PR-B в поддержании миометрия в состоянии покоя на ранних сроках беременности, а в конце беременности способствует функциональной отмене действия прогестерона, позволяя миометрию сокращаться [18].

Изучение эффектов селективного лиганда mPR α

10-этил-19-норпрогестерона (Org OD 02-0)

До 2017 г. из мировой научной литературы были известны два соединения, считающиеся селективными лигандами mPR α . Они были выявлены в 2010 г. в единственной работе, посвященной поиску избирательно взаимодействующих с mPR α стероидов [19]. В этой работе использовался эмпирический подход идентификации таких соединений, заключающийся в зондировании лиганд-связывающего кармана mPR α путем конкурентного связывания различных по структуре синтезированных стероидов с дополнительными заместителями в разных положениях углеродного скелета молекулы. Большинство использованных стероидов имело очень низкое сродство к mPR α . 10-этил-19-норпрогестерон (Org OD 02-0) и 19а-метилпрогестерон (Org OD 13-0) имели высокое или сходное с прогестероном сродство к mPR α , но оба стероида связывались с nPR в цитозольной фракции MCF-7 линии клеток молочной железы человека с относительной конкурентной активностью (ОКА) 12.9% и 2.3% от активности прогестерона соответственно. Org OD 13-0 практически не использовался в дальнейших работах, его эффекты неизвестны. Org OD 02-0, наоборот, очень активно применяется в научных исследованиях для выявления участия mPRs в действии прогестинов (табл. 1). Сродство этого стероида к nPR может быть достаточным для активации ядерных рецепторов, поэтому в работе, где это соединение исследовалось, была сделана про-

верка, как оно действует на транскрипционную активность ядерного рецептора В, экспрессированного в MCF-7 наряду с репортерной системой анализа активности nPR. В качестве репортерной системы использовалась векторная конструкция с геном люциферазы под MMTV – промотором, являющимся гормончувствительным элементом (ГЧЭ) для nPR. Было показано, что в данной системе Org OD 02-0 не являлся агонистом PR-B, поскольку не стимулировал его транскрипционную активность [19]. Отсюда был сделан вывод, что это соединение можно считать селективным лигандом mPR α . Однако изучение агонистической активности с одним вариантом ГЧЭ и в одном типе клеток не является гарантией, что такая активность не выявится на других объектах. Известно многообразие действия стероидных гормонов при разных концентрациях в клетках с различным фенотипом. К тому же в этих экспериментах проверялась активность одной изоформы nPR-B, транскрипционная активность nPR-A не изучалась в присутствии Org OD 02-0. Изоформа nPR-B является более мощным активатором транскрипции, однако другая изоформа также обладает собственной транскрипционной активностью. В клетках опухоли молочной железы T47D-YA с изоформой nPR-A и T47D-YB с изоформой nPR-B было показано, что только 25 генов, регулируемых прогестероном, были общими для обеих изоформ рецептора, 229 регулировались только nPR-B, а 83 – только nPR-A [20]. Проверялась и антагонистическая активность Org OD 02-0 в вышеупомянутой системе. Показано, что она хоть и недостоверно, но снижает транскрипционную активность nPR-B, индуцированную прогестероном [19]. Поэтому главным недостатком этого соединения является его довольно высокая относительная конкурентная активность (12.9%) по отношению к прогестерону за связывание с nPR. Org OD 02-0 используется в работах в качестве селективного лиганда mPR α , но есть вероятность, что это соединение влияет на транскрипционную активность ядерных рецепторов. И такие факты уже появились в литературе, о чем будет сказано ниже.

Изучение связывающей активности Org OD 02-0 было проведено сначала только с mPR α и nPR человека. Но в дальнейшем было показано, что этот стероид связывается с mPR δ и mPR ϵ [21], а также с mPR других видов животных, оказывает эффекты в тканях, где уровень mPR α низок, а содержание mPR β , наоборот, очень высоко [22]. Поэтому делается предположение, что Org OD 02-0 является лигандом mPRs разных подтипов мембранных рецепторов. Однако в литературе чаще всего традиционно это соединение упоминается как селективный лиганд mPR α .

Стероид Org OD 02-0 использовался для доказательства участия mPR α в многообразных процессах в целом ряде работ. В линии BeWo плацентарных клеток, происходящей из хориокарциномы человека, изучался механизм преждевременных родов, связанный с повышенным уровнем воспалительных цитокинов. Использование специфического агониста Org OD 02-0 позволило получить доказательства того, что активация mPR α ингибирует эффекты цитокина IL-1 β , предиктора преждевременных родов. Изменялась экспрессия генов mPRs и других рецепторов прогестерона в плацентах человека с недоношенными плодами в сравнении с нормой, указывая на важность соотношения различных типов рецепторов в этих процессах [23].

Изучалась стимуляция подвижности сперматозоидов прогестинами у костистых рыб – атлантических горбылей (*Micropogonias undulatus*) и южной камбалы (*Paralichthys lethostigma*). Гиперподвижность инициировалась посредством mPR α и включала активацию пути Pi3k/Akt и повышение уровня активности фосфодиэстеразы. Специфический агонист mPR α 10-этил-19-норпрогестерон (Org OD 02-0) имитировал стимулирующее действие эндогенного прогестина этих видов, 17,20- β , 21-тригидрокси-4-прегнен-3-она (20 β -S) влиял на подвижность сперматозоидов [24]. Также в опосредованной mPR α стимуляции прогестинами 20 β -S и Org OD 02-0 гиперподвижности сперматозоидов активировался через путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR и ErbB2) и MAPK (MEK1/2, Erk1/2) [25]. Обработка сперматозоидов 20 β -S или Org OD 02-0 приводила к повышению уровня цАМФ через mPR α ,

сопряженных в этих клетках со стимулирующими G-белками (Golf), активирующими мембранную аденилатциклазу [26]. Таким образом, повышение фертильности у костистых рыб, связанное с быстрой индукцией прогестином 20 β -S гиперподвижности сперматозоидов, опосредуют три сигнальных каскада – мембранной аденилатциклазы/цАМФ, рецептора эпидермального фактора роста EGFR/ Erk и Pi3k/Akt/фосфодиэстеразы, приводящие к повышению содержания кальция в течение 10 с. С использованием специфического агониста mPR α , Org OD 02-0, были получены доказательства того, что действие прогестина опосредуется mPR α в сочетании со стимулирующим G-белком (Golf) [27].

В данном случае nPR как транскрипционные факторы не могут принимать участие в процессе активации сперматозоидов из-за отсутствия в них рибосом, плотной упаковки ДНК и быстрого развития процесса. Поэтому Org OD 02-0 в этих клетках может действовать только через взаимодействие с mPRs.

Прогестерон оказывает благотворное влияние на сердечно-сосудистую систему человека, вызывая быстрое увеличение продукции оксида азота (NO) в эндотелиальных клетках сосудов. Прогестерон и Org OD 02-0 связывались с мембранной фракцией эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) с характеристиками, присущими mPRs, тогда как агонисты nPR промгестон (R5020) и медроксипрогестерон ацетат продемонстрировали низкую аффинность связывания. Иммуноцитохимический и вестерн-блот-анализ подтвердили, что mPRs экспрессируются на плазматических мембранах в HUVEC. Под действием прогестерона и Org OD 02-0 повышались уровень NO, активность эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и фосфорилирование eNOS. Агонист nPR R5020 не оказывал такого эффекта. Нокдаун экспрессии mPR, но не nPR, блокировал эти процессы. Использование ингибиторов показало участие киназных путей PI3K/Akt и ERK в действии прогестерона на продукцию NO и фосфорилирование eNOS [28]. Показано расслабляющее действие прогестерона непосредственно на гладкомышечные клетки сосудов посредством активации mPR α . Прогестерон и селективный агонист mPR Org OD-02-0, но не агонист nPR R5020, вызывали быстрое снижение концентраций Ca²⁺ в цитозоле и индукцию мышечной релаксации. Это действие прогестерона включало поглощение Ca²⁺ сарко/эндоплазматическим ретикуломом (SR) и увеличение активности Ca²⁺-АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA). Обработка культивируемых гладкомышечных клеток пупочной артерии человека прогестероном и Org OD 02-0, но не с R5020, увеличивала фосфорилирование фосфоламбана, что приводило к растормаживанию SERCA. Быстрый эффект прогестерона и Org OD-02-0 на внутриклеточный уровень Ca²⁺ и релаксацию гладкомышечных клеток сосудов посредством активации mPR α осуществлялся через регуляцию функций SERCA2 и фосфоламбана сигнальными путями, включающими Gi, MAP-киназы и Akt/Pi3k и подавление активности RhoA, фосфорилирование ROCK, то есть ингибирование передачи сигналов RhoA/ROCK [29, 30].

В этих работах очень убедительно доказано с применением селективных агонистов и нокдауна гена с помощью siRNA, что прогестерон стимулирует выработку NO в эндотелии HUVECs и оказывает расслабляющее действие на гладкомышечные клетки сосудов посредством взаимодействия именно с mPR α , сопряженного здесь с ингибиторными G-белками, активируя передачу сигналов через каскады Pi3k/Akt и MAPK.

Прогестерон подавляет активацию Т-клеток человека во время беременности. Приток Ca²⁺ является важным сигналом для пролиферации Т-клеток после активации их фитогемагглютинином (ФГА). Было показано, что прогестерон воздействовал на клеточную мембрану Т-клеток, вызывая быстрые реакции, включая повышение внутриклеточной концентрации свободного кальция Ca²⁺. При этом он подавлял пролиферацию Т-клеток, активируемую ФГА. Интересно, что и ФГА, и прогестерон индуцируют повышение Ca²⁺, но прогестерон и агонист nPR R5020 дозозависимо подавляли индуцированный ФГА приток Ca²⁺, это приводило к иммуносупрессии Т-клеток, ингибиро-

ванию их пролиферации, активируемому ФГА. Аналогичный дозозависимый эффект подавления клеточного притока Ca^{2+} и пролиферации происходили при использовании ингибитора канала TRPC и селективного канала TRPC3. Аналог прогестерона Org OD 02-0 также вызывал дозозависимое подавление притока Ca^{2+} , но не влиял на пролиферацию. Делается предположение, что прогестерон и R5020 способны быстро снижать стимулированный ФГА устойчивый приток Ca^{2+} , вероятно, за счет блокады каналов TRPC3, что подавляет пролиферацию Т-клеток [31]. Посредником в действии прогестерона и его аналогов (R5020/Org OD 02-0) на подавление притока Ca^{2+} в покоящиеся Т-клетки является сРКСβII, которая активируется негеномным мембранным путем и вызывает иммуносупрессию [32]. Данные, полученные в этом исследовании, трудно интерпретировать, особенно если учитывать, что в Т-клетках человека никто не выявил mPR, но только mPRs [33, 34]. Авторы работы предполагают, что какую-то роль в действии прогестерона и R5020 играет мембранный компонент рецептора прогестерона PGRMC1. Но функции этого белка столь обширны, а связывать он может самые разные соединения, в том числе стероидные, поэтому механизмы выявленных эффектов в Т-клетках требуют дальнейшего изучения.

Прогестины участвуют в модуляции физиологических процессов в шванновских клетках, основных нейроглиальных клетках периферической нервной системы. Исследовалось возможное участие mPRs в нейропротекторных эффектах прогестинов в иммортализованных шванновских клетках S42. Все пять подтипов mPRs и PGRMC1 были обнаружены в этих клетках на клеточной мембране. Прогестерон и mPR-специфичный агонист Org-OD-02-0 связывались с этими мембранами, что указывает на функциональность обнаруженных mPRs. Org-OD-02-0 быстро увеличивал миграцию клеток в экспериментах *in vitro*, указывая на возможную роль mPRs в процессе регенерации нервов. Действие Org-OD-02-0 было опосредовано активацией ингибирующего G-белка и снижением внутриклеточного уровня цАМФ. Долгосрочная активация mPRs приводила к увеличению уровня экспрессии миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG). В совокупности эти результаты показали, что mPRs присутствуют и активны в шванновских клетках, модулируя их физиологические процессы [35]. В первичной культуре шванновских клеток крысы был обнаружен другой паттерн экспрессии mPRs. Подтипы mPRα (PAQR7) и β (PAQR8) были основными идентифицированными вариантами mPRs, причем различной субклеточной локализации. Активация ядерного рецептора прогестерона его специфическим агонистом R5020 стимулировала экспрессию mPRs, а активация mPRs специфическим агонистом Org OD 02-0 изменяла их субклеточную локализацию, приводила к активации Akt, но не ERK1/2, а также к снижению экспрессии миелин-ассоциированного гликопротеина (MAG), морфологическим изменениям, изменениям экспрессии нескольких маркеров дифференцировки шванновских клеток и увеличению миграции и пролиферации этих клеток [36]. Таким образом, в первичной культуре шванновских клеток крысы и в иммортализованных шванновских клетках S42 наблюдалось противоположное действие Org OD 02-0 на экспрессию миелин-ассоциированного гликопротеина – MAG, авторы объясняют это разным уровнем экспрессии mPRδ и разными сроками действия в клетках. Высказано предположение, что долгосрочный эффект вызывает падение экспрессии MAG, в то время как краткосрочный эффект приводит к ее увеличению, вызванному главным образом снижением уровня цАМФ [36]. Теми же авторами исследовалась роль mPRs в стволовых клетках (ASC) жировой ткани человека, дифференцированных в клетки, подобные шванновским клеткам (SCL-ASC). В исследовании показано, что mPRs присутствовали как в недифференцированных, так и в дифференцированных ASC. Активация mPRα способствовала миграции и дифференцировке клеток SCL-ASC, увеличению экспрессии и секреции BDNF, нейротрофина с прорегенеративной активностью. Анализ показал участие сигнальных путей Src и Pi3k-Akt при активации mPRα в SCL-ASC клетках. Эти результаты позволили предположить, что mPRα может играть положительную роль в регенерации

периферических нервов [37, 38]. Действительно, активация mPR α с помощью Org OD 02-0 в клетках SCL-ASC повлияла на регенеративные параметры в двух линиях нейрональных клеток – IMR-32 и SH-SY-5Y, усиливая рост нейритов, защищая от гибели и увеличивая экспрессию маркеров регенерации периферических нервов (CREB3, ATF3, GAP43). Инкубационная клеточная среда от необработанных Org OD 02-0 клеток SCL-ASC действовала значительно слабее. Добавление Org OD 02-0 к такой инкубационной среде влияло на гибель нейрональных клеток, но не на рост нейритов. Следовательно, влияние Org OD 02-0 на рост нейритов зависит от клеток SCL-ASC, из которых высвобождается BDNF и IGF-2. А его влияние на выживаемость нейрональных клеток обусловлено прямой активацией mPR на самих нейрональных клетках. Трансфекция SCL-ASC с помощью siRNA mPR α показала, что именно этот рецептор отвечает за благотворное влияние на рост нейритов. Этот же факт подтвердился в экспериментах с совместным культивированием SCL-ASC и SH-SY-5Y клеток [39]. В исследовании 2023 г. тех же авторов изучалась предполагаемая нейропротекторная роль mPR α на нейрональных клетках SH-SY-5Y с использованием двух известных фармакологических клеточных моделей болезни Паркинсона. Применение химических веществ, обычно используемых на клеточных культурах для имитации повреждения при этом заболевании, 6-гидроксидофамина (6-OHDA) и активного MPTP метаболита 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP $^{+}$), вызывало гибель клеток. Прогестерон и специфический агонист mPR Org OD 02-0 были эффективны в снижении гибели клеток SH-SY5Y, вызванной 6-OHDA и MPP $^{+}$, тогда как агонист nPR промгестон (R5020) и агонист рецептора GABA $_A$ мусцимол оказались неэффективными. Эксперименты, проведенные с нокдауном генов и селективными фармакологическими агонистами, показали, что mPR α является рецептором, ответственным за наблюдаемые нейропротекторные эффекты, запускающие сигнальные пути Pi3k-Akt и ERK в клетках SH-SY5Y. Авторы предполагают, что mPR α может играть нейропротекторную роль при патологии болезни Паркинсона [40]. Во всяком случае *in vitro* его участие убедительно доказано.

Функции прогестерона в миометрии хорошо известны, но негеномные эффекты при сокращениях миометрия беременных изучены слабо. Поэтому было проведено исследование негеномных эффектов прогестерона во время беременности с использованием полосок миометрия, полученных от небеременных, беременных крыс и крыс после родов. Прогестерон не вызывал ритмических сокращений в миометрии небеременных, но индуцировал ритмичные сокращения миометрия беременных с пиком эффекта на 21-й день беременности. Однако сокращения миометрия уменьшались после родов и снижались до уровня небеременных через 7 дней после родов. Кроме того, прогестерон стабильно ингибировал сильные сокращения миометрия, вызванные KCl, во время беременности. Актиномицин D и циклогексимид не влияли на сократительные эффекты прогестерона, а Org OD 02-0 эффективно их имитировал. Было выявлено значительное увеличение экспрессии гена mPR β во время беременности, а уровни экспрессии mPR α , mPR γ , mPR δ и mPR ϵ оставались неизменными. Авторы работы сделали вывод, что стимулирующий негеномный эффект прогестерона во время беременности на сократительную активность миометрия был индуцибельным, зависел от mPR β и мог участвовать в процессе родов. Ингибиторный эффект прогестерона был конститутивным, зависел от других mPRs и мог участвовать в поддержании беременности [41]. Прямых доказательств действия Org OD 02-0 на сократительную активность миометрия беременных через mPR β в данной работе не приводится.

Изучение роли mPR с использованием Org OD 02-0 проводилось в опухолевых тканях. В двух клеточных линиях рака молочной железы SKBR3 и MDA-MB-468, в клетках которых не выявляются nPR, но обнаружены подтипы mPR α , mPR β и mPR γ , исследовали эффекты прогестерона и Org OD 02-0 в сравнении с действием тестостерона, 17 β -эстрадиола, дексаметазона и агониста и антагониста nPR (R5020 и RU486). Только прогестерон и Org OD 02-0 в этих клеточных линиях значительно уменьшали

гибель клеток и апоптоз в ответ на исключение из среды инкубации сыворотки. При этом происходила быстрая активация ингибирующего G-белка, а также активация киназы p42/44 MAP (ERK 1/2). Повышалась активность Akt под действием прогестерона в этих клетках, а снижения активности каспазы 3 не наблюдалось. Таким образом, показано, что прогестерон может действовать через mPR, ингибируя апоптоз в клетках рака молочной железы [42]. Поскольку в изучаемых клетках нет nPR, действие Org OD 02-0 через мембранные рецепторы в данном случае не вызывает сомнения.

Прогестерон способствует прогрессированию глиобластомы, наиболее частой и агрессивной опухоли головного мозга из-за ее высокой способности к миграции и проникновению в нормальную ткань мозга. Прогестерон стимулирует пролиферацию, миграцию и клеточную инвазию за счет активации nPR. Однако использование антагониста nPR RU486 только частично блокировало эффекты прогестерона. Поэтому были проведены исследования влияния активации mPR α на пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиобластомы человека. Клеточные линии глиобластомы человека U87 и U251 были обработаны специфическим агонистом mPR α .

Org OD 02-0 увеличивал количество клеток U87 и U251 за счет усиления их пролиферации, также увеличивал миграцию и инвазию клеток U87 и U251. Распространение и инвазия клеток U87 уменьшались, когда экспрессия mPR α подавлялась. Org OD 02-0 увеличивал фосфорилирование киназ Src и Akt в обеих клеточных линиях. Эти данные показывают, что прогестерон оказывает свое влияние на прогрессирование глиобластомы человека не только за счет взаимодействия с nPR, но также через клеточные сигнальные пути, активируемые mPR α [43]. Однако учитывая возможность действия Org OD 02-0 как агониста nPR, участие mPR α в исследуемых процессах в клетках U251 глиобластомы не может считаться доказанным.

Экспрессия mPR α была выявлена у пациентов с аденокарциномой легких и влияла на эффективность лечения EGFR-тирозинкиназным ингибитором EGFR-TKI. Прогестерон или его производное Org OD 02-0, действуя через mPR α , усиливали функцию EGFR-TKI по подавлению пролиферации, миграции и инвазии клеток аденокарциномы легких *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, активация mPR α запускала каскад, ингибирующий EGFR-Src-ERK1/2 путь, тем самым способствуя противоопухолевому эффекту [44]. Те же авторы показали, что mPR α опосредует способность прогестерона ингибировать рост клеток аденокарциномы легких, приводя следующие доказательства: mPR α экспрессировался в клетках аденокарциномы легких A549 и PC-9 и локализовался на клеточной мембране; прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали пролиферацию клеток аденокарциномы легких; с помощью нокдауна экспрессии mPR α показано участие этого рецептора в действии прогестерона и Org OD 02-0 на ингибирование пролиферации клеток аденокарциномы легких; mPR α опосредовал способность прогестерона и Org OD 02-0 ингибировать PKA/CREB и PKA/ β -катенин сигнальные пути; прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали рост опухоли аденокарциномы легкого в модели ксенотрансплантатной опухоли у мышей *in vivo* [45]. Вводимые мышам клетки A549 не содержали nPR, но в них искусственно экспрессировали mPR α . Поэтому Org OD 02-0, как, впрочем, и сам прогестерон, мог действовать только через этот рецептор и осуществлял при этом противоопухолевый эффект.

Работ с использованием Org OD 02-0 *in vivo* немного. Одна из них касается изучения действия прогестерона и агониста mPR α в моделях пролактиномы. Предварительно были изучены функции mPRs в гипофизе. Экспрессия mPR α была самой высокой среди mPRs в передней доле гипофиза крыс. Иммуноокрашивание mPR α было обнаружено в соматотрофах, гонадотрофах и лактотрофах. 63% mPR α -положительных клеток в гипофизе были лактотрофами, это позволило предположить, что mPR α участвует в контроле секреции пролактина (ПРЛ). Для проверки гипотезы гипофизы крыс инкубировали либо с прогестероном, либо со специфическим агонистом mPR α Org OD 02-0, измеряя затем секрецию ПРЛ. Как прогестерон, так и Org OD 02-0 снижали се-

крецию ПРЛ. На клеточной линии GH3, полученной из опухоли гипофиза крысы, было показано, что прогестерон и Org OD 02-0 ингибировали высвобождение ПРЛ, а агонист mPR R5020 был неэффективен. Исследование клеточных механизмов активности mPR α показало, что прогестерон и Org OD 02-0 уменьшали накопление цАМФ, тогда как R5020 не оказывал такого эффекта. Высвобождение ПРЛ блокировалось предварительной обработкой коклюшным токсином, ингибитором белков Go/Gi. TGF β 1 является мощным ингибитором секреции пролактина в лактотрофах. Прогестерон и Org OD 02-0, но не R5020, повышали уровень активированного TGF β 1. Этот эффект не наблюдался при трансфекции клеток mPR α -siRNA. Получены доказательства того, что mPR α опосредует ингибирующее действие прогестерона на секрецию ПРЛ посредством снижения уровня цАМФ и активации TGF β 1 в популяции лактотрофов [46]. Затем изучалась роль mPRs в развитии пролактиномы *in vivo*. С этой целью экспрессию mPRs в гипофизе изучали в трех животных моделях пролактиномы: а) трансгенные мыши с дефицитом дофаминового рецептора D2; б) трансгенные мыши со сверхэкспрессией β -субъединицы хорионического гонадотропина человека (hCG β); в) крысы, получающие эстрогены. Экспрессия mPRs и nPR была значительно снижена в опухолях гипофиза по сравнению с нормой. Однако относительная доля mPR α и mPR β была значительно выше в пролактиномах. Селективный агонист mPR Org OD 02-0 значительно ингибировал высвобождение ПРЛ как в нормальных, так и в опухолевых эксплантатах гипофиза, проявляя более выраженный эффект в опухолевых тканях. Поскольку прогестерон также регулирует секрецию ПРЛ, косвенно воздействуя на дофаминергические нейроны, было изучено участие mPRs в этом эффекте. Обнаружено, что гипоталамус имеет высокую экспрессию mPRs. Как прогестерон, так и Org OD 02-0 увеличивали высвобождение дофамина в эксплантатах гипоталамуса. В условиях *in vivo*, которое обеспечивает действие как на гипофиз, так и на гипоталамус, агонист mPR Org OD 02-0 значительно подавлял гиперпролактинемия у трансгенных самок мышей с пролактиномой. Однократное введение этого соединения значительно снижало уровень пролактина в сыворотке. Были обнаружены гендерные различия в содержании рецепторов: у самцов экспрессировались более высокие уровни гипофизарного mPR α/β , и у них в этих моделях мышей не развивается пролактинома. Результаты позволили предположить, что активация mPRs может представлять собой новый инструмент для лечения пациентов с гиперпролактинемией, особенно для тех, которые обладают устойчивостью к дофаминергическим препаратам [47]. Однако в экспериментах *in vivo* нельзя исключить, что Org OD 02-0 действует в том числе и через nPR.

Еще одна работа была посвящена изучению эффектов Org OD 02-0 *in vivo*. Однократное введение прогестерона увеличивало частоту апноэ у новорожденных крыс, тогда как финастерид (который блокирует превращение прогестерона в аллопрегнанолон, являясь антагонистом 5 α -редуктазы) снижал частоту апноэ. Нейроактивный метаболит прогестерона аллопрегнанолон является модулятором рецепторов GABA $_A$. Агонист nPR R5020 снижал частоту апноэ у самцов, а агонист mPR Org OD 02-0 уменьшал частоту апноэ и у самцов, и у самок и уменьшал частоту дыхания у самок. При хроническом введении прогестерон снижал частоту апноэ более эффективно у самцов, чем у самок. Сделан вывод, что частота апноэ у новорожденных крыс частично определяется половыми особенностями, балансом между прогестероном и аллопрегнанолоном, GABA $_A$ -рецепторами и рецепторами прогестерона [48]. В данном случае прогестерон действует на частоту апноэ через оба типа рецепторов. Половые различия могут быть результатом разного уровня nPR и mPRs у самок и самцов в дорсальной части ствола мозга. Возможная активация ядерных рецепторов Org OD 02-0 в этом процессе не играет роли.

Наконец, *in vivo* изучалось действие Org OD 02-0 у рыб. Прогестины вызывают процесс созревания и овуляции ооцитов рыб посредством координации негеномных и геномных действий. Был изучен эффект Org OD 02-0, селективного агониста mPR α , на созревание ооцитов рыб и овуляцию *in vitro* и *in vivo*. Org OD 02-0 запускал созре-

вание ооцитов *in vitro* и *in vivo*. Удивительно, но Org OD 02 вызывал также овуляцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Яйцеклетки после овуляции, вызванной Org OD 02, можно было оплодотворить искусственным осеменением. Молодняк развивался нормально. Эти результаты показали, что Org OD 02-0 действовал как агонист не только mPR α , но и ядерного рецептора прогестерона (nPR) [49]. Таким образом, эти результаты свидетельствуют, что Org OD 02 может активировать nPR в физиологических условиях.

Рассмотренные работы показали, что Org OD 02 через mPR α и mPRs других подтипов [22, 41] активировал как ингибиторные Gi, так и стимулирующие Golf белки, запускающие сигнальные каскады Pi3k/Akt, EGFR/ERK, RhoA/ROCK, cPKC β II, Src, TGF β 1 или вызывая ингибирование EGFR- Src-ERK1/2, PKA/CREB и PKA/ β -катенин сигнальных путей. При этом происходили разнонаправленные изменения в клетках в зависимости от их фенотипа: повышение содержания Ca²⁺ в сперматозоидах и повышение их активности, снижение концентрации Ca²⁺ в цитозоле гладкомышечных клеток сосудов и их релаксация, индукция ритмичных сокращений миометрия беременных крыс, подавление притока Ca²⁺ в Т-клетки. В клетках рака молочной железы и глиобластомы Org OD 02 вызывал ингибирование апоптоза, активацию пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток, но ингибировал рост опухоли аденокарциномы легкого (табл. 2).

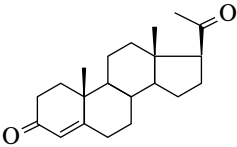
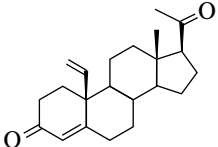
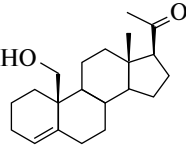
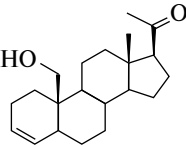
Изучение эффектов селективных лигандов mPRs

19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02)

Поскольку отсутствуют данные о трехмерной структуре mPR, необходимые для моделирования их специфических лигандов, в нашей работе было проведено зондирование лиганд-связывающего кармана mPR α человека, гетерологично экспрессируемого в дрожжевых клетках, с использованием прегнановых стероидов, несущих дополнительное шестичленное кольцо D' [50, 51], ряда производных прогестерона и некоторых природных стероидов с последовательно меняющимися фрагментами структуры стероидного скелета [52]. Для этого был проведен радиолигандный анализ по измерению связывания [³H]-прогестерона в отсутствие и в присутствии возрастающих концентраций немеченных конкурентов с мембранной фракцией дрожжей. Большинство использованных стероидов имело очень низкое сродство к mPR α , хотя среди них были соединения с высокой константой взаимодействия с nPR. На основании анализа нашей работы и работы зарубежных исследователей, о которой говорилось ранее [19], был выявлен ряд структурных детерминант, определяющих избирательность связывания полученных соединений с mPRs по сравнению с ядерными рецепторами. Были синтезированы новые аналоги прогестерона, взаимодействие которых с mPRs было изучено радиолигандным методом в клетках человека с высоким уровнем их экспрессии и отсутствием nPR. В этой работе впервые была исследована роль 3-кетона во взаимодействии с мембранными рецепторами прогестерона. Обнаружилось, что для mPRs в отличие от nPR эта группировка не имеет определяющего значения для связывания. В работе 2017 г. среди вновь синтезированных производных прогестерона были выявлены два соединения, являющиеся 3-дезоксистероидами. Это 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он (LS-02), которые связывались с mPRs, но не взаимодействовали с nPR (табл. 1) [53]. Относительная конкурентная активность (ОКА) этих стероидов составляла 10% и 24% от ОКА прогестерона для mPRs соответственно, и 0,2–0,3% для nPR. Индекс дискриминации mPR / nPR этих соединений был 50 и 80, что значительно выше индекса Org OD 02-0, равного 20. В модельной дрожжевой системе с экспрессионной и репортерной плазмидой, несущей ген ядерного рецептора прогестерона В человека и репортерный ген β -галактозидазы, была изучена агонистическая и антагонистическая активность этих соединений [54]. Транскрипционная активность рецептора оценивалась по экспрессии репортерного гена β -галактозидазы под промотором цитохрома С, содержащего пять гормон-чувст-

вительных элементов (HREs), активируемых лиганд-рецепторным комплексом. Для определения агонистической активности соединений изучалась транскрипционная активность pPR-B при добавлении серийных разведений изучаемых стероидов. Для тестирования антагонистической или ингибирующей активности соединений дрожжевые клетки инкубировали сначала с прогестероном в такой минимальной концентрации, которая дает максимальную экспрессию гена-репортера. Затем добавляли серийные разведения тестируемых на антагонистическую активность соединений. Было показано, что LS-01 и LS-02 не обладают ни агонистической, ни антагонистической активностью в отношении pPR-B [54]. Таким образом, данные стероиды можно считать селективными лигандами mPRs. В дальнейшей работе оказалось, что несмотря на относительно низкое сродство, эти соединения оказывают эффекты в клетках, где изучалось их действие. Следует отметить, что, в отличие от самого прогестерона и большинства его производных, выявленные нами селективные лиганды не связываются не только с pPR, но и с ядерными рецепторами других стероидов, поскольку лишены необходимой для такого взаимодействия кето/гидроксигруппы в третьем положении кольца А [55, 56]. Анализ полученных позднее данных позволяет предположить, что использованный в 19-м положении заместитель, по-видимому, оказался неудачным и препятствует взаимодействию LS-01 и LS-02 с mPRs.

Таблица 1. Строение стероидов

Структура соединения	Название	nPR RBA, %	mPR α RBA, %	Индекс дискриминации mPR α / nPR
	прогестерон	100	100	1.0
	10-этил-19-норпрогестерон Org OD 02-0	12.9	257.7	20
	19-гидроксипрегн-4-ен-20-он LS-01	0.2	10.3	52
	19-гидрокс-5 β -прегн-3-ен-20-он LS-02	0.3	23.9	80

Примечание. RBA – относительное сродство связывания стероидных лигандов к nPR и mPRs; индекс дискриминации – предпочтительность mPR α / nPR по сравнению с прогестероном.

Действие селективных лигандов LS-01 и LS-02 на экспрессию цитокинов про- и противовоспалительного действия изучалось в активированных иммунных клетках человека. Были использованы Т-лимфоциты линии Jurkat, моноциты линии THP-1 и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека. В работе была исследована экспрессия mPRs и pPRs в изучаемых клетках. Только в моноцитах THP-1 была выявлена мПНК pPRs наряду с очень высоким уровнем мПНК mPR β . В Т-лимфоцитах и в PBMC обнаружена только экспрессия mPR α , mPR β , а мПНК pPRs отсутствовала. Селективные лиганды действовали односторонне с прогестероном во всех клетках. В PBMC под действием этих стероидов повышался уровень мПНК и секретируемого белка провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6, мПНК INF γ , понижался – мПНК IL-2, повышался уровень мПНК противовоспалительного цитокина TGF β , понижался – мПНК IL-4 и секретируемого белка IL-10. В моноцитах, как в PBMC, повышалась экспрессия IL-1 β , TNF α , но экспрессия IL-10 также повышалась, а TGF β достоверно не менялась. В Т-лимфоцитах Jurkat понижалась экспрессия IL-2 и TNF α , повышалась IL-10, а TGF β не менялась. Таким образом, прогестины действуют на иммунные клетки через mPRs и оказывают как про-, так и противовоспалительные эффекты в зависимости от фенотипа этих клеток. В различных типах иммунных клеток три изучаемых соединения действовали между собой одинаково, но оказывали разные, иногда даже противоположные эффекты. Селективные лиганды mPRs перспективны как иммуномодуляторные прогестины, не оказывающие побочного действия на ткани и органы, клетки которых экспрессируют ядерные рецепторы стероидных гормонов [34].

Далее действие LS-01 и LS-02 было изучено в клетках аденокарциномы поджелудочной железы человека ВхРС3, содержащей высокий уровень mPR α и mPR γ . Ядерные рецепторы не были обнаружены в этих клетках. Здесь эффекты селективных лигандов существенно отличались между собой. Прогестерон и соединение LS-01 действовали одинаково практически на все исследуемые процессы пролиферации и гибели клеток. Соединение LS-02 оказывало собственные эффекты, отличающиеся от действия двух других изучаемых стероидов [57]. В работе изучалось влияние стероидов на жизнеспособность клеток, на различные проявления апоптотических процессов, на экспрессию генов факторов, связанных с этими процессами, а также участие двух киназ – p38 MAPK и JNK в сигнальных каскадах при активации mPRs с использованием их ингибиторов SB203580 и SP600125. Действие первого ингибитора парадоксальным образом усиливало в ряде случаев эффекты изучаемых прогестинов. Загадка получила объяснение, когда было изучено активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK под действием стероидов и на фоне ингибиторов. Ингибитор SB203580 блокирует связывание АТФ в соответствующем кармане p38 MAPK, но он не ингибирует фосфорилирование p38 MAPK вышерасположенными в сигнальном каскаде (upstream) киназами. На фоне ингибитора фосфорилирование киназы p38 усиливалось, но не могло ее активировать. По механизму отрицательной обратной связи вышерасположенные в сигнальном каскаде киназы, видимо, активировались, пытаясь восстановить инактивированный ингибитором фермент. Самым интересным был факт значительного усиления активирующего фосфорилирования JNK на фоне ингибитора p38 MAPK SB203580. Очевидно, в ВхРС3 клетках JNK и p38 MAPK фосфорилировались общей вышерасположенной в сигнальном каскаде киназой. Активация JNK на фоне ингибитора p38 MAPK приводила к усилению эффектов стероидов, опосредуемых этой киназой. Действие ингибитора SP600125 связано с подавлением активирующего фосфорилирования JNK и не имело побочных эффектов. Было обнаружено антипролиферативное подавляющее действие прогестерона и LS-01 на клетки аденокарциномы поджелудочной железы человека ВхРС3 с участием сигнального каскада JNK. При этом мишенями этого действия были гены белков циклина D1, p21, Ki67, PCNA. Прогестерон и соединение LS-01 оказывали проапоптотическое действие, стимулируя процесс фрагментации ДНК ядер клеток с участием сигнального каскада p38 MAPK. При этом подавлялась экспрессия

гена антиапоптотического белка BCL2A1. Соединение LS-02 не влияло на процесс пролиферации, но вызывало апоптотические изменения в проницаемости мембран, связанные с появлением фосфатидилсерина на поверхности клеток. Выявленными мишенями действия этого стероида были гены белков каспазы 9, DAPK (Death-associated protein kinase 1), HRK (harakiri). LS-02 активировал оба сигнальных каскада JNK и p38 MAPK. Возможно, отличающееся действие LS-01 и LS-02 в клетках ВхРС3 связано с активацией разных подтипов mPRs и сигнальных каскадов, поскольку родство этих стероидов к конкретным субтипам mPRs – α , β и γ пока не изучено детально [57].

В клетках LNCaP карциномы простаты не было обнаружено ни nPRs, ни mPRs. Влияния прогестерона, а также LS-01 и LS-02 на жизнеспособность этих клеток не было выявлено [57].

В клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека был обнаружен высокий уровень только одного рецептора прогестина – mPR β . С использованием селективных лигандов mPRs и прогестерона были изучены функции этого белка и участие p38 MAPK и JNK в сигнальных каскадах при его активации. Действие LS-01, LS-02 и прогестерона в клетках HepG2 было антипролиферативным и проапоптотическим, а также однонаправленным в связи с наличием лишь одного подтипа mPRs. Стероиды подавляли жизнеспособность клеток, стимулировали появление фосфатидилсерина на наружной поверхности мембран, связанное с процессом апоптоза, но не влияли на фрагментацию ДНК ядер в использованном интервале времени. Возможно, поздние проявления апоптоза еще не успели проявиться в этих клетках в изученные сроки. Активирующего фосфорилирования p38 MAPK не наблюдалось под действием данных соединений, но происходила активация всех изоформ JNK. Только прогестерон достоверно изменял экспрессию генов факторов, связанных с пролиферацией и апоптозом в клетках HepG2. При этом изменения не всегда соответствовали его результирующему эффекту. LS-01 и LS-02 не влияли на транскрипцию изученных генов, возможно, из-за их более низкого родства к mPR β и недостаточной его активации [58].

Таблица 2. Механизмы действия и эффекты селективных лигандов mPRs

Клетки/ткани	Мишени	Участие G-белков	Сигнальные пути	Функции	Ссылка
BeWo линия плацентарных клеток человека	mPR α			Ингибирование эффектов IL-1 β , снижающего жизнеспособность клеток	[23]
Сперматозоиды костистых рыб	mPR α	Golf-белки α $\beta\gamma$ $\beta\gamma$	Активация сигнальных путей: adenylyl cyclase/cAMP, EGFR/ERK1/2 и Pi3k/Akt/phosphodiesterase	Повышение уровня внутриклеточного Ca ²⁺ , ведущее к гиперактивности сперматозоидов	[24–27]
Эндотелиальные клетки сосудов человека	mPR α	Gi-белки G α	Активация сигнальных путей Pi3k/Akt и ERK	Повышение активности и фосфорилирования eNOS, увеличение продукции NO	[28]

Продолжение таблицы 1

Гладкомышечные клетки сосудов человека	mPR α	Gi-белки G $_{1\alpha}$	Активация сигнальных путей ERK и Akt/Pi3k, подавление RhoA/ROCK	Увеличение активности SERCA 2, снижение концентрации Ca $^{2+}$ в цитозоле, индукция релаксации	[29–30]
Т-клетки человека			Активация сигнальных путей cPKC β II	Подавление притока Ca $^{2+}$ в клетки, вызванного фитогемагглютинином	[31–32]
Линия S42 шванновских клеток крысы	mPRs	Gi-белки G $_{1\alpha}$		Увеличение миграции клеток, увеличение экспрессии MAG	[35]
Шванновские клетки крысы	mPR α и β		Активация сигнальных путей Akt, но не ERK1/2	Снижение экспрессии MAG, регуляция дифференцировки, увеличение миграции и пролиферации клеток	[36]
Стволовые клетки (ASC) жировой ткани человека, дифференцированные в клетки, подобные шванновским (SCL-ASC)	mPR α		Активация сигнальных путей Src и Pi3k/Akt	Стимуляция миграции, пролиферации и дифференцировки SCL-ASC, увеличение экспрессии и секреции BDNF и IGF-2	[37–39]
Нейрональные клетки SH-SY-5Y	mPR α		Активация сигнальных путей Pi3k/Akt и ERK	Снижение гибели клеток в бессывороточной среде. Снижение гибели клеток, вызванной 6-OHDA и MPP+	[39–40]
Миометрий беременных, небеременных крыс и крыс после родов	mPR β			Индукция ритмичных сокращений к 20-му дню беременности	[41]
	mPR α , γ , δ , ϵ			Ингибирование в течение беременности сильных сокращений миометрия, вызванных KCl	
Линии рака молочной железы SKBR3 и MDA-MB-468	mPR α	Gi-белки	Активация сигнальных путей ERK 1/2 и Akt	Уменьшение гибели клеток и апоптоза в бессывороточной среде	[42]

Продолжение таблицы 1

Линии глиобластомы U87 и U251	mPR α		Активация сигнальных путей Src и Akt	Усиление пролиферации, миграции и инвазии клеток	[43]
Линии аденокарциномы легких A549 и PC-9	mPR α		Ингибирование EGFR-Src-ERK1/2 пути	Повышение чувствительности к тирозинкиназному ингибитору EGFR и усиление его функции в подавлении пролиферации, миграции и инвазии клеток	[44]
			Ингибирование PKA/CREB и PKA/ β -катенин	Ингибирование пролиферации клеток, ингибирование роста опухоли в модели ксенотрансплантации	[45]
Лактотрофы гипофиза крысы и клетки линии GH3 из опухоли гипофиза крысы	mPR α	Gi- белки	Активация TGF β 1	Снижение секреции пролактина	[46]
Дофаминергические нейроны гипоталамуса и пролактиномы мышей и крыс	mPRs			Увеличение секреции дофамина в гипоталамусе. Подавление гиперпролактинемии	[47]
Дыхательные нейроны в вентролатеральной части продолговатого мозга у новорожденных крыс	mPRs			Уменьшение частоты апноэ у обоих полов новорожденных крыс, уменьшение частоты дыхания у самок	[48]
Ооциты рыб				Индукция созревания ооцитов и овуляции	[49]
T-лимфоциты линии Jurkat	mPR α , mPR β			Понижение экспрессии IL-2 и TNF α , повышение экспрессии IL-10	[34]

Окончание таблицы 1

Моноциты линии THP-1	mPR β			Повышение экспрессии IL-1 β , TNF α , IL-10	[34]
PBMC человека	mPR α , mPR β			Повышение экспрессии и секреции IL-1 β , TNF α , IL-6, экспрессии INF γ и TGF β . Понижение экспрессии IL-2, IL-4 и секреции IL-10	[34]
Линия ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы человека	mPR α , mPR γ		Активация сигнальных путей JNK и p38 MAPK	Подавление пролиферации, подавление экспрессии циклина D1, Ki67, PCNA, усиление p21. Стимуляция апоптоза, подавление экспрессии BCL2A1, повышение экспрессии каспазы 9, DAPK, HRK	[57]
Линия НерG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека	mPR β		Активация JNK но не p38 MAPK	Подавление жизнеспособности клеток, стимуляция апоптоза	[58]

Перспективы

К настоящему времени выявленные селективные лиганды mPRs, используемые в различных исследованиях, представлены тремя соединениями – Org OD 02-0, LS-01 и LS-02. Первое имеет существенное сродство к nPRs и в некоторых случаях проявляет себя как агонист этих рецепторов [49]; другие два не взаимодействуют с nPRs и с другими ядерными рецепторами стероидов, но их сродство к mPRs низкое [53], поэтому эффекты часто слабее, чем у прогестерона. В 2021 г. вышел обзор, в котором была сделана попытка обобщить имеющиеся данные о строении взаимодействующих с mPRs соединений и проанализировать их различия в связывании с nPRs и mPRs. На основании этого анализа были выявлены основные структурные фрагменты молекулы стероида, которые ответственны за эффективность связывания и избирательность взаимодействия с mPRs. Были предложены направления модификации стероидного каркаса для создания новых селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона [59].

Функциональные домены nPRs были идентифицированы, а их структуры подробно изучены еще в 1998 г. [55, 56]. Остатки алифатических и ароматических аминокислот в лиганд-связывающем домене (LBD) окружают гидрофобное ядро прогестерона. Структура LBD, выявленная с помощью рентгеноструктурного анализа, показывает, что 3-кетогруппа прогестерона принимает водородные связи от двух аминокислотных остатков Q725 и R766 [55, 56, 60]. Это было подтверждено мутационным анализом,

показывающим, что мутанты Q725A или R766H демонстрируют полную потерю аффинности связывания с mPR-B [60]. Эти результаты иллюстрируют важность 3-кетогруппы в прогестероне в связывании с mPRs. 20-кетогруппа прогестерона не связывается с LBD водородными связями, важны только гидрофобные контакты для связывания прогестерона с этой частью LBD.

В 2022 г. появилось новое исследование, посвященное поиску путей к созданию новых селективных лигандов mPRs. Было осуществлено моделирование структуры mPR α на основе структуры рецепторов адипонектина (AdipoR), определенной по их кристаллам рентгеноструктурным анализом. Модель гомологии mPR α показала, что водородная связь 20-кетогруппы прогестерона с остатком глутамина (Q) в положении 206 в связывающем кармане этого рецептора критически важна. Это подтвердил мутационный анализ, который не выявил связывания прогестерона с мутантным рецептором при замене глутамина (Q) 206 на аланин или аргинин. Модель предсказала гидрофобные взаимодействия прогестерона с аминокислотными остатками, окружающими лиганд-связывающий карман, в том числе с валином 146, мутация которого с заменой на полярный серин привела к полной потере связывания прогестерона. Но что особенно важно, модель mPR α показала отсутствие донора водородной связи вблизи 3-кетогруппы прогестерона. Исследования активности взаимодействия mPR α с 3-дезоксистероидами показали, что в отличие от nPRs, для связывания с mPR α 3-карбонильный кислород не является необходимым [61]. Таким образом, эта работа подтвердила наши исследования и правильность выбора 3-дезоксистероидов LS-01 и LS-02. Очевидно, именно эта особенность структуры – отсутствие кислородной функции в третьем положении, будет в дальнейшем основой для разработки синтеза эффективных и избирательно взаимодействующих с mPRs соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые в настоящее время селективные лиганды mPRs – Org OD 02-0, LS-01 и LS-02 имеют существенные недостатки и не перспективны как лекарственные средства для клинического применения, но позволяют исследовать функции изучаемых мембранных рецепторов в эксперименте. Их использование помогло выработать стратегию для выработки направлений модификации стероидной молекулы с высокой эффективностью и избирательностью взаимодействия. Мембранные рецепторы прогестерона могут играть значительную роль в гомеостазе, создавая баланс между воспалением и иммуносупрессией. Разработка аналогов прогестерона как препаратов, нацеленных на специфическое действие через mPRs, может иметь терапевтическое значение для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, во время трансплантации, при терапии рака, при беременности, когда есть риск потери плода, при болезни сосудов, пролактинемии, болезни Паркинсона, мужском бесплодии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета гранта Российского научного фонда № 23-25-00071, <https://rscf.ru/project/23-25-00071/>. Никаких дополнительных грантов на проведение и/или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP (2016) Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol* 428: 3831–3849.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.020>
2. Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2237–2242.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0436133100>
3. Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhous EW, Randeva HS, Thomas P (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20: 1519–1534.
<https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
4. Atif F, Yousuf S, Stein DG (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multi-forme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 146: 62–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.007>
5. Atif F, Sayeed I, Yousuf S, Ishrat T, Hua F, Wang J, Brat DJ, Stein DG (2011) Progesterone inhibits the growth of human neuroblastoma: in vitro and in vivo evidence. *Mol Med* 17: 1084–1094.
<https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00255>
6. Hapgood JP, Africander D, Louw R, Ray RM, Rohwer JM (2014) Potency of progestogens used in hormonal therapy: toward understanding differential actions. *J Steroid Mol Biol* 142: 39–47
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.08.001>
7. Thomas P (2022) Membrane Progesterone Receptors (mPRs, PAQRs): Review of Structural and Signaling Characteristics. *Cells* 11: 1785.
<https://doi.org/10.3390/cells11111785>
8. Thomas P, Pang Y, Kelder J (2023) Membrane progesterone receptors on the cell membrane: A review highlighting potential export motifs in mPR α regulating its trafficking to the cell surface. *Steroids* 199: 109295.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109295>
9. Moussatche P, Lyons TJ (2012) Non-genomic progesterone signaling and its non-canonical receptor. *Biochem Soc Trans* 40: 200–204.
<https://doi.org/10.1042/BST20110638>
10. Liu Z, Xiao T, Peng X, Li G, Hu F (2017) APPLs: More than just adiponectin receptor binding proteins. *Cell Signal* 52: 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.018>
11. Nader N, Dib M, Courjaret R, Hodeify R, Machaca R, Graumann J, Machaca K (2018) The VLDL receptor regulates membrane progesterone receptor trafficking and nongenomic signaling. *J Cell Sci* 131: 212522.
<https://doi.org/10.1242/jcs.212522>
12. Thomas P, Pang Y, Dong J (2014) Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progestin receptor α (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): Evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology* 155: 1107–1119.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1991>
13. McGuire MR, Espenshade PJ (2023) PGRMC1: An enigmatic heme-binding protein. *Pharmacol Ther* 241: 108326.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108326>
14. Cahill MA, Medlock AE (2017) Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 171: 11–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.12.020>
15. Sueldo C, Liu X, Peluso JJ (2015) Progestin and adipoQ Receptor 7, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and their role in regulating progesterone's ability to suppress human granulosa/luteal cells from entering into the cell cycle. *Biol Reprod* 93: 63.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131508>
16. Aizen J, Pang Y, Harris C, Converse A, Zhu Y, Aguirre M, Thomas P (2018) Roles of progesterone receptor membrane component 1 and membrane progestin receptor alpha in regulation of zebrafish oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol* 263: 51–61.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.009>
17. Wu X-J, Thomas P, Zhu Y (2018) Pgrmc1 knockout impairs oocyte maturation in zebrafish. *Front Endocrinol* 9: 560.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00560>

18. Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, Thomas P (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20: 1519–1534. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
19. Kelder J, Azevedo R, Pang Y, Vlieg J, Dong J, Thomas P (2010) Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor (mPR) and to nuclear progesterone receptor: Correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPR-specific agonists. *Steroids* 75: 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.010>
20. Jacobsen BM, Horwitz KB (2012) Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* 357: 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.016>
21. Pang Y, Dong J, Thomas P (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ϵ (mPR δ and mPR ϵ) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 154: 283–295. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1772>
22. Boukari R, Rossignol O, Baldy C, Marcouiller F, Bairam A, Joseph V (2016) Membrane progesterone receptor- β , but not - α , in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. *J Appl Physiol* (1985) 121: 781–791. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00397.2016>
23. Zachariades E, Mparmpakas D, Pang Y, Rand-Weaver M, Thomas P, Karteris E (2012) Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta* 33: 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.002>
24. Tan W, Thomas P (2014) Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progestin receptor-alpha (mPRalpha) regulate progestin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biol Reprod* 90: 105. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112896>
25. Tan W, Thomas P (2015) Involvement of epidermal growth factor receptors and mitogen-activated protein kinase in progestin-induction of sperm hypermotility in Atlantic croaker through membrane progestin receptor-alpha. *Mol Cell Endocrinol* 414: 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.023>
26. Tan W, Aizen J, Thomas P (2014) Membrane progestin receptor alpha mediates progestin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Gen Comp Endocrinol* 200: 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.003>
27. Tan W, Pang Y, Tubbs C, Thomas P (2019) Induction of sperm hypermotility through membrane progestin receptor alpha (mPR α): A teleost model of rapid, multifaceted, nongenomic progestin signaling. *Gen Comp Endocrinol* 279: 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.002>
28. Pang Y, Dong J, Thomas P (2015) Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E899–E911. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00527.2014>
29. Pang Y, Thomas P (2019) Role of mPR α (PAQR7) in progesterone-induced Ca²⁺ decrease in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Endocrinol* 63: 199–213. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0019>
30. Pang Y, Thomas P (2021) Involvement of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in mPR α (PAQR7)-mediated progesterone induction of vascular smooth muscle relaxation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320: E453–E466. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00359.2020>
31. Lin VH, Chen JJ, Liao CC, Lee SS, Chien EJ (2016) The rapid immunosuppression in phytohemagglutinin-activated human T cells is inhibited by the proliferative Ca(2⁺) influx induced by progesterone and analogs. *Steroids* 111: 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.010>
32. Lin VH, Chien A, Chien EJ (2023) The rapid activation of cPKC β II by progesterone results in the negative regulation of Ca²⁺ influx in human resting T cells. *J Chin Med Assoc* 86: 885–891. <https://doi.org/10.1097/jcma.0000000000000970>
33. Dosiou C, Hamilton A, Pang Y, Overgaard M, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice L (2008) Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol* 196: 67–77. <https://doi.org/10.1677/joc-07-0317>

34. Polikarpova AV, Levina IS, Sigai NV, Zavarzin IV, Morozov IA, Rubtsov PM, Guseva AA, Smirnova OV, Shchelkunova TA (2019) Immunomodulatory effects of progesterone and selective ligands of membrane progesterone receptors. *Steroids* 145: 5–18.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.02.009>
35. Castelnovo LF, Magnaghi V, Thomas P (2019) Expression of membrane progesterone receptors (mPRs) in rat peripheral glial cell membranes and their potential role in the modulation of cell migration and protein expression. *Steroids* 142: 6–13.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.009>
36. Castelnovo LF, Caffino L, Bonalume V, Fumagalli F, Thomas P, Magnaghi V (2020) Membrane Progesterone Receptors (mPRs/PAQRs) Differently Regulate Migration, Proliferation, and Differentiation in Rat Schwann Cells. *J Mol Neurosci* 70: 433–448.
<https://doi.org/10.1007/s12031-019-01433-6>
37. Castelnovo LF, Thomas P (2021) Membrane progesterone receptor α (mPR α /PAQR7) promotes migration, proliferation and BDNF release in human Schwann cell-like differentiated adipose stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 531: 111298.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111298>
38. Castelnovo LF, Thomas P, Magnaghi V (2021) Membrane progesterone receptors (mPRs/PAQRs) in Schwann cells represent a promising target for the promotion of neuroregeneration. *Neural Regen Res* 16: 281–282.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.290885>
39. Castelnovo LF, Thomas P (2022) Membrane Progesterone Receptor α (mPR α /PAQR7) Promotes Survival and Neurite Outgrowth of Human Neuronal Cells by a Direct Action and Through Schwann Cell-like Stem Cells. *J Mol Neurosci* 72: 2067–2080.
<https://doi.org/10.1007/s12031-022-02057-z>
40. Castelnovo LF, Thomas P (2023) Progesterone exerts a neuroprotective action in a Parkinson's disease human cell model through membrane progesterone receptor α (mPR α /PAQR7). *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1125962.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1125962>
41. Yoshida A, Yasuda K, Okada H (2024) Changes in the conflicting nongenomic effects of progesterone in rat myometrium during pregnancy. *Life Sci* 340: 122454.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122454>
42. Dressing GE, Alyea R, Pang Y, Thomas P (2012) Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Horm Cancer* 3: 101–112.
<https://doi.org/10.1007/s12672-012-0106-x>
43. González-Orozco JC, Hansberg-Pastor V, Valadez-Cosmes P, Nicolas-Ortega W, Bastida-Beristain Y, Fuente-Granada M, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I (2018) Activation of membrane progesterone receptor-alpha increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 477: 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.06.004>
44. Lu X, Guan A, Chen X, Xiao J, Xie M, Yang B, He S, You S, Li W, Chen Q (2020) mPR α mediates P4/Org OD02-0 to improve the sensitivity of lung adenocarcinoma to EGFR-TKIs via the EGFR-SRC-ERK1/2 pathway. *Mol Carcin* 59: 179–192.
<https://doi.org/10.1002/mc.23139>
45. Xiao J, Chen X, Lu X, Xie M, He B, He S, You S, Chen Q (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor alpha. *Thorac Cancer* 11: 2209–2223.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.13528>
46. Camilletti MA, Ferraris J, Abeledo-Machado A, Converse A, Faraoni EY, Pisera D, Gutierrez S, Thomas P, Díaz-Torga G (2018) Participation of membrane progesterone receptor α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion. *J Neuroendocrinol* 30: e12614.
<https://doi.org/10.1111/jne.12614>
47. Camilletti MA, Abeledo-Machado A, Perez PA, Faraoni EY, De Fino F, Rulli SB, Ferraris J, Pisera D, Gutierrez S, Thomas P, Díaz-Torga G (2019) mPRs represent a novel target for PRL inhibition in experimental prolactinomas. *Endocr Relat Cancer* 26: 497–510.
<https://doi.org/10.1530/ERC-18-0409>
48. Joseph V, Uppari N, Kouchi H, De Bruyn C, Boukari R, Bairam A (2018) Respiratory regulation by steroids in newborn rats: a sex-specific balance between allopregnanolone and progesterone receptors. *Exp Physiol* 103: 276–290.
<https://doi.org/10.1113/EP086807>
49. Rezanujjaman M, Tanvir R, Ali MH, Tokumoto T (2020) An agonist for membrane progestin receptor (mPR) induces oocyte maturation and ovulation in zebrafish in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 529: 347–352.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.208>

50. Kamernitzky AV, Levina IS (2005) Pregna-D' -pentaranes, progestins and antiprogestins: I. Separation of biological functions of steroid hormones. *Russ J Bioorg Chem* 31: 115–129.
<https://doi.org/10.1007/s11171-005-0015-7>
51. Kamernitzky AV, Levina IS (2005) Pregna-d' -pentaranes, progestins and antiprogestins: II. Pathways and realization mechanisms of separate biological functions of steroid hormones. *Russ J Bioorg Chem* 31: 227–238.
<https://doi.org/10.1007/s11171-005-0028-2>
52. Lisanova OV, Shchelkunova TA, Morozov IA, Rubtsov PM, Levina IS, Kulikova LE, Smirnov AN (2013) Approaches to the design of selective ligands for membrane progesterone receptor alpha. *Biochemistry (Moscow)* 78: 236–243.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913030048>
53. Polikarpova AV, Maslakova AA, Levina IS, Kulikova LE, Kuznetsov YV (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Moscow)* 82: 140–148.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917020055>
54. Michurina AO, Polikarpova AV, Levina IS, Kulikova LE, Zavarzin IV, Guseva AA, Morozov IA, Rubtsov PM, Smirnova OV, Shchelkunova TA (2018) Agonistic and Antagonistic Effects of Progesterone Derivatives on the Transcriptional Activity of Nuclear Progesterone Receptor B in Yeast Model System. *Biochemistry (Moscow)* 83: 574–585.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918050103>
55. Williams SP, Sigler PB (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393: 392–396.
<https://doi.org/10.1038/30775>
56. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5998–6003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5998>
57. Goncharov AI, Levina IS, Shliapina VL, Morozov IA, Rubtsov PM, Zavarzin IV, Smirnova OV, Shchelkunova TA (2021) Cytotoxic Effects of the Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells BxPC3. *Biochemistry (Moscow)* 86: 1446–1460.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110080>
58. Shchelkunova TA, Levina IS, Morozov IA, Rubtsov PM, Goncharov AI, Kuznetsov YV, Zavarzin IV, Smirnova OV (2023) Effects of Progesterone and Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in HepG2 Cells of Human Hepatocellular Carcinoma. *Biochemistry (Moscow)* 88: 1920–1932.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923110202>
59. Levina IS, Kuznetsov YV, Shchelkunova TA, Zavarzin IV (2021) Selective ligands of membrane progesterone receptors as a key to studying their biological functions in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 207: 105827.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105827>
60. Letz M, Bringmann P, Mann M, Mueller-Fahrnow A, Reipert D, Scholz P, Wurtz JM, Egner U (1999) Investigation of the binding interactions of progesterone using muteins of the human progesterone receptor ligand binding domain designed on the basis of a three-dimensional protein model. *Biochim Biophys Acta* 1429: 391–400.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00249-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00249-0)
61. Kelder J, Pang Y, Dong J, Schaftenaar G, Thomas P (2022) Molecular modeling, mutational analysis and steroid specificity of the ligand binding pocket of mPR α (PAQR7): Shared ligand binding with AdipoR1 and its structural basis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 219: 106082.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106082>

Investigation the Functions of Membrane Progesterone Receptors Using their Selective Ligands

T. A. Shchelkunova^{a, *}

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**e-mail: Schelkunova-t@mail.ru*

Progesterone plays a key role in reproductive processes in the female body and has effects in the central nervous system and other tissues. Progestins are widely used clinically in contraception and hormonal therapy. The classical effects of progesterone are mediated through nuclear receptors, which are ligand-dependent transcription factors. Since 2003, membrane progesterone receptors (mPRs) of the adiponectin receptor family of five subtypes have been in the spotlight. Their role in many normal and pathological processes in the body remains unclear. Determining the mechanisms of action of progesterone is complicated by the fact that activation of different types of receptors can cause opposite effects. The search for selective ligands of mPRs is an important task, since the use of such compounds makes it possible to differentiate the effects of progestins mediated by different types of receptors. The review analyzes the action of three selective ligands of mPRs, described and studied at present. One of them is widely used in international research, the other two have been identified and used in our work. The advantages and defects of these three compounds and the studies of mPRs functions conducted using them are considered. In conclusion, the prospects for creating new selective mPRs ligands are assessed, taking into account the structural features of their ligand-binding pocket. We found that the 3-keto group of progesterone and its derivatives, which is fundamentally required for binding to nuclear steroid receptors, is not important for interaction with mPRs. Our conclusion was confirmed in a study published in 2022 using modeling techniques and mutational analysis. It is this structural feature that will further serve as the basis for the development of the synthesis of compounds that are effective and selectively interact with mPRs.

Keywords: progestins, steroids, membrane receptors, nuclear receptors, selective ligands, signaling cascades

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИНЕРТНЫХ ГАЗОВ

© 2024 г. И. А. Кабиольский¹, С. Д. Симоненко¹, Н. Ю. Сарычева¹, В. А. Дубынин¹

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

*E-mail: ilyakab1999@gmail.com

Поступила в редакцию 24.06.2024 г.

После доработки 23.10.2024 г.

Принята к публикации 23.10.2024 г.

С середины прошлого века известно, что инертные газы способны вызывать целый набор физиологических эффектов. При этом биологическая активность инертных газов представляет собой крайне многогранный феномен. Несмотря на схожесть большинства физических и химических характеристик, они влияют на множество органов и тканей, взаимодействуя с разнообразными белковыми мишенями. В настоящее время известно, что ксенон, криптон и аргон способны изменять функциональное состояние центральной нервной системы, корректировать некоторые психоэмоциональные расстройства. Помимо этого, они влияют на процессы апоптоза и клеточной реакции на стресс. Инертные газы оказывают действие на состояние иммунной системы и различные параметры гомеостаза. Также убедительно показаны цитопротекторные эффекты гелия на сердечно-сосудистую и дыхательную системы. Таким образом, инертные газы в настоящее время рассматриваются как потенциальные средства коррекции различных заболеваний.

Представленный обзор посвящен анализу данных литературы о физиологических эффектах инертных газов, выявленных в биомедицинских исследованиях на пациентах, а также в моделях на клеточных культурах и *in vivo*. Каждая глава статьи посвящена отдельному газу данной группы, начиная с наиболее изученных. Для каждого из инертных газов (гелия, неона, аргона, криптона, ксенона и радона) рассмотрены физиологическая активность, возможность применения в медицине, а также некоторые известные механизмы действия. Помимо этого, в обзоре проведен критический анализ имеющихся данных и обозначены основные пробелы, которые предстоит заполнить в будущих исследованиях.

Ключевые слова: инертные газы, нейропротекция, органопротекция, ксенон, аргон, гелий

DOI: 10.31857/S0869813924100033, **EDN:** VRXCIA

ВВЕДЕНИЕ

Инертные («благородные», noble) газы – элементы особой группы таблицы Менделеева. Они представлены одноатомными газами с полностью занятыми электронными орбиталями, что определяет их абсолютную химическую пассивность в нормальных условиях. Атомы инертных газов являются симметричными и неполярными, что исключает также возможность электростатических взаимодействий с биологическими мишенями. Вместе с тем уже с середины прошлого века ученым известны как мини-

мум анестетические свойства инертных газов в нормобарических и гипербарических условиях [1]. Это позволяет предположить, что биологическая активность инертных газов должна быть опосредована некоторыми специфическими физико-химическими особенностями данных веществ.

Одной из характерных особенностей атомов инертных газов является прямая зависимость их растворимости в липидах от атомной массы. Именно это свойство изначально предполагалось в качестве основной причины наличия у инертных газов анестетических эффектов в соответствии с гипотезой Мейера – Овертона [2]. Инертные газы, масса которых больше массы молекулярного азота (Xe, Kr, Ar), обладают анестетическими свойствами. У ксенона они проявляются при атмосферном давлении, а у криптона и аргона в условиях гипербарии [3]. При воздействии более легких и менее липофильных инертных газов (Ne, He) в гипербарических условиях характерно развитие неврологического синдрома высокого давления, при котором наблюдаются дисметрии, миоклонии, тремор и прочие нарушения двигательных функций [4]. Методами моделирования молекулярной динамики взаимодействия с липидным бислоем показано, что тяжелые, вызывающие анестезию инертные газы встраиваются внутрь билипидного слоя и в гидрофобные сайты белковых молекул. Малые инертные газы, в свою очередь, в условиях повышенного давления действуют как «растворители», нарушающие структуру границы между водной фазой и липидами, что как раз и может становиться причиной развития синдрома высокого давления [5].

Как уже было сказано, благодаря своей липофильности, тяжелые инертные газы способны не только внедряться в структуру мембраны, но и занимать гидрофобные сайты внутри белковых молекул. Существует множество методов исследования мест и энергии связывания атомов инертных газов с белковыми молекулами. Проводятся работы с применением как рентгеноструктурного анализа [6], так и компьютерного моделирования [7], при котором места связывания предсказываются с точностью до 1-2 вандерваальсовых радиусов. Так, выявлено, что атомы инертных газов склонны связываться с гидрофобными остатками лейцина, фенилаланина и валина в основном в соответствующих карманах белковых молекул [7]. Также существует методология детекции белок-ксеноновых взаимодействий на основе анализа стабильности белков по скорости окисления (SPROX) и ограниченного протеолиза (LiP) [8]. В настоящее время в базах данных, таких как RCSB (Research Collaboratory for Structural Biology), можно найти множество спрогнозированных интерактомонов между инертными газами и белками [9].

Параллельно с изучением молекулярной динамики взаимодействия инертных газов с биологическими молекулами активно идет анализ интегративных (системных) аспектов их влияния на организм. Уже около восьмидесяти лет в физиологии и медицине известны анестетические свойства ксенона. Позже исследования были направлены на изучение действия его субанестетических концентраций на организм, что привело к открытию органопротекторных эффектов ксенона и аргона. Эта актуальная и многообещающая тема заинтересовала многих ученых, и в последние годы наблюдается заметное увеличение числа работ, направленных на изучение терапевтического действия всей группы инертных газов на организм. В числе прочего "бум" исследований в данной области обусловлен необходимостью поиска газа, который стал бы более дешевым аналогом ксенона, обладая при этом сходными протекторными свойствами. Вместе с тем на волне растущего интереса к оценке свойств этих относительно новых для биомедицинской области веществ появляются исследования, авторы которых подходят к интерпретации своих результатов с не слишком высокой степенью ответственности и критичности. Многие исследователи заявляют о наличии разнообразных «целебных» свойств инертных газов. Однако, как правило, такие выводы не подкреплены достаточно убедительными эмпирическими выкладками и не снабжены сопоставлением с исследованиями других авторов. Изложенная ситуация – одна из причин, по кото-

рой представляется важным и актуальным провести критический анализ литературы в данной области, чему и посвящен данный обзор.

ЭФФЕКТЫ КСЕНОНА

Ксенон среди инертных газов стал первым, для которого были открыты явные физиологические эффекты. Более того, на данный момент известно, что среди прочих инертных газов именно ксенон обладает наиболее выраженной нейротропной активностью. Впервые его действие было показано более 80 лет назад: профессор кафедры фармакологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова Н. В. Лазарев выдвинул предположение о наличии анестетических свойств у ксенона [10]. Позже данное предположение подтвердилось в исследованиях на лабораторных животных [2]. Дальнейшее изучение привело к тому, что с 1999 г. ксенон официально разрешен Министерством здравоохранения РФ для применения в анестезиологической практике. Известно, что минимальная альвеолярная концентрация (МАК – концентрация ингаляционного анестетика, предотвращающая двигательную активность у 50% пациентов в ответ на стандартный болевой раздражитель) ксенона для человека составляет 63.1% [11], что позволяет использовать его при нормальном давлении. Для крыс же МАК превышает атмосферное давление и составляет $161 \pm 17\%$ (парциальное давление ксенона должно составлять 1.6 ± 0.17 атм.) [3]. Концентрация ксенона при анестезии положительно коррелирует с мощностью медленноволновых компонент в спектре ЭЭГ в лобной и теменной коре испытуемых [12]. Ксеноновая анестезия, по сравнению с кетаминовой, характеризуется быстрым выходом из наркоза с минимальным проявлением postanестетических симптомов и галлюцинаций, что обусловлено более глубоким подавлением активности коры больших полушарий [13]. Однако как после ксеноновой, так и после севофлурановой анестезии через час после индукции у пациентов для проведения литотрипсии отмечали повышение маркеров нейронального повреждения в крови. Были увеличены тотальный и фосфорилированный Тау-белок и тонкий полипептидный нейрофиламент (NFL) [14]. Впрочем, такой эффект может быть сопряжен с ростом проницаемости гематоэнцефалического барьера, что характерно при проведении операций под наркозом [15]. Таким образом, ксенон представляется одним из наилучших газовых анестетиков в клинической практике. Обзоры, посвященные оценке эффективности ксеноновой анестезии, указывают на улучшение постоперационного когнитивного восстановления у пациентов [16]. Вдобавок ксенон способен влиять на серотонинергическую систему – показано, что он способен ингибировать ток через ионотропные серотониновые рецепторы (5-HT₃), что может купировать постоперационную тошноту и рвоту [17].

Анестетический эффект ксенона опосредован в первую очередь его способностью ингибировать глутаматергические NMDA-рецепторы [18]. Известно, что ксенон взаимодействует с сайтом глицина на NMDA-рецепторах, включая одновременно конкурентную и аллостерическую компоненты молекулярного антагонизма [19]. При помощи компьютерного моделирования динамики взаимодействия ксенона с глициновым сайтом показано, что область связывания глицина на NMDA-рецепторе образована полностью в белковой молекуле; внутри полости находятся три ароматические аминокислоты – Phe 484, Phe 758 и Trp 781 [20]. При связывании с глицином эти аминокислоты обуславливают взаимодействие с лигандом и запускают конформационные изменения в NMDA-рецепторе, опосредующие его активацию. Для атомов ксенона данные аминокислоты создают три локальных сайта улавливания, образованные π -комплексами электронов ароматических колец, между которыми возможна миграция атома ксенона [21]. Атом ксенона стабилизирует лиганд-связывающий домен в открытом положении. Были найдены точечные мутации (F758W и F758Y) в сайте связывания глицина, которые нивелируют аффинность ксенона к данному сайту [22].

Электрофизиологические исследования сообщают о влиянии ксенона не только на NMDA-рецепторы, но и на другие мишени. В клетках гиппокампа крыс ксенон снижал амплитуду входящих токов, генерируемых NMDA-, AMPA- и кинаматными рецепторами [23, 24]. При этом ксенон не оказывал влияния на токи, генерируемые ГАМК-рецепторами, однако при экспозиции нейронов в среде ксенона отмечалось снижение частоты спонтанных тормозных постсинаптических потенциалов при сохранении их амплитуды и кинетики затухания. В исследованиях на ооцитах гладкой шпорецовой лягушки ксенон проявил ингибирующее действие по отношению к $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 4\beta 4$ никотиновым ацетилхолиновым рецепторам и, напротив, потенцировал $\alpha 1$ -глициновый рецептор и ГАМК_A-рецептор [25]. Авторы рассуждают о механизмах анальгетического действия ксенона, однако ингибирующее воздействие ксенона на $\alpha 4\beta 2$ Н-холинорецепторы противоречит их роли в ноцицепции. В статье выдвигается предположение, что анальгетический эффект ксенона, по всей видимости, опосредован воздействием на NMDA-рецепторы. Помимо этого, показано, что ксенон способен оказывать влияние на внутриклеточную концентрацию кальция. Для ряда газовых анестетиков (ксенон, закись азота, изофлуран и галотан) показано ингибирующее влияние на Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [26]. Такой эффект газовых анестетиков может приводить к значительным альтерациям в гомеостазе внутриклеточного кальция, увеличивая кальциевую нагрузку и потенциально влияя на секрецию нейротрансмиттеров [27]. Однако существуют и противоположные данные: ксенон способен подавлять долговременную потенциацию в нейронах гиппокампа мыши [28] и данный эффект, напротив, опосредован снижением внутриклеточной концентрации кальция за счет блокады кальциевого тока через каналы NMDA-рецепторов. Среди прочих механизмов действия ксенона отмечена его способность активировать некоторые из двупоровых калиевых каналов – TREK-1, TASK-3, а также АТФ-чувствительные калиевые каналы [29]. Активацию TREK-1 связывают с нейропротекторными эффектами ксенона – подавлением глутаматной эксайтотоксичности [30].

В ряду других проявлений нейропротекторного действия ксенона способен увеличивать выживаемость нейронов в срезах гиппокампа мышей в модели кислородно-глюкозной депривации. При этом при повышении концентрации глицина в среде защитные свойства ксенона исчезают [31]. В модели травмы мозга *in vivo* ксенон привел к увеличению выживаемости нейронов и снижению воспаления в нервной ткани, что стало причиной улучшения пространственной памяти у животных [32]. Ксенон частично, но устойчиво обеспечивал защиту кортикальных нейронов и септальных холинергических нейронов крыс в модели болезни Альцгеймера, вызванной воздействием L-транспирролидин-2,4-дикарбоновой кислоты (PDC) на культуру клеток. PDC является синтетическим аналогом глутамата и оказывает легкий эксайтотоксический стресс [33]. Также было продемонстрировано, что ксенон способен оказывать нейропротекторное действие комплементарно с мексантином или кетаминном, совместно усиливая подавление избыточной активности NMDA-рецепторов.

В рамках исследований прочих положительных эффектов ксенона в субанестетических концентрациях было выявлено его антиконвульсантное действие как в моделях на животных [34], так и в терапии младенцев с энцефалопатией [35]. Ингаляции ксенонсодержащими смесями (30% Xe) способны снижать проявления абстинентного синдрома при моделировании морфиновой зависимости у мышей [36] и алкогольной зависимости у крыс [37].

Ингибиторное влияние на импульсацию клеток мозга может быть использовано в терапии психозомоциональных расстройств, связанных с избыточной активностью нейронов головного мозга. В частности, ингаляции ксеноном применяются в клинике в качестве средства терапии панических атак [38], оказывая анксиолитический эффект и купируя симптомы сопутствующих депрессивных эпизодов. Данные эффекты также подтверждаются и в исследованиях на лабораторных животных с использованием мо-

дели депрессии, вызванной инъекцией липополисахаридов [39]. При моделировании посттравматического стрессорного расстройства у крыс ксенон ослаблял реконсолидацию памяти о негативном опыте контакта со стрессогенной средой [40].

В лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов кафедры физиологии человека и животных МГУ имени М. В. Ломоносова проводятся исследования неврологических эффектов инертных газов в экспериментах на белых крысах в различных моделях. В частности, нашей научной группой было показано, что при моделировании расстройств аутистического спектра ксенон оказывал корректирующее влияние на параметры социального и депрессивно-подобного поведения [41].

Для ксенона наряду с его влияниями на центральную нервную систему показано протекторное действие по отношению к другим тканям и органам. Ксенон способен снижать размер зоны инфаркта сердца у крыс после ишемии-реперфузии [42]. Данный эффект опосредован транслокацией и фосфорилированием протеинкиназы С-эпсилон, а также активацией митоген-активируемой протеинкиназы р38 под действием ксенона. Согласно клиническим данным, ксенон способен уменьшать повреждение миокарда у пациентов, перенесших внебольничную остановку сердца. Ингаляции газовой смеси с концентрацией ксенона 40% снижали содержание в крови тропонина-Т, который является маркером повреждения миокарда [43]. Кроме того, ксенон улучшил систолическую функцию левого желудочка, увеличив фракцию выброса [44].

Также показано ренопротекторное действие ксенона в условиях кислородной депривации культуры эпителиальных клеток проксимального канальца. В данной модели ксенон увеличил выживаемость клеток за счет увеличения экспрессии протеинкиназы В, а также фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), что обуславливает протекцию в условиях ишемического повреждения тканей [45]. Известно, что HIF-1 α способен увеличивать уровень эритропоэтина в крови, связываясь с энхансером его гена и активируя его транскрипцию [46]. Посредством этого механизма ксенон способен вызывать повышение концентрации эритропоэтина в плазме, а также увеличение общего объема крови испытуемых [47, 48]. Из-за наличия данного эффекта ксенон внесен всемирной антидопинговой организацией в список препаратов, запрещенных для использования в профессиональном спорте [<https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list?item-id=5029>, дата обращения: 28.05.2024].

Таким образом, ксенон, благодаря своей ярко выраженной нейротропной активности и органопротекторным свойствам, является инертным газом с широким спектром потенциальных терапевтических применений. Особое значение имеет его потенциал как средства терапии множества психоэмоциональных нарушений, таких как тревожные расстройства, посттравматическое стрессорное расстройство и расстройства аутистического спектра. Однако использование ксенона в медицине сопряжено с рядом технических и экономических сложностей, вызванных низкой концентрацией ксенона в атмосфере и, как следствие, его высокой стоимостью. Эти обстоятельства диктуют необходимость развития более совершенных способов использования ксенона при ингаляциях, например, внедрение систем рециклинга, которые позволят повторно использовать выдыхаемый пациентом ксенон. Увеличение доступности ксенона будет способствовать расширению сферы его применения в клинике.

Общий тренд в исследованиях ксенона имеет хорошую перспективу, включающую расширение анализа фармакологической активности в субанестетических концентрациях. История изучения свойств ксенона является показательной с точки зрения полноты исследования. Анализ физиологических эффектов ксенона касался как молекулярно-динамических основ взаимодействия лиганда с его мишенями, так и влияния на системном уровне, включая исследования *in vivo* и описания применений ксенона в клинике. Опыт описания действия ксенона может помочь во всестороннем изучении других инертных газов.

ЭФФЕКТЫ АРГОНА

При изучении эффектов аргона исследователи уделяли большое внимание его нейропротекторным свойствам. В моделях кислородно-глюкозной депривации на кортикальных нейронах [49–51] и нейронах гиппокампа [52] было продемонстрировано, что аргон приводит к увеличению выживаемости клеток; его защитный эффект имеет дозозависимый и времязависимый характер. Действие аргона выражалось в снижении количества лактатдегидрогеназы, а также в увеличении экспрессии и транслокации в ядро фактора Nrf-2 в коре головного мозга.

Помимо работ на клеточных культурах, существует ряд исследований нейропротекторных свойств аргона в моделях *in vivo*. Позитивные эффекты были показаны на животных, подвергавшихся временной окклюзии средней мозговой артерии [50, 53–54] и неонатальной односторонней окклюзии каротидной артерии [55]. Ингаляции аргон-кислородной смесью привели к улучшению неврологического состояния и способности к обучению белых крыс. Ингаляции аргоном снизили размер зоны поражения коры головного мозга; показано увеличение экспрессии генов трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и фактора роста нервов (NGF) в зоне пенумбры через 24 ч после реперфузии по сравнению с группой, получавшей плацебо [54]. В модели субарахноидального кровотечения у крыс аргон также показал протекторное действие, положительно сказавшееся на выживании животных [56]. Однако в модели черепно-мозговой травмы ингаляции аргоном не оказали влияния на объем зоны повреждения в головном мозге [57].

Особое внимание уделяется механизму нейропротекции аргона, связанному с изменением активности системы врожденного иммунитета. Известно, что аргон способен снижать плотность Toll-подобных рецепторов 2-го и 4-го типов (TLR-2, TLR-4), увеличивать количество фосфорилированной ERK 1/2 и снижать содержание фосфорилированной киназы 4-го типа, ассоциированной с рецептором к интерлейкину-1 (IRAK4), тем самым подавляя активность каспазы-3 [58]. В дальнейших исследованиях ученые выявили снижение экспрессии транскрипционных факторов NF- κ B и STAT3 и содержания их фосфорилированных форм при воздействии аргон-кислородной смеси на культуру клеток нейробластомы человека [59]. Также показано, что аргон снижает экспрессию ряда провоспалительных факторов: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α и iNOS [60]. Описаны также антиапоптотические свойства аргона: газ приводил к снижению экспрессии белка BAX, падению содержания расщепленной каспазы-3 и увеличению уровня экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-2 [61, 62].

Ряд эффектов аргона, очевидно, нуждается в дополнительном изучении. Например, показано, что газ снижает количество фосфорилированной протеинкиназы B (Akt), которая вовлечена в сигнальные пути, связанные с выживанием клеток, что противоречит гипотезе о его цитопротекторном действии [62]. Помимо этого, существуют данные, что аргон приводит к уменьшению экспрессии белка теплового шока HSP-70 и гемоксигеназы-1, которая была повышена при воздействии ротенона – яда, нарушающего работу электронтранспортной цепи митохондрий. Данный эффект аргона относится к защитным, однако не снимается действием ингибитора TLR-2 и TLR-4, что говорит о наличии у аргона механизма нейропротекции, не связанного с действием через рецепторы врожденного иммунитета. Таким образом, механизмы физиологической активности аргона остаются не до конца ясными. В частности, отсутствуют данные о сайтах его связывания на белковых мишенях. Для поиска сайта связывания аргона можно проводить исследования с помощью ЯМР спектроскопии, а также рентгеноструктурного анализа, как, например, было показано для ксенона [63]. Также для визуализации взаимодействия аргона с Toll-подобными рецепторами еще пока не было проведено работ с использованием молекулярного моделирования по аналогии с описанием ксенона у Andrijchenko с соавт. [20].

Toll-подобные рецепторы играют значительную роль в формировании и функционировании нервной системы: в частности, они регулируют нейрогенез в гиппокампе как в период развития нервной системы, так и во взрослом мозге [64]. Показано, что мыши с нокаутом Toll-подобного рецептора 2 демонстрировали ухудшение когнитивных функций [65]. Помимо этого, Toll-подобные рецепторы играют значительную роль в нейровоспалении: например, провоспалительный каскад, опосредованный этими рецепторами, запускается при употреблении алкоголя, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [66]. В связи с этим высокий интерес представляет потенциальная возможность аргона влиять на онтогенез центральной нервной системы и корректировать различные расстройства, вызванные цитотоксическим влиянием избыточного нейровоспаления и связанных с ним изменений поведенческого характера. В настоящее время наблюдается дефицит исследований свойств аргона в *in vivo* моделях поведенческих расстройств, спровоцированных нейроиммунной активацией. В свою очередь, работы на потомстве лабораторных животных, ставящие своей целью проследить динамику развития ЦНС на самых ранних этапах онтогенеза под влиянием аргона, отсутствуют вовсе. В настоящее время на биологическом факультете МГУ имени М. В. Ломоносова наша научная группа активно ведет подобные работы, результаты которых будут опубликованы в ближайшее время.

Помимо нейропротекторных свойств, ингаляции аргонсодержащими смесями способны оказывать органопротекторное действие. Пре- и посткондиционирование аргоном при моделировании полиорганной недостаточности привело к увеличению сердечного выброса у кроликов, а также к снижению креатинина в плазме крови. Таким образом, аргон обладает кардио- и ренопротекторными свойствами [67]. Ингаляция аргон-кислородной смесью при ишемии-реперфузии снизила смертность ганглионарных клеток сетчатки [58], а также волоковых клеток Кортиева органа [68].

В целом можно заключить, что аргон вызывает широкий спектр физиологических изменений, оказывая цитопротекторное действие в различных тканях. Несмотря на то, что исследователи пока не сошлись на единой картине механизмов действия данного газа, уже сейчас можно сказать, что аргон является многообещающим средством терапии и коррекции множества расстройств как нервной системы, так и иных систем органов.

ЭФФЕКТЫ ГЕЛИЯ

Значимая часть исследований эффектов гелия посвящена его органопротекторным свойствам. Показано, что газ способен оказывать пре- и посткондиционирующее действие, защищая ткани и органы от чрезмерной дегенерации. Одним из механизмов гелиевой нейропротекции может являться снижение концентрации внутриклеточного кальция, содержание которого возрастает в клетках при гипоксических ишемических повреждениях. Прекодиционирование гелием уменьшает кальциевую нагрузку за счет снижения содержания фосфорилированной формы рианодиновых рецепторов второго типа (p-RyR-2), а также подавляет экспрессию Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназы 2-го типа и ряда белков, ассоциированных с некроптозом (RIPK-1, RIPK-3, p-MLKL) [69]. Некроптоз является одним из типов программируемой клеточной гибели, ключевую роль в котором занимают рецептор-связанные протеинкиназы 1 и 3 (RIPK-1, RIPK-3), а также псевдокиназа смешанного происхождения (MLKL) [70]. Иницируют процесс некроптоза рецепторы с доменами смерти, передавая сигнал рецептор-связанным протеинкиназам, которые опосредуют активирующее фосфорилирование MLKL. Фосфорилированные MLKL способны образовывать олигомер, образующий поры в цитоплазматической мембране и вызывающий некроптотическую гибель клеток. Известно, что повышенная кальциевая нагрузка приводит к активации Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых киназ, которые вызывают активацию RIPK-1 [71].

Другим молекулярным механизмом действия гелия является его способность снижать окислительный стресс в нейронах [72]. Гелий увеличивает продукцию NO, что активирует транслокацию фактора транскрипции Nrf-2 в ядро. Nrf-2 является редокс-чувствительным транскрипционным фактором, сигнальный путь которого активирует антиоксидантный ответ клеток [73]. Дополнительно показано, что гелий снижает содержание провоспалительных белков (TNF- α и интерлейкина-1 β) и повышает уровни интерлейкина-10, нейротрофического фактора мозга (BDNF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и фактора роста нервов (NGF), обеспечивая защиту нейронов от воспаления и апоптоза [74].

Гелий способен улучшать функциональное состояние эндотелия, что показано как на испытуемых добровольцах [75], так и на культурах эндотелиальных клеток [76]. Отмечено его влияние на содержание белков кавеолинов в разных тканях. Кавеолины являются компонентами, участвующими в формировании кавеол – впячиваний плазматической мембраны. Структурная организация кавеол позволяет клеткам осуществлять адаптацию к стрессу, регуляцию шаперонов и сигнальных белков [77]. Исследования показывают, что гелий приводит к динамическим изменениям содержания кавеолинов в эндотелии, мозге и сердце [78]. Газ способствует секреции кавеолина-1 из эндотелия, что стабилизирует мембраны и уменьшает проницаемость сосудов. При этом гелий способен увеличивать экспрессию кавеолинов-1 и -3 в сердце крыс, что позволяет использовать этот инертный газ как кардиопротективное средство [79]. Также гелий приводит к увеличению полимеризации F-актина у плазматической мембраны клеток венозного эндотелия и снижает его полимеризацию в артериальном эндотелии [76].

Кардиопротекторное действие гелия может быть снято ибериотоксином – блокатормитохондриальных кальций-чувствительных калиевых каналов [80]. Это позволяет сделать вывод о способности гелия активировать данный тип каналов, что подтверждается снижением индекса контроля дыхания (свидетельствует о расхождении процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях). Гелий предотвращает пермеабиллизацию митохондриальных мембран в сердечной мышце – открытие так называемых пор переходной проницаемости, ассоциированных с апоптозом, что увеличивает выживаемость кардиомиоцитов [81]. Изучается также влияние гелия на фибробласты сердца. Несмотря на отсутствие изменений в экспрессии факторов активации фибробластов и уровне секреции внеклеточных везикул и растворимых факторов, гелий ускорил миграцию фибробластов в модели глюкозной депривации *in vitro* [82]. Однако в случае пациентов, перенесших аортокоронарное шунтирование, гелий не продемонстрировал кардиопротекторного эффекта: пре- и посткондиционирование не повлияло на содержание тропонина в крови и на активность протеинкиназы C-эпсилон, p38, ERK 1/2 и HSP27 [83].

Помимо позитивного влияния на выживаемость кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии, гелий-кислородные смеси способны улучшать функциональное состояние дыхательной системы. Использование подобных ингаляций способствовало улучшению у пациентов с астмой таких спирометрических показателей, как объем форсированного выдоха за первую секунду и максимальная объемная скорость выдоха [84]. Также гелий снизил степень тяжести заболевания по шкале Вуда и частоту дыхательных движений при бронхоспазме [85]. При этом на состояние пациентов с хронической обструктивной болезнью легких ингаляции гелием не повлияли [86].

Проводились исследования влияния гелия на выживаемость нейронов зоны СА-1 гиппокампа при моделировании сердечного приступа у крыс. Однако результаты данных работ противоречивы: показано как наличие эффектов гелия на выраженность апоптоза [78], так и их отсутствие [87]. Предположительно, это может быть связано с различными способами моделирования сердечного приступа с последующей реанимацией, а также с различиями в методах оценки последствий моделирования инфаркта.

Физиологические эффекты гелия представляют большой интерес и являются наиболее парадоксальными, поскольку их специфика не соотносится со стандартной направленностью биологического действия инертных газов. Несмотря на широкий спектр цитопротекторных свойств, механизм молекулярного взаимодействия гелия с его мишенями остается до сих пор неясным. Наглядно показаны многие молекулярные посредники воздействия гелия на выживаемость клеток, однако неизвестны прямые причины их вовлеченности. Например, вызывает вопрос сходимость данных о снижении концентрации внутриклеточного кальция [69] и увеличении содержания NO в гомогенате ткани мозга [71]. Известно, что активность конститутивных NO-синтаз увеличивается в ответ на рост концентрации ионов кальция, а значит, при снижении кальциевой нагрузки следует ожидать, напротив, снижение NO [88]. При этом вызванное гелием увеличение NO в ткани мозга может быть обусловлено активацией любой из трех изоформ NO-синтазы (нейрональной, эндотелиальной или индуцибельной) и соответственно может регулироваться не только посредством изменения уровня кальция, но и на уровне экспрессии, что характерно для индуцибельной NO-синтазы. Вместе с тем повышение концентрации NO может быть связано и со снижением продукции активных форм кислорода, которые участвуют в окислительной инактивации NO. Таким образом, для прояснения картины необходимо продемонстрировать, взаимодействует ли гелий с какой-либо из изоформ NO-синтаз или с другими потенциальными регуляторами. Имеющаяся база литературных данных о физиологических эффектах гелия может служить хорошим фундаментом для дальнейших исследований в этой области.

ЭФФЕКТЫ РАДОНА

Радон является единственным радиоактивным представителем группы инертных газов, что накладывает определенные ограничения на изучение его физиологических эффектов. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, радон способен вызывать рак легких в 3–14% всех случаев в зависимости от его концентрации в атмосфере [<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/radon-and-health> Дата обращения: 30.05.2024]. В то же время радиоактивность радона способствует его относительно широкому применению в физиотерапии.

Радон распределен в атмосфере неравномерно. Пики его концентрации сопряжены с местами эмиссии из урансодержащих горных пород. Радон легко диффундирует из почвы, накапливаясь как в шахтах, так и в жилых домах. Тот факт, что он аккумулируется в горных зонах и пещерах, привел к распространению лечебных курортов и санаториев, использующих радон в спелео- и бальнеотерапии. На базе таких санаториев фиксируется много данных о лечебных эффектах радона, однако двойные слепые плацебо-контролируемые исследования, конечно, не проводятся: для обеспечения всех требований надлежащей клинической практики (GCP) необходимо было бы создать пещеру без радона, полностью аналогичную имеющимся на территории курорта [89]. Вместе с тем существует ряд биомедицинских исследований последних лет, демонстрирующих широкий спектр влияний радона на организм.

Наиболее известный эффект радона – его анальгетическое действие. Исследования на пациентах показали, что радон является значимым обезболивающим средством при ревматоидном артрите, болезни Бехтерева (анкилозирующем спондилите), остеоартрите [90]. Среди потенциальных молекулярных механизмов, опосредующих данный феномен, показано участие трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1), β-эндорфина, адренокортикотропного гормона (АКТГ), а также ряда белков, ассоциированных с воспалением. Продemonстрировано, что радоновая спелеотерапия способствует снижению TGF-β1 у пациентов с болезнью Бехтерева [91]. При остеоартрите применение радоновых ингаляций приводило к острому увеличению концентрации β-эндорфина и отставленному увеличению концентрации β-эндорфина и АКТГ [92]. Несколько исследований

посвящены способности радона снижать содержание в крови пациентов провоспалительных цитокинов TNF- α [93, 94] и IL-18 [95]. Влияние на иммунную систему происходит и на клеточном уровне. Газ подавляет воспаление за счет уменьшения числа нейтрофилов и Т-киллеров, а также увеличения активности эозинофилов, дендритных клеток, моноцитов и Т-регуляторных лимфоцитов (данные группы клеток принимают участие в восстановлении тканевого гомеостаза при хроническом воспалении) [96].

Улучшение состояния пациентов с хроническими заболеваниями опорно-двигательной системы связывают также со снижением интенсивности эрозии костей, опосредованном действием радона [97]. У пациентов после радоновой спелеотерапии зафиксировали уменьшение содержания фрагментов коллагена (СТХ-I) в сыворотке крови, падение уровня гормона жировой ткани висфатина и увеличение количества Т-регуляторных клеток, что сигнализирует об ослаблении резорбции костной ткани. При этом действие радона на такие показатели целостности костной ткани, как уровень паратормона в крови и отношение остеопротегерина к активатору рецептора ядерного фактора κ B (OPG/RANKL), не отличалось от действия безрадоновых ванн [98].

Существуют сообщения о благоприятном влиянии радоновой спелеотерапии на состояние сердечно-сосудистой системы [99]. Радон снижал вариабельность сердечного ритма и при совместном действии с углекислым газом приводил к снижению артериального давления. Зафиксировано также увеличение содержания предсердного натрийуретического пептида и снижение содержания вазопрессина [91]. Эти эффекты потенциально могут быть связанными с гипотензивными свойствами радона.

К позитивным эффектам радона относят и его косвенную антиоксидантную активность: показано, что газ активирует супероксиддисмутазу и каталазу, которые предотвращают перекисное окисление липидов в клетках при окислительном стрессе [100].

Можно заключить, что знания о физиологической активности радона весьма разнообразны, но фрагментарны. Остается неясным, какие рецепторные механизмы и сигнальные каскады лежат в основе изменений в иммунно-эндокринной регуляции и связаны ли эти изменения между собой. Также непонятно, являются ли наблюдаемые эффекты результатом действия непосредственно атомов радона или же радиоактивного облучения. Очевидно, что необходимо проводить больше фундаментальных исследований в этой области, в частности, на лабораторных животных. На данный момент существует несколько таких работ, подтверждающих антиоксидантную активность радона в модели гепатопатии на грызунах [101], а также в мозге интактных животных [102]. Однако дизайн этих экспериментов никак не соотносится с использованием радона при лечении пациентов, и еще не было проведено исследований на лабораторных моделях ревматоидного артрита *in vivo*. Именно эти ограничения важно преодолеть в будущих работах.

ЭФФЕКТЫ КРИПТОНА

Количество публикаций исследований терапевтических свойств криптон-кислородных ингаляций в рецензируемых журналах крайне мало, а имеющиеся результаты характеризуются повышенной неоднородностью. Газ криптон при разном давлении для разных видов животных может вызывать обездвиживание (20–30 атм. для тигровой планарии *Girardia tigrina*, 18–20 атм. для плодовых мушек *Drosophila melanogaster*) или анестезию (14–16 атм. для иглистых тритонов *Pleurodeles waltii*, 5–5.5 атм. для японских перепелов *Coturnix coturnix japonica* и 3–3.5 атм. для человека) [103, 104]. Инкубация крыс в криптон-воздушной среде при высоком давлении приводит к повышению содержания кортизола и прогестерона в крови, снижению общего тироксина, тестостерона, глюкозы и мочевины. Также отмечены спектральные изменения в ЭЭГ человека: при дыхании в нормобарических условиях падение мощности α -, Δ - и θ -волн и увеличение β -волн; при дыхании криптон-кислородной смесью в условиях 2.9 атм.

снижение в α - и β -диапазонах и рост Δ - и θ -составляющих, что свидетельствует о переходе испытуемых в наркоз.

В модели фотоиндуцированного инсульта криптон оказал отставленный нейропротективный эффект, улучшив неврологический статус крыс [105]. Ингаляции криптон-кислородной смесью в данном исследовании привели к уменьшению зоны пенумбры и апоптоза нейронов, снизили количество активных клеток микроглии в зоне некроза и активировали неоангиогенез. Выявлено, что механизм нейропротективного действия криптона связан с увеличением содержания фосфорилированной протеинкиназы В и киназы гликогенсинтазы-3 β , а также с повышением экспрессии Nrf-2 и снижением экспрессии ядерного фактора NF- κ B, ответственного, в частности, за апоптоз. Ингибиторное фосфорилирование киназы гликогенсинтазы-3 β предотвращает повышение проницаемости митохондрий, приводящее к их дисфункции и клеточной гибели вследствие окислительного стресса.

Вопрос о наличии у криптона физиологических эффектов является наиболее спорным. Наблюдается крайне высокая нехватка публикаций в рецензируемых научных изданиях. Результаты, полученные в работе Antonova с соавт., являются многообещающими, но нуждаются в воспроизведении другими коллективами. При этом большинство отчетов и тезисов, найденных в процессе анализа литературы о криптоне, не относятся к рецензируемым источникам. Они заявляют о наличии у криптона целебных свойств, однако характеризуются крайне высоким разнообразием протоколов проведения экспериментов и интерпретации данных, в связи с чем, к сожалению, не вызывают доверия. В результате представляется сложным сделать какую-либо объективную оценку сходимости и достоверности данных разных авторов. В связи с этим в дальнейших исследованиях требуется осуществлять более глубокий и комплексный подход к выявлению и анализу свойств криптона. В перспективе следует провести полноценный скрининг криптона на предмет наличия всех типов фармакологической активности с использованием тест-систем как на клеточных культурах, так и *in vivo*. Таким образом, криптон представляет собой неизученную, но крайне перспективную область для физиологических и фармакологических исследований.

ЭФФЕКТЫ НЕОНА

Среди прочих инертных газов неон демонстрирует минимум или же полное отсутствие собственных физиологических эффектов в нормобарических условиях. Согласно гипотезе Мейера – Овертона, для создания анестетического эффекта с помощью неона необходимо крайне высокое давление (80–90 атм.). Однако подобная гипербарическая аппликация имеет проконвульсантный эффект, вызывая неврологический синдром высокого давления, включающий тремор, миоклонии, дисметрии и прочие двигательные нарушения [3]. Изучение взаимодействия атомов неона с биологическими мембранами показало, что в присутствии газа при высоком давлении (до 100 бар) наблюдается нарушение равномерности расположения молекул фосфолипидов в бислое. Также неон, благодаря своим размерам и массе, обладает повышенной диффузионной способностью. Это свойство позволяет ему свободно мигрировать в мембране и повышать мобильность фосфолипидов, что делает структуру мембраны менее плотной и упорядоченной. Предполагается, что причиной проявления неврологических нарушений является возникновение так называемых «шумов» в целостности мембранных структур, нарушение взаимосвязи между мембраной и встроенными в нее белковыми комплексами [5].

Что касается связывания атомов инертных газов с белковыми молекулами, то и в этом случае размер и масса атома играют решающую роль. Существует гипотеза, что более легкие представители группы инертных газов (гелий и неон) обладают слишком низкой энергией связывания с белками и, следовательно, неспособны оказывать анестетический эффект [106]. В базе данных RCSB (Research Collaboratory for

Structural Biology) на настоящий момент отсутствует упоминание каких-либо белковых структур, с которыми взаимодействует неон (<https://www.rcsb.org/>; дата обращения 29.05.2024). Впрочем, как было сказано выше, гелий, несмотря на его малые размеры, способен модулировать активность множества рецепторов, транскрипционных факторов и провоспалительных белков. Следовательно, известные гипотезы неточно прогнозируют физиологический потенциал инертных газов. Хотя на данный момент нет засвидетельствованных эффектов неона, нельзя с уверенностью заявлять об абсолютном отсутствии у него биологической активности. Впрочем, возможно, что неон окажется единственным истинно инертным газом в своей группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время поиск новых нейро- и органопротекторных факторов является крайне актуальной задачей фундаментальной физиологии и практической медицины. В связи с этим представление о наличии у инертных газов терапевтических свойств, безусловно, вызывает живой интерес в научном и медицинском сообществе. Открытие явной физиологической активности ксенона закономерно привело к изучению других веществ данной группы. Не последнюю роль играют экономические и технические сложности в повсеместном использовании ксенона, заинтересованность в поиске его более дешевых аналогов. Благодаря этому на текущий момент известно, что почти все остальные инертные газы в той или иной мере проявляют биологическую активность (рис. 1). Так, гелий проявляет цитопротекторные свойства, снижая активность некроптоза и окислительного стресса в сердце и мозге, аргон известен своим противовоспалительным и антиапоптотическим действием в различных тканях, а радон – анальгетическим.

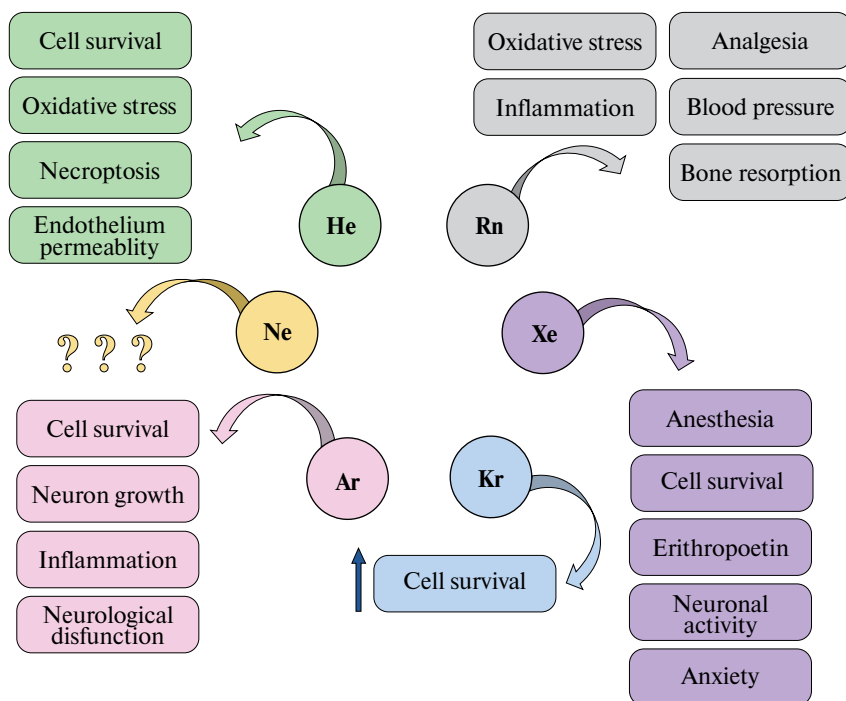


Рис. 1. Эффекты инертных газов, выявленные в экспериментальных работах.

Однако несмотря на растущее количество исследований, посвященных данной проблеме, до сих пор наблюдается существенный разрыв между знаниями о физиологических эффектах инертных газов и механизмах их действия. Так, имеется множество данных о влиянии радона, ксенона, аргона и гелия на метаболические каскады, обуславливающие выживание клеток в различных тканях, но при этом только для ксенона описаны молекулярные мишени, инициирующие запуск физиологических изменений. Помимо этого, наблюдается явный дефицит исследований интегративных (поведенческих, нейроиммunoэндокринных) эффектов инертных газов. Неон и криптон, в свою очередь, представляют собой практически абсолютно неизведанную область в физиологии и фармакологии.

В целом можно заключить, что наличие у инертных газов значительного цитопротекторного потенциала делает их многообещающим объектом для дальнейших доклинических и клинических испытаний, направленных на расширение медицинских показаний к их применению. Вместе с тем работы, нацеленные на изучение инертных газов, являются плодотворной почвой для роста фундаментальных знаний о принципах их действия на человеческий организм, его органы, ткани, клетки.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, обсуждение и редактирование манускрипта (Н. Ю. С. и В. А. Д.), сбор и анализ данных литературы, написание манускрипта (И. А. К. и С. Д. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lazarev NV, Lyublina YI, Madorskaya RY (1948) Narcotic action of xenon. *Fiziol Zh SSSR* 34: 131–134.
2. Lawrence JH, Loomis WF, Tobias CA, Turpin FH (1946) Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils. *J Physiol* 105(3): 197. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1946.sp004164>
3. Koblin DD, Fang Z, Eger EI, Laster MJ, Gong D, Ionescu P, Halsey MJ, Trudell JR (1998) Minimum alveolar concentrations of noble gases, nitrogen, and sulfur hexafluoride in rats: helium and neon as nonimmobilizers (nonanesthetics). *Anesthesia & Analgesia* 87(2): 419–424. <https://doi.org/10.1097/00000539-199808000-00035>
4. Rostain JC, Balon N (2006) Recent neurochemical basis of inert gas narcosis and pressure effects. *Undersea Hyperbar Med* 33(3): 197.
5. Moskovitz Y, Yang H (2015) Modelling of noble anaesthetic gases and high hydrostatic pressure effects in lipid bilayers. *Soft Matter* 11(11): 2125–2138. <https://doi.org/10.1039/c4sm02667e>
6. Prangé T, Schiltz M, Pernot L, Colloc'h N, Longhi S, Bourguet W, Fourme R (1998) Exploring hydrophobic sites in proteins with xenon or krypton. *Proteins: Struct Funct Bioinform* 30(1): 61–73.
7. Winkler DA, Katz I, Farjot G, Warden AC, Thornton AW (2018) Decoding the Rich Biological Properties of Noble Gases: How Well Can We Predict Noble Gas Binding to Diverse Proteins? *ChemMedChem* 13(18): 1931–1938. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800434>

8. *Wiebelhaus N, Singh N, Zhang P, Craig SL, Beratan DN, Fitzgerald MC* (2022) Discovery of the xenon–protein interactome using large-scale measurements of protein folding and stability. *J Am Chem Soc* 144(9): 3925–3938.
<https://doi.org/10.1021/jacs.1c11900>
9. *Winkler DA, Thornton A, Farjot G, Katz I* (2016) The diverse biological properties of the chemically inert noble gases. *Pharmacol Therap* 160: 44–64.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera>
10. *Лазарев НВ* (1941) Биологическое действие газов под давлением. Л.: Медицина. [*Lazarev NV* (1941) Biological effect of gases under pressure. L. Medicina. (In Russ)].
11. *Nakata Y, Goto T, Ishiguro Y, Terui K, Kawakami H, Santo M, Niimi Y, Morita S* (2001) Minimum alveolar concentration (MAC) of xenon with sevoflurane in humans. *J Am Soc Anesthesiol* 94(4): 611–614.
<https://doi.org/10.1097/00000542-200104000-00014>
12. *Pelentritou A, Kuhlmann L, Cormack J, Woods W, Sleight J, Liley D* (2018) Recording brain electromagnetic activity during the administration of the gaseous anesthetic agents xenon and nitrous oxide in healthy volunteers. *J Visual Exp* 131: e56881.
<https://doi.org/10.3791/56881>
13. *Sarasso S, Boly M, Napolitani M, Gosseries O, Charland-Verville V, Casarotto S, Rosanova M, Casali AG, Brichant JF, Boveroux P, Rex S, Tononi G, Laureys S, Massimini M* (2015). Consciousness and complexity during unresponsiveness induced by propofol, xenon, and ketamine. *Current Biol* 25(23): 3099–3105.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.014>
14. *McGuigan S, Evered L, Scott DA, Silbert B, Zetterberg H, Blennow K* (2022) Comparing the effect of xenon and sevoflurane anesthesia on postoperative neural injury biomarkers: a randomized controlled trial. *Med Gas Res* 12(1): 10–17.
<https://doi.org/10.4103/2045-9912.324591>
15. *Yang S, Gu C, Mandeville ET, Dong Y, Esposito E, Zhang Y, Yang G, Shen Y, Fu X, Lo EH, Xie Z* (2017) Anesthesia and Surgery Impair Blood-Brain Barrier and Cognitive Function in Mice. *Front Immunol* 8: 902.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00902>
16. *Nair AS, Christopher A, Pulipaka SK, Suvvari P, Kodisharapu PK, Rayani BK* (2021) Efficacy of xenon anesthesia in preventing postoperative cognitive dysfunction after cardiac and major non-cardiac surgeries in elderly patients: a topical review. *Med Gas Res* 11(3): 110–113.
<https://doi.org/10.4103/2045-9912.314330>
17. *Suzuki T, Koyama H, Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T* (2002) The diverse actions of volatile and gaseous anesthetics on human-cloned 5-hydroxytryptamine₃ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology* 96(3): 699–704.
<https://doi.org/10.1097/00000542-200203000-00028>
18. *Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, Hall AC, Lieb WR* (1998) How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 396(6709): 324.
<https://doi.org/10.1038/24525>
19. *Dickinson R, Peterson BK, Banks P, Simillis C, Martin JC, Valenzuela CA, Maze M, Franks NP* (2007) Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology* 107(5): 756–767.
<https://doi.org/10.1097/01.anes.0000287061.77674.71>
20. *Andriychenko NN, Ermilov AY, Khriachtchev L, Räsänen M, Nemukhin AV* (2015) Toward molecular mechanism of xenon anesthesia: a link to studies of xenon complexes with small aromatic molecules. *J Phys Chem* 119(11): 2517–2521.
<https://doi.org/10.1021/jp508800k>
21. *Sanejouand YH* (2022) At least three xenon binding sites in the glycine binding domain of the N-methyl D-aspartate receptor. *Archiv Biochem Biophys* 724: 109265.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109265>
22. *Armstrong SP, Banks PJ, McKittrick TJ, Geldart CH, Edge CJ, Babla R, Simillis C, Franks NP, Dickinson R* (2012) Identification of two mutations (F758W and F758Y) in the N-methyl-D-aspartate receptor glycine-binding site that selectively prevent competitive inhibition by xenon without affecting glycine binding. *Anesthesiology* 117(1): 38–47.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31825ada2e>
23. *Haseneder R, Kratzer S, Kuchs E, Eckle VS, Zieglgänsberger W, Rammes G* (2008) Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Anesthesiology* 109(6): 998–1006.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31818d6aee>

24. *Nonaka K, Kotani N, Akaike H, Shin MC, Yamaga T, Nagam H, Akaike N* (2019) Xenon modulates synaptic transmission to rat hippocampal CA3 neurons at both pre- and postsynaptic sites. *J Physiol* 597(24): 5915–5933.
<https://doi.org/10.1113/JP278762>
25. *Yamakura T, Harris RA* (2000) Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* 93(4): 1095–1101.
<https://doi.org/10.1097/0000542-200010000-00034>
26. *Franks JJ, Horn JL, Janicki PK, Singh G* (1995) Halothane, isoflurane, xenon, and nitrous oxide inhibit calcium ATPase pump activity in rat brain synaptic plasma membranes. *Anesthesiology* 82(1): 108–117.
<https://doi.org/10.1097/0000542-199501000-00015>
27. *Franks JJ, Wamil AW, Janicki PK, Horn JL, Franks WT, Janson VE, Vanaman TC, Brandt PC* (1998) Anesthetic-induced alteration of Ca^{2+} homeostasis in neural cells: a temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoforms. *Anesthesiology* 89(1): 149–164.
<https://doi.org/10.1097/0000542-199807000-00022>
28. *Kratzer S, Mattusch C, Kochs E, Eder M, Haseneder R, Rammes G* (2012) Xenon attenuates hippocampal long-term potentiation by diminishing synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor currents. *Anesthesiology* 116(3): 673–682.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182475d66>
29. *Alam A, Suen KC, Hana Z, Sanders RD, Maze M, Ma D* (2017) Neuroprotection and neurotoxicity in the developing brain: an update on the effects of dexmedetomidine and xenon. *Neurotoxicol Teratol* 60: 102–116.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.01.001>
30. *Harris K, Armstrong SP, Campos-Pires R, Kiru L, Franks NP, Dickinson R* (2013) Neuroprotection against traumatic brain injury by xenon, but not argon, is mediated by inhibition at the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site. *Anesthesiology* 119(5): 1137–1148.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182a2a265>
31. *Koziaikova M, Harris K, Edge CJ, Franks NP, White IL, Dickinson R* (2019) Noble gas neuroprotection: xenon and argon protect against hypoxic-ischaemic injury in rat hippocampus in vitro via distinct mechanisms. *Br J Anaesthesia* 123(5): 601–609.
<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.07.010>
32. *Campos-Pires R, Hirnet T, Valeo F, Ong BE, Radyushkin K, Aldhoun J, Saville J, Edge CJ, Franks NP, Thal SC, Dickinson R* (2019) Xenon improves long-term cognitive function, reduces neuronal loss and chronic neuroinflammation, and improves survival after traumatic brain injury in mice. *Br J Anaesthesia* 123(1): 60–73.
<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.032>
33. *Lavaur J, Lemaire M, Pype J, Le Nogue D, Hirsch EC, Michel PP* (2016) Xenon-mediated neuroprotection in response to sustained, low-level excitotoxic stress. *Cell Death Discov* 2: 16018.
<https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.18>
34. *Cheng Y, Zhai Y, Yuan Y, Li H, Zhao W, Fan Z, Zhou L, Gao X, Zhan Y, Sun H* (2023) Xenon inhalation attenuates neuronal injury and prevents epilepsy in febrile seizure Sprague-Dawley pups. *Front Cell Neurosci* 17: 1155303.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1155303>
35. *Azzopardi D, Robertson NJ, Kapetanakis A, Griffiths J, Rennie JM, Mathieson SR, Edwards AD* (2013) Anticonvulsant effect of xenon on neonatal asphyxial seizures. *Archives of disease in childhood. Fetal Neonatal Edit* 98(5): F437–F439.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-303786>
36. *Kaufman MJ, Meloni EG, Orareya AN, Paronis CA, Bogin V* (2024) Effects of inhaled low-concentration xenon gas on naltrexone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. *Drug Alcohol Depend* 255: 110967.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2023.110967>
37. *Vengeliene V, Bessiere B, Pype J, Spanagel R* (2014) The effects of xenon and nitrous oxide gases on alcohol relapse. *Alcoholism, Clin Exp Res* 38(2): 557–563.
<https://doi.org/10.1111/acer.12264>
38. *Dobrovolsky A, Ichim TE, Ma D, Kesari S, Bogin V* (2017) Xenon in the treatment of panic disorder: an open label study. *J Translat Med* 15(1): 137.
<https://doi.org/10.1186/s12967-017-1237-1>
39. *Shao J, Meng L, Yang Z, Yu P, Song L, Gao Y, Gong M, Meng C, Shi H* (2020) Xenon produces rapid antidepressant- and anxiolytic-like effects in lipopolysaccharide-induced depression mice model. *Neuroreport* 31(5): 387–393.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001415>

40. Meloni EG, Gillis TE, Manoukian J, Kaufman MJ (2014) Xenon impairs reconsolidation of fear memories in a rat model of post-traumatic stress disorder (PTSD). *PLoS One* 9(8): e106189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106189>
41. Dobrovolsky AP, Gedzun VR, Bogin VI, Ma D, Ichim TE, Sukhanova IA, Malyshev AV, Dubynin VA (2019) Beneficial effects of xenon inhalation on behavioral changes in a valproic acid-induced model of autism in rats. *J Translat Med* 17(1): 400. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02161-6>
42. Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Müllenheim J, Preckel B, Schlack W (2005) The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br J Pharmacol* 144(1): 123–132. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706063>
43. Arola O, Saraste A, Laitio R, Airaksinen J, Hynninen M, Bäcklund M, Ylikoski E, Wennervirta J, Pietilä M, Roine RO, Harjola VP, Niiranen J, Korpi K, Varpula M, Scheinin H, Maze M, Vahlberg T, Laitio T, Xe-HYPOTHECA Study Group (2017) Inhaled Xenon Attenuates Myocardial Damage in Comatose Survivors of Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The Xe-Hypotheca Trial. *J Am Coll Cardiol* 70(21): 2652–2660. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.1088>
44. Saraste A, Ballo H, Arola O, Laitio R, Airaksinen J, Hynninen M, Bäcklund M, Ylikoski E, Wennervirta J, Pietilä M, Roine RO, Harjola VP, Niiranen J, Korpi K, Varpula M, Scheinin H, Maze M, Vahlberg T, Laitio T (2021) Effect of Inhaled Xenon on Cardiac Function in Comatose Survivors of Out-of-Hospital Cardiac Arrest-A Substudy of the Xenon in Combination With Hypothermia After Cardiac Arrest Trial. *Crit Care Explor* 3(8): e0502. <https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000502>
45. Rizvi M, Jawad N, Li Y, Vizcaychipi MP, Maze M, Ma D (2010) Effect of noble gases on oxygen and glucose deprived injury in human tubular kidney cells. *Exp Biol Med* (Maywood, NJ) 235(7): 886–891. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009366>
46. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148(3): 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
47. Stoppe C, Coburn M, Fahlenkamp A, Ney J, Kraemer S, Rossaint R, Goetzenich A (2015) Elevated serum concentrations of erythropoietin after xenon anaesthesia in cardiac surgery: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Br J Anaesth* 114(4): 701–703. <https://doi.org/10.1093/bja/aev060>
48. Dias KA, Lawley JS, Gatterer H, Howden EJ, Sarma S, Cornwell WK 3rd, Hearon CM Jr, Samels M, Everding B, Liang AS, Hendrix M, Piper T, Thevis M, Bruick RK, Levine BD (2019) Effect of acute and chronic xenon inhalation on erythropoietin, hematological parameters, and athletic performance. *J Appl Physiol* (Bethesda, Md. 1985) 127(6): 1503–1510. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00289.2019>
49. Jawad N, Rizvi M, Gu J, Adeyi O, Tao G, Maze M, Ma D (2009) Neuroprotection (and lack of neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. *Neurosci Lett* 460(3): 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.069>
50. David HN, Haelewyn B, Degoulet M, Colomb DG Jr, Risso JJ, Abraini JH (2012) Ex vivo and in vivo neuroprotection induced by argon when given after an excitotoxic or ischemic insult. *PLoS One* 7(2): e30934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030934>
51. Zhao H, Mitchel S, Ciechanowicz S, Savage S, Wang T, Ji X, Ma D (2016) Argon protects against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats through activation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oncotarget* 7(18): 25640–25651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8241>
52. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, Ryang YM, Grottke O, Coburn M (2009) Argon: neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit Care* (London, England) 13(6): R206. <https://doi.org/10.1186/cc8214>
53. Ryang YM, Fahlenkamp AV, Rossaint R, Wesp D, Loetscher PD, Beyer C, Coburn M (2011) Neuroprotective effects of argon in an in vivo model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Crit Care Med* 39(6): 1448–1453. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821209be>
54. Fahlenkamp AV, Coburn M, de Prada A, Gereitzig N, Beyer C, Haase H, Rossaint R, Gempt J, Ryang YM (2014) Expression analysis following argon treatment in an in vivo model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Med Gas Res* 4: 11. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-4-11>

55. Zhuang L, Yang T, Zhao H, Fidalgo AR, Vizcaychipi MP, Sanders RD, Yu B, Takata M, Johnson MR, Ma D (2012) The protective profile of argon, helium, and xenon in a model of neonatal asphyxia in rats. *Crit Care Med* 40(6): 1724–1730.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182452164>
56. Höllig A, Weinandy A, Liu J, Clusmann H, Rossaint R, Coburn M (2016) Beneficial Properties of Argon After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Early Treatment Reduces Mortality and Influences Hippocampal Protein Expression. *Crit Care Med* 44(7): e520–e529.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001561>
57. Antonova VV, Silachev DN, Ryzhkov IA, Lapin KN, Kalabushev SN, Ostrova IV, Varnakova LA, Grebenchikov OA (2022) Three-Hour Argon Inhalation Has No Neuroprotective Effect after Open Traumatic Brain Injury in Rats. *Brain Sci* 12(7): 920.
<https://doi.org/10.3390/brainsci12070920>
58. Ulbrich F, Kaufmann K, Roesslein M, Wellner F, Auwärter V, Kempf J, Loop T, Buerkle H, Goebel U (2015) Argon Mediates Anti-Apoptotic Signaling and Neuroprotection via Inhibition of Toll-Like Receptor 2 and 4. *PloS One* 10(12): e0143887.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143887>
59. Ulbrich F, Lerach T, Biermann J, Kaufmann KB, Lagreze WA, Buerkle H, Loop T, Goebel U (2016) Argon mediates protection by interleukin-8 suppression via a TLR2/TLR4/STAT3/NF-κB pathway in a model of apoptosis in neuroblastoma cells in vitro and following ischemia-reperfusion injury in rat retina in vivo. *J Neurochem* 138(6): 859–873.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13662>
60. Goebel U, Scheid S, Spassov S, Schallner N, Wollborn J, Buerkle H, Ulbrich F (2021) Argon reduces microglial activation and inflammatory cytokine expression in retinal ischemia/reperfusion injury. *Neural Regener Res* 16(1): 192–198.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.290098>
61. Ulbrich F, Schallner N, Coburn M, Loop T, Lagreze WA, Biermann J, Goebel U (2014) Argon inhalation attenuates retinal apoptosis after ischemia/reperfusion injury in a time- and dose-dependent manner in rats. *PloS One* 9(12): e115984.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115984>
62. Scheid S, Lejarre A, Wollborn J, Buerkle H, Goebel U, Ulbrich F (2023) Argon preconditioning protects neuronal cells with a Toll-like receptor-mediated effect. *Neural Regener Res* 18(6): 1371–1377.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.355978>
63. Rubin SM, Lee SY, Ruiz EJ, Pines A, Wemmer DE (2002) Detection and characterization of xenon-binding sites in proteins by ^{129}Xe NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 322(2): 425–440.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00739-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00739-8)
64. Squillace S, Salvemini D (2022) Toll-like receptor-mediated neuroinflammation: relevance for cognitive dysfunctions. *Trends Pharmacol Sci* 43(9): 726–739.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.05.004>
65. Hu Y, Sun X, Wang S, Zhou C, Lin L, Ding X, Han J, Zhou Y, Jin G, Wang Y, Zhang W, Shi H, Zhang Z, Yang X, Hua F (2021) Toll-like receptor-2 gene knockout results in neurobehavioral dysfunctions and multiple brain structural and functional abnormalities in mice. *Brain Behav Immun* 91: 257–266.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.004>
66. Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD (2020) Involvement of TOLL-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism. *Biomed Khim* 66(3): 208–215.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20206603208>
67. De Deken J, Rex S, Lerut E, Martinet W, Monbaliu D, Pirenne J, Jochmans I (2018) Postconditioning effects of argon or xenon on early graft function in a porcine model of kidney autotransplantation. *Br J Surgery* 105(8): 1051–1060.
<https://doi.org/10.1002/bjs.10796>
68. Yarin YM, Amarjargal N, Fuchs J, Haupt H, Mazurek B, Morozova SV, Gross J (2005) Argon protects hypoxia-, cisplatin- and gentamycin-exposed hair cells in the newborn rat's organ of Corti. *Hearing Res* 201(1-2): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.09.015>
69. Zhong W, Cheng J, Yang X, Liu W, Li Y (2023) Heliox Preconditioning Exerts Neuroprotective Effects on Neonatal Ischemia/Hypoxia Injury by Inhibiting Necroptosis Induced by Ca^{2+} Elevation. *Translat Stroke Res* 14(3): 409–424.
<https://doi.org/10.1007/s12975-022-01021-8>
70. Yan J, Wan P, Choksi S, Liu ZG (2022) Necroptosis and tumor progression. *Trends Cancer* 8(1): 21–27.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.09.003>
71. Nomura M, Ueno A, Saga K, Fukuzawa M, Kaneda Y (2014) Accumulation of cytosolic calcium induces necroptotic cell death in human neuroblastoma. *Cancer Res* 74(4): 1056–1066.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1283>

72. Li Y, Liu K, Kang ZM, Sun XJ, Liu WW, Mao YF (2016) Helium preconditioning protects against neonatal hypoxia-ischemia via nitric oxide mediated up-regulation of antioxidases in a rat model. *Behav Brain Res* 300: 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.001>
73. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L (2020) An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* (Basel, Switzerland) 25(22): 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
74. Li Y, Zhang P, Liu Y, Liu W, Yin N (2016) Helium preconditioning protects the brain against hypoxia/ischemia injury via improving the neurovascular niche in a neonatal rat model. *Behav Brain Res* 314: 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.015>
75. Smit KF, Oei GTML, Brevoord D, Stroes ES, Nieuwland R, Schlack WS, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B (2013) Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo. *Anesthesiology* 118(1): 95–104. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182751300>
76. Smit KF, Konkel M, Kerindongo R, Landau MA, Zuurbier CJ, Hollmann MW, Preckel B, Nieuwland R, Albrecht M, Weber NC (2018) Helium alters the cytoskeleton and decreases permeability in endothelial cells cultured in vitro through a pathway involving Caveolin-1. *Scient Rep* 8(1): 4768. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23030-0>
77. Weber NC, Preckel B (2019) Gaseous mediators: an updated review on the effects of helium beyond blowing up balloons. *Intens Care Med* 7(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0288-4>
78. Aehling C, Weber NC, Zuurbier CJ, Preckel B, Galmbacher R, Stefan K, Hollmann MW, Popp E, Knapp J (2018) Effects of combined helium pre/post-conditioning on the brain and heart in a rat resuscitation model. *Acta Anaesthesiol Scand* 62(1): 63–74. <https://doi.org/10.1111/aas.13041>
79. Flick M, Albrecht M, Oei GTML, Steenstra R, Kerindongo RP, Zuurbier CJ, Patel HH, Hollmann MW, Preckel B, Weber NC (2016) Helium postconditioning regulates expression of caveolin-1 and -3 and induces RISK pathway activation after ischaemia/reperfusion in cardiac tissue of rats. *Eur J Pharmacol* 791: 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.012>
80. Heinen A, Huhn R, Smeele KM, Zuurbier CJ, Schlack W, Preckel B, Weber NC, Hollmann MW (2008) Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive potassium channel activation. *Anesthesiology* 109(5): 830–836. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181895aa0>
81. Pagel PS, Krolkowski JG, Shim YH, Venkatapuram S, Kersten JR, Weihrauch D, Warltier DC, Pratt PF Jr (2007) Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo. *Anesthesia and Analgesia* 105(3): 562–569. <https://doi.org/10.1213/01.anc.0000278083.31991.36>
82. Jelemenský M, Kováčsházi C, Ferenczyová K, Hofbauerová M, Kiss B, Pállinger É, Kittel Á, Sayour VN, Görbe A, Pelyhe C, Hambalkó S, Kindernay L, Barančík M, Ferdinandy P, Barteková M, Giricz Z (2021) Helium Conditioning Increases Cardiac Fibroblast Migration Which Effect Is Not Propagated via Soluble Factors or Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 22(19): 10504. <https://doi.org/10.3390/ijms221910504>
83. Smit KF, Brevoord D, De Hert S, de Mol BA, Kerindongo RP, van Dieren S, Schlack WS, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B (2016) Effect of helium pre- or postconditioning on signal transduction kinases in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Transl Med* 14(1): 294. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1045-z>
84. Motamed H, Forouzan A, Masoumi K, Sajadi R (2022) The effect of albuterol with heliox versus albuterol nebulization in acute asthma exacerbation: a randomized controlled clinical trial. *Advanc Respirat Med* 90(1): 86–93. <https://doi.org/10.5603/ARM.a2022.0009>
85. Nascimento MS, Santos É, Prado CD (2018) Helium-oxygen mixture: clinical applicability in an intensive care unit. *Einstein* (Sao Paulo, Brazil) 16(4): eAO4199. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2018AO4199
86. Collins EG, Jelinek C, O'Connell S, Butler J, McBurney C, Gozali C, Reda D, Laghi F (2014) Contrasting breathing retraining and helium-oxygen during pulmonary rehabilitation in COPD: a randomized clinical trial. *Respirat Med* 108(2): 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.10.023>

87. Zuercher P, Springe D, Grandgirard D, Leib SL, Grossholz M, Jakob S, Takala J, Haenggi M (2016) A randomized trial of the effects of the noble gases helium and argon on neuroprotection in a rodent cardiac arrest model. *BMC Neurol* 16: 43.
<https://doi.org/10.1186/s12883-016-0565-8>
88. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7): 829–837d.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
89. Maier A, Wiedemann J, Rapp F, Papenfuß F, Rödel F, Hehlhans S, Gaipf US, Kraft G, Fournier C, Frey B (2020) Radon Exposure-Therapeutic Effect and Cancer Risk. *Int J Mol Sci* 22(1): 316.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010316>
90. Annegret F, Thomas F (2013) Long-term benefits of radon spa therapy in rheumatic diseases: results of the randomised, multi-centre IMuRa trial. *Rheumatol Int* 33(11): 2839–2850.
<https://doi.org/10.1007/s00296-013-2819-8>
91. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Demirtas D, Richter D, Hubmann R, Boeck P, Leiner G, Falkenbach A (2006) Effect of combined spa-exercise therapy on circulating TGF-beta1 levels in patients with ankylosing spondylitis. *Wiener Klin Wochenschrift* 118(9-10): 266–272.
<https://doi.org/10.1007/s00508-006-0560-y>
92. Yamaoka K, Mitsunobu F, Hanamoto K, Mori S, Tanizaki Y, Sugita K (2004) Study on biologic effects of radon and thermal therapy on osteoarthritis. *J Pain* 5(1): 20–25.
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2003.09.005>
93. Dischereit G, Neumann N, Müller-Ladner U, Kürten B, Lange U (2014) The impact of serial low-dose radon hyperthermia exposure on pain, disease activity and pivotal cytokines of bone metabolism in ankylosing spondylitis – a prospective study. *Aktuelle Rheumatol* 39(05): 304–309.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1384554>
94. Lange U, Dischereit G, Turner I, Frommer K, Neumann E, Müller-Ladner U, Kürten B (2016) The impact of serial radon and hyperthermia exposure in a therapeutic adit on pivotal cytokines of bone metabolism in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 35(11): 2783–2788.
<https://doi.org/10.1007/s10067-016-3236-7>
95. Kullmann M, Rühle PF, Harrer A, Donaubauer A, Becker I, Sieber R, Klein G, Fournier C, Fietkau R, Gaipf US, Frey B (2019) Temporarily increased TGFβ following radon spa correlates with reduced pain while serum IL-18 is a general predictive marker for pain sensitivity. *Radiat Environment Biophys* 58(1): 129–135.
<https://doi.org/10.1007/s00411-018-0768-z>
96. Rühle PF, Wunderlich R, Deloch L, Fournier C, Maier A, Klein G, Fietkau R, Gaipf US, Frey B (2017) Modulation of the peripheral immune system after low-dose radon spa therapy: Detailed longitudinal immune monitoring of patients within the RAD-ON01 study. *Autoimmunity* 50(2): 133–140.
<https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1284819>
97. Cucu A, Shreder K, Kraft D, Rühle PF, Klein G, Thiel G, Frey B, Gaipf US, Fournier C (2017) Decrease of Markers Related to Bone Erosion in Serum of Patients with Musculoskeletal Disorders after Serial Low-Dose Radon Spa Therapy. *Front Immunol* 8: 882.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00882>
98. Winklmayr M, Kluge C, Winklmayr W, Küchenhoff H, Steiner M, Ritter M, Hartl A (2015) Radon balneotherapy and physical activity for osteoporosis prevention: a randomized, placebo-controlled intervention study. *Radiat Environment Biophys* 54(1): 123–136.
<https://doi.org/10.1007/s00411-014-0568-z>
99. Rühle PF, Klein G, Rung T, Tjep Phan H, Fournier C, Fietkau R, Gaipf US, Frey B (2019) Impact of radon and combinatory radon/carbon dioxide spa on pain and hypertension: Results from the explorative RAD-ON01 study. *Modern Rheumatol* 29(1): 165–172.
<https://doi.org/10.1080/14397595.2018.1442640>
100. Yamaoka K, Mitsunobu F, Hanamoto K, Shibuya K, Mori S, Tanizaki Y, Sugita K (2004) Biochemical comparison between radon effects and thermal effects on humans in radon hot spring therapy. *J Radiat Res* 45(1): 83–88.
<https://doi.org/10.1269/jrr.45.83>
101. Kataoka T, Nishiyama Y, Yamato K, Teraoka J, Morii Y, Sakoda A, Ishimori Y, Taguchi T, Yamaoka K (2012) Comparative study on the inhibitory effects of antioxidant vitamins and radon on carbon tetrachloride-induced hepatopathy. *J Radiat Res* 53(6): 830–839.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrs057>
102. Kataoka T, Etani R, Kanzaki N, Kobashi Y, Yunoki Y, Ishida T, Sakoda A, Ishimori Y, Yamaoka K (2017) Radon inhalation induces manganese-superoxide dismutase in mouse brain via nuclear factor-κB activation. *J Radiat Res* 58(6): 887–893.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx048>

103. Куссмауль АР, Богачева МА, Шкурят ТП, Павлов БН (2007) Влияние дыхательных сред, содержащих ксенон и криптон, на клинко-биохимические показатели крови животных. Авиакосм экол мед 41(2): 60–63. [Kussmaul AR, Bogacheva MA, Shkurat TP, Pavlov BN (2007) Effects of xenon and krypton-containing breathing mixtures on clinical and biochemical blood indices in animals. Aviakosm Ekol Med 41(2): 60–64. (In Russ)].
104. Куссмауль АР, Гурьева ТС, Дадашева ОА, Павлов НБ, Павлов БН (2008) Влияние газовой среды, содержащей криптон, на эмбриональное развитие японского перепела. Авиакосм экол мед 42(1): 41–43. [Kussmaul AR, Gur'eva TS, Dadasheva OA, Pavlov NB, Pavlov BN (2008) Effect of krypton-containing gas mixture on Japanese quail embryo development. Aviakosm Ekol Med 42(1): 41–44. (In Russ)].
105. Antonova VV, Silachev DN, Plotnikov EY, Pevzner IB, Yakupova EI, Pisarev MV, Boeva EA, Tsokolaeva ZI, Lyubomudrov MA, Shumov IV, Grechko AV, Grebenchikov OA (2024) Neuroprotective Effects of Krypton Inhalation on Photothrombotic Ischemic Stroke. Biomedicines 12(3): 635. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030635>
106. Trudell JR, Koblin DD, Eger EI 2nd (1998) A molecular description of how noble gases and nitrogen bind to a model site of anesthetic action. Anesthesia and analgesia 87(2): 411–418. <https://doi.org/10.1097/00000539-199808000-00034>

Therapeutic Effects of Noble Gases

I. A. Kabiolskiy^a, S. D. Simonenko^a, N. U. Sarycheva^a, and V. A. Dubynin^a

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* e-mail: ilyakab1999@gmail.com

Since the last century it has been known that inert gases can cause a range of physiological effects. The biological activity of inert gases is an extremely multifaceted phenomenon. Despite the similarity of most physical and chemical characteristics, they are able to affect many organs and tissues by interacting with a variety of protein targets. Currently, it is known that xenon, krypton and argon are capable of changing the functional state of the central nervous system and correcting some psychoemotional disorders. In addition, they influence the processes of apoptosis and cellular response to stress. Noble gases affect the state of the immune system and various parameters of homeostasis. The cytoprotective effects of helium on the cardiovascular and respiratory systems have also been convincingly demonstrated. Thus, noble gases are currently being considered as potential means of correcting various diseases.

This review is devoted to the analysis of literature data on the physiological effects of noble gases identified in biomedical studies on patients, as well as in cell culture and *in vivo* models. Each chapter of the review is devoted to a particular gas of this group, starting with the most studied ones. For each of the noble gases (helium, neon, argon, krypton, xenon and radon) their physiological activity, the possibility of using these substances in medicine and some known mechanisms of their action are considered. Moreover, in the review existing data were critically analyzed and key gaps that need to be filled in future research were identified.

Keywords: noble gases, neuroprotection, organoprotection, xenon, argon, helium

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

**ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ В МОТОРНЫХ
СИНАПСАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ – ТРИГГЕРЫ И МОДУЛЯТОРЫ
НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ**

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

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

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 04.09.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Запуск быстрой синхронной квантовой секреции нейротрансмиттеров в центральных и периферических синапсах обеспечивается за счет локального возрастания концентрации ионов Ca^{2+} в нервных терминалях около Ca^{2+} -сенсоров синаптических везикул в ответ на деполяризацию пресинаптической мембраны распространяющимся по аксону потенциалом действия. Вход ионов Ca^{2+} снаружи через пресинаптические потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы $\text{Ca}_v2.1$ или $\text{Ca}_v2.2$ (P/Q- или N-типа) – основной способ формирования динамического Ca^{2+} -сигнала, запускающего процесс экзоцитоза синаптических везикул практически во всех типах химических синапсов и способного индуцировать развитие определенных Ca^{2+} -зависимых форм синаптической пластичности. Однако в последние годы стало очевидным, что набор источников и спектр пресинаптических Ca^{2+} -сигналов весьма разнообразен. Выявление спектра регуляторных Ca^{2+} -входов, работающих в комплексе с соответствующими им мишенями, описание их вклада в механизмы, управляющие квантовой секрецией нейротрансмиттера, представляет собой актуальное направление современной синаптической физиологии. Среди таких дополнительных к триггерному Ca^{2+} -входов особый интерес представляют Ca^{2+} -каналы L-типа, роль и условия активации которых в нервно-мышечных синапсах малоизучены и не дают однозначного представления о месте этого Ca^{2+} -входа в регуляции секреции ацетилхолина в моторных синапсах позвоночных. Данный обзор систематизирует имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований многообразной функциональной роли потенциал-управляемых Ca^{2+} -каналов в нервно-мышечных синапсах млекопитающих и пресинаптических сигнальных путях, контролирующих эти Ca^{2+} -входы, и их участие в процессах тонкой настройки квантовой секреции ацетилхолина.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, Ca^{2+} -каналы P/Q-типа, Ca^{2+} -каналы L-типа, квантовая секреция, ацетилхолин

DOI: 10.31857/S0869813924100044, **EDN:** VRWHWE

ВВЕДЕНИЕ

Исключительная роль ионов Ca^{2+} , входящих снаружи в нервные терминалы синапсов и приводящих к выбросу нейротрансмиттера, впервые была обнаружена в нервно-мышечных синапсах (НМС) [1]. В настоящее время вход ионов Ca^{2+} через определен-

ные пресинаптические потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы известен как специфический триггерный сигнал, запускающий процесс экзоцитоза синаптических везикул во всех типах химических синапсов [2, 3]. К концу XX века стало очевидным, что набор источников и спектр внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов в нейронах и других клетках весьма разнообразен. В постсинаптических структурах синапсов ЦНС подробно описана пространственно-временная организация Ca^{2+} -сигналов, их мишени и влияния на разные режимы синаптической передачи [4, 5]. В то же время в пресинаптических нервных окончаниях подобные явления до сих пор остаются малоизученными.

В настоящее время известны примеры Ca^{2+} -зависимой пресинаптической пластичности, такие как Ca^{2+} -зависимое облегчение, депрессия, посттетаническая потенция [6, 7]. Однако источники регуляторного Ca^{2+} в таких случаях часто остаются неясными либо – по умолчанию – приписываются Ca^{2+} , входящему в нервные терминали по основному, триггерному Ca^{2+} -входу – в случае моторных синапсов млекопитающих это Ca^{2+} -каналы P/Q-типа [8]. Между тем в последние годы идентифицирован целый ряд других путей и возможностей локального повышения уровня Ca^{2+} в нервных терминалах. Это и активность разнообразных пресинаптических потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, отличных от триггерного Ca^{2+} -входа [9, 10], и пресинаптические Ca^{2+} -проводящие ионотропные хеморецепторы [11, 12], и выброс Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо по каналам рианодиновых (РиР) или IP_3 -рецепторов [13]. Как правило, такие Ca^{2+} -входы рассматривают как вспомогательный источник ионов Ca^{2+} для усиления триггерного Ca^{2+} -сигнала в терминалах. Способны ли такие Ca^{2+} -входы обеспечивать определенную регуловку параметров квантовой секреции нейротрансмиттера как в сторону ее усиления, так и торможения – остается малоизученным. Выявление спектра регуляторных Ca^{2+} -входов, работающих в комплексе с соответствующими им мишенями, условий их вовлечения в управление квантовой секрецией нейротрансмиттера, установление механизмов, лежащих в основе их регуляторного влияния, безусловно, представляет собой актуальное направление современной синаптической физиологии.

Несмотря на имеющиеся попытки описания ряда пресинаптических Ca^{2+} -входов и мишеней ионов Ca^{2+} в нервных терминалах синапсов в ЦНС [14–16], наиболее удобной моделью для решения проблемы являются периферические НМС – благодаря их крупным размерам, изолированной локализации на мышечных волокнах и доступности пресинаптических процессов для электрофизиологических экспериментов [17].

В настоящее время в моторных нервных терминалах млекопитающих, наряду с триггерным для экзоцитоза синаптических везикул Ca^{2+} -входом (потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы P/Q-типа), описан ряд других потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [18–20]. Среди них особый интерес представляют «медленные» Ca^{2+} -каналы L-типа, чьи условия активации и модуляторная роль в отношении нервно-мышечной передачи неоднозначны и продолжают интенсивно изучаться.

ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ Ca^{2+} -КАНАЛЫ

Ca^{2+} -проводимость в нервных терминалах синапсов активируется в ответ на депolarизацию пресинаптической мембраны распространяющимся по аксону потенциалом действия (ПД). Каналы, обеспечивающие такую проводимость, относятся к семейству потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов (Ca_v).

В нервных терминалах синапсов в ЦНС и на периферии описана экспрессия нескольких типов Ca_v , которые отличаются по молекулярной структуре, функциональным свойствам, регуляции, локализации и влияниям на секрецию нейротрансмиттеров. Если рассматривать Ca_v безотносительно паттерна экспрессии и локализации именно в пресинаптической мембране нервных окончаний, то их традиционно делят на две группы.

Первая группа – высокопороговые Ca_v , активирующиеся (переходящие в открытое состояние) при низких значениях мембранного потенциала (МП) (HVA – high voltage activated). Им требуется значительная деполяризация мембраны по сравнению с потенциалом покоя (ПП) для их активации. К ним относят L-тип ($\text{Ca}_v1.1$ – 1.4), P/Q-тип ($\text{Ca}_v2.1$), N-тип ($\text{Ca}_v2.2$) и R-тип ($\text{Ca}_v2.3$) потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [3, 7, 21].

Вторая группа – единственный T-тип Ca^{2+} -каналов ($\text{Ca}_v3.1$ – 3.3) – низкопороговый (LVA – low voltage activated). Эти каналы активируются при незначительных деполяризующих сдвигах МП, близких к ПП, демонстрируют быструю кинетику срабатывания воротного механизма и обладают малой унитарной проводимостью. LVA-каналы играют главную роль в реализации нейрональной пейсмейкерной активности, развитии эпилепсии и проведении болевых сигналов [22].

На рубеже XX–XXI веков было установлено, что у млекопитающих каналообразующие $\alpha 1$ -субъединицы Ca_v кодируются 10 отдельными генами, разделяемыми на три отдельных подсемейства по сходству последовательностей. Основываясь на генетических данных, в современной физиологии Ca_v также делят на 3 группы – Ca_v1 , Ca_v2 и Ca_v3 [3, 21, 23]. Несмотря на определенные нюансы, такое деление на три группы справедливо и для беспозвоночных [24].

Исследование потенциал-активируемых Ca^{2+} -токов и опосредующих их каналов на многочисленных объектах показало, что простое разделение потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов на LVA и HVA достаточно искусственно и в малой степени отражает фактическое положение дел. Реально существует континуум порогов активации среди различных подтипов Ca_v , который меняется в зависимости от результата альтернативного сплайсинга основной каналообразующей $\alpha 1$ -субъединицы в конкретных клетках и дополнительно модифицируется в результате комбинирования изоформ вспомогательных субъединиц β , $\alpha 2\delta$ и γ , взаимодействующих с $\alpha 1$. Это в конечном итоге способно приводить к различным физиологическим проявлениям, включая модулирование синаптической передачи [25–27]. Тем не менее буквенные варианты обозначений Ca_v до сих пор продолжают употребляться для подчеркивания функциональной специфики.

На пресинаптической мембране могут быть представлены разные типы Ca_v , при этом в разных синапсах плотность и степень их участия в определенных режимах функционирования нервных терминалей выражены по-разному. Наиболее типичными для центральных синапсов в качестве триггеров экзоцитоза синаптических везикул являются HVA-каналы N- и P/Q-типов, тогда как у периферических синапсов амфибий в качестве такого триггера задействован N-тип, а у млекопитающих – P/Q-тип Ca^{2+} -каналов [28, 29].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Ca^{2+} -КАНАЛОВ

Основная каналообразующая $\alpha 1$ -субъединица Ca_v -каналов

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы представляют собой мультисубъединичный комплекс, состоящий из основной каналообразующей субъединицы $\alpha 1$ с дополнительными субъединицами (за исключением Ca_v3 , образующих канал без участия дополнительных субъединиц) [30, 31]. Субъединица $\alpha 1$ (190–250 кДа) является самой большой и включает в себя структуры, образующие проводящую ионы Ca^{2+} пору, сенсор напряжения и воротный механизм, а также большинство специфических участков, обеспечивающих широкий спектр регуляторных влияний на работу канала со стороны вторичных посредников, фармакологических агентов и токсинов.

Топологическая организация субъединицы $\alpha 1$, состоящей из примерно 2000 аминокислотных остатков, представляет собой 4 гомологичных домена (I–IV). Каждый из доменов состоит из 6 трансмембранных α -спиралей (S1 – S6) и неспирализованной P-петли между S5 и S6. Сенсор потенциала S4 содержит последовательности из 4–5

положительно заряженных аминокислотных остатков аргинина или лизина, разделенных трехаминокислотными интервалами. Положительные заряды в составе S4 находятся во взаимодействии с «противозарядами» (негативно заряженные и полярные аминокислотные остатки) в составе S1 – S3, образуя совместно потенциал-чувствительный домен [32, 33]. Р-петли выстилают пору и содержат в определенных местах негативно заряженные аминокислотные остатки (в основном глутамат), формирующие ионоселективный фильтр канала.

Конформационные изменения S5 и S6, индуцированные в ответ на деполяризацию мембраны транслокацией во внешний листок плазмалеммы S4 в составе потенциал-чувствительного домена, обеспечивают непосредственное функционирование воротного механизма Ca_v [33]. Обширные внутриклеточные неспирализованные участки $\alpha 1$ -субъединицы – направленные в цитоплазму N- и C-концы, междоменные петли – служат своеобразной сигнальной платформой для модулирования Ca^{2+} -токов и в конечном итоге Ca^{2+} -зависимой регуляции синаптической передачи.

Вспомогательные субъединицы Ca_v -каналов

Свойства $\text{Ca}_v 1$ и $\text{Ca}_v 2$ модулируются вспомогательными субъединицами, зачастую обеспечивая различные роли этих типов каналов в секреции нейротрансмиттеров.

β -субъединицы Ca_v – результат экспрессии 4 отдельных генов. Это цитоплазматические модуляторы функций Ca_v , регулирующие как количество каналов на мембране клетки, так и их потенциал-зависимую активацию и инактивацию [34, 35]. β -субъединицы взаимодействуют с $\alpha 1$ -субъединицами за счет наличия у последних специального участка на внутриклеточной петле между I и II доменами.

Субъединицы $\alpha 2\delta$ – результат посттрансляционного процессинга продукта одного из 4 генов, кодирующих препробелок, в результате протеолиза которого образуются $\alpha 2$ и δ , соединенные дисульфидным мостиком. За счет гликозилфосфатидилинозитольного якоря $\alpha 2\delta$ взаимодействуют с внешним листом плазмалеммы и одновременно связываются с первой внеклеточной петлей домена I $\alpha 1$ -субъединиц $\text{Ca}_v 1$ и $\text{Ca}_v 2$. $\alpha 2\delta$ -субъединицы могут регулировать активацию и инактивацию Ca_v , а также не просто их плотность на поверхности клеток (вместе с β -субъединицами), но и траффик Ca_v в специфические мембранные домены нейронов, включая пресинаптическую мембрану [36, 37]. Кроме того, $\alpha 2\delta$ могут обеспечивать трансинаптические взаимодействия с белками постсинаптической мембраны, включая рецепторы к нейротрансмиттерам [38, 39], и определять уровень вероятности выброса нейротрансмиттера в синапсах ЦНС [40].

γ -субъединица является неотъемлемым компонентом $\text{Ca}_v 1.1$, но не пресинаптических $\text{Ca}_v 2.1$ и $\text{Ca}_v 2.2$ [21].

Таким образом, ансамбль дополнительных субъединиц Ca_v , хотя и модулирует функциональные характеристики Ca^{2+} -каналов, но ключевые фармакологические и физиологические различия Ca_v обусловлены преимущественно различиями в структуре изоформ их $\alpha 1$ -субъединиц.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Ca^{2+} -КАНАЛОВ В АКТИВНЫХ ЗОНАХ МОТОРНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЕЙ

Начиная с 60-х годов XX столетия стало известно, что в НМС и всех других химических синапсах квантовая секреция нейротрансмиттера происходит в специализированных регионах пресинаптической мембраны – активных зонах [41, 42]. Набор специфически взаимодействующих белков активных зон обеспечивает не только рекрутирование, докинг, прайминг синаптических везикул и их последующий экзоцитоз, но и позиционирование Ca_v в непосредственной близости от везикул и точное распо-

ложение пре- и постсинаптических структур друг напротив друга, а также участвует в реализации пресинаптической пластичности [43, 44].

Активные зоны НМС млекопитающих организованы в виде коротких (80–100 нм) линейных рядов, образованных синаптическими везикулами и внутримембранными частицами (ионными каналами и др.). В каждой активной зоне экзоцитоз синаптических везикул происходит в местах их докинга, а по бокам от них расположены ряды из примерно 20 трансмембранных частиц, часть из которых считается Ca_v [45]. Таким образом, в активных зонах НМС млекопитающих Ca_v расположены по обоим сторонам докированных синаптических везикул, в отличие от НМС лягушки, где ряды частиц в активных зонах значительно длиннее (1–2 мкм), а Ca_v располагаются только с одной стороны от синаптических везикул [46]. Эксперименты с использованием высокочастотной стимуляции показали, что в НМС мыши число докированных синаптических везикул, отражающих максимально возможный размер пула везикул, готовых к выбросу (RRP – readily-releasable pool), составляет около 1700 [47]. Учитывая, что зрелый НМС мыши содержит примерно 900 активных зон [29, 48], эти данные подтверждают предположения, полученные с помощью электронно-микроскопических методов, о наличии в каждой активной зоне моторных синапсов млекопитающих двух синаптических везикул, потенциально готовых к экзоцитозу.

Слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной может происходить и в отсутствие электрической стимуляции мембраны (спонтанная секреция), и в течение миллисекунд после достижения потенциала действия нервной терминали (быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера) или в течение десятков секунд после стимуляции (асинхронный выброс). Все эти паттерны секреции нейротрансмиттеров по-разному зависят от изменения внутритерминальной концентрации ионов Ca^{2+} и функционирования определенных Ca^{2+} -входов [49–51]. В подавляющем большинстве химических синапсов, включая нервно-мышечные, основными (триггерными) Ca^{2+} -входами, обеспечивающими быстрый синхронный выброс нейротрансмиттера, служат Ca^{2+} -каналы семейства Ca_v2 – $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-тип) и $\text{Ca}_v2.2$ (N-тип) и в меньшей степени – $\text{Ca}_v2.3$ (R-тип). Ключевая роль единичной изоформы Ca_v2 для запуска выброса нейротрансмиттеров показана и в НМС беспозвоночных (*Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*) [37, 52, 53], несмотря на ее определенные структурно-функциональные отличия от изоформ Ca_v2 позвоночных животных [24].

ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ Ca^{2+} -КАНАЛЫ P/Q-ТИПА ($\text{Ca}_v2.1$) И ИХ РОЛЬ В НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ

Свое название Ca^{2+} -каналы P/Q-типа получили после описания токсинов пауков, блокирующих Ca^{2+} -токи, опосредуемые Ca^{2+} -каналами в клетках Пуркинье (P-тип) или в гранулярных клетках мозжечка (Q-тип) [54, 55]. Ca^{2+} -токи, чувствительные к этим токсинам, обеспечивают вызванную синаптическую активность не только во многих синапсах ЦНС, но и в НМС млекопитающих. В них селективный блокатор $\text{Ca}_v2.1$ ω -агатоксин IVA способен полностью терминировать быструю синхронную многоквантовую секрецию АХ [56, 57]. Оба Ca^{2+} -тока P- и Q-типа развиваются при срабатывании Ca_v с основной порообразующей субъединицей $\alpha 1A$, кодируемой одним геном *CACNA1A*. Разделение токов (и каналов) на P- и Q-типы может быть результатом комбинирования $\alpha 1A$ -субъединицы с различными изоформами $\text{Ca}_v\beta$ -субъединиц [58]. В НМС мыши доминирующей изоформой β -субъединицы, взаимодействующей с $\alpha 1A$ $\text{Ca}_v2.1$, является $\beta 4$ [59].

Еще одним фактором, обеспечивающим экспрессию широкого спектра $\text{Ca}_v2.1$ -токов (которые сейчас называют P/Q-типом) с разными биофизическими и фармаколо-

гическими характеристиками, является альтернативный сплайсинг гена, кодирующего $\alpha 1A$ -субъединицу $Ca_v2.1$ [60].

Роль субъединицы $\alpha 1A$ Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в их активности

Об исключительной функциональной важности именно $\alpha 1A$ -субъединицы по сравнению с дополнительными в составе гетеромультимерных комплексов Ca^{2+} -каналов P/Q-типа для обеспечения нервно-мышечной передачи свидетельствуют данные о неврологических повреждениях (прогрессирующей атаксии и дистонии) у мышей с нокаутом гена $\alpha 1A$ -субъединицы. Это сопровождалось значительными нарушениями синаптической передачи и смерти в течение нескольких недель после рождения, несмотря на компенсаторное участие в поддержании быстрой синхронной секреции квантов АХ со стороны других типов Ca_v [61, 62].

$\alpha 1A$ -субъединицы P/Q-типа Ca^{2+} -каналов моторных синапсов являются ключевой мишенью аутоантител при миастеническом синдроме Ламберта – Итона. Характерной особенностью патогенеза этого заболевания является не просто уменьшение поступления ионов Ca^{2+} в моторное нервное окончание, но и дезорганизация там активных зон, сопровождающаяся изменением сопряжения триггерного Ca^{2+} -входа и синаптических везикул. Это, учитывая нелинейность Ca^{2+} -зависимости быстрой синхронной секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах, крайне негативно сказывается на нервно-мышечной передаче [42, 63, 64].

Ключевая роль $Ca_v2.1$ в обеспечении секреции нейротрансмиттеров не только в качестве триггерного Ca^{2+} -входа, но и как участника формирования и функционирования активных зон показана не только при каналопатиях и аутоиммунных воздействиях на этот тип Ca_v , но и по результатам протеомного анализа. Количественная протеомика свидетельствует, что пресинаптический интерактом (паттерн взаимодействия белков) Ca_v2 образует так называемое наноокружение и насчитывает около 200 белков, хотя не все из них связаны с Ca_v2 напрямую [65].

Именно такая эволюционно консервативная тесная ассоциация Ca_v2 с определенными белками активных зон обеспечивает при открывании этих каналов в ответ на приход ПД регулируемый быстрый экзоцитоз синаптических везикул, что будет рассмотрено далее.

Связь Ca^{2+} -каналов P/Q-типа с белками докинга и прайминга синаптических везикул

Белки, взаимодействующие с везикулярными малыми ГТФазами Rab3 (RIMs – Rab3-interacting molecules), являются одними из ключевых факторов активных зон, обеспечивающими не только докинг и прайминг синаптических везикул. Они также связываются посредством своих PDZ-доменов с консервативным аминокислотным мотивом на цитоплазматическом С-конце $\alpha 1A$ -субъединицы $Ca_v2.1$ [66]. Такое взаимодействие является необходимым для рекрутирования в активные зоны $Ca_v2.1$ и их правильного позиционирования, определяя там их плотность. Помимо прямого взаимодействия, RIMs также контактируют с $Ca_v2.1$ опосредованно, за счет взаимодействия с RIM-связывающими белками, которые связываются с богатыми пролином участками на С-конце субъединицы $\alpha 1A$ $Ca_v2.1$. Учитывая многочисленные связи RIMs и RIM-связывающих белков как с β -субъединицей Ca^{2+} -каналов, так и белками цитоматрикса активных зон CAST/ELKS и Bassoon, также взаимодействующими с β -субъединицей, можно говорить о наличии в активной зоне взаимосвязанной белковой сети. Основой такой сети служит тройной комплекс – RIMs, RIM-связывающие белки и С-концы $Ca_v2.1$, располагающий эти триггерные Ca^{2+} -каналы на определенном расстоянии от синаптических везикул (позиционный прайминг). Нарушение одной точки связи в такой сети может быть скомпенсировано за счет других молекулярных взаимодействий $Ca_v2.1$ -каналов в активных зонах [3, 37, 67, 68].

В синапсах ЦНС взаимодействие субъединиц $\text{Ca}_v2.1$ с RIMs, белками цитоматрикса и белковыми регуляторами прайминга определяет не только собственно позиционный прайминг синаптических везикул по отношению к триггерному Ca^{2+} -входу, но и разнонаправленно контролирует время перехода самих Ca^{2+} -каналов из закрытого в открытое состояние и обратно в ответ на пресинаптический ПД, а также – потенциалозависимость их инактивации. Это в конечном итоге обуславливает динамику функционирования Ca^{2+} -каналов и Ca^{2+} -зависимого характера секреции квантов нейротрансммитера при ритмической нейрональной активности [69, 70].

Учитывая высокую консервативность белков активных зон и машинерии экзоцитоза, а также доказанное наличие всех ключевых белков в активных зонах моторных нервных терминалей млекопитающих [71, 72], можно с уверенностью предполагать, что сходный характер влияния белков позиционного прайминга на активность $\text{Ca}_v2.1$ имеет место и в активных зонах НМС млекопитающих.

Регуляция Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: synprint-сайт Ca_v2 -каналов

В составе триггерных Ca_v2 был идентифицирован synprint-сайт (synaptic protein interaction). Это последовательность аминокислот в составе цитоплазматической петли между доменами II и III $\alpha 1$ -субъединиц каналов $\text{Cav}2.1$ и $\text{Cav}2.2$. Synprint обеспечивает Ca^{2+} -зависимое связывание несущих его Ca^{2+} -каналов с белками экзоцитоза SNARE-комплекса синтаксином и SNAP-25, а также с быстрым низкоаффинным везикулярным Ca^{2+} -сенсором синаптотагмином (1, 2 или 9) [73, 74]. Физиологическое значение такого прямого взаимодействия заключается не в физической связи канала с синаптической везикулой и машинерией экзоцитоза, а в регуляции активности самих триггерных Ca^{2+} -каналов. Встроенные в пресинаптическую мембрану синтаксин и SNAP-25 (t-SNAREs) еще вне собранных SNARE-комплексов при отсутствии докированной синаптической везикулы обеспечивают сдвиг потенциалозависимости инактивации $\text{Ca}_v2.1$ в сторону более негативных значений МП. Это уменьшает доступность каналов для обеспечения экзоцитоза, но не препятствует их активации [74, 75]. Образование окончательно собранных SNARE-комплексов с участием везикулярных синаптотагминов и взаимодействие именно этих синаптотагминов с synprint обеспечивает отмену негативного влияния t-SNARE на $\text{Ca}_v2.1$. Это способствует открытию Ca^{2+} -каналов, входу через них ионов Ca^{2+} , взаимодействию последних с синаптотагминами и в конечном итоге увеличению вероятности выброса (p – probability) докированных вблизи этих Ca^{2+} -каналов синаптических везикул [74, 76]. Совсем недавно появились данные о взаимодействии медленного, высокоаффинного синаптотагмина-7 с synprint-сайтом $\text{Ca}_v2.1$, что модулирует Ca^{2+} -зависимую фасилитацию (CDF) и Ca^{2+} -зависимую инактивацию (CDI) канала, обеспечивая в конечном итоге кратковременное облегчение квантовой секреции и асинхронный выброс нейротрансммитера в синапсах ЦНС [76–78].

Взаимодействие t-SNAREs с сайтом synprint контролируется фосфорилированием synprint Ca^{2+} -зависимыми ферментами – протеинкиназой C (PKC) и кальций-кальмодулин-зависимой киназой II типа (CaMKII) [79, 80]. Кроме того, не только synprint, но и другие участки в составе $\alpha 1A$ -субъединицы $\text{Ca}_v2.1$ могут функционально взаимодействовать со SNARE-белками, расширяя таким образом возможности регуляторных воздействий со стороны $\text{Ca}_v2.1$ на процесс запуска нейротрансмиссии [81].

Регуляция Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: ионы Ca^{2+} и кальмодулин (CaM)

Вход ионов Ca^{2+} , изменяя их цитоплазматическую концентрацию около $\text{Ca}_v2.1$, влияет не только на экзоцитоз синаптических везикул, но и на активность самих Ca^{2+} -каналов. Это происходит за счет стимулирования Ca^{2+} -связывающих белков и прежде всего CaM. Внутриклеточный C-конец $\alpha 1A$ -субъединицы несет два функционально

важных участка, обеспечивающих ее взаимодействие с Ca^{2+} -связывающими белками – IQ-похожим мотивом (IM) и CaM-связывающим доменом (CBD). При увеличении локальной концентрации ионов Ca^{2+} связывающие его белки сначала взаимодействуют с участком IM, инициируя CDF, обеспечивая развитие кратковременного облегчения синаптической передачи в НМС мыши. В случае длительного (глобального) повышения концентрации ионов Ca^{2+} CaM, связывая больше ионов Ca^{2+} , взаимодействует и с CBD, индуцируя CDI $\text{Ca}_v2.1$ [82–84]. Эти данные свидетельствуют о том, что регулирование активности триггерных $\text{Ca}_v2.1$ с помощью CaM и других Ca^{2+} -связывающих белков может играть одну из ключевых ролей в механизмах кратковременной пластичности в моторных синапсах.

Регуляция Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: пресинаптические метаботропные рецепторы и G-белки

Модулирование активности $\text{Ca}_v2.1$ не исчерпывается их взаимодействием с белками SNARE-комплекса и Ca^{2+} -связывающими белками. Еще один путь регуляции работы Ca_v2 – их ингибирование за счет активности G-белок-сцепленных рецепторов, связанных с G_i/G_o -белками. Такое ингибирование Ca_v реализуется за счет замедления их активации и опосредуется непосредственным взаимодействием $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка с определенными участками на N- и C-концах, а также на цитоплазматической петле между I и II доменами $\alpha1$ -субъединиц Ca_v2 -каналов при необходимом участии β -субъединицы [85, 86].

$G_{\beta\gamma}$ -опосредованное ингибирование Ca_v2 является потенциал-зависимым, поскольку его влияние на работу Ca^{2+} -каналов может быть значительно снижено при сильной и/или повторяющейся деполяризации мембраны, что вызывает уход $G_{\beta\gamma}$ -субъединиц от Ca_v [85]. В НМС млекопитающих такой способ регуляции активности триггерных Ca^{2+} -каналов P/Q-типа принципиально может функционировать в случае активации и запуска сигнальных путей со стороны пресинаптических метаботропных G_i -белок-сцепленных аденозиновых A_1 - и A_3 -рецепторов [87, 88], пуриновых P2Y₁₃-рецепторов [89, 90] и мускариновых M2-рецепторов [91].

Регуляция Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в нервных терминалях: пресинаптические ферменты

Существует еще один возможный способ модулирования активности в НМС Ca^{2+} -каналов P/Q-типа – за счет их фосфорилирования различными Ca^{2+} -зависимыми и Ca^{2+} -независимыми протеинкиназами, как это показано для ряда центральных синапсов и в гетерологичных экспрессирующих системах [92]. Среди потенциальных кандидатов, способных оказывать влияние на работу P/Q-типа Ca^{2+} -каналов, можно рассматривать цАМФ-зависимую протеинкиназу A (РКА), различные пресинаптические изоформы РКС и CaMKII.

В зависимости от результата альтернативного сплайсинга получающиеся белковые продукты $\alpha1A$ -субъединицы $\text{Ca}_v2.1$ могут дифференцированно фосфорилироваться РКА или РКС [93]. В ЦНС активация G_s -белок-сцепленных рецепторов, стимулирующих аденилатциклазу и РКА, обеспечивает усиление $\text{Ca}_v2.1$ -опосредуемых Ca^{2+} -токов [94]. Предполагается, что РКА может модулировать активность $\text{Ca}_v2.1$ не напрямую, а противодействуя негативному влиянию на канал мембранного фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата, сдвигающего потенциал-зависимость активации $\text{Ca}_v2.1$ в сторону более деполяризованного МП [95, 96]. Активация РКС может приводить к фосфорилированию $G_{\beta\gamma}$ -связывающего сайта в I-II линкерном участке $\text{Ca}_v2.1$, противодействуя таким образом G-белок-опосредованному торможению Ca^{2+} -каналов [97]. В НМС крысы активация РКА и РКС и последующее потенцирование одиночной вызванной секреции квантов АХ зависит от функционирования P/Q-типа Ca^{2+} -каналов. Это позволяет

рассматривать $\text{Ca}_v2.1$ -каналы как возможную мишень, обеспечивающую регуляторное действие этих протеинкиназ на секрецию АХ в НМС млекопитающих [98].

Согласно данным, полученным при экспрессии $\text{Ca}_v2.1$ в клеточных линиях и их активности в нервных терминалах пирамидальных нейронов гиппокампа, потенцировать работу этого типа Ca^{2+} -каналов, замедляя развитие их потенциал-зависимой инактивации, способна СаМКП. Причем оказалось, что модулирующая роль СаМКП обеспечивается самой ее посадкой на С-конец $\alpha 1$ -субъединиц $\text{Ca}_v2.1$, а не ее каталитической активностью [79]. Связывание СаМКП с $\text{Ca}_v2.1$ обеспечивает усиление активности самой СаМКП за счет увеличения ее аутофосфорилирования Ca^{2+} -независимым способом [99]. Такая связанная с $\text{Ca}_v2.1$ СаМКП способна фосфорилировать синапсины, снижая уровень связи синаптических везикул в резервном или рециклирующем пулах с актиновым цитоскелетом, что способствует восполнению RRP при высокочастотной и/или длительной активности синапсов [100].

Пресинаптические Ca^{2+} -каналы P/Q-типа и создание в активных зонах Ca^{2+} -доменов

Срабатывание в течение определенного (обычно короткого) промежутка времени Ca^{2+} -входа вызывает появление в цитоплазме нервной терминали локализованного и достаточно короткоживущего увеличения концентрации ионов Ca^{2+} – Ca^{2+} -домена.

Пресинаптические Ca^{2+} -домены можно разделить на два типа. Первый – нанодомен, своеобразная «струя» ионов Ca^{2+} в высокой концентрации, возникающая в цитоплазме в результате открытия одиночного Ca^{2+} -канала (или иного источника ионов Ca^{2+} в нервной терминали). Нанодомен возникает и прекращается практически мгновенно при открытии и закрытии Ca^{2+} -канала (микросекунды) и имеет достаточно однородный концентрационный профиль с центром в устье канала. Данные Ca^{2+} -имиджинга свидетельствуют, что концентрация ионов Ca^{2+} в таком нанодомене может достигать сотен микромолей [101], но только в нескольких десятках нм от устья Ca^{2+} -канала, а на больших расстояниях – резко снижается до 1 мкМ [102].

Второй тип Ca^{2+} -домена – микродомен – может возникать в результате перекрывания отдельных нанодоменов кластера открывающихся вблизи друг от друга Ca^{2+} -входов. Данный Ca^{2+} -сигнал – его размер, продолжительность существования и концентрационный профиль – достаточно вариабелен, поскольку будет определяться количеством Ca^{2+} -каналов в их кластере и их взаимном пространственном расположении, а также флуктуациями их перехода из открытого состояния в закрытое [103, 104].

Таким образом, когда быстрый запуск секреции медиатора осуществляется с использованием нанодомена, необходимо расположение одного (или небольшого количества) Ca^{2+} -входов в непосредственной близости от синаптической везикулы (на расстоянии порядка 10–20 нм) – тогда везикула будет практически «омываться» входящим потоком ионов Ca^{2+} . Разобщить такой Ca^{2+} -сигнал способен только Ca^{2+} -буфер с быстрой кинетикой связывания ионов Ca^{2+} – 1,2-бис(2-аминофеноксид) этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ВАРТА) [46, 105, 106]. При формировании Ca^{2+} -микродомена, когда расстояние от источников ионов Ca^{2+} до готовых к выбросу синаптических везикул превышает 20 нм (100 нм – 1 мкм), необходимо срабатывание большего числа Ca^{2+} -каналов и подъем концентрации ионов Ca^{2+} , при котором возможен запуск экзоцитоза более удаленных везикул. При этом не только ВАРТА, но и Ca^{2+} -буфер с более медленной кинетикой связывания ионов Ca^{2+} – этиленгликоль-бис(β-аминоэтил)-N, N, N', N'-тетрауксусная кислота (EGTA) – способен эффективно конкурировать с везикулярными синаптотагминами за свободные ионы Ca^{2+} [3, 103, 107]. Исследование сопряжения Ca^{2+} -сигнала в районе активных зон и секреции нейротрансмиттера в разных синапсах показало, что имеет место континуум разных расстояний и геометрии расположения Ca^{2+} -входов по отношению к синаптическим везикулам как в отдельных синапсах, так иногда и в пределах одного синапса [108–111].

В настоящий момент считается, что сопряжение входа ионов Ca^{2+} через P/Q-тип Ca^{2+} -каналов и синаптотагмина в НМС млекопитающих – очень тесное, то есть обеспечивается Ca^{2+} -нанодоменом протяженностью порядка 20 нм [29, 43, 44].

В отличие от НМС лягушки, где количество триггерных $\text{Ca}_v2.2$ на везикулу, докированную в активной зоне, не превышает 2, в НМС млекопитающих это соотношение может достигать 4 [44, 112]. Кроме того, в НМС млекопитающих Ca^{2+} -каналы теснее сопряжены пространственно с синаптическими везикулами, что, по всей видимости, обеспечивает более высокую вероятность выброса АХ и меняющийся характер синаптической пластичности при ритмической активности в НМС млекопитающих по сравнению с таковыми у холоднокровных. При этом в НМС млекопитающих, несмотря на высокое количество мест, откуда может осуществляться экзоцитоз синаптических везикул (500–900 активных зон, каждая содержит две везикулы – итого около 1000–1800 потенциальных мест выброса АХ), квантовый состав постсинаптических потенциалов концевой пластинки (ПКП) составляет всего от 20 до 80, в зависимости от экспериментальных процедур, используемых при регистрации и анализе данных электрофизиологических сигналов. Это свидетельствует о низкой вероятности выброса квантов АХ (порядка 3–5% на везикулу).

Гетерогенность Ca^{2+} -зависимости вероятности выброса синаптических везикул и ее связь с локализацией пресинаптических Ca^{2+} -каналов P/Q-типа

Биномиальный анализ секреции АХ в НМС мышцы показал, что вероятность выброса квантов АХ достаточно высока (около 0.9), однако число мест секреции оказалось довольно низким (около 70) [113]. Это резко противоречит вышеприведенным данным о количестве активных зон в моторной нервной терминали и числе синаптических везикул, потенциально готовых к выбросу в них, если не допускать, что значительное большинство активных зон в составе НМС «молчит», и лишь небольшое их количество (меньше 10–20%) принимает участие в вызванной приходом пресинаптического ПД быстрой квантовой секреции АХ. Такая гетерогенность вероятности выброса АХ между активными зонами может быть связана с разной чувствительностью аппаратуры экзоцитоза синаптических везикул к ионам Ca^{2+} в отдельных активных зонах, что, возможно, определяется разным положением Ca^{2+} -входов (Ca^{2+} -каналов P/Q-типа) по отношению к везикулам [114].

Косвенно о том, что вероятность выброса в НМС млекопитающих реально не приближена к 1, а гораздо ниже при небольшом числе функционирующих активных зон, говорят исследования кратковременной пластичности при высокочастотной ритмической активности НМС. Если секреция АХ осуществляется из небольшого числа активных зон с очень высокой вероятностью выброса, следует ожидать сильную кратковременную депрессию передачи по ходу залпа за счет преобладания истощения RRP над рекрутированием синаптических везикул из других пулов к активным зонам, что, однако, не наблюдается в экспериментах. Наоборот, при короткой высокочастотной активности моторных синапсов сначала наблюдается выраженное облегчение синаптической передачи, и затем следует депрессия [47, 106, 114]. Таким образом, либо вероятность выброса квантов АХ из каждой отдельной активной зоны очень низка, либо после первого стимула в коротком залпе последующие ПД приводят к экзоцитозу синаптических везикул из набора активных зон, отличных от задействованных в выбросе АХ при первом ПД в залпе (последнее нуждается в строгом экспериментальном подтверждении).

Выявленное в моторных терминалях млекопитающих значительное число отдельно расположенных и независимых друг от друга активных зон неизбежно порождает вопрос о гомогенности их секреторной активности для обеспечения надежной и достаточно эффективной нервно-мышечной передачи. Имеется ли и какова допустимая степень гетерогенности вероятности выброса квантов АХ между активными зонами в НМС? При использовании везикулярных оптических зондов слияния синаптических

везикул в НМС мышцы было установлено, что при высокочастотной активности моторных терминалей экзоцитоз синаптических везикул по ходу ритмического залпа начинает преимущественно происходить в определенных кластерах активных зон, названных «горячими точками» [115–117]. Такие данные свидетельствуют в пользу того, что выброс АХ в моторной нервной терминали при физиологических режимах ее работы может преимущественно осуществляться в определенном наборе активных зон, где происходит повышенное рекрутирование резервных везикул, в то время как оставшаяся часть активных зон остается функционально «молчащей» [44, 47, 118].

Число мест в моторной нервной терминали, где происходит вызванная пресинаптическими ПД секрция АХ, зависит от частоты стимуляции терминали [115]. Более того, оценка размера RRP – общего числа докированных везикул, содержимое которых может выбрасываться при ритмической активности НМС, выявила зависимость этого параметра от частоты стимуляции [43, 47, 118]. Это также свидетельствует в пользу того, что в НМС млекопитающих, видимо, существуют «молчащие» активные зоны, часть из которых вовлекается в секрецию АХ при переходе от одиночной или низкочастотной активности к высокочастотной. Такое вовлечение недавно было показано в НМС дрозофилы [119].

Таким образом, с функциональной точки зрения НМС млекопитающих представляет собой большой, одиночный и самое главное надежный в плане обеспечения передачи сигнала синаптический контакт, построенный из сотен «ненадежных» активных зон с преимущественно низкой вероятностью выброса АХ [29, 48, 105]. Низкая вероятность выброса АХ обеспечивает надежность синаптической передачи во время ритмической активности НМС, поскольку в этом случае активные зоны не вовлекаются в секрецию слишком часто, предотвращая развитие мощной депрессии нервно-мышечной передачи за счет быстрого массивного истощения RRP, не компенсируемого восполнением за счет рекрутирования резервных синаптических везикул. Активно обсуждается вопрос – в чем причина такой низкой вероятности секрции медиатора в отдельных активных зонах НМС млекопитающих?

Количество триггерных $\text{Ca}_v2.1$ в активных зонах НМС млекопитающих невелико, а вероятность их открытия, зависящая от пространственно-временных характеристик деполяризации пресинаптической мембраны, создаваемой коротким (~1 мс) пресинаптическим ПД, также, скорее всего, низка – около 0.2 [46, 64]. Об этом свидетельствуют как данные о вероятности открытия триггерных Ca^{2+} -входов в ответ на пресинаптический ПД в НМС лягушки [120] и в синапсе *Calyx of Held* [121], так и моделирование динамики квантовой секрции АХ в НМС мышцы с учетом особенности архитектуры и взаиморасположения его активных зон [29, 122].

Таким образом, в ответ на генерацию пресинаптического ПД в каждой отдельной активной зоне возможно открытие одного (или совсем небольшого) числа потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, способных обеспечить вход ионов Ca^{2+} , достаточный для запуска слияния синаптической везикулы с пресинаптической мембраной. Однако реальные случаи экзоцитоза (исходя из вышеописанных условий срабатывания Ca^{2+} -каналов и взаимодействия Ca^{2+} -сигнала с синаптической везикулой) будут возникать с очень низкой вероятностью.

ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ Ca^{2+} -КАНАЛЫ N- И R-ТИПОВ ($\text{Ca}_v2.2$ И $\text{Ca}_v2.3$) И ИХ РОЛЬ В МОТОРНЫХ НЕРВНЫХ ТЕРМИНАЛЯХ

P/Q-тип Ca^{2+} -каналов – ключевой, но отнюдь не единственный потенциал-зависимый Ca^{2+} -вход в моторных нервных терминалях млекопитающих.

В неонатальных НМС крыс и мышей показано, что наряду с $\text{Ca}_v2.1$, блокируемыми ω -агатаксином IVA, экспрессируется и принимает участие в запуске выброса АХ

и блокируемый ω -конотоксином GVIA N-тип Ca^{2+} -каналов ($\text{Ca}_v2.2$), хотя сопряжение этого Ca^{2+} -входа с секрецией АХ было слабее, чем у $\text{Ca}_v2.1$. Это связывают с более удаленным расположением $\text{Ca}_v2.2$ от синаптических везикул [123–126].

Что касается зрелых НМС, то долгое время считалось, что там вклад в регуляцию секреции АХ Ca^{2+} -каналов, отличных от $\text{Ca}_v2.1$, проявляется либо при особых экспериментальных условиях, либо при патологиях, затрагивающих $\text{Ca}_v2.1$ [28]. Генетическая элиминация каналов $\text{Ca}_v2.1$ у мышей вызывала быстро прогрессирующие неврологические синдромы, приводящие к утрате способности передвигаться и гибели животных на самых ранних этапах постнатального развития. При этом возможность нервно-мышечной передачи сохранялась, однако в электрофизиологических экспериментах в моторных синапсах у таких мышей отмечались сильные нарушения быстрой мультиквантовой синхронной секреции АХ и кратковременной пластичности – сниженный по сравнению с диким типом квантовый состав ПКП, увеличенная вариабельность задержек синаптической передачи (что свидетельствует о десинхронизации выброса АХ) и угнетение парной фасилитации. Функции отсутствующего P/Q-типа Ca^{2+} -каналов в таких случаях берут на себя Ca^{2+} -каналы N- и R-типов, но полностью компенсировать тотальную утрату основного триггерного Ca^{2+} -входа эти типы Ca^{2+} -каналов не могут [61, 127]. Подобные компенсаторные подключения к контролю секреции АХ Ca^{2+} -каналов N- и R-типов в НМС млекопитающих отмечены и при определенных мутациях, затрагивающих как каналообразующую $\alpha 1A$ -субъединицу Ca^{2+} -каналов P/Q-типа [18, 20], так и регуляторную β -субъединицу [59].

В последнее время появляются экспериментальные данные, свидетельствующие об участии N- и R-типов Ca^{2+} -каналов в регуляции как спонтанной, так и вызванной квантовой секреции АХ в нормальных зрелых НМС млекопитающих, обеспечивая там определенный уровень синхронизации выброса нейротрансмиттера [128].

Кроме того, в моторных нервных терминалах млекопитающих, наряду с N- и R-типами потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, показана экспрессия и Ca^{2+} -каналов L-типа [19].

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ Ca^{2+} -КАНАЛЫ L-ТИПА ($\text{Ca}_v1.2$ И $\text{Ca}_v1.3$) И ИХ СВОЙСТВА

Семейство Ca^{2+} -каналов L-типа в настоящее время включает в себя 4 подтипа ($\text{Ca}_v1.1$ – 1.4), имеющих около 70% идентичности каналообразующих $\alpha 1S$ -F субъединиц. Представители данного семейства были первоначально названы Ca^{2+} -каналами L-типа по результатам ранних исследований на кардиомиоцитах и нейронах – благодаря опосредуемым этими Ca^{2+} -каналами при деполяризации мембраны долго длящимся входящим Ca^{2+} -токам с медленной кинетикой спада (long-lasting), что позволило отделить их от короткоживущих (transient) Ca^{2+} -токов через Ca_v3 [129, 130].

Особенностью L-типа Ca^{2+} -каналов, отличающей его от всех остальных Ca^{2+} -каналов, является его чувствительность к органическим модуляторам (преимущественно блокаторам) трех химически различающихся видов: дигидропиридинам, фенилалкиламинам и бензотиазепинам. Данные соединения, такие как соответственно нитрендипин, верапамил и дилтиазем, а также их многочисленные структурные аналоги не только являются излюбленным фармакологическим инструментом для работы с данными Ca^{2+} -каналами (и опосредуемыми ими Ca^{2+} -токами) *in vitro*, но и широко используются много лет в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [23, 131]. Выделение, гомологичное клонирование и исследование биохимических характеристик субъединиц Ca_v1 показало, что в скелетных мышцах экспрессируется изоформа $\alpha 1$ -субъединицы $\text{Ca}_v1.1$, кодируемая геном *CACNA1S*. В нейронах, кардиомиоцитах, хромоаффинных клетках надпочечников были выявлены другие изоформы $\alpha 1$ -субъединицы – $\text{Ca}_v1.2$

(CACNA1C) и $\text{Ca}_v1.3$ (CACNA1D). В сетчатке выявлена экспрессия отдельной изоформы $\alpha 1$ -субъединицы – $\text{Ca}_v1.4$ (CACNA1F) [132], которая, обладая ограниченной инактивацией, обеспечивает постоянную работу Ca^{2+} -канала и поддерживает пролонгированную секрецию глутамата в ленточных синапсах фоторецепторов.

Все 4 подтипа Ca_v1 обладают сходной чувствительностью к фармакологическим агентам – до сих пор отсутствуют изоформ-специфические модуляторы их активности [133, 134]. При этом подтипы Ca_v1 различаются по представленности в тканях и биофизическим характеристикам. $\text{Ca}_v1.1$ и $\text{Ca}_v1.4$ имеют очень ограниченный паттерн экспрессии – скелетные мышечные волокна и сетчатка соответственно. $\text{Ca}_v1.2$ и/или $\text{Ca}_v1.3$ экспрессируются в большинстве электровозбудимых клеток и часто – совместно в одних и тех же клетках. Обе эти изоформы каналов необходимы для нормального функционирования мозга и играют каждый определенную роль в сердечно-сосудистой и эндокринной системах [10, 21].

Несмотря на высокую степень структурного сходства их каналообразующих $\alpha 1$ -субъединиц и чувствительности к блокаторам, изоформы $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$ различаются по особенностям работы воротного механизма образуемых ими Ca^{2+} -каналов L-типа, вовлеченности в различные белок-белковые регуляторные взаимодействия и по механизмам тонкой настройки их работы в результате альтернативного сплайсинга [10, 133]. Так, нейрональные каналы $\text{Ca}_v1.3$ активируются при более высоких (негативных) значениях МП (на 9–25 мВ) и медленнее инактивируются, чем $\text{Ca}_v1.2$ [135–137].

Инактивация Ca^{2+} -каналов L-типа – важнейший процесс, необходимый для тонкого регулирования входа ионов Ca^{2+} в клетку. Специфической особенностью инактивации Ca^{2+} -каналов L-типа является ее очень медленная кинетика, приводящая к пролонгированному снижению Ca^{2+} -тока в ответ на деполяризацию мембраны. Инактивация Ca^{2+} -каналов L-типа может обеспечиваться за счет функционирования нескольких механизмов.

Потенциал-зависимая инактивация («в чистом виде») ее исследуют при экспрессии Ca^{2+} -каналов L-типа в клеточных системах и замене Ca^{2+} на Ba^{2+} включает в себя несколько процессов с разной кинетикой развития и участием нескольких сайтов в составе $\alpha 1$ -субъединиц $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$. Это цитозольные концы S6-сегментов, N- и C-концы, участок линкерной петли между доменами II и III, а также линкерная петля между I и II доменами, служащая инактивационной створкой [138–140]. Наряду с потенциал-зависимой инактивацией, у каналов, образованных $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$ (так же, как и у $\text{Ca}_v2.1$), ярко выражена CDI [139].

CDI Ca^{2+} -каналов L-типа реализуется за счет конформационных перестроек, затрагивающих многие участки каналообразующих $\alpha 1$ -субъединиц при взаимодействии определенных аминокислотных мотивов их C-концов с CaM, который служит Ca^{2+} -сенсором [141–143]. Наличие CDI у L-типа Ca^{2+} -каналов обеспечивает таким образом тонкий ауторегуляторный механизм лимитирования входа ионов Ca^{2+} по этим каналам [144].

Ca^{2+} -каналы L-типа располагают еще одним Ca^{2+} -зависимым механизмом регуляции – CDF. CDF проявляется в увеличении вероятности нахождения Ca^{2+} -каналов L-типа в открытом состоянии при продолжительной или повторяющейся активности. Данное усиление Ca^{2+} -входа реализуется с участием CaM и CaMKII [145–147].

Управление воротным механизмом (как активации, так и инактивации) каналов, образованных $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$, контролируется белок-белковыми взаимодействиями между участками C-конца канала [143]. При этом конкретные электрофизиологические характеристики Ca^{2+} -токов L-типа в местах их функционирования в значительной степени будут определяться тканеспецифическим альтернативным сплайсингом, затрагивающим в результате многие важные структурные компоненты $\alpha 1$ -субъединицы, участвующие как в активации и инактивации каналов, так и в различных механизмах регуляции этих процессов [148, 149].

Важную регулирующую роль, определяющую характеристики Ca^{2+} -токов и Ca^{2+} -сигналов, обеспечиваемых $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$ -каналами, будут играть изоформы дополнительных субъединиц этих каналов – β и $\alpha 2\text{-}\delta$ [150, 151].

Ca^{2+} -индуцированные физические взаимодействия между С-концами $\alpha 1$ -субъединиц Ca^{2+} -каналов L-типа, кластрированных в непосредственной близости друг от друга, потенцируют вход ионов Ca^{2+} за счет увеличения активности соседних каналов, усиливая кооперативным образом Ca^{2+} -сигнал в возбудимых клетках [152].

Таким образом, вход ионов Ca^{2+} через нейрональные Ca^{2+} -каналы L-типа может регулироваться с использованием сигнальных механизмов, устроенных по принципу прямой и обратной связи.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа в пост- и пресинаптических структурах синапсов ЦНС

Каналы $\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$ широко экспрессируются в мозге. Для обеих изоформ характерна преимущественная постсинаптическая дифференцированная сомато-дендритная локализация, где этот Ca^{2+} -вход является основополагающим для запуска электро-транскрипционного сопряжения с участием CaM, CaMKII и митоген-активируемых протеинкиназ [153–155]. Электро-транскрипционное сопряжение с ключевым участием именно Ca^{2+} -каналов L-типа в постсинаптических структурах дендритов и сомы нейронов трансформирует паттерны синаптической активности в ремоделирование нейронов и их участков. Данный процесс лежит в основе нейронального развития, обучения, формирования разных типов памяти и привыкания к лекарственным и наркотическим веществам [10, 156]. Регуляция транскрипционной активности обеспечивается за счет формирования на С-конце $\alpha 1$ -субъединицы Ca^{2+} -каналов L-типа мультимолекулярного сигнального комплекса, включающего якорные и каркасные белки цитоскелета, например, AKAP (A-kinase anchoring protein), а также ферменты, участвующие в сигнальных каскадах, такие как PKA и кальцинейрин (CaN), модулирующие входящий Ca^{2+} -ток по этим каналам [154, 157, 158].

Хорошо известно участие постсинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа в индукции, экспрессии и поддержании различных форм синаптической пластичности [159–161] и регуляторного контроля спайковой и осцилляторной активности нейронов в разных отделах ЦНС [162–164].

Долгое время считалось, что в синапсах ЦНС, где доминируют быстрые Ca^{2+} -каналы P/Q- и N-типов, на пресинаптической мембране Ca^{2+} -каналы L-типа или практически отсутствуют [165], или, за редким исключением [9, 166], не участвуют в запуске секреции нейротрансмиттеров (в ходе базальной активности) [2, 167]. Однако за последние 10–15 лет постепенно появляются свидетельства как о присутствии разных изоформ Ca^{2+} -каналов L-типа в нервных терминалях синапсов ЦНС [168, 169], так и о вовлечении этих каналов в реализацию разных форм пластичности во многих синапсах ЦНС именно на пресинаптическом уровне (в нормальных условиях и при патологиях) [170–172].

Тем удивительнее выглядят накопленные в литературе за последние десятилетия данные о присутствии и активности Ca^{2+} -каналов L-типа в НМС и их способности эффективно и специфически регулировать секрецию АХ при определенных функциональных состояниях и режимах активности синапсов.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа ($\text{Ca}_v1.2$ и $\text{Ca}_v1.3$) в нервных терминалях НМС млекопитающих

Исследование L-типа Ca^{2+} -каналов в НМС млекопитающих и их возможный вклад в регуляцию секреции АХ продолжается с конца 80-х годов XX века. Оно началось с использования в качестве агониста (активатора) этих каналов дигидропиридина S(-)

Вай К8644, который в субмикромольных концентрациях вызывал увеличение амплитуды и квантового состава одиночных многоквантовых ПКП в диафрагмальных синапсах крысы и мыши, что предотвращалось или реверсировалось блокатором L-типа Ca^{2+} -каналов нимодипином, который сам не оказывал влияния на вызванную секрецию АХ [173].

Экспрессия L-типа Ca^{2+} -каналов в НМС млекопитающих показана не только с помощью фармакологических воздействий в сочетании с электрофизиологией, но и с использованием иммуногистохимических методов. В 2004 г. было представлено первое безусловное доказательство наличия в НМС млекопитающих – и в здоровых зрелых нервных терминалах, и в НМС мышей с нокаутом $\text{Ca}_v2.1 - \alpha 1D$ -субъединицы ($\text{Ca}_v1.3$), но не $\alpha 1C$ -субъединицы ($\text{Ca}_v1.2$) [19]. В более поздней работе на диафрагме крыс была выявлена экспрессия и $\alpha 1C$ -субъединицы ($\text{Ca}_v1.2$), причем значительная только у новорожденных и уменьшающаяся в ходе постнатального онтогенеза [174]. Выраженная экспрессия $\alpha 1D$ -субъединицы ($\text{Ca}_v1.3$) обнаружена и в созревающих, и в зрелых НМС мыши [175]. Исползованные иммуногистохимические методы, конечно, не дают ответа на вопрос о точной локализации Ca^{2+} -каналов L-типа по отношению к активным зонам.

Учитывая низкий порог активации нейрональных изоформ, особенно у $\text{Ca}_v1.3$, и то, что эти каналы могут находиться в открытом состоянии дольше, чем триггерные Ca^{2+} -каналы P/Q-типа, можно было бы ожидать появления опосредуемого Ca^{2+} -каналами L-типа выраженного Ca^{2+} -сигнала при деполяризации моторных терминалей, потенциально способного влиять на секрецию квантов АХ. С таким предположением согласуются ранние данные электрофизиологических экспериментов о вовлечении L-типа Ca^{2+} -каналов в обеспечение уровня спонтанной секреции квантов АХ в НМС крысы. Нифедипин (дигидропиридиновый блокатор L-типа Ca^{2+} -каналов) вызывал уменьшение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки при нормальных внеклеточных концентрациях ионов K^+ и Ca^{2+} , но не в условиях K^+ -деполяризации [176]. Предполагается, что вклад L-типа Ca^{2+} -каналов (наряду с другими типами Ca^{2+} -каналов) в поддержание уровня именно спонтанной секреции обеспечивается за счет возможности их стохастического открывания при значениях МП около ПП [128].

При этом уже пионерские работы постулировали, во-первых, неучастие пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа в регуляции вызванной квантовой секреции АХ в нормальных условиях [177, 178] и, во-вторых, наличие принципиальной способности у этого Ca^{2+} -входа при его принудительной прямой активации потенцировать выброс АХ в НМС млекопитающих [173, 179]. «Замаскированность» Ca^{2+} -каналов L-типа и отсутствие вовлеченности этого Ca^{2+} -входа в регуляцию вызванного выброса АХ в НМС млекопитающих как при их одиночной, так кратковременной ритмичной стимуляции многократно подтверждались во многих дальнейших экспериментах разными научными коллективами, в том числе и нами [128, 174, 180, 181]. Нужно отметить, что в последнее время начинает рассматриваться мнение об относительно слабом участии Ca^{2+} -каналов L-типа в работе НМС млекопитающих в нормальных условиях [182], что никак не оспаривает доминирующую триггерную роль каналов $\text{Ca}_v2.1$ в индукции экзоцитоза синаптических везикул, вызванного деполяризацией мембраны.

Ca^{2+} -каналы L-типа в нервных терминалах развивающихся, новообразованных при реиннервации и находящихся в патологических условиях моторных синапсов

Эксперименты на развивающихся и новообразованных НМС, формирующихся на мышечных волокнах в ходе их реиннервации, показали, что в нервных терминалах таких нервно-мышечных контактов, во-первых, имеет место активация L-типа Ca^{2+} -каналов, а во-вторых, их вовлечение и в регуляцию секреции АХ, и в проведение ПД в таких моторных терминалах [183]. Однако данные о роли Ca^{2+} -каналов L-типа в регуляции секреции АХ в развивающихся и новообразованных синапсах неоднознач-

ны. Отмечается как отсутствие влияния L-типа Ca^{2+} -каналов на секрецию АХ в таких синапсах [184], так и возможный позитивный вклад этого Ca^{2+} -входа в функционирование незрелых моторных синапсов [183, 185]. Описано и негативное воздействие активности L-типа Ca^{2+} -каналов, тормозящее вызванную квантовую секрецию АХ [125, 186, 187], или десинхронизирующее ее (в условиях сниженной по сравнению с нормой внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+}) [174]. Последний способ – уменьшение пресинаптического триггерного входа ионов Ca^{2+} за счет уменьшения их наружной концентрации или частичного блокирования Ca^{2+} -каналов P/Q-типа, а также угнетение опосредуемого этими каналами инициирующего быструю синхронную секрецию квантов АХ Ca^{2+} -сигнала за счет загрузки в нервные терминалы «быстрого» Ca^{2+} -буфера в сочетании с ингибированием фосфатазы PP1 позволило выявить, во-первых, появление в таких условиях периневрального Ca^{2+} -тока, опосредуемого L-типом Ca^{2+} -каналов [188], а во вторых, демаскировать этот обычно «молчащий» Ca^{2+} -вход, зарегистрировав его участие в обеспечении квантовой секреции АХ в зрелых НМС млекопитающих [189].

Снижение опосредованного P/Q-типом Ca^{2+} -каналов входа ионов Ca^{2+} , наблюдаемое при экспериментальном моделировании развития синдрома Ламберта – Итона, также приводило к появлению в моторных нервных терминалах компоненты пресинаптических Ca^{2+} -токов, опосредуемых L-типом Ca^{2+} -каналов, и выявило их вовлечение в регуляцию квантовой секреции АХ [190, 191]. Аналогичная картина наблюдается при экспериментальном снижении внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , в этих условиях вовлечение L-типа Ca^{2+} -каналов в поддержание квантовой секреции АХ сопровождается ее десинхронизацией [192].

Таким образом, совокупность современных данных о последствиях подавления основного (по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов) Ca^{2+} -входа в моторные нервные терминалы свидетельствует о том, что при нормальном функционировании НМС млекопитающих (в нормокальциевой наружной среде) и сохраняющейся активности триггерных Ca^{2+} -каналов P/Q-типа пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа, хотя и потенциально способны обеспечивать массиванный вход ионов Ca^{2+} в моторную нервную терминаль млекопитающих, тем не менее не активны – по крайней мере, в отношении их вклада в Ca^{2+} -зависимую регуляцию синхронной многоквантовой секреции АХ. Это неизбежно вызывает вопрос об их физиологическом назначении в нормально функционирующих НМС.

Регуляция активности Ca^{2+} -каналов L-типа в моторных синапсах млекопитающих

Отсутствие проявлений регуляторных влияний L-типа Ca^{2+} -каналов на Ca^{2+} -зависимую вызванную секрецию АХ у здоровых и зрелых НМС млекопитающих инициировало поиск факторов и сигнальных путей как подавляющих там эти каналы и препятствующих их участию в контроле над секрецией АХ, так и способствующих вовлечению этого Ca^{2+} -входа в регуляцию нервно-мышечной передачи. В настоящее время таких факторов насчитывается несколько.

В моторных синапсах мышцы Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы высокой проводимости (ВК-каналы) находятся в непосредственной близости от триггерных Ca^{2+} -каналов P/Q-типа (входят в Ca^{2+} -нанодомен) в составе белкового кластера активных зон [112]. Такой вывод был сделан в результате загрузки терминалей Ca^{2+} -буфером с быстрой кинетикой связывания ионов Ca^{2+} – ВАРТА. В присутствии ВАРТА не наблюдалось активации K^{+} -тока, опосредуемого ВК-каналами: блокаторы ВК-каналов на фоне ВАРТА теряли способность вызывать облегчение секреции АХ [193]. Принято считать, что активация ВК-каналов входящим в терминаль Ca^{2+} -током во время нервного импульса, вызывая гиперполяризацию мембраны, ограничивает дальнейшее поступление ионов Ca^{2+} по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам по механизму отрицательной обратной связи [43]. Действительно, блокирование ВК-каналов в НМС мышцы сопровождается увеличени-

ем выброса АХ как в ответ на одиночный ПД [180], так и (в наших экспериментах) при короткой ритмической стимуляции [194, 195]. Важно, что такое потенцирование вызванной секреции АХ полностью предотвращалось предварительным блокированием L-типа Ca^{2+} -каналов. Таким образом, роль ВК-каналов в активных зонах моторных нервных терминалей предназначена не для ограничения входящего Ca^{2+} -тока по триггерным каналам P/Q-типа, как считалось ранее, а в удержании в «молчащем» состоянии Ca^{2+} -каналов L-типа. Механизм негативного влияния со стороны ВК-каналов на Ca^{2+} -каналы L-типа *in vivo* может быть связан с более медленной кинетикой активации этих каналов по сравнению с Ca^{2+} -каналами P/Q-типа [196] и, следовательно, зависимостью их активации от длительности пресинаптического ПД. Мы с уверенностью предполагаем, что в моторных синапсах млекопитающих существует взаимосвязь между активностью двух потенциал-управляемых Ca^{2+} -входов терминалей – через P/Q- и L-типы Ca^{2+} -каналов, осуществляемая с участием ВК-каналов. Вход Ca^{2+} через P/Q-тип Ca^{2+} -каналов под действием пресинаптического ПД активирует ВК-каналы. В свою очередь, их срабатывание предназначено для одновременного подавления активности L-типа Ca^{2+} -каналов. По-видимому, этот тип Ca^{2+} -каналов играет роль резервного (страховочного) Ca^{2+} -входа, необходимого для поддержания секреции АХ в условиях ослабления триггерного Ca^{2+} -входа (Ca^{2+} -каналы P/Q-типа). Выдвинутые нами представления подтверждаются и данными литературы, поскольку в случаях существенного ослабления активности P/Q-типа Ca^{2+} -каналов в моторных терминалях мыши при миастенических синдромах [191] либо при длительной и интенсивной активности НМС [197] наблюдается компенсаторное растормаживание L-типа Ca^{2+} -каналов.

Помимо ВК-каналов, длительность ПД в моторных нервных терминалях, а значит, и возможность активации Ca^{2+} -каналов L-типа может контролироваться пресинаптическими потенциал-зависимыми K^{+} -каналами преимущественно K_v3 -типа, опосредующими калиевый А-ток. Присутствие этих каналов в моторных терминалях и их функциональная активность давно выявлены в многочисленных исследованиях с использованием аминопиридинов в качестве селективных блокаторов этого типа K^{+} -каналов [198, 199]. Блокаторы K_v3 -каналов 4-аминопиридин и 3,4-диаминопиридин, вызывающие увеличение квантовой секреции АХ в НМС, рассматриваются в настоящее время как компоненты терапии, поддерживающей сниженную нервно-мышечную передачу при синдроме Ламберта – Итона и ряде других неврологических расстройств [64, 200, 201]. Считается, что это действие аминопиридинов связано с увеличением вероятности выброса квантов АХ за счет потенцирования входа ионов Ca^{2+} в моторную терминаль при снижении потенциал-зависимой K^{+} -проводимости [179, 202]. Исследование возможного растормаживания именно L-типа Ca^{2+} -каналов под действием близких к миллимолярным концентрациям аминопиридинов привело к неожиданному результату – подверглась сомнению сама их способность блокировать развитие пресинаптических потенциал-зависимых K^{+} -токов. Вместо этого в качестве нового механизма действия аминопиридинов предлагалось их прямое потенцирующее влияние на Ca^{2+} -каналы N- и L-типов [203], опосредуемое через взаимодействие с $\text{Ca}_v\beta$ -субъединицей [204]. Такое непосредственное потенцирующее влияние аминопиридинов на активность дополнительных пресинаптических Ca^{2+} -входов и в особенности клиническое значение такого влияния в настоящее время подвергаются критике [199, 205]. Тем не менее наши исследования с использованием 4-аминопиридина показывают способность L-типа Ca^{2+} -каналов вовлекаться в контролирование Ca^{2+} -зависимой квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих при манипуляциях с потенциал-зависимой K^{+} -проводимостью [206].

Многочисленные данные свидетельствуют, что функционирование L-типа Ca^{2+} -каналов, как и других потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в НМС млекопитающих, может находиться под сильным управляющим контролем со стороны сигнальных путей,

запускаемых при активации многочисленных пресинаптических метаботропных рецепторов в работающих синапсах.

Анализ выделения меченного тритием АХ из моторных синапсов нервно-мышечного препарата, изменений флуоресценции липофильного красителя мембраны синаптических везикул (FM2-10) при стимуляции моторных синапсов и электрофизиологическая регистрация постсинаптических потенциалов концевой пластинки выявили, что Ca^{2+} -каналы L-типа в моторных синапсах млекопитающих подвержены разнонаправленным влияниям со стороны компонентов пуринаргической системы. Активация пресинаптических аденозиновых A_1 -рецепторов через торможение аденилатциклазы и фосфорилирующей активности РКА может приводить к ослаблению регуляторного фосфорилирования Ca^{2+} -каналов L-типа и торможению их функционирования. Это наблюдается при обычной заполовой активности синапсов и образовании там соответствующих концентраций эндогенного аденозина [90, 207–210].

Пресинаптические мускариновые M2-рецепторы, преимущественно активируемые эндогенным АХ в моторных синапсах при их обычной работе, также могут оказывать аналогичное A_1 -рецепторам тормозное влияние на L-тип Ca^{2+} -каналов [211–213].

Обсуждается комплексное взаимодействие пресинаптических мускариновых и аденозиновых рецепторов, направленное на тонкую регуляцию активности пресинаптических ферментов (РКА и РКС), способных потенциально менять функционирование пресинаптических Ca^{2+} -входов или компонентов машинерии экзоцитоза, регулируя таким образом квантовую секрецию АХ в моторных синапсах млекопитающих [214, 215]. О возможности регулирования работы Ca^{2+} -каналов L-типа в таких условиях комплексного контроля со стороны метаботропных рецепторов в НМС говорит присутствие в моторных терминалях якорного белка AKAP150 [216], необходимого для расположения в непосредственной близости от потенциальной мишени регуляторного воздействия РКА и РКС и их функционального антагониста – фосфатазы кальцинеина (CaN). Мы установили, что CaN играет значимую роль в поддержании Ca^{2+} -каналов L-типа в «молчащем» состоянии – равноценную таковой у ВК-каналов и активностью метаботропных рецепторов [181, 195, 217].

Совсем недавно выявлено, что у метаботропных пуринорецепторов P2Y₁₃, активируемых АТФ и в большей степени АДФ, присутствующих и негативно влияющих на квантовую секрецию АХ в НМС мыши [89, 90, 218], одной из мишеней являются Ca^{2+} -каналы L-типа – при блокировании P2Y₁₃ данный Ca^{2+} -вход растормаживается, что приводит к характерному потенцированию вызванного выброса АХ [213].

Таким образом, в НМС млекопитающих L-тип Ca^{2+} -каналов находится под мощным и разнообразным по природе тормозным контролем, в основе которого лежат как Ca^{2+} -зависимые факторы (ВК-каналы и CaN), так и продублированные петли обратной связи, запускаемые со стороны пресинаптических эндогенно активируемых метаботропных рецепторов основного нейротрансмиттера (M2) и дериватов котрансмиттера – АТФ (A_1 и P2Y₁₃).

При этом не прекращаются поиски условий и механизмов, позволяющих превозмочь вышеописанный многоуровневый тормозной контроль и обеспечить вовлечение L-типа Ca^{2+} -каналов в регуляцию вызванного выброса АХ в НМС млекопитающих.

Выявлено, что при увеличении интенсивности и продолжительности синаптической активности (и возрастающей концентрации аденозина в синаптической щели) может происходить «растормаживание» L-типа Ca^{2+} -каналов [219]. Предполагается, что это реализуется вследствие сдвига баланса регуляторного действия аденозина от A_1 -рецепторов в сторону преимущественной активации пресинаптических A_{2A} -рецепторов, стимулирующих аденилатцикласный сигнальный путь и облегчающих активацию L-типа Ca^{2+} -каналов [210, 220, 221]. Кроме того, показана возможность функционального взаимодействия G_q -белок-сцепленных мускариновых M1-рецепторов, стимули-

рующих активацию пресинаптической РКС, с A_{2A} -рецепторами в демаскировании L-типа Ca^{2+} -каналов [222].

Такой сдвиг баланса активности A_1/A_{2A} -рецепторов в сторону PKA-опосредованного усиления активности L-типа Ca^{2+} -каналов проявляется в моторных синапсах не только в норме как отражение изменений уровня аденозина в синаптической щели и его влияний на разные типы аденозиновых рецепторов, но может возникать в моторных синапсах и на модели бокового амиотрофического склероза в пресимптоматическую фазу [223, 224].

Мы обнаружили, что демаскирование L-типа Ca^{2+} -каналов с последующим усилением нервно-мышечной передачи может происходить в результате селективного функционирования необычного синаптического Ca^{2+} -входа – ионотропных P2X7-рецепторов, активирующихся только АТФ в высоких концентрациях и обладающих значительной проводимостью для ионов Ca^{2+} . Механизм такого функционального сопряжения двух Ca^{2+} -входов обеспечивается активацией CaM и CaMKII за счет входа ионов Ca^{2+} через P2X7-рецепторы, с последующим CaMKII-зависимым усилением активности L-типа Ca^{2+} -каналов [106, 225]. Активная CaMKII (наряду с PKA и РКС) требуется для проявления вовлечения L-типа Ca^{2+} -каналов в регуляцию квантовой секреции АХ в НМС млекопитающих [195].

Достаточно неожиданным, но мощным активатором пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа в моторных синапсах млекопитающих оказался анандамид. Этот эндоканнабиноид через CB1-рецепторы неканоническим образом, стимулируя PKA (а не снижая ее активность, как это обычно происходит в синапсах ЦНС), вызывал растормаживание именно Ca^{2+} -каналов L-типа и потенцирование квантовой секреции АХ [226–228].

Итак, обычно «молчащий» пресинаптический Ca^{2+} -вход через L-тип Ca^{2+} -каналов находится под совокупным контролем целого ряда одновременно действующих как облегчающих, так и (обычно доминирующих) тормозных воздействий (рис. 1). Такая многокомпонентная регуляция Ca^{2+} -входа через L-тип Ca^{2+} -каналов сходна с ранее описанной сложной и неоднозначной метаболической зависимостью активности L-типа Ca^{2+} -каналов и в других возбудимых клетках [229, 230].

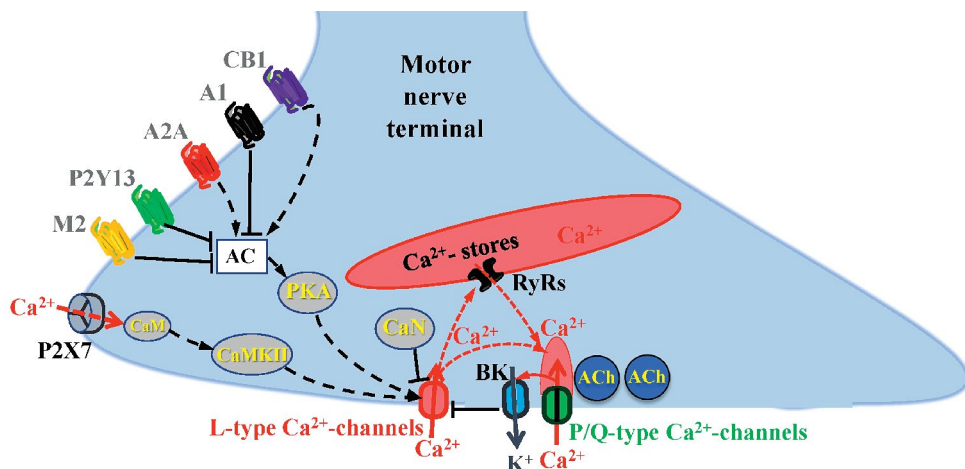


Рис. 1. Схема разнонаправленных влияний в нервной терминали НМС млекопитающих, контролирующих вовлечение L-типа Ca^{2+} -каналов в регуляцию квантовой секреции АХ. Черные пунктирные стрелки – активирующие влияния. Отрезки с плоским концом – тормозные влияния. Красные стрелки – потоки ионов Ca^{2+} . AC – аденилатциклаза.

Дублирование систем потенциальной негативной регуляции L-типа Ca^{2+} -каналов, вероятнее всего, связано с тем, что может различаться пространственно-временной паттерн появления в синаптической щели каждого из эндогенных активаторов (АХ, АТФ, АДФ и аденозина) разных типов метаботропных рецепторов (соответственно M1-M2 -, P2Y13 и $\text{A}_1/\text{A}_{2\text{A}}$). Это позволяет создать в НМС комплексную и пролонгированную избирательную активацию сигнальных путей, функционирующих сходно либо параллельно (подавление РКА, активирование CaN), которые надежно препятствуют вовлечению Ca^{2+} -каналов L-типа в регуляцию секреции АХ. При этом наличие регуляторных контуров не только для снижения активности аденилатциклазного сигнального каскада, но и подключение других сигнальных путей (за счет вероятной активации M1 -, P2X7 -, $\text{A}_{2\text{A}}$ -, CB1 -рецепторов) позволяет потенциально не только препятствовать, но и промотировать (при определенных условиях) вовлечение L-типа Ca^{2+} -каналов в регуляцию секреции АХ в НМС. Контур обратной связи для регуляции секреции нейротрансмиттеров с участием пресинаптических ауторецепторов хорошо известны и в синапсах ЦНС. Однако там они, как правило, обеспечивают тонкую настройку основного Ca^{2+} -входа и функционирования ансамбля белков, обеспечивающего экзоцитоз синаптических везикул. В моторных терминалях аналогичные контуры, как выяснилось, могут быть нацелены на контроль не только и не столько триггерного Ca^{2+} -входа, сколько на отслеживание активности дополнительного Ca^{2+} -входа обычно «молчащих» Ca^{2+} -каналов L-типа. Низкий порог активации этих Ca^{2+} -каналов и их пролонгированная Ca^{2+} -проводимость делает их принципиально легко вовлекаемыми в регуляцию работы нервных терминалей НМС. Именно поэтому, видимо, существуют множественные механизмы удерживания этих каналов от их активного включения в контролирование вызванной квантовой секреции АХ при нормальной работе НМС. В то же время предусмотренное «аварийно включение» именно L-типа Ca^{2+} -каналов в случае ослабления триггерного Ca^{2+} -входа, сопровождающегося дефицитом секреции АХ и нервно-мышечной передачи, призвано поддержать секрецию АХ, причем, как оказалось, по собственным механизмам, не имеющим места при обычном функционировании выброса квантов АХ, запускаемого за счет входа ионов Ca^{2+} по триггерному P/Q-типу Ca^{2+} -каналов.

Особенности механизмов потенцирования квантовой секреции АХ в моторных синапсах млекопитающих при демаскировании Ca^{2+} -каналов L-типа

Влияние Ca^{2+} -каналов L-типа на секрецию АХ при их демаскировании вышеописанными способами во время не одиночной, а более физиологически характерной для НМС ритмической вызванной активности имеет особый характер – единообразный симметричный прирост амплитуд и квантового состава ПКП по всему ходу короткого ритмического залпа [181, 225, 227]. При этом сохраняется неизменной выраженность всех трех фаз изменений амплитуд в залпе ПКП (начальное облегчение, депрессия и плато). Проведенный нами анализ с использованием последовательной модели [47] выявил, что такое характерное усиление секреции АХ при растормаживании Ca^{2+} -каналов L-типа связано не с увеличением вероятности выброса, как это наблюдается при усилении входа ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы P/Q-типа, а с возрастанием пула синаптических везикул, непосредственно готовых к выбросу (RRP) [225, 227] при высокочастотной ритмической активности НМС. Такое возрастание динамического параметра квантовой секреции АХ, как RRP, на наш взгляд, происходит за счет вовлечения в выброс АХ ранее «молчавших» активных зон.

Необходимо было понять, происходит ли при демаскировании Ca^{2+} -каналов L-типа формирование нового Ca^{2+} -сигнала только за счет их активности, или, учитывая мощные негативные влияния на них и удаленность этих каналов от синаптических везикул, для вовлечения этого Ca^{2+} -входа в регуляцию секреции АХ требуется «усилитель Ca^{2+} -сигнала».

Наши исследования выявили, что при практически всех способах стимулирования входа ионов Ca^{2+} в моторные нервные терминалы по пресинаптическим Ca^{2+} -каналам L-типа – блокировании ВК-каналов, ингибировании CaN и A_1 -рецепторов, активации A_{2A} -рецепторов и стимулировании РКС – происходит Ca^{2+} -зависимая активация пресинаптических риаудиновых рецепторов (РиР), необходимая для усиления (либо пространственного распространения) Ca^{2+} -сигнала, формируемого Ca^{2+} -каналами L-типа [181, 194, 210]. Такое Ca^{2+} -зависимое подключение РиР и выброса депонированного Ca^{2+} , генерируя новый, комбинированный Ca^{2+} -сигнал, способно обеспечить необходимую концентрацию ионов Ca^{2+} для запуска экзоцитоза везикул, обычно не выбрасывающих АХ из-за недостаточной насыщаемости их Ca^{2+} -сенсоров ионами Ca^{2+} , входящими снаружи. Это объясняет расширение пространственного диапазона доступных для Ca^{2+} -зависимой секреции квантов АХ, что находит отражение в равномерном возрастании квантового состава ПКП по всему ходу короткого высокочастотного залпа именно за счет увеличения РРР, а не роста вероятности выброса при подключении в регуляцию секреции АХ Ca^{2+} -каналов L-типа (в комплексе с активацией РиР и выбросом депонированного Ca^{2+}). Такой комбинированный Ca^{2+} -сигнал, по-видимому, способен специфически усиливать секрецию дополнительной популяции квантов АХ из ранее «молчавших» активных зон. Данный механизм отличен от реализуемого при входе ионов Ca^{2+} через P/Q-тип Ca^{2+} -каналов.

Это позволяет выдвинуть новое, подкрепленное экспериментальными данными представление, согласно которому специфическое увеличение концентрации ионов Ca^{2+} за счет срабатывания функционального тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов – РиР» может быть предназначено для вовлечения в секрецию АХ дополнительных, ранее «молчавших» активных зон и секреторируемых из них квантов АХ в ответ на достигающий моторной терминалы нервный импульс. Об этом свидетельствует возрастание значения РРР, но не вероятности выброса квантов АХ именно и только при активации (растормаживании разными способами) L-типа Ca^{2+} -каналов.

Качественно подобный механизм усиления вызванной секреции нейротрансмиттера – за счет роста числа сайтов, участвующих в секреции квантов, а не возрастания вероятности выброса или размера квантов – недавно выявлен в созревающих ГАМКергических синапсах интернейронов зрительной коры мыши под действием эндоканнабиноидов [231]. НМС присуща низкая вероятность выброса квантов АХ, но при большом количестве активных зон в совокупности это обеспечивает достаточно высокое значение квантового состава ПКП [44, 47]. Такое сочетание структурных и функциональных особенностей позволяет предполагать, что в активных зонах значительное число потенциально доступных для выброса в ответ на приходящий ПД (и активацию входа в моторную терминалы ионов Ca^{2+}) синаптических везикул испытывает недостаток триггерного действия Ca^{2+} -сигнала из-за слабой «мощности» возникающих вблизи везикул Ca^{2+} -нанодоменов. Это может быть связано с низкой вероятностью открывания потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов P/Q-типа в ответ на короткий по длительности пресинаптический ПД [64]. Включение в активность моторных терминалов эффективно функционирующего тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов – РиР» в районе активных зон может дополнить недостающий уровень ионов Ca^{2+} вблизи «молчавших» активных зон и расположенных там готовых к выбросу синаптических везикул (рис. 2) и тем самым вовлекать их в экзоцитоз. При этом в моторных терминалах нельзя исключить возможность прямой физической сцепки (характерной для триад в скелетных мышечных волокнах) между Ca^{2+} -каналами L-типа и РиР, опосредующей выброс депонированного Ca^{2+} [232].

Стабильность обеспечиваемого L-типом Ca^{2+} -каналов Ca^{2+} -сигнала, вызывающего активацию РиР и выброс депонированного Ca^{2+} , может обеспечивать комбинированный Ca^{2+} -сигнал и, как следствие, повышение размера РРР и обусловленное этим возрастание квантового состава (количества квантов) ПКП по всему ходу короткого

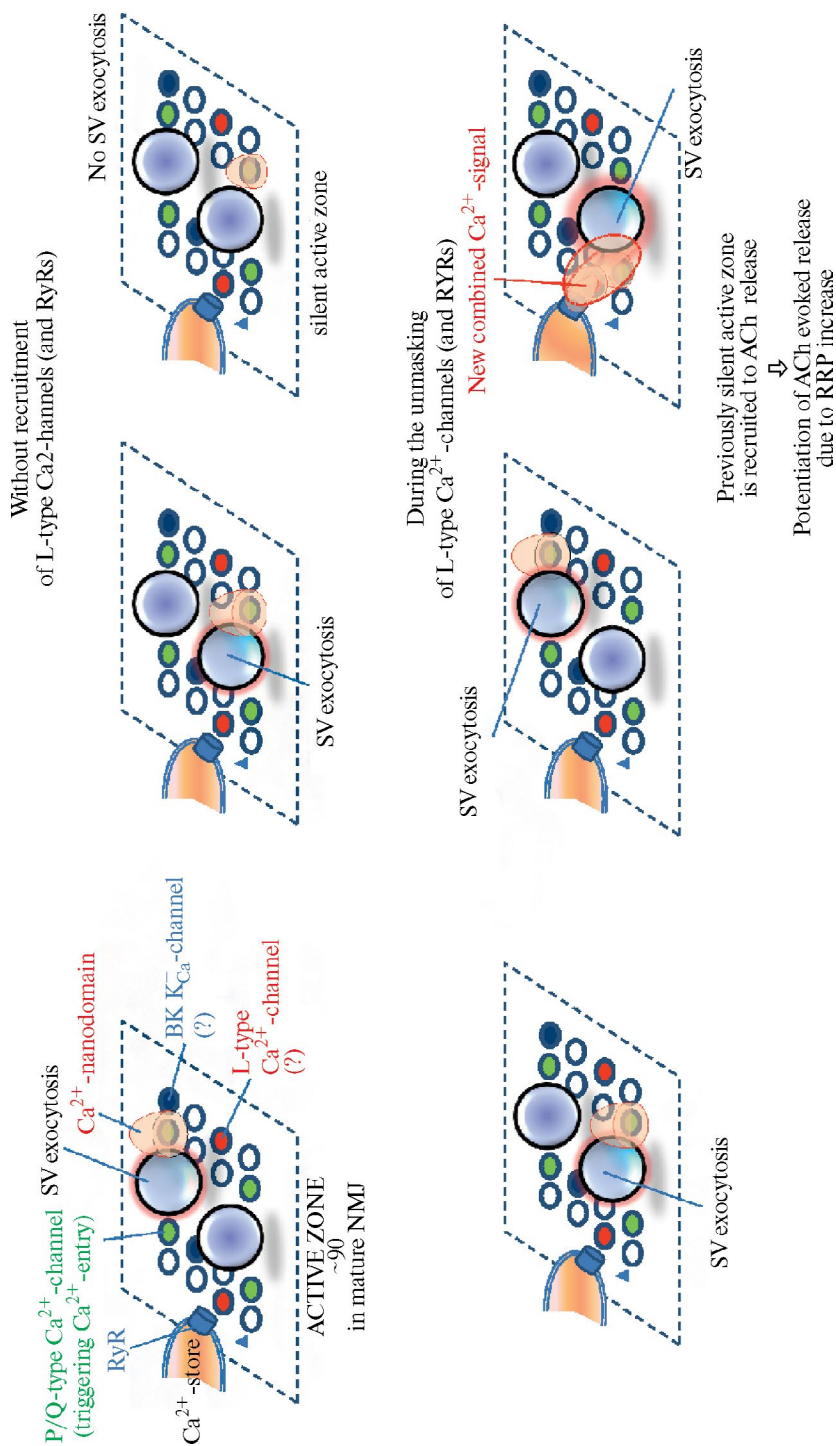


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая механизм равномерного увеличения квантового состава ПКП в ритмических высокочастотных заплах при растормаживании функционального тандема «L-тип Ca^{2+} -каналов – РrР». Слева сверху представлены архитектура и вероятное расположение ионных каналов в активной зоне НМС млекопитающих. Демаскирование L-типа Ca^{2+} -каналов с обязательным участием РrР в качестве «усилителя» Ca^{2+} -сигнала приводит к вовлечению в секрцию АХ везикул из ранее «молчавших» активных зон (справа внизу). Знак ? означает не установленное точно расположение определенных ионных каналов в активных зонах НМС млекопитающих. Относительное пространственное расположение везикул и каналов в составе активных зон основано на литературных данных [43, 44, 112].

ритмического залпа. Именно это и наблюдается при растормаживании L-типа Ca^{2+} -каналов, но, как оказалось, обязательно в тандеме с выбросом ионов Ca^{2+} из рианодин-чувствительных пресинаптических Ca^{2+} -депо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре собраны воедино данные о специфической роли пресинаптических потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в управлении квантовой секрецией АХ в НМС млекопитающих. У этих Ca^{2+} -каналов имеется четкое разделение функциональных ролей – триггером экзоцитоза синаптических везикул в нормальных условиях служит P/Q-тип Ca^{2+} -каналов ($\text{Ca}_v2.1$). N-, R- и особенно L-тип Ca^{2+} -каналов не дублируют роль P/Q-типа Ca^{2+} -каналов в НМС, но могут существенно влиять на квантовую секрецию АХ в зависимости от функционального состояния НМС и условий их работы, причем задействуя разнообразные механизмы. В НМС активность обычно «молчащих» пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа находится под многоуровневым и разнонаправленным (преимущественно тормозным) контролем со стороны метаботропных и ионотропных рецепторов, ферментов и калиевых токов в терминалях. При этом достаточно выключения лишь одного из тормозных либо усиления облегчающего влияния, чтобы сдвинуть баланс модулирующих воздействий в сторону активации L-типа Ca^{2+} -каналов. Включение L-типа Ca^{2+} -каналов облегчает выброс нейротрансмиттера по особому механизму – за счет увеличения размера RRP – роста числа срабатывающих активных зон при стабильной вероятности выброса, что обеспечивает повышенный уровень секреции АХ. Такое потенцирование секреции АХ при растормаживании Ca^{2+} -каналов L-типа вызывает активация РнР. Это может быть частью адаптивной системы страхования надежности синаптической передачи через единственный синапс мышечного волокна – в случае функционального ослабления триггерного Ca^{2+} -входа по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов при избыточной активности или различных патологиях нервно-мышечной передачи. Таким образом, роль модуляторов типов Ca^{2+} -каналов не сводится лишь к повышению внутритерминальной концентрации Ca^{2+} за счет суммации с Ca^{2+} , поступающим по P/Q-типу Ca^{2+} -каналов. Каждый такой Ca^{2+} -вход является частью дифференцированной адаптивной регуляции параметров секреции АХ в работающих моторных синапсах. Взятые вместе, такие данные расширяют современные представления о возможностях Ca^{2+} -зависимой регуляции квантовой секреции нейротрансмиттеров.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, сбор данных (А. Е. Г. и О. П. Б.), написание и редактирование манускрипта (А. Е. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета научного проекта государственного задания Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова № 121032300071-8 (28-3-21). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katz B, Miledi R* (1965) The Effect Of Calcium On Acetylcholine Release From Motor Nerve Terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161: 496–503.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0017>
2. *Dolphin AC* (2020) Functions of Presynaptic Voltage-gated Calcium Channels. *Function* (Oxf).
<https://doi.org/10.1093/FUNCTION/ZQAA027>
3. *Dolphin AC, Lee A* (2020) Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 21: 213–229.
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0278-2>
4. *Padamsey Z, Foster WJ, Emptage NJ* (2018) Intracellular Ca^{2+} Release and Synaptic Plasticity: A Tale of Many Stores. *Neuroscientist* 25: 208–226.
<https://doi.org/10.1177/1073858418785334>
5. *Rozov A, Zakharova Y, Vazetdinova A, Valiullina-Rakhmatullina F* (2018) The Role of Polyamine-Dependent Facilitation of Calcium Permeable AMPARs in Short-Term Synaptic Enhancement. *Front Cell Neurosci* 12.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00345>
6. *Regehr WG* (2012) Short-Term Presynaptic Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005702.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005702>
7. *Nanou E, Catterall WA* (2018) Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* 98: 466–481.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.017>
8. *Catterall WA, Few AP* (2008) Calcium Channel Regulation and Presynaptic Plasticity. *Neuron* 59: 882–901.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.005>
9. *Brimblecombe KR, Gracie CJ, Platt NJ, Cragg SJ* (2015) Gating of dopamine transmission by calcium and axonal N-, Q-, T- and L-type voltage-gated calcium channels differs between striatal domains. *J Physiol* 593: 929–946.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2014.285890>
10. *Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P* (2014) L-type Ca^{2+} channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3: 15–38.
<https://doi.org/10.1002/wmts.102>
11. *Moore TS, Hasdemir B, Vega-Riveroll L, Deuchars J, Parson SH* (2005) Properties of presynaptic P2X7-like receptors at the neuromuscular junction. *Brain Res* 1034: 40–50.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2004.12.001>
12. *Yakel JL* (2014) Nicotinic ACh receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity. *J Physiol* 592: 4147–4153.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2014.273896>
13. *De Juan-Sanz J, Holt GT, Schreier ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA* (2017) Axonal Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron* 93: 867–881.e6.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.01.010>
14. *Castillo PE, Purpura DP, Sheng M, Sabatini B, Sü T* (2012) Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a005728.
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A005728>
15. *Jeans AF, van Heusden FC, Al-Mubarak B, Padamsey Z, Emptage NJ* (2017) Homeostatic Presynaptic Plasticity Is Specifically Regulated by P/Q-type Ca^{2+} Channels at Mammalian Hippocampal Synapses. *Cell Rep* 21: 341–350.
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.09.061>
16. *De Jong AP, Verhage M* (2009) Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 19: 245–253.
<https://doi.org/10.1016/J.CONB.2009.06.005>
17. *Slater CR* (2015) The functional organization of motor nerve terminals. *Prog Neurobiol* 134: 55–103.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.004>
18. *Kaja S, Van de Ven RCG, Ferrari MD, Frants RR, Van den Maagdenberg AMJM, Plomp JJ* (2006) Compensatory Contribution of $\text{Ca}_v2.3$ Channels to Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction of Tottering Mice. *J Neurophysiol* 95: 2698–2704.
<https://doi.org/10.1152/jn.01221.2005>
19. *Pagani R, Song M, Mcenery M, Qin N, Tsien RW, Toro L, Stefani E, Uchitel OD* (2004) Differential expression of $\alpha 1$ and β subunits of voltage dependent Ca^{2+} channel at the neuromuscular junction of normal and P/Q Ca^{2+} channel knockout mouse. *Neuroscience* 123: 75–85.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.019>

20. Pardo NE, Hajela RK, Atchison WD (2006) Acetylcholine release at neuromuscular junctions of adult tottering mice is controlled by N-(Cav2.2) and R-type (Cav2.3) but not L-type (Cav1.2) Ca^{2+} channels. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1009–1020.
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.108670>
21. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67: 821–870.
<https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
22. Weiss N, Zamponi GW (2019) T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities. *Int J Biochem Cell Biol* 108: 34–39.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.008>
23. Catterall WA, Llena MJ, Gamal El-Din TM (2020) Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60: 133–154.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757>
24. Senatore A, Spafford JD (2022) Voltage-Gated Calcium Channels in Invertebrates. In: Zamponi GW, Weiss N (eds) *Voltage-Gated Calcium Channels*. Springer Internat Publ. Cham. 115–158.
25. Brockhaus J, Schreitmüller M, Repetto D, Klatt O, Reissner C, Elmslie K, Heine M, Missler M (2018) α -Neurexins together with $\alpha 2\delta$ -1 auxiliary subunits regulate Ca^{2+} influx through Cav2.1 channels. *J Neurosci* 38: 8277–8294.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-18.2018>
26. Heck J, Parutto P, Ciurazkiewicz A, Bikbaev A, Freund R, Mitlöhner J, Andres-Alonso M, Fejtova A, Holcman D, Heine M (2019) Transient Confinement of Cav2.1 Ca^{2+} -Channel Splice Variants Shapes Synaptic Short-Term Plasticity. *Neuron* 103: 66–79.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.030>
27. Thalhammer A, Contestabile A, Ermolyuk YS, Ng T, Volynski KE, Soong TW, Goda Y, Cingolani LA (2017) Alternative Splicing of P/Q-Type Ca^{2+} Channels Shapes Presynaptic Plasticity. *Cell Rep* 20: 333–343.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.055>
28. Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Uchitel OD (2002) Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review). *Mol Membr Biol* 19: 293–300.
<https://doi.org/10.1080/0968768021000035087>
29. Laghaei R, Ma J, Tarr TB, Homan AE, Kelly L, Tilwala MS, Vuocolo BS, Rajasekaran HP, Meriney SD, Dittrich M (2018) Transmitter release site organization can predict synaptic function at the neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 119: 1340–1355.
<https://doi.org/10.1152/jn.00168.2017>
30. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–23.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
31. Dolphin AC (2018) Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv* 2: 239821281879480.
<https://doi.org/10.1177/2398212818794805>
32. Groome JR, Bayless-Edwards L (2020) Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels. *Front Pharmacol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00160>
33. Tuluc P, Yarov-Yarovoy V, Benedetti B, Flucher BE (2016) Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of Cav Calcium Channels. *Structure* 24: 261–271.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.011>
34. Ferron L, Guderyan SD, Smith EJ, Zamponi GW (2022) Cav β -subunit dependence of forward and reverse trafficking of Cav1.2 calcium channels. *Mol Brain* 15: 1–7.
<https://doi.org/10.1186/S13041-022-00930-X/FIGURES/3>
35. Tran-Van-Minh A, De Waard M, Weiss N (2022) Cav β surface charged residues contribute to the regulation of neuronal calcium channels. *Mol Brain* 15: 1–5.
<https://doi.org/10.1186/S13041-021-00887-3/FIGURES/1>
36. Risher WC, Eroglu C (2020) Emerging roles for $\alpha 2\delta$ subunits in calcium channel function and synaptic connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 63: 162–169.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.04.007>
37. Cunningham KL, Littleton JT (2022) Mechanisms controlling the trafficking, localization, and abundance of presynaptic Ca^{2+} channels. *Front Mol Neurosci* 15: 1116729.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1116729>
38. Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, MacLean DM, Zhang Y, Zhou MH, Jayaraman V, Pan HL (2018) The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. *Cell Rep* 22: 2307–2321.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.021>

39. Geisler S, Schöpf CL, Stanika R, Kalb M, Campiglio M, Repetto D, Traxler L, Missler M, Obermair GJ (2019) Presynaptic $\alpha 2\delta$ -2 calcium channel subunits regulate postsynaptic GABAA receptor abundance and axonal wiring. *J Neurosci* 39: 2581–2605.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2234-18.2019>
40. Hoppa MB, Lana B, Margas W, Dolphin AC, Ryan TA (2012) $\alpha 2\delta$ expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature* 486: 122–125.
<https://doi.org/10.1038/nature11033>
41. Badawi Y, Nishimune H (2018) Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging. *Neurosci Res* 127: 78–88.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.014>
42. Ginebaugh SP, Badawi Y, Tarr TB, Meriney SD (2022) Neuromuscular Active Zone Structure and Function in Healthy and Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome States. *Biomol* 12: 740.
<https://doi.org/10.3390/Biom12060740>
43. Dittrich M, Homan AE, Meriney SD (2018) Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction. *Curr Opin Physiol* 4: 15–24.
<https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.004>
44. Homan AE, Meriney SD (2018) Active zone structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Synapse* 72.
<https://doi.org/10.1002/syn.22057>
45. Nagwaney S, Harlow ML, Jung JH, Szule JA, Ress D, Xu J, Marshall RM, McMahan UJ (2009) Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse. *J Comp Neurol* 513: 457–468.
<https://doi.org/10.1002/cne.21975>
46. Meriney SD, Dittrich M (2013) Organization and function of transmitter release sites at the neuromuscular junction. *J Physiol* 591: 3159–3165.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248625>
47. Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. *J Neurosci* 31: 2000–2008.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011>
48. Cano R, Torres-Benito L, Tejero R, Biea AI, Ruiz R, Betz WJ, Tabares L (2013) Structural and functional maturation of active zones in large synapses. *Mol Neurobiol* 47: 209–219.
<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8347-9>
49. Bukharaeva EA (2015) Synchronous and asynchronous quantal release at synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 263–269.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050025>
50. Chanaday NL, Kavalali ET (2018) Presynaptic origins of distinct modes of neurotransmitter release. *Curr Opin Neurobiol* 51: 119–126.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.03.005>
51. Kaeser PS, Regehr WG (2014) Molecular Mechanisms for Synchronous, Asynchronous, and Spontaneous Neurotransmitter Release. *Annu Rev Physiol* 76: 333–363.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170338>
52. Mueller BD, Merrill SA, Watanabe S, Liu P, Niu L, Singh A, Maldonado-Catala P, Cherry A, Rich MS, Silva M, Maricq AV, Wang Z-W, Jorgensen EM (2023) CaV1 and CaV2 calcium channels mediate the release of distinct pools of synaptic vesicles. *eLife* 12: e81407.
<https://doi.org/10.7554/eLife.81407>
53. Krick N, Ryglewski S, Pichler A, Bikbaev A, Götz T, Kobler O, Heine M, Thomas U, Duch C (2021) Separation of presynaptic Cav2 and Cav1 channel function in synaptic vesicle exo- and endocytosis by the membrane anchored Ca^{2+} pump PMCA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2106621118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2106621118>
54. Llinás R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15: 351–355.
[https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90053-B](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90053-B)
55. Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15: 2995–3012.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-04-02995.1995>
56. Hong SJ, Chang CC (1995) Inhibition of acetylcholine release from mouse motor nerve by a P-type calcium channel blocker, omega-agatoxin IVA. *J Physiol* 482(Pt 2): 283–290.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020517>
57. Protti DA, Uchitel OD (1993) Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin ω -aga-IVA. *NeuroReport* 5: 333–336.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199312000-00039>

58. Richards KS, Swensen AM, Lipscombe D, Bommert K (2007) Novel CaV2.1 clone replicates many properties of Purkinje cell CaV2.1 current. *Eur J Neurosci* 26: 2950–2961.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05912.x>
59. Molina-Campos E, Xu Y, Atchison WD (2015) Age-Dependent Contribution of P/Q- and R-Type Ca²⁺ Channels to Neuromuscular Transmission in Lethargic Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 352: 395–404.
<https://doi.org/10.1124/JPET.114.216143>
60. Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of $\alpha(1A)$ subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2: 407–415.
<https://doi.org/10.1038/8070>
61. Depetris RS, Nudler SI, Uchitel OD, Urbano FJ (2008) Altered synaptic synchrony in motor nerve terminals lacking P/Q-calcium channels. *Synapse* 62: 466–471.
<https://doi.org/10.1002/syn.20516>
62. Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Schellner RH, Tsien RW, Shin HS (1999) Ablation of P/Q-type Ca²⁺ channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the $\alpha(1A)$ -subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15245–15250.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15245>
63. Tarr TB, Wipf P, Meriney SD (2015) Synaptic Pathophysiology and Treatment of Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Mol Neurobiol* 52: 456–463.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-8887-2>
64. Meriney SD, Tarr TB, Ojala KS, Wu M, Li Y, Lacomis D, Garcia-Ocaña A, Liang M, Valdomir G, Wipf P (2018) Lambert–Eaton myasthenic syndrome: mouse passive-transfer model illuminates disease pathology and facilitates testing therapeutic leads. *Ann N Y Acad Sci* 1412: 73–81.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13512>
65. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nanoenvironments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14950–14957.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005940107>
66. Mochida S (2019) Presynaptic calcium channels. *Int J Mol Sci* 20.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092217>
67. Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schröder MS, Altmann WD, Henneberger C, Rusakov DA, Gundelfinger ED, Fejtova A (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82: 181–194.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.012>
68. Hirano M, Takada Y, Wong CF, Yamaguchi K, Kotani H, Kurokawa T, Mori MX, Snutch TP, Ronjat M, De Waard M, Mori Y (2017) C-terminal splice variants of P/Q-type Ca²⁺ channel Cav2.1 $\alpha 1$ subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins. *J Biol Chem* 292: 9365–9381.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778829>
69. Calloway N, Gouzer G, Xue M, Ryan TA (2015) The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *eLife* 4.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07728>
70. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* 10: 691–701.
<https://doi.org/10.1038/nn1904>
71. Juranek J, Mukherjee K, Rickmann M, Martens H, Calka J, Südhof TC, Jahn R (2006) Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification. *Eur J Neurosci* 24: 3043–3052.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05183.x>
72. Takikawa K, Nishimune H (2022) Similarity and Diversity of Presynaptic Molecules at Neuromuscular Junctions and Central Synapses. *Biomolecules* 12: 179.
<https://doi.org/10.3390/biom12020179>
73. Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA (1996) Isoform-specific interaction of the $\alpha 1A$ subunits of brain Ca²⁺ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7363–7368.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7363>
74. Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin [1]. *Nat Neurosci* 2: 939–941.
<https://doi.org/10.1038/14721>

75. *Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW* (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378: 623–626.
<https://doi.org/10.1038/378623a0>
76. *Djillani A, Bazinet J, Catterall WA* (2022) Synaptotagmin-7 Enhances Facilitation of Cav2.1 Calcium Channels. *eNeuro* 9.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0081-22.2022>
77. *Turecek J, Regehr WG* (2018) Synaptotagmin 7 Mediates Both Facilitation and Asynchronous Release at Granule Cell Synapses. *J Neurosci* 38: 3240–3251.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3207-17.2018>
78. *Jackman SL, Regehr WG* (2017) The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. *Neuron* 94: 447–464.
<https://doi.org/10.1016/j.NEURON.2017.02.047>
79. *Jiang X, Lautermilch NJ, Watari H, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA* (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin- dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 341–346.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0710213105>
80. *Yokoyama CT, Myers SJ, Fu J, Mockus SM, Scheuer T, Catterall WA* (2005) Mechanism of SNARE protein binding and regulation of Cav2 channels by phosphorylation of the synaptic protein interaction site. *Mol Cell Neurosci* 28: 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.08.019>
81. *Serra SA, Gené GG, Elorza-Vidal X, Fernández-Fernández JM* (2018) Cross talk between β subunits, intracellular Ca²⁺ signaling, and SNAREs in the modulation of CaV2.1 channel steady-state inactivation. *Physiol Rep* 6.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13557>
82. *Demaria CD, Soong TW, Alseikhan BA, Alvania RS, Yue DT* (2001) Calmodulin bifurcates the local Ca²⁺ signal that modulates P/Q-type Ca²⁺ channels. *Nature* 411: 484–489.
<https://doi.org/10.1038/35078091>
83. *Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA* (2008) Regulation of Presynaptic CaV2.1 Channels by Ca²⁺ Sensor Proteins Mediates Short-Term Synaptic Plasticity. *Neuron* 57: 210–216.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.036>
84. *Nanou E, Yan J, Whitehead NP, Kim MJ, Froehner SC, Scheuer T, Catterall WA* (2016) Altered short-term synaptic plasticity and reduced muscle strength in mice with impaired regulation of presynaptic CaV2.1 Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1068–1073.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1524650113>
85. *Zamponi GW, Currie KPM* (2013) Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 1828: 1629–1643.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2012.10.004>
86. *Zhang Y, Chen YH, Bangaru SD, He L, Abele K, Tanabe S, Kozasa T, Yang J* (2008) Origin of the voltage dependence of G-protein regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 28: 14176–14188.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1350-08.2008>
87. *Cinalli AR, Guarracino JF, Fernandez V, Roquel LI, Losavio AS* (2013) Inosine induces presynaptic inhibition of acetylcholine release by activation of A3 adenosine receptors at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 169: 1810–1823.
<https://doi.org/10.1111/bph.12262>
88. *Silinsky EM* (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 558: 389–401.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061457>
89. *Guarracino JF, Cinalli AR, Fernández V, Roquel LI, Losavio AS* (2016) P2Y13 receptors mediate presynaptic inhibition of acetylcholine release induced by adenine nucleotides at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 326: 31–44.
<https://doi.org/10.1016/j.NEUROSCIENCE.2016.03.066>
90. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2017) The role of pannexin 1 in the purinergic regulation of synaptic transmission in mouse motor synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 11: 311–320.
<https://doi.org/10.1134/S1990747817040067/METRICS>
91. *Santafé MM, Salon I, García N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomàs J* (2003) Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur J Neurosci* 17: 119–127.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02428.x>
92. *Dai S, Hall DD, Hell JW* (2009) Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 89: 411–452.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2007>

93. Sakurai T, Hell JW, Woppmann A, Miljanich GP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the $\alpha(1A)$ subunit of brain calcium channels. *J Biol Chem* 270: 21234–21242.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21234>
94. Huang CC, Wang SJ, Gean PW (1998) Selective enhancement of P-type calcium currents by isoproterenol in the rat amygdala. *J Neurosci* 18: 2276–2282.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-06-02276.1998>
95. Rodríguez-Menchaca AA, Adney SK, Zhou L, Logothetis DE (2012) Dual regulation of voltage-sensitive ion channels by PIP2. *Front Pharmacol* 3: 170.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00170>
96. Wu L, Bauer CS, Zhen X, Guang, Xie C, Yang J (2002) Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. *Nature* 419: 947–952.
<https://doi.org/10.1038/nature01118>
97. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Nature* 385: 442–446.
<https://doi.org/10.1038/385442a0>
98. Santafé MM, García N, Lanuza MA, Tomàs M, Tomàs J (2009) Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse. *J Neurosci Res* 87: 683–690.
<https://doi.org/10.1002/jnr.21885>
99. Mochida S (2018) Presynaptic calcium channels. *Neurosci Res* 127: 33–44.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.012>
100. Magupalli VG, Mochida S, Yan J, Jiang X, Westenbroek RE, Nairn AC, Scheuer T, Catterall WA (2013) Ca^{2+} -independent activation of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain of $\text{CaV}2.1$ calcium channels. *J Biol Chem* 288: 4637–4648.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.369058>
101. Digregorio DA, Peskoff A, Vergara JL (1999) Measurement of Action Potential-Induced Presynaptic Calcium Domains at a Cultured Neuromuscular Junction. *J Neurosci* 19(18): 7846–7859.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07846.1999>
102. Oheim M, Kirchhoff F, Stühmer W (2006) Calcium microdomains in regulated exocytosis. *Cell Calcium* 40: 423–439.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.007>
103. Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2012) Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13: 7–21.
<https://doi.org/10.1038/nrn3125>
104. Stanley EF (2016) The Nanophysiology of Fast Transmitter Release. *Trends Neurosci* 39: 183–197.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.005>
105. Tarr TB, Dittrich M, Meriney SD (2013) Are unreliable release mechanisms conserved from NMJ to CNS? *Trends Neurosci* 36: 14–22.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.009>
106. Miteva A, Gaydukov A, Balezina O (2020) Interaction between Calcium Chelators and the Activity of P2X7 Receptors in Mouse Motor Synapses. *Int J Mol Sci* 2034(21): 2034.
<https://doi.org/10.3390/IJMS21062034>
107. Dittman JS, Ryan TA (2019) The control of release probability at nerve terminals. *Nat Rev Neurosci* 20: 177–186.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0111-3>
108. Bornschein G, Schmidt H (2019) Synaptotagmin Ca^{2+} sensors and their spatial coupling to presynaptic CaV channels in central cortical synapses. *Front Mol Neurosci* 11.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00494>
109. Fekete A, Nakamura Y, Yang YM, Herlitze S, Mark MD, DiGregorio DA, Wang LY (2019) Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules. *Nat Commun* 10.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08452-2>
110. Nakamura Y, Reva M, Digregorio DA (2018) Variations in Ca^{2+} influx can alter chelator-based estimates of Ca^{2+} channel–synaptic vesicle coupling distance. *J Neurosci* 38: 3971–3987.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2061-17.2018>
111. Wang LY, Augustine GJ (2015) Presynaptic nanodomains: A tale of two synapses. *Front Cell Neurosci* 8: 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00455>
112. Ginebaugh SP, Badawi Y, Laghaei R, Mersky G, Wallace CJ, Tarr TB, Kaufhold C, Reddel S, Meriney SD (2023) Simulations of active zone structure and function at mammalian NMJs predict that loss of calcium channels alone is not sufficient to replicate LEMS effects. *J Neurophysiol* 129: 1259–1277.
<https://doi.org/10.1152/jn.00404.2022>

113. Wang X, Pinter MJ, Rich MM (2010) Ca^{2+} dependence of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 103: 659–666.
<https://doi.org/10.1152/jn.00708.2009>
114. Wang X, Wang Q, Englisch KL, Rich MM (2010) Activity-dependent regulation of the binomial parameters p and n at the mouse neuromuscular junction in vivo. *J Neurophysiol* 104: 2352–2358.
<https://doi.org/10.1152/jn.00460.2010>
115. Gaffield MA, Tabares L, Betz WJ (2009) Preferred sites of exocytosis and endocytosis colocalize during high- but not lower-frequency stimulation in mouse motor nerve terminals. *J Neurosci* 29: 15308–15316.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4646-09.2009>
116. Tabares L, Ruiz R, Linares-Clemente P, Gaffield MA, Alvarez De Toledo G, Fernandez-Chacón R, Betz WJ (2007) Monitoring synaptic function at the neuromuscular junction of a mouse expressing synaptopHluorin. *J Neurosci* 27: 5422–5430.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0670-07.2007>
117. Wyatt RM, Balice-Gordon RJ (2008) Heterogeneity in synaptic vesicle release at neuromuscular synapses of mice expressing synaptopHluorin. *J Neurosci* 28: 325–335.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3544-07.2008>
118. Cano R, Ruiz R, Shen C, Tabares L, Betz WJ (2012) The functional landscape of a presynaptic nerve terminal. *Cell Calcium* 52: 321–326.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.012>
119. Newman ZL, Hoagland A, Aghi K, Worden K, Levy SL, Son JH, Lee LP, Isacoff EY (2017) Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the Drosophila Larval Neuromuscular Junction. *Neuron* 93: 1388–1404.e10.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.028>
120. Luo F, Dittrich M, Cho S, Stiles JR, Meriney SD (2015) Transmitter release is evoked with low probability predominately by calcium flux through single channel openings at the frog neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 113: 2480–2489.
<https://doi.org/10.1152/jn.00879.2014>
121. Scarnati MS, Clarke SG, Pang ZP, Paradiso KG (2020) Presynaptic Calcium Channel Open Probability and Changes in Calcium Influx Throughout the Action Potential Determined Using AP-Waveforms. *Front Synaptic Neurosci* 12: 17.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00017>
122. Laghaei R, Meriney SD (2022) Microphysiological Modeling of the Structure and Function of Neuromuscular Transmitter Release Sites. *Front Synaptic Neurosci* 14: 34.
<https://doi.org/10.3389/FNSYN.2022.917285>
123. Nudler S, Piriz J, Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Piedras Renteria ES, Uchitel OD (2003) Ca^{2+} channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 998: 11–17.
<https://doi.org/10.1196/annals.1254.003>
124. Rosato-Siri MD, Piriz J, Giugovaz Tropper BA, Uchitel OD (2002) Differential Ca^{2+} -dependence of transmitter release mediated by P/Q- and N-type calcium channels at neonatal rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 15: 1874–1880.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02015.x>
125. Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol* 514: 533–540.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.533ae.x>
126. Chand KK, Lee KM, Schenning MP, Lavidis NA, Noakes PG (2015) Loss of $\beta 2$ -laminin alters calcium sensitivity and voltage-gated calcium channel maturation of neurotransmission at the neuromuscular junction. *J Physiol* 593: 245–265.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284133>
127. Urbano FJ, Piedras-Renteria ES, Jun K, Shin HS, Uchitel OD, Tsien RW (2003) Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3491–3496.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0437991100>
128. Tsentsevitsky AN, Khuzakmetova VF, Bukharaeva EA, Petrov AM (2024) The Mechanism of $\alpha 2$ adrenoreceptor-dependent Modulation of Neurotransmitter Release at the Neuromuscular Junctions. *Neurochem Res* 49: 453–465.
<https://doi.org/10.1007/s11064-023-04052-1>
129. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440–443.
<https://doi.org/10.1038/316440a0>
130. Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC (1986) Mechanisms of calcium channel modulation by β -adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J Mol Cell Cardiol* 18: 691–710.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(86\)80941-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(86)80941-5)

131. *Godfraind T* (2017) Discovery and development of calcium channel blockers. *Front Pharmacol* 8: 286.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>
132. *Torben Bech-Hansen N, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM* (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19: 264–267.
<https://doi.org/10.1038/947>
133. *Zuccotti A, Clementi S, Reinbothe T, Torrente A, Vandael DH, Pirone A* (2011) Structural and functional differences between L-type calcium channels: Crucial issues for future selective targeting. *Trends Pharmacol Sci* 32: 366–375.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.02.012>
134. *Ortner NJ, Kaserer T, Copeland JN, Striessnig J* (2020) De novo CACAN1D Ca^{2+} channelopathies: clinical phenotypes and molecular mechanism. *Pflugers Arch* 472(7): 755–773.
<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02418-w>
135. *Lieb A, Ortner N, Striessnig J* (2014) C-terminal modulatory domain controls coupling of voltage-sensing to pore opening in Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J* 106: 1467–1475.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.017>
136. *Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni ME, Sinnegger-Brauns MJ, Herzig S, Striessnig J, Koschak A* (2011) Functional properties of a newly identified c-terminal splice variant of Cav1.3 L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 286: 42736–42748.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269951>
137. *Xu W, Lipscombe D* (2001) Neuronal Cav1.3 $\alpha 1$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21: 5944–5951.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-05944.2001>
138. *Soldatov NM* (2012) Molecular Determinants of Ca v 1.2 Calcium Channel Inactivation. *ISRN Mol Biol* 2012: 1–10.
<https://doi.org/10.5402/2012/691341>
139. *Tadross MR, Johny MB, Yue DT* (2010) Molecular endpoints of Ca^{2+} /calmodulin- and voltage-dependent inactivation of Cav1.3 channels. *J Gen Physiol* 135: 197–215.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910308>
140. *Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P, Charnet P* (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca^{2+} channels. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 104–117.
141. *Abderemane-Ali F, Findeisen F, Rossen ND, Minor DL* (2019) A Selectivity Filter Gate Controls Voltage-Gated Calcium Channel Calcium-Dependent Inactivation. *Neuron* 101: 1134–1149e3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.011>
142. *Kuzmenkina E, Novikova E, Jangsangthong W, Matthes J, Herzig S* (2019) Single-Channel Resolution of the Interaction between C-Terminal CaV1.3 Isoforms and Calmodulin. *Biophys J* 116: 836–846.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.01.025>
143. *Liu N, Yang Y, Ge L, Liu M, Colecraft HM, Liu X* (2017) Cooperative and acute inhibition by multiple C-terminal motifs of L-type Ca^{2+} channels. *eLife* 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.21989>
144. *Simms BA, Zamponi GW* (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82: 24–45.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
145. *Simms BA, Souza IA, Rehak R, Zamponi GW* (2014) The amino-terminus of high voltage activated calcium channels: CaM you or can't you? *Channels* 8: 370–375.
<https://doi.org/10.4161/chan.29313>
146. *Sahu G, Asmara H, Zhang FX, Zamponi GW, Turner RW* (2017) Activity-dependent facilitation of CaV1.3 calcium channels promotes Kca3.1 activation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 37: 11255–11270.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0967-17.2017>
147. *Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, Abiria S, Kim KY, Usachev YM, Obermair GJ, Colbran RJ, Lee A* (2010) Ca^{2+} -Dependent facilitation of Cav1.3 Ca^{2+} channels by densin and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* 30: 5125–5135.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4367-09.2010>
148. *Lipscombe D, Andrade A, Allen SE* (2013) Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1522–1529.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.018>

149. *Bartels P, Yu D, Huang H, Hu Z, Herzig S, Soong TW* (2018) Alternative Splicing at N Terminus and Domain I Modulates CaV1.2 Inactivation and Surface Expression. *Biophys J* 114: 2095–2106. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.029>
150. *Savalli N, Pantazis A, Sigg D, Weiss JN, Neely A, Olcese R* (2016) The $\alpha 2\delta$ -1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca^{2+} influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol* 148: 147–159. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611586>
151. *Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW* (2014) L-type CaV1.2 calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 94: 303–326. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2013>
152. *Moreno CM, Dixon RE, Tajada S, Yuan C, Opitz-Araya X, Binder MD, Santana LF* (2016) Ca^{2+} entry into neurons is facilitated by cooperative gating of clustered Cav1.3 channels. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15744>
153. *Murphy JG, Sanderson JL, Gorski JA, Scott JD, Catterall WA, Sather WA, Dell'Acqua ML* (2014) AKAP-anchored PKA maintains neuronal L-type calcium channel activity and NFAT transcriptional signaling. *Cell Rep* 7: 1577–1588. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.027>
154. *Wang X, Marks CR, Perfitt TL, Nakagawa T, Lee A, Jacobson DA, Colbran RJ* (2017) A novel mechanism for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II targeting to L-type Ca^{2+} channels that initiates longrange signaling to the nucleus. *J Biol Chem* 292: 17324–17336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788331>
155. *Ma H, Cohen S, Li B, Tsien RW* (2013) Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. *Biosci Rep* 33: 97–101. <https://doi.org/10.1042/BSR20120099>
156. *Berger SM, Bartsch D* (2014) The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res* 357: 463–476. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1936-3>
157. *Murphy JG, Crosby KC, Dittmer PJ, Sather WA, Dell'Acqua ML* (2019) AKAP79/150 recruits the transcription factor NFAT to regulate signaling to the nucleus by neuronal L-type Ca^{2+} channels. *Mol Biol Cell* 30: 1743–1756. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0060>
158. *Perfitt TL, Wang X, Dickerson MT, Stephenson JR, Nakagawa T, Jacobson DA, Colbran RJ* (2020) Neuronal L-type calcium channel signaling to the nucleus requires a novel CaMKII α -SHANK3 interaction. *J Neurosci* 40: 2000–2014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0893-19.2020>
159. *Kim SS, Lee EH, Lee K, Jo S-H, Seo SR* (2015) PKA regulates calcineurin function through the phosphorylation of RCAN1: Identification of a novel phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 459: 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.155>
160. *Sridharan PS, Lu Y, Rice RC, Pieper AA, Rajadhyaksha AM* (2020) Loss of Cav1.2 channels impairs hippocampal theta burst stimulation-induced long-term potentiation. *Channels* 14: 287–293. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1807851>
161. *Vandael D, Okamoto Y, Jonas P* (2021) Transsynaptic modulation of presynaptic short-term plasticity in hippocampal mossy fiber synapses. *Nat Commun* 12(12): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23153-5>
162. *Hasreiter J, Goldnagl L, Böhm S, Kubista H* (2014) Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels operate in a similar voltage range but show different coupling to Ca^{2+} -dependent conductances in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 306. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2013>
163. *Plumbly W, Brandon N, Deeb TZ, Hall J, Harwood AJ* (2019) L-type voltage-gated calcium channel regulation of in vitro human cortical neuronal networks. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50226-9>
164. *Wang D, Grillner S, Wallén P* (2013) Calcium dynamics during NMDA-induced membrane potential oscillations in lamprey spinal neurons – contribution of L-type calcium channels (CaV1.3). *J Physiol* 591: 2509–2521. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248526>
165. *Leitch B, Szostek A, Lin R, Shevtsova O* (2009) Subcellular distribution of L-type calcium channel subtypes in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 164: 641–657. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.08.006>
166. *Giugovaz-Tropper B, González-Inchauspe C, Di Guilmi MN, Urbano FJ, Forsythe ID, Uchitel OD* (2011) P/Q-type calcium channel ablation in a mice glycinergic synapse mediated by multiple types of Ca^{2+} channels alters transmitter release and short term plasticity. *Neuroscience* 192: 219–230. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.06.021>

167. *Holmgaard K, Jensen K, Lambert JDC* (2009) Imaging of Ca^{2+} responses mediated by presynaptic L-type channels on GABAergic boutons of cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1249: 79–90. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.10.033>
168. *Subramanian J, Morozov A* (2011) Erk1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels. *J Neurosci* 31: 4755–4764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6594-10.2011>
169. *Tippens AL, Pare JF, Langwieser N, Moosmang S, Milner TA, Smith Y, Lee A* (2008) Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca^{2+} channels in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506: 569–583. <https://doi.org/10.1002/CNE.21567>
170. *Giansante G, Marte A, Romei A, Prestigio C, Onofri F, Benfenati F, Baldelli P, Valente P* (2020) Presynaptic L-Type Ca^{2+} Channels Increase Glutamate Release Probability and Excitatory Strength in the Hippocampus during Chronic Neuroinflammation. *J Neurosci* 40: 6825–6841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2981-19.2020>
171. *Rey S, Maton G, Satake S, Llano I, Kang S, Surmeier DJ, Silverman RB, Collin T* (2020) Physiological involvement of presynaptic L-type voltage-dependent calcium channels in GABA release of cerebellar molecular layer interneurons. *J Neurochem* 155: 390–402. <https://doi.org/10.1111/JNC.15100>
172. *Shin MC, Nonaka K, Yamaga T, Wakita M, Akaike H, Akaike N* (2018) Calcium channel subtypes on glutamatergic mossy fiber terminals synapsing onto rat hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol* 120: 1264–1273. <https://doi.org/10.1152/JN.00571.2017>
173. *Atchison WD, O'Leary SM* (1987) Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction. *Brain Res* 419: 315–319. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90599-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90599-3)
174. *Khuzakhmetova VF, Nurullin LF, Bukharaeva EA, Nikolsky EE* (2016) Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in high asynchrony of transmitter release in neuromuscular synapses of newborn rats. *Dokl Biol Sci* 470: 220–223. <https://doi.org/10.1134/S0012496616050124>
175. *García N, Hernández P, Lanuza MA, Tomàs M, Cilleros-Mañé V, Just-Borràs L, Duran-Vigara M, Polishchuk A, Balanya-Segura M, Tomàs J* (2022) Involvement of the Voltage-Gated Calcium Channels L- P/Q- and N-Types in Synapse Elimination During Neuromuscular Junction Development. *Mol Neurobiol* 59: 4044–4064. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02818-2>
176. *Losavio A, Muchnik S* (1997) Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 273. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.c1835>
177. *Protti DA, Reislin R, Mackinley TA, Uchitel OD* (1996) Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology* 46: 1391–1396. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.5.1391>
178. *Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R* (1992) P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3330–3333. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3330>
179. *Beske PH, Hoffman KM, Machamer JB, Eisen MR, McNutt PM* (2017) Use-dependent potentiation of voltage-gated calcium channels rescues neurotransmission in nerve terminals intoxicated by botulinum neurotoxin serotype A. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16064-3>
180. *Flink MT, Atchison WD* (2003) Iberitoxin-induced block of Ca^{2+} -activated K^{+} channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 646–652. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.046102>
181. *Gaydukova AE, Tarasova EO, Balezina OP* (2013) Calcium-dependent phosphatase calcineurin downregulates evoked neurotransmitter release in neuromuscular junctions of mice. *Neurochem J* 7: 29–33. <https://doi.org/10.1134/S1819712413010030>
182. *Zhilyakov N, Arkhipov A, Malomouzh A, Samigullin D* (2021) Activation of Neuronal Nicotinic Receptors Inhibits Acetylcholine Release in the Neuromuscular Junction by Increasing Ca^{2+} Flux through Cav1 Channels. *Int J Mol Sci* 22: 9031. <https://doi.org/10.3390/IJMS22169031>
183. *Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD* (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol* 497: 687–697. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021800>

184. *Santafé MM, Garcia N, Lanuza MA, Uchitel OD, Tomás J* (2001) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience* 102: 697–708.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00507-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00507-8)
185. *Santafé MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD* (1999) Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience* 95: 227–234.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00382-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00382-6)
186. *Balezina OP, Bogacheva PO, Orlova TY* (2007) Effect of L-type calcium channel blockers on activity of newly formed synapses in mice. *Bull Exp Biol Med* 143: 171–174.
<https://doi.org/10.1007/S10517-007-0041-Y>
187. *Bogacheva PO, Balezina OP* (2013) Multidirectional Effects of Calmodulin Kinase II on Transmitter Release in Mature and Newly Formed Mouse Motor Synapses. *Bull Exp Biol Med* 154: 316–319.
<https://doi.org/10.1007/S10517-013-1940-8>
188. *Urbano FJ, Uchitel OD* (1999) L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca^{2+} buffer at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 437: 523–528.
<https://doi.org/10.1007/s004240050813>
189. *Urbano FJ, Depetris RS, Uchitel OD* (2001) Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 441: 824–831.
<https://doi.org/10.1007/s004240000489>
190. *Flink MT, Atchison WD* (2002) Passive transfer of Lambert-Eaton syndrome to mice induces dihydropyridine sensitivity of neuromuscular transmission. *J Physiol* 543: 567–576.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.021048>
191. *Giovannini F, Sher E, Webster R, Boot J, Lang B* (2002) Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 136: 1135–1145.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704818>
192. *Tsentsevitsky AN, Khuzakhmetova VF, Vasin AL, Samigullin DV, Bukharaeva EA* (2015) Calcium modulation of the kinetics of evoked quantum secretion in neuromuscular synapses of cold- and warm-blooded animals. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 270–277.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050177>
193. *Protti DA, Uchitel OD* (1997) P/Q-type calcium channels activate neighboring calcium-dependent potassium channels in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch* 434: 406–412.
<https://doi.org/10.1007/s004240050414>
194. *Gaydukov AE, Melnikova SN, Balezina OP* (2009) Facilitation of Acetylcholine Secretion in Mouse Motor Synapses Caused by Calcium Release from Depots upon Activation of L-Type Calcium Channels. *Bull Exp Biol Med* 148: 163–166.
<https://doi.org/10.1007/S10517-009-0678-9>
195. *Tarasova EO, Gaydukov AE, Balezina OP* (2015) Methods of activation and the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of acetylcholine secretion in the motor synapses of mice. *Neurochem J* 9: 101–107.
<https://doi.org/10.1134/S1819712415020099>
196. *Mermelstein PG, Bito H, Deisseroth K, Tsien RW* (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* 20: 266–273.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-01-00266.2000>
197. *Perissinotti PP, Tropper BG, Uchitel OD* (2008) L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 27: 1333–1344.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06113.x>
198. *Bradford AB, Machamer JB, Russo TM, McNutt PM* (2018) 3,4-diaminopyridine reverses paralysis in botulinum neurotoxin-intoxicated diaphragms through two functionally distinct mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 341: 77–86.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.012>
199. *Ojala KS, Ginebaugh SP, Wu M, Miller EW, Ortiz G, Covarrubias M, Meriney SD* (2021) A high-affinity, partial antagonist effect of 3,4-diaminopyridine mediates action potential broadening and enhancement of transmitter release at NMJs. *J Biol Chem* 296: 100302.
<https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100302>
200. *Giglio LD, Cortese F, Pennisi EM* (2020) Aminopyridines in the treatment of multiple sclerosis and other neurological disorders. *Neurodegener Dis Manag* 10: 409–423.
<https://doi.org/10.2217/nmt-2020-0018>

201. *Simon CM, Blanco-Redondo B, Buettner JM, Pagiazitis JG, Fletcher EV, Sime Longang JK, Mentis GZ* (2021) Chronic pharmacological increase of neuronal activity improves sensory-motor dysfunction in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 41: 376–389.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2142-20.2020>
202. *Ng F, Lee DC, Schruppf LA, Mazurek ME, Lee Lo V, Gill SK, Maselli RA* (2017) Effect of 3,4-diaminopyridine at the murine neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 55: 223–231.
<https://doi.org/10.1002/mus.25208>
203. *Wu ZZ, Li DP, Chen SR, Pan HL* (2009) Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel β subunit. *J Biol Chem* 284: 36453–36461.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075523>
204. *Li L, Li DP, Chen SR, Chen J, Hu H, Pan HL* (2014) Potentiation of high voltage-activated calcium channels by 4-Aminopyridine depends on subunit composition. *Mol Pharmacol* 86: 760–772.
<https://doi.org/10.1124/mol.114.095505>
205. *Mériney SD, Lacomis D* (2018) Reported direct aminopyridine effects on voltage-gated calcium channels is a high-dose pharmacological off-target effect of no clinical relevance. *J Biol Chem* 293: 16100.
<https://doi.org/10.1074/jbc.L118.005425>
206. *Gaydukova AE, Marchenkova AA, Balezina OP* (2012) Involvement of basal and calcium-activated protein kinase C in neurotransmitter secretion in mouse motor synapses. *Bull Exp Biol Med* 153: 820–823.
207. *Correia-De-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (1996) Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol* 76: 3910–3919.
<https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.6.3910>
208. *Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (2000) A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: Influence of stimulus paradigm on calcium mobilization. *J Neurochem* 74: 2462–2469.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0742462.x>
209. *Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA* (2000) Influence of stimulation on Ca^{2+} recruitment triggering $[^3\text{H}]$ acetylcholine release from the rat motor-nerve endings. *Eur J Pharmacol* 406: 355–362.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00686-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00686-5)
210. *Tarasova EO, Miteva AS, Gaidukov AE, Balezina OP* (2015) The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses. *Biochem Mosc Suppl Ser Membr Cell Biol* 9: 318–328.
<https://doi.org/10.1134/S1990747815050141>
211. *García N, Santafé MM, Salon I, Lanuza MA, Tomàs J* (2005) Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol* 20: 733–743.
<https://doi.org/10.14670/HH-20.733>
212. *Santafé MM, Lanuza MA, García N, Tomàs J* (2006) Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci* 23: 2048–2056.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04753.x>
213. *Molchanova AI, Balezina OP, Gaydukova AE* (2024) BDNF Prodomain Inhibits Neurotransmitter Quantal Release in Mouse Motor Synapses with the Necessary Participation of Sortilin and Adenosine A1-Receptors. *J Evol Biochem Physiol* 60: 363–379.
<https://doi.org/10.1134/S0022093024010277>
214. *Nadal L, García N, Hurtado E, Simó A, Tomàs M, Lanuza MA, Santafé M, Tomàs J* (2016) Presynaptic muscarinic acetylcholine autoreceptors (M1, M2 and M4 subtypes), adenosine receptors (A1 and A2A) and tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB) modulate the developmental synapse elimination process at the neuromuscular junction. *Mol Brain* 9.
<https://doi.org/10.1186/s13041-016-0248-9>
215. *Santafé MM, Priego M, Obis T, García N, Tomàs M, Lanuza MA, Tomàs J* (2015) Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Eur J Neurosci* 42: 1775–1787.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12922>
216. *Cilleros-Mañé V, Just-Borràs L, Tomàs M, García N, Tomàs JM, Lanuza MA* (2020) The M_2 muscarinic receptor, in association to M_1 , regulates the neuromuscular PKA molecular dynamics. *FASEB J* 34: 4934–4955.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902113R>

217. *Tarasova EO, Gaydukov AE, Balezina OP* (2018) Calcineurin and Its Role in Synaptic Transmission. *Biochemistry (Mosc)* 83(6): 674–689.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918060056>
218. *Giniatullin AR, Mukhutdinova KA, Petrov AM* (2024) Mechanism of Purinergic Regulation of Neurotransmission in Mouse Neuromuscular Junction: The Role of Redox Signaling and Lipid Rafts. *Neurochem Res* 49: 2021–2037.
<https://doi.org/10.1007/s11064-024-04153-5>
219. *Perissinotti PP, Uchitel OD* (2010) Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci* 32: 985–996.
<https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07332.X>
220. *Noronha-Matos JB, Morais T, Trigo D, Timóteo MA, Magalhães-Cardoso MT, Oliveira L, Correia-De-Sá P* (2011) Tetanic failure due to decreased endogenous adenosine A2A tonus operating neuronal Cav1 (L-type) influx in Myasthenia gravis. *J Neurochem* 117: 797–811.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07216.x>
221. *Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P* (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A2A receptor facilitation of L-type Ca^{2+} influx into rat motor nerve terminals. *J Physiol* 560: 157–168.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.067595>
222. *Oliveira L, Correia-De-Sá P* (2005) Protein kinase A and Cav1 (L-type) channels are common targets to facilitatory adenosine A2A and muscarinic M1 receptors on rat motoneurons. *Neurosignals* 14: 262–272.
<https://doi.org/10.1159/000088642>
223. *Nascimento F, Sebastião AM, Ribeiro JA* (2015) Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1(G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signal* 11: 471–480.
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9465-4>
224. *Sebastião AM, Rei N, Ribeiro JA* (2018) Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and adenosine receptors. *Front Pharmacol* 9.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00267>
225. *Miteva AS, Gaydukov AE, Shestopalov VI, Balezina OP* (2018) Mechanism of P2X7 receptor-dependent enhancement of neuromuscular transmission in pannexin 1 knockout mice. *Purinergic Signal* 14: 459–469.
<https://doi.org/10.1007/S11302-018-9630-7>
226. *Tarasova EO, Khotkina NA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Spontaneous Acetylcholine Release Potentiation Induced by 2-Arachidonoylglycerol and Anandamide in Mouse Motor Synapses. *Mosc Univ Biol Sci Bull* 76: 1–6.
<https://doi.org/10.3103/S0096392521010053>
227. *Tarasova EO, Khotkina NA, Bogacheva PO, Chernyshev KA, Gaydukov AE, Balezina OP* (2021) Noncanonical Potentiation of Evoked Quantal Release of Acetylcholine by Cannabinoids Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Mouse Motor Synapses. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser Membr Cell Biol* 15: 395–405.
<https://doi.org/10.1134/S199074782106012X>
228. *Balezina OP, Tarasova EO, Gaydukov AE* (2021) Noncanonical Activity of Endocannabinoids and Their Receptors in Central and Peripheral Synapses. *Biochemistry (Mosc)* 86(7): 818–832.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921070038>
229. *Dittmer PJ, Dell'Acqua ML, Sather WA* (2014) Ca^{2+} /calcineurin-dependent inactivation of neuronal L-Type Ca^{2+} channels requires priming by AKAP-anchored protein kinase A. *Cell Rep* 7: 1410–1416.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.039>
230. *Qian H, Patriarchi T, Price JL, Matt L, Lee B, Nieves-Cintrón M, Buonarati OR, Chowdhury D, Nanou E, Nystoriak MA, Catterall WA, Poomvanicha M, Hofmann F, Navedo MF, Hell JW* (2017) Phosphorylation of Ser1928 mediates the enhanced activity of the L-type Ca^{2+} channel Cav1.2 by the β_2 -adrenergic receptor in neurons. *Sci Signal* 10.
<https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.AAF9659>
231. *Huang S, Kirkwood A* (2020) Endocannabinoid Signaling Contributes to Experience-Induced Increase of Synaptic Release Sites From Parvalbumin Interneurons in Mouse Visual Cortex. *Front Cell Neurosci* 14: 304.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.571133>
232. *Palma AG, Muchnik S, Losavio AS* (2011) Excitatory effect of the A2A adenosine receptor agonist CGS-21680 on spontaneous and K^{+} -evoked acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 172: 164–176.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.015>

Voltage-Dependent Calcium Channels in Mammalian Motor Synapses – Triggers and Modulators of Neuromuscular Transmission

A. E. Gaydukov^{a,*}, and O. P. Balezina^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

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

The initiation of fast synchronous quantal release of neurotransmitters in central and peripheral synapses is ensured by a local increase in the concentration of Ca^{2+} ions in the nerve terminals near the Ca^{2+} sensors of synaptic vesicles in response to depolarization of the presynaptic membrane by an action potential (AP) propagating along the axon. The Ca^{2+} -entry from the outside through presynaptic voltage-dependent Ca^{2+} channels $\text{Ca}_v2.1$ or $\text{Ca}_v2.2$ (P/Q- or N-type) is the main way of forming a dynamic Ca^{2+} signal that initiates the process of exocytosis of synaptic vesicles in virtually all types of chemical synapses and is capable of inducing the development of certain Ca^{2+} -dependent forms of synaptic plasticity. However, in recent years it has become obvious that the set of sources and the spectrum of presynaptic Ca^{2+} signals are very diverse. Identification of the ensemble of regulatory Ca^{2+} -entries operating in combination with their corresponding targets, description of their contribution to the mechanisms controlling quantal release of neurotransmitter is a topical area of modern synaptic physiology. Among such additional to the trigger Ca^{2+} -inputs, L-type Ca^{2+} -channels are of particular interest. Their role and activation conditions in neuromuscular junctions (NMJs) are poorly studied and do not provide an unambiguous idea of the place of this Ca^{2+} -entry in the regulation of acetylcholine (ACh) release in vertebrate motor synapses. This review systematizes the currently available research results on the diverse functional role of voltage-gated Ca^{2+} -channels in mammalian NMJs and presynaptic signaling pathways that control these Ca^{2+} -inputs and their participation in the processes of fine-tuning the ACh quantal release.

Keywords: neuromuscular synapse, P/Q-type Ca^{2+} -channels, L-type Ca^{2+} -channels, quantal release, acetylcholine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ ПЕРИОДА РАННЕГО
ОРГАНОГЕНЕЗА НА ПОКАЗАТЕЛИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО
РИТМА У КРЫСЯТ В ПРЕПУБЕРТАТНЫЙ И ПУБЕРТАТНЫЙ ПЕРИОДЫ**

© 2024 г. А. В. Граф^{1,2,*}, А. С. Маклакова¹, М. В. Маслова¹, Я. В. Крушинская¹,
А. А. Гусева¹, Н. А. Соколова¹

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

²Физтех-школа природоподобных, плазменных и ядерных технологий имени И. В. Курчатова,
Москва, Россия

*E-mail: nastjushka@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 01.10.2024 г.

Принята к публикации 01.10.2024 г.

Факторы риска, связанные с воздействием окружающей среды, особенно в критические периоды внутриутробного развития, влияют на развитие плода и повышают риск определенных заболеваний во взрослой жизни, в том числе сердечно-сосудистых (ССЗ). Самой распространенной и клинически значимой формой внутриутробного стресса является гипоксия, причем системные патологические изменения, которые она вызывает, в 78% случаев касаются поражений сердечно-сосудистой системы. Цель данного исследования – оценить влияние гипоксического стресса, перенесенного на 10-е сутки гестации, на сердечный ритм и его регуляцию в препубертатный и пубертатный периоды жизни потомства крыс, а также проанализировать зависимость возникающих нарушений от пола. Показано, что к началу пубертатного периода ЧСС крысят, переживших пренатальную гипоксию, оказывается значимо выше, чем в контроле, и сопровождается достоверным падением вариабельности сердечного ритма (dX), что закономерно приводит к росту стресс-индекса (SI) и свидетельствует об усилении симпатической активности в регуляции ритма сердца. В то же время базовый сердечный ритм у животных, перенесших гипоксию внутриутробно, оказывается ниже, чем у контрольных. То, что у взрослых половозрелых животных обоих полов, переживших пренатальную гипоксию в период раннего органогенеза, также сохраняются изменения dX и SI, свидетельствует о долгосрочных и необратимых нарушениях регуляции сердечного ритма. Таким образом, гипоксия в период закладки первичной сердечной петли носит программирующий характер, потенциально увеличивая риск развития ССЗ уже у взрослых животных. При этом нарушения баланса вегетативной системы в сторону активации симпатического тонуса более выражены у самок, что делает их более уязвимыми к риску развития сердечной патологии в пубертатном периоде.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, вариабельность сердечного ритма, вегетативная нервная система; пренатальное программирование

DOI: 10.31857/S0869813924100051, **EDN:** VRPZKD

ВВЕДЕНИЕ

В большинстве развитых стран мира сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной инвалидности и смертности [1, 2]. Одним из направлений для снижения развития сердечно-сосудистых патологий и связанных с ними заболеваемости и смертности является поиск новых факторов риска их развития и как можно более ранняя диагностика потенциальных нарушений. Помимо генетической предрасположенности и традиционных факторов риска, таких как ожирение, малоподвижный образ жизни, курение и пр., все больше данных о перинатальных факторах, влияющих на последующие риски развития ССЗ во взрослом возрасте. Концепция фетального программирования подразумевает, что факторы, воздействующие во время зачатия или во время внутриутробного и неонатального периодов, могут навсегда изменять анатомию и физиологию ключевых органов и систем у потомства, тем самым увеличивая риски многих заболеваний в более позднем возрасте [3]. Самой распространенной формой внутриутробного стресса является гипоксия. Плод может испытывать гипоксический стресс по различным причинам: беременность в высокогорье, беременность с анемией, плацентарная недостаточность, сдавление пуповины, преэклампсия и др. [4]. Большая часть исследований, посвященных программирующему влиянию внутриутробной гипоксии, сосредоточена на долгосрочных последствиях нарушения развития нервной системы, таких как церебральный паралич, эпилепсия, когнитивные проблемы [5]. При этом от 25 до 60% детей, страдающих от асфиксии при рождении, в неонатальном периоде имеют клинические признаки сердечных осложнений [6]. Несмотря на очевидную связь внутриутробной гипоксии с высоким риском развития ССЗ, основные исследования направлены на изучение хронических воздействий кислородной недостаточности и нарушений механизмов адаптации. И очень мало доказательств того, что острые перинатальные воздействия также увеличивают риск ССЗ во взрослом возрасте. Особую опасность представляют «скрытые» нарушения развития, когда новорожденные рождаются внешне здоровыми, в результате чего им не проводят ранний скрининг заболеваний. Однако вследствие внутриутробной гипоксии у плода нарушается функция сосудистого эндотелия, развивается окислительный стресс [7, 8], наблюдаются морфологические изменения структуры сердца и сосудов [8, 9], изменяется активность вегетативной нервной системы (ВНС) [10], что может стать одним из ключевых факторов развития артериальной гипертензии [11]. Тяжесть возникающих нарушений зависит не только от силы стрессорного фактора, но также от периода его воздействия [12, 13]. Несмотря на то, что большая часть исследований посвящена влиянию стрессорных воздействий в предродовой и ранний постнатальный периоды, нами было показано, что последствия гипоксического стресса в период раннего органогенеза часто носят более выраженный характер и могут представлять повышенный риск для последующего развития заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [12]. Цель данного исследования – оценить влияние гипоксического стресса, перенесенного в критический для развития сердца период, на сердечный ритм и его регуляцию в препубертатный и пубертатный периоды жизни потомства, а также проанализировать зависимость возникающих нарушений от пола.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Крыс содержали при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с циклом 12/12 ч свет/темнота (свет 9:00 = ZT 0, свет выключен 21:00 = ZT 12). Беременных самок крыс стока Wistar ($n = 3$) подвергали острой гипоксии по стандартной методике, описанной ранее [14, 15], на 10-е сутки беременности, что примерно соответствует концу первого месяца внутриутробного развития у человека, когда происходит образование «первичной (незрелой) сердечной петли» [16, 17]. Среднее время

пробытия беременных самок в условиях острой гипоксии составило 99.3 ± 16.4 с, то есть все они относились к группе низкоустойчивых к гипоксии. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. Анализ вагинального мазка проводили через сутки после помещения самца в клетку с самками в соотношении 1 : 2. Контрольных беременных самок ($n = 4$) гипоксии не подвергали.

Использовали две экспериментальные группы: (1) контроль – потомство контрольных самок; $n = 15$ (самки, $n = 8$; самцы, $n = 7$); (2) ПГ(10) – потомство самок, пережившее острую пренатальную гипоксию (ПГ) на 10-е сутки гестации; $n = 13$ (самки, $n = 6$; самцы, $n = 7$). Роды у контрольных самок наступили на 22-е, а у опытных – на 23-е сутки беременности. В представленной экспериментальной серии не было обнаружено статистически значимых различий в количестве новорожденных детенышей между контрольной и опытной группами.

Для оценки работы сердца в обеих экспериментальных группах на 42-й и 56-й дни постнатального периода (ПНД) проводили неинвазивную регистрацию ЭКГ в свободном поведении в течение трех минут. Настоящее исследование является продолжением изучения последствий воздействия пренатальной гипоксии на регуляцию сердечного ритма у крыс на разных этапах постнатального онтогенеза и охватывает очень важный временной отрезок, оканчивающийся наступлением половой зрелости животных. Характерными особенностями выбранного временного отрезка у крыс могут быть некоторая гетерохрония морфологического и функционального созревания отдельных звеньев вегетативной нервной системы, а также гормональный дисбаланс. Отдельно следует отметить, что данный возрастной период характеризуется множеством изменений в нейроэндокринной функции, что может приводить как к немедленным, так и к долгосрочным влияниям на физиологию и поведение [18].

Таким образом, выбор сроков регистрации ЭКГ был продиктован следующими соображениями. С одной стороны, по ранее полученным данным, ЧСС крысят в первый месяц жизни постоянно и неуклонно растет, и показатели, регистрируемые один раз в неделю, каждый раз достоверно отличаются от показателей предыдущего возраста (рис. 1). Однако после относительной стабилизации ЧСС животных в четырехнедельном возрасте целесообразно увеличить интервалы времени между регистрацией, чтобы избежать возможной адаптации животных к хэндлингу и условиям эксперимента [19, 20]. Поэтому после записи ЭКГ на 28-й ПНД следующую регистрацию проводили с двухнедельной паузой, то есть в возрасте 42-х, а затем 56-ти дней.

С другой стороны, по литературным данным, репродуктивная зрелость у крыс наступает приблизительно на 38–42-й день после рождения, причем самки несколько опережают самцов, у которых этот показатель обладает большой вариативностью [21, 22]. Поскольку одной из задач представленной работы является анализ гендерных различий, важно было проводить регистрацию ЭКГ в один и тот же день у детенышей обоих полов. Таким образом, 42-й ПНД укладывается в препубертатный период для самцов и максимально приближен к нему для самок, в то время как 56-й ПНД для крыс обоих полов уже относится к пубертату.

С целью определения соотношения вкладов разных отделов ВНС в формирование сердечного ритма в указанные экспериментальные дни проводили фармакологический анализ путем последовательного введения кардиоблокаторов. Двойную блокаду использовали, чтобы исключить вклад симпатической и парасимпатической регуляции в ЧСС и определить базовый сердечный ритм, то есть ритм сердца после суммарной кардиоблокады [23].

Моделирование пренатальной гипоксии. Самок крыс подвергали острой гипобарической гипоксии (5% O_2) до первого агонального вдоха в декомпрессионной камере объемом 3.3 л, атмосферное давление снижали вакуумным насосом «MezMohelnice» (Чехия) за 1 мин [14].

Регистрация ЭКГ. Регистрацию ЭКГ проводили в течение трех минут в условиях свободного поведения с помощью детских ЭКГ-электродов (SkintactF-301) и специально изготовленных манжеток, не нарушающих покровы животного. Электроды в соответствии со II стандартным отведением закрепляли на правой передней и левой задней лапах животного. Для уменьшения сопротивления контакта использовали гель для ЭКГ («Гельтек-Медика»). Клеммы с помощью проходящих в манжетку проводов соединяли с контактами разъема, которые подключали к усилителю биопотенциалов, имевшему полосу частот от 10 до 20 кГц. От усилителя сигнал поступал на аналого-цифровой преобразователь (Е14-440, L-Card, Россия), соединенный через USB-порт с компьютером. Запись осуществляли с помощью программы PowerGraph Professional v 3.3 (ДИСофт Россия) с частотой оцифровки 1 кГц. Для анализа вариабельности сердечного ритма (BCR) использовали непрерывные фрагменты записи длительностью 180 с.

Описанный способ регистрации ЭКГ не позволяет получить запись, достаточно четкую для оценки изменения характера QRST-комплекса, однако является неинвазивным и дает возможность получить выборку RR-интервалов для оценки основных параметров BCR в произвольных отрезках записи. Специально разработанные программы (Average, Intervals) позволяют рассчитать следующие параметры BCR: среднее значение RR-интервала в выборке; вариабельность ритма (dX): $dX = RR_{\max} - RR_{\min}$, где $RR_{\max}$ – максимальное, а $RR_{\min}$ – минимальное значение RR-интервала в выборке; индекс RMSSD (Root Mean Square of Successive Differences) – квадратный корень из суммы разностей последовательного ряда RR-интервалов:

$$RMSSD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} (RR_i - RR_{i+1})^2},$$

где n – число RR-интервалов в выборке, стресс-индекс, или индекс напряженности, (SI):

$$SI = \frac{AMo}{2 * Mo * \Delta X},$$

где Mo – мода выборки RR-интервалов – наиболее часто встречающиеся по длительности кардиоинтервалы; AMo – амплитуда моды – доля наиболее часто встречающегося RR-интервала в выборке [24].

Введение блокаторов. Последовательное введение блокаторов кардиотропных влияний ВНС проводили для определения соотношения вкладов парасимпатического и симпатического отделов ВНС в формирование сердечного ритма и выявления нарушений в нервной регуляции работы сердца. Блокаду влияний парасимпатической нервной системы на сердце осуществляли введением атропина (M1300000; Sigma Aldrich, США), неселективного блокатора М-холинорецепторов, в дозе 1 мг/кг. Для блокады кардиотропных влияний симпатической нервной системы вводили β_1 -адреноблокатор атенолол (A7655; Sigma Aldrich, США), 2 мг/кг. Навески блокаторов готовили в день эксперимента и растворяли в физиологическом растворе, объем введения составлял 0.01 мл/г. Введения осуществляли подкожно в область холки животного, промежутки между введениями составляли не менее 15 мин. Трехминутные записи ЭКГ проводили до и через 12 мин после введения каждого из веществ. Таким образом, общее время эксперимента, включая период первоначальной адаптации к условиям регистрации, не превышало 40 мин.

Статистика. Значения представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPadPrism, версия 8.4.3. (GraphPadSoftwareInc., Ла-Хойя, США). Достоверность различий между двумя группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни. Несколько экспериментальных групп анализировали с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма в препубертатном и пубертатном периодах

У крысят контрольной группы ЧСС с рождения и до позднего пубертатного периода меняется следующим образом: постепенно возрастает, начиная с 258.5 ± 7.8 уд/мин в первые дни жизни, достигает максимальных значений в 562.0 ± 8.2 уд/мин на 28-й ПНД [25], затем постепенно снижается до 462.3 ± 6.2 уд/мин к 56-му дню жизни (рис. 1), что соответствует ЧСС взрослых животных [12]. При этом на 56-й ПНД ЧСС у самок составляет 476.1 ± 7.6 уд/мин и значимо выше, чем 449.5 ± 9.1 уд/мин у самцов (рис. 2), что хорошо согласуется с данными литературы [26, 27].

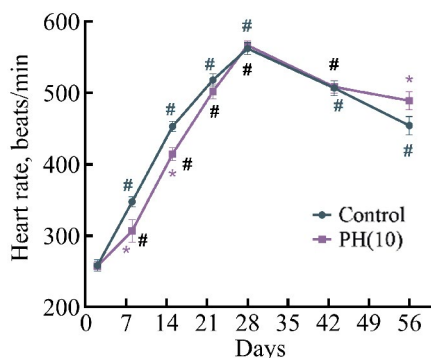


Рис. 1. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на возрастную динамику ЧСС. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Значения ЧСС на 2–28-й ПНД получены в работе [25]. Условные обозначения: PH(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сутки гестации. * – значимые ($p < 0.05$) различия между экспериментальными группами. #, # – значимые ($p < 0.05$) различия между разными возрастными периодами соответствующих экспериментальных групп.

В целом возрастная динамика ЧСС у потомства, пережившего внутриутробную гипоксию в период раннего органогенеза, носит схожий с контрольной группой характер, однако достигнутые к 42-му ПНД значения ЧСС в 508.2 ± 8.9 уд/мин более значимо не снижаются (рис. 1) и сохраняются на этом уровне также у взрослых [12]. В пубертатном периоде у самок регистрируется более высокая ЧСС, чем у самцов (521.4 ± 6.9 уд/мин против 493.4 ± 9.4 уд/мин соответственно), и в обоих случаях частота сердечного ритма у крысят, переживших пренатальную гипоксию, оказывается значимо выше, чем у животных соответствующего пола в контрольных группах (рис. 2). Кроме того, более высокая ЧСС детенышей обоих полов сопровождается достоверным падением ВСР, dX, что закономерно приводит к росту у них стресс-индекса SI (рис. 2) и косвенно свидетельствует об усилении симпатической активности в регуляции сердечного ритма.

Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели сердечного ритма при блокаде кардиотропных нервных влияний в препубертатном и пубертатном периодах

Для оценки возможных механизмов, обуславливающих нарушения регуляции сердечного ритма у потомства, пережившего пренатальную гипоксию, проводили последовательную фармакологическую блокаду парасимпатического и симпатического отделов ВНС.

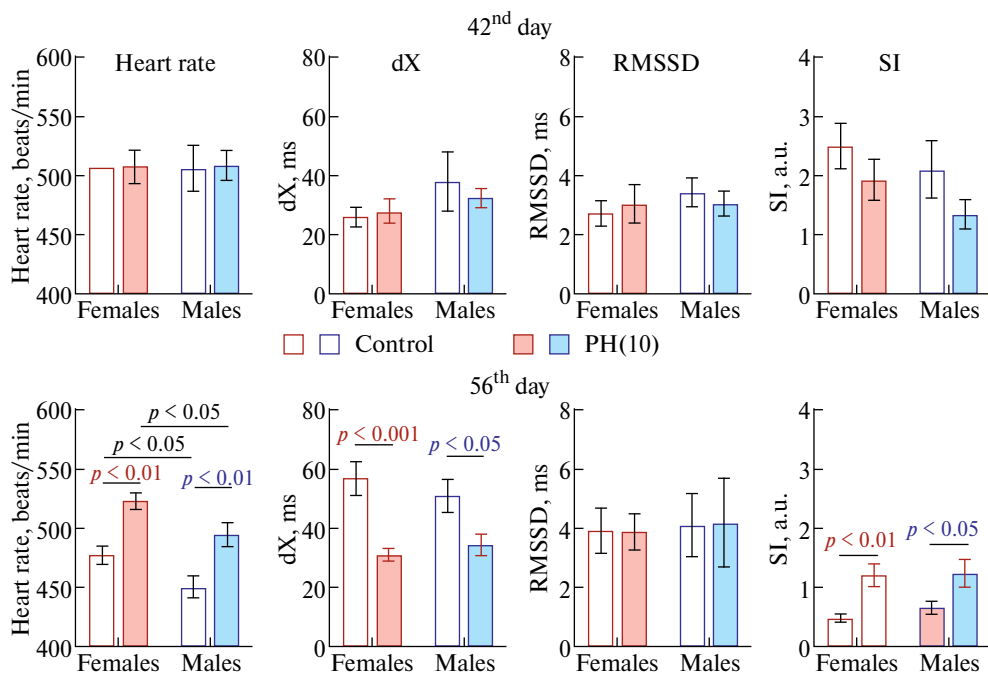


Рис. 2. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крыс стока Wistar в препубертатном и пубертатном периодах. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Условные обозначения: PH(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сутки гестации. На графиках показаны значимые различия между экспериментальными группами животных разных возрастов, определенные с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака. #, * – значимые ($p < 0.05$) различия между разными возрастными периодами соответствующих групп.

Введение атропина крысам на 42-й ПНД не привело к ожидаемому увеличению ЧСС: ярко выраженной реакции на атропин не было ни в опытной, ни в контрольной группах независимо от пола животных (рис. 3а). Отсутствие хронотропного эффекта может быть связано с возрастными особенностями уровня экспрессии M_2 -холинорецепторов в сердце [28]. В этом же возрасте в ответ на введение ателолола у крысят обоих полов наблюдали значимое снижение ЧСС, сходное у контрольных и опытных животных (рис. 3б). Таким образом, у полуторамесячного потомства не было выявлено влияний гипоксии, перенесенной внутриутробно, ни на базовый ритм сердечных сокращений (418.3 ± 7.3 уд/мин в опыте против 425.0 ± 7.3 уд/мин в контроле), ни на регуляцию этого ритма со стороны ВНС (рис. 3).

Две недели спустя реакция контрольных животных обоих полов на атропин оставалась такой же, тогда как у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, были зафиксированы достоверные межполовые различия. При этом у самок наблюдалось заметное падение ЧСС, нехарактерное для детенышей мужского пола (рис. 3а). Введение адреноблокатора также продемонстрировало существенную разницу между опытными крысами разных полов. Если у самцов наблюдали заметное падение ЧСС, сопоставимое с реакцией контрольных животных, то у самок изменения сердечного ритма не наблюдали (рис. 3б). В итоге у молодых животных периода пубертата, перенесших внутриутробную гипоксию, базовый ритм сердца составил 398.9 ± 3.1 уд/мин, что достоверно ниже, чем 417.9 ± 5.6 уд/мин у контрольных.

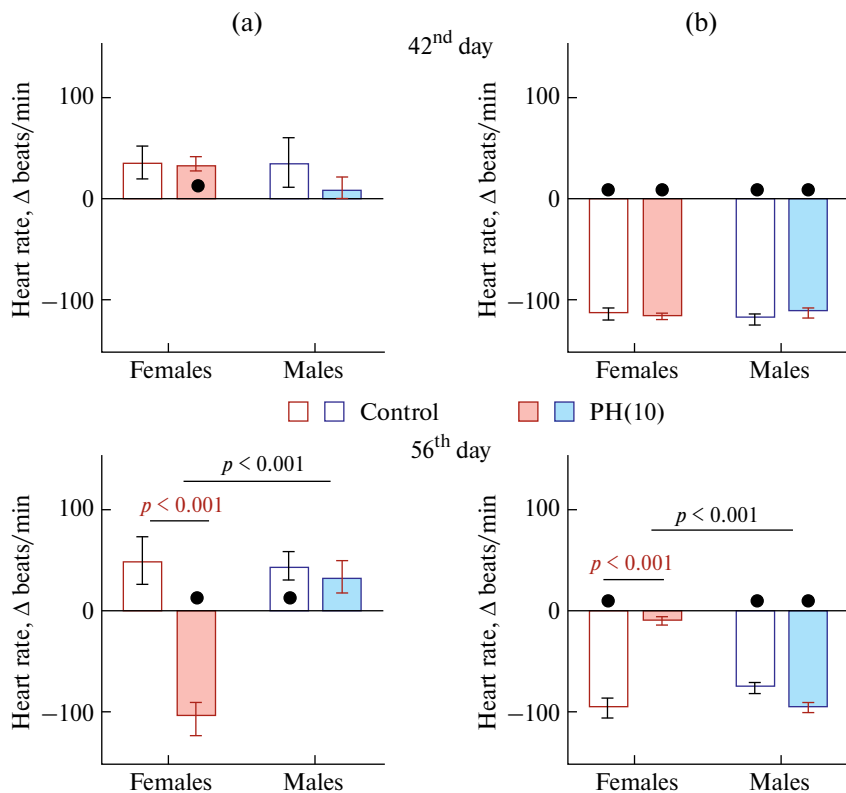


Рис. 3. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на ЧСС крыс на фоне блокаторов парасимпатических (а) и симпатических (б) кардиотропных нервных влияний, зарегистрированные в препубертатном и пубертатном возрасте. • – $p < 0.05$ по сравнению с фоном. Остальные обозначения как на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что регуляция деятельности сердца может осуществляться за счет разных контуров: с одной стороны, за счет центрального управления, с другой стороны, за счет работы автономных механизмов, причем в онтогенезе наблюдается попеременное преобладание этих влияний. В соответствии с литературными данными, к общим закономерностям возрастного становления регуляции сердечного ритма можно отнести неравномерность становления симпато-парасимпатических регуляторных влияний.

Если в первую неделю жизни имеет место общая слабость всех регуляторных механизмов, то постепенно в течение 2–3-й недели происходит усиление сначала симпатических, а затем, к четырехнедельному возрасту, – парасимпатических влияний. С началом полового созревания у шестинедельных крысят хронотропная функция сердца формируется под влиянием высокой активности симпатического канала, и только с наступлением половой зрелости наблюдается относительный баланс парасимпатических и симпатоадреналовых влияний на формирование сердечного ритма в состоянии покоя. В процессе онтогенеза меняется чувствительность и экспрессия определенных подтипов адренергических и холинергических рецепторов, происходят изменения в системах внутриклеточных посредников, а также повышаются возможности гуморального канала регуляции, вероятно, в результате изменения чувствительности ре-

цепторов мембран кардиомиоцитов к регуляторным факторам, циркулирующим во внутренней среде [26, 27].

Несмотря на небольшую выборку животных и относительно короткий временной интервал наблюдений в данной работе, полученные результаты в целом отражают основной вектор возрастных изменений в регуляции хронотропной функции сердца. Действительно, контрольные 42-дневные крысы имеют достоверно более высокие ЧСС и индекс напряженности и более низкую вариабельность сердечного ритма, чем половозрелые животные, что можно трактовать как свидетельство преобладания симпатических влияний в регуляции сердечного ритма на данном этапе онтогенеза. С другой стороны, высокая вариабельность кардиоинтервалов и низкая ЧСС у половозрелых детенышей свидетельствуют о повышении активности парасимпатического канала регуляции при одновременном снижении симпатoadреналовых влияний на сердце.

У 42-дневных детенышей, как и ранее в течение первого месяца жизни, мы не обнаружили значимых различий между самцами и самками по ЧСС и основным показателям ВСР, что может служить косвенным подтверждением незрелости детенышей этого возраста [25]. Половозрелые же самки крыс уже имеют более высокую ЧСС, что, вероятно, связано с потенцированием синтеза кортикостероидов и роста симпатического тонуса эстрогенами. Однако, если на ранних этапах развития активация симпатoadреналовой системы может иметь защитное значение, влияя на созревание миокарда и периферической сосудистой сети [29], то сохраняющийся высокий тонус и активность симпатической нервной системы в дальнейшем может быть одним из ведущих факторов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний.

Поскольку высшим регулятором ЧСС и сердечного выброса у взрослых является ВНС, принято считать, что хронический вегетативный дисбаланс играет решающую роль в развитии сердечной недостаточности, а повышенный симпатический тонус в сочетании со снижением парасимпатической активности наблюдается на ранних стадиях хронической сердечной недостаточности [28]. Действительно, гиперактивность симпатической нервной системы наблюдается при ряде заболеваний сердца, включая гипертонию и дисфункцию левого желудочка [29], а снижение ее активности увеличивает выживаемость животных на модели хронической сердечной недостаточности [29], что позволяет предполагать решающую роль усиления симпатической передачи сигналов в прогрессировании сердечных дисфункций.

Нам не удалось обнаружить проявлений воздействия пренатальной гипоксии на регуляцию сердечного ритма у 42-дневных животных, не достигших половой зрелости. Однако у молодого половозрелого потомства обоих полов внутриутробная гипоксия приводит к падению базового сердечного ритма, а также к увеличению ЧСС и стресс-индекса наряду со снижением ВСР, то есть стрессорное воздействие способствует росту симпатoadреналовых влияний на хронотропную функцию сердца. Так, если у контрольных животных данного возраста базовый ритм сердца составляет 92% от ЧСС, то после перенесенной гипоксии – только 79.8%, что подразумевает повышенный вклад вегетативной регуляции в формирование сердечного ритма.

Примечательно, что в первую неделю жизни крысят, пережившие гипоксию внутриутробно, напротив, демонстрируют более высокий базовый сердечный ритм при достоверно более низкой ЧСС [25]. В последующие восемь недель базовый ритм контрольных животных вырос на 262.7 ± 5.9 уд/мин против 226.7 ± 4.9 уд/мин у экспериментальных ($p < 0.001$). Что касается ЧСС, то за тот же временной отрезок в контроле этот показатель увеличился на 106.6 ± 10.1 уд/мин, а после гипоксии – на 182.2 ± 14.4 уд/мин ($p < 0.001$). Таким образом, на ранних этапах постнатальной жизни пренатальная гипоксия приводит к замедлению закономерного роста базового сердечного ритма и ускоряет характерное для контрольных животных нарастание ЧСС.

У взрослых трехмесячных крыс обоих полов, переживших внутриутробную гипоксию, ЧСС уже не отличается от значений контрольных животных, но изменения

dX и SI, характерные для двухмесячного потомства, сохраняются, что свидетельствует о долгосрочных и необратимых нарушениях регуляции сердечного ритма [12]. Таким образом, можно предполагать, что гипоксия в период раннего органогенеза действительно носит программирующий характер, потенциально увеличивая риск развития ССЗ уже у взрослых животных. Можно также отметить, что большая часть исследований влияния пренатальной гипоксии на сердечную функцию потомства проведена на взрослых половозрелых животных, преимущественно 4–6-месячных. Результаты представленной работы свидетельствуют о том, что определенные отклонения в работе сердца можно зарегистрировать и в более молодом возрасте, что делает возможными раннюю диагностику и профилактику.

Как последствия внутриутробной гипоксии, так и предрасположенность к патологиям сердца у взрослых часто предполагают зависимость от пола [12, 13]. Потомство женского пола, как правило, располагает защитными механизмами против программирующих эффектов пренатальной гипоксии, тогда как потомство мужского пола характеризуется повышенной предрасположенностью к ССЗ [30]. Традиционно считается, что самцы имеют более высокую предрасположенность к развитию артериальной гипертензии в раннем возрасте [31] и повышенную восприимчивость к ишемическому/реперфузионному повреждению по сравнению с самками [32]. Данные различия могут быть обусловлены увеличением продукции активных форм кислорода у самцов или снижением активности системы антиоксидантной защиты [33], а также эпигенетическими механизмами [12]. Факторами риска для развития ССЗ считаются также повышенный уровень тестостерона и, наоборот, сниженное содержание эстрогена [34].

Однако в нашей модели гипоксического стресса нарушения баланса вегетативной регуляции сердца оказались более выраженными у самок, что делает их более уязвимыми к риску развития сердечной патологии в пубертатном периоде. Особое беспокойство вызывает нехарактерное и резко отличное от такового у самцов изменение сердечного ритма в ответ на введение классических кардиоблокаторов, что может быть результатом изменения чувствительности кардиомиоцитов или изменения соотношения определенных подтипов рецепторов. Известно, что гипоксия вызывает окислительный стресс и подавляет экспрессию целого ряда генов, вовлеченных в передачу сигналов внутри клетки, коммуникацию между клетками, защиту, пролиферацию и выживание клеток в эмбриональном сердце, то есть генов, которые оказывают длительное или пожизненное влияние на функции сердца во взрослом возрасте [35, 36]. В частности, к генам, которые могут быть запрограммированы внутриутробной гипоксией, относятся гены β -адренорецепторов (β -АР) и определенных G-белков, а результатом программирования является увеличение во взрослом сердце β_2 -АР и соотношения белков Gs/Gi [29]. Увеличение β_2 -АР и подавление Gi обеспечивают в сердце, перенесшем гипоксию, развитие положительного инотропного эффекта, опосредованного β_2 -АР. Однако сверхвыраженная экспрессия в сердце β_2 -АР, как и подавление экспрессии Gi-белка, могут иметь и негативные последствия. В первом случае вследствие усиления сократимости миокарда повышен риск развития ишемии, во втором – у кардиомиоцитов ослаблены защитные механизмы против клеточной гибели, опосредованные через сигнальный каскад β_2 -АР с Gi-белками. У четырехмесячных самцов, переживших хроническую пренатальную гипоксию, не было обнаружено изменений в экспрессии M_2 -холинэргических и β_1 -АР в сердце [37], однако для самок, а также половозрелых животных более молодого возраста вопрос остается открытым.

Интересно, что у трехмесячных крысят, переживших внутриутробную гипоксию в период раннего органогенеза, наблюдались разнонаправленные зависимые от пола изменения активности оксоглутратдегидрогеназного комплекса (ОГДК): увеличение у самок и снижение у самцов, при этом у самок наблюдали корреляцию между изменением активности ОГДК и увеличением ацетилирования белков 13–17 кДа, соответствующих гистонам [12]. Гиперацетилирование может вызывать метаболическую не-

гибкость при таких кардиометаболических заболеваниях, как гипертония, сердечные аритмии, атеросклероз, а также участвовать в патогенезе гипертрофии сердца и сердечной недостаточности [38, 39]. Таким образом, если программирующие эффекты пренатального стресса направлены на ОГДК, то к эпигенетическим изменениям самки вполне могут оказаться чувствительнее самцов.

Полученные на относительно небольшой выборке животных результаты работы носят предварительный характер. Однако дальнейшее выявление молекулярных механизмов, обуславливающих повышение риска развития ССЗ, имеет важное значение как для разработки методов предупреждения сердечных патологий органогенеза, так и для своевременного, как можно более раннего, выявления самих заболеваний и разработки новых препаратов для их лечения. Наличие половых различий в вегетативной регуляции сердца в условиях раннего пубертата является экспериментальным подтверждением необходимости гендерного подхода к диагностике и терапии кардиальной дисфункции, возникшей в результате воздействия повреждающих факторов в пренатальном онтогенезе.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. В. Г., М. В. М., Н. А. С.); сбор данных (А. В. Г., А. С. М., М. В. М., Я. В. К.); обработка данных (А. В. Г., А. А. Г.); написание и редактирование манускрипта (А. В. Г., А. С. М., М. В. М.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова №121032300071-8. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, протокол №137-д от 11.11.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mente A, Yusuf S (2017) Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res* 121: 677–694. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.308903>
2. Magnussen C, Ojeda FM, Leong DP, Alegre-Diaz J, Amouyel P, Aviles-Santa L, De Bacquer D, Ballantyne CM, Bernabé-Ortiz A, Bobak M, Brenner H, Carrillo-Larco RM, de Lemos J, Dobson A, Dörr M, Donfrancesco C, Drygas W, Dullaart RP, Engström G, Ferrario MM, Ferrières J, de Gaetano G, Goldbourt U, Gonzalez C, Grassi G, Hodge AM, Hveem K, Iacoviello L, Ikram MK, Irazola V, Jobe M, Jousilahti P, Kaleebu P, Kavousi M, Kee F, Khalili D, Koenig W, Kontsevaya A, Kuulasmaa K, Lackner KJ, Leistner DM, Lind L, Linneberg A, Lorenz T, Lyngbakken MN, Malekzadeh R, Malyutina S, Mathiesen EB, Melander O, Metspalu A, Miranda JJ, Moitry M, Mugisha J, Nalini M, Nambi V, Ninomiya T, Oppermann K, d'Orsi E, Pajak A, Palmieri L, Panagiotakos D, Perianayagam A, Peters A, Poustchi H, Prentice AM, Prescott E, Riserus U, Salo-

- maa V, Sans S, Sakata S, Schöttker B, Schutte AE, Sepanlou SG, Sharma SK, Shaw JE, Simons LA, Söderberg S, Tamosiunas A, Thorand B, Tunstall-Pedoe H, Twerenbold R, Vanuzzo D, Veronesi G, Waibel J, Wannamethee SG, Watanabe M, Wild PS, Yao Y, Zeng Y, Ziegler A, Blankenberg S* (2023) Global effect of modifiable risk factors on cardiovascular disease and mortality. *N Engl J Med* 389: 1273–1285.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA2206916>
3. *Gluckman PD, Hanson MA, Phil D, Cooper C, Thornburg KL* (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 359: 61–73.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>
4. *Chen X, Zhang L, Wang C* (2019) Prenatal hypoxia-induced epigenomic and transcriptomic reprogramming in rat fetal and adult offspring hearts. *Sci Data* 6: 238.
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0253-9>
5. *Razaz N, Norman M, Alfvén T, Chnattingius S* (2023) Low Apgar score and asphyxia complications at birth and risk of longer-term cardiovascular disease: a nationwide population-based study of term infants. *Lancet Reg Health Eur* 24: 100532.
<https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100532>
6. *Rakesh K, Vishnu Bhat B, Adhisivam B, Ajith P* (2018) Effect of therapeutic hypothermia on myocardial dysfunction in term neonates with perinatal asphyxia – a randomized controlled trial. *J Matern-Fetal Neonatal Med* 31: 2418–2423.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1344633>
7. *Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, Blake EZ, Horder KA, Thakor AS, Hansell JA, Kane AD, Wooding FBP, Cross CM, Herrera EA* (2012) Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One* 7: e31017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031017>
8. *Walton SL, Singh RR, Tan T, Paravicini TM, Moritz KM, Moritz KM* (2016) Late gestational hypoxia and a postnatal high salt diet programs endothelial dysfunction and arterial stiffness in adult mouse offspring. *J Physiol* 594: 1451–1463.
<https://doi.org/10.1113/JP271067>
9. *Herrera EA, Camm EJ, Cross CM, Mullender JL, Wooding FBP, Giussani DA* (2012) Morphological and functional alterations in the aorta of the chronically hypoxic fetal rat. *J Vasc Res* 49: 50–58.
<https://doi.org/10.1159/000330666>
10. *Svitok P, Molcan L, Stebelova K, Vesela A, Sedlackova N, Ujhazy E, Mach M, Zeman M* (2016) Prenatal hypoxia in rats increased blood pressure and sympathetic drive of the adult offspring. *Hypertens Res* 39: 501–505.
<https://doi.org/10.1038/hr.2016.21>
11. *Rook W, Johnson CD, Coney AM, Marshall JM* (2014) Prenatal hypoxia leads to increased muscle sympathetic nerve activity, sympathetic hyperinnervation, premature blunting of neuropeptide Y signaling, and hypertension in adult life. *Hypertension* 64: 1321–1327.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04374>
12. *Graf AV, Maslova MV, Artiukhov AV, Ksenofontov AL, Aleshin VA, Bunik VI* (2022) Acute prenatal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age. *Int J Mol Sci* 23: 2579.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052579>
13. *Sutovska H, Babarikova K, Zeman M, Molcan L* (2022) Prenatal hypoxia affects foetal cardiovascular regulatory mechanisms in a sex- and circadian-dependent manner: a review. *Int J Mol Sci* 23: 2885.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052885>
14. *Graf A, Trofimova L, Ksenofontov A, Baratova L, Bunik V* (2020) Hypoxic adaptation of mitochondrial metabolism in rat cerebellum decreases in pregnancy. *Cells* 9: 139.
<https://doi.org/10.3390/cells9010139>
15. *Maslova MV, Graf AV, Maklakova AS, Krushinskaya YaV, Sokolova NA, Koshelev VB* (2005) Acute hypoxia during organogenesis affects cardiac autonomic balance in pregnant rats. *Bull Exp Biol Med* 139: 180–182.
<https://doi.org/10.1007/s10517-005-0241-2>
16. *Marcela SG, Cristina RMM, Angel PGM, Manuel AM, Sofia DC, Patricia DLRS, Bladimir RR, Concepción SG* (2012) Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec* 295: 1267–1290.
<https://doi.org/10.1002/AR.22508>
17. *Itani N, Salinas CE, Villena M, Skeffington KL, Beck C, Villamor E, Blanco CE, Giussani DA* (2018) The highs and lows of programmed cardiovascular disease by developmental hypoxia: studies in the chicken embryo. *J Physiol* 596: 2991–3006.
<https://doi.org/10.1113/JP274111>

18. *José Jaime H-P, Venus B-C, Graciela J-R, Tania H-HO, Lucía M-M* (2016) Young-adult male rats' vulnerability to chronic mild stress is reflected by anxious-like instead of depressive-like behaviors. *Neurosci J* 2016: 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2016/5317242>
19. *Marcotte M, Bernardo A, Linga N, Pérez-Romero CA, Guillou J-L, Sibille E, Prevot TD* (2021) Handling techniques to reduce stress in mice. *J Vis Exp* 25: 175.
<https://doi.org/10.3791/62593>
20. *Bigelow LJ, Pope EK, MacDonald DS, Rock JE, Bernard PB* (2023) Getting a handle on rat familiarization: The impact of handling protocols on classic tests of stress in *Rattus norvegicus*. *Lab Anim* 57: 259–269.
<https://doi.org/10.1177/00236772221142687>
21. *Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC* (2008) Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res* 1215: 40–52.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.056>
22. *Lenschow C, Sigl-Glöckner J, Brecht M* (2017) Development of rat female genital cortex and control of female puberty by sexual touch. *PLoS Biol* 15: e2001283.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001283>
23. *Sato S* (2008) Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1708–H1715.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01122.2007>
24. *Baevsky RM, Chernikova AG* (2017) Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods. *Cardiometry* 66–76.
<https://doi.org/10.12710/cardiometry.2017.10.6676>
25. *Граф АВ, Маклакова АС, Маслова МВ, Крушинская ЯВ, Гусева АА, Соколова НА* (2024) Влияние пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крысят первого месяца жизни. *Вестн Московск универ Серия 16 Биология* 79: 151–159. [*Graf AV, Maklakova AS, Maslova MV, Krushinskaya YaV, Guseva AA, Sokolova NA* (2024) Prenatal hypoxia of the period of early organogenesis influence on heart rate variability in rat pups during the first month of life. *Vestn Moskovsk Univer Seriya 16 Biol* 79(2): 151–159. (In Russ)].
<https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-79-2-8>
26. *Курьянова ЕВ* (2008) К вопросу о методах анализа сердечного ритма и типах его регуляции на разных этапах онтогенеза белых крыс. *Естеств науки* 4: 77–84. [*Kuryanova EV* (2008) On the issue of methods for analyzing heart rate and types of its regulation at different stages of ontogenesis of white rats. *Natural Sci* 4: 77–84. (In Russ)].
27. *Курьянова ЕВ, Теплый ДЛ, Зеренинова НВ* (2011) Становление регуляции хронотропной функции сердца в постнатальном онтогенезе белых крыс по данным спектрального анализа вариабельности. *Бюл экпер биол мед* 2: 614–617. [*Kuryanova EV, Teply DL, Zereninova NV* (2011) Regulation of chronotropic heart function formation in postnatal ontogenesis of white rats according to spectral analysis of variability. *Bull Exp Biol Med* 12: 614–617. (In Russ)].
28. *Ziyatdinova NI, Sergeeva AM, Dementieva RE, Zefirov TL* (2012) Peculiar effects of muscarinic M1, M2, and M3 receptor blockers on cardiac chronotropic function in neonatal rats. *Bull Exp Biol Med* 154: 1–2.
<https://doi.org/10.1007/s10517-012-1859-5>
29. *Li G, Bae S, Zhang L* (2004) Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 286: H1712–H1719.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00898.2003>
30. *Zeman M, Okuliarova M* (2017) Sex-specific cardiovascular susceptibility to ischaemic myocardial injury following exposure to prenatal hypoxia. *Clin Sci* 131: 2791–2794.
<https://doi.org/10.1042/CS20171255>
31. *Gao Y, Dasgupta C, Huang L, Song R, Zhang Z, Zhang L* (2019) Multi-omics integration reveals short and long-term effects of gestational hypoxia on the heart development. *Cells* 8: 1608.
<https://doi.org/10.3390/cells8121608>
32. *Ostadal B, Ostadalova I, Szarszoi O, Netuka I, Olejnickova V, Hlavackova M* (2021) Sex-dependent effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to oxygen deprivation in adults. *Can J Physiol Pharmacol* 99: 1–8.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0310>
33. *Hellgren KT, Premanandhan H, Quinn CJ, Trafford AW, Galli GLJ* (2021) Sex-dependent effects of developmental hypoxia on cardiac mitochondria from adult murine offspring. *Free Radic Biol Med* 162: 490–499.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.11.004>

34. Song R, Mishra JS, Dangudubiyam SV, Antony KM, Baker TL, Watters JJ, Kumar S (2022) Gestational intermittent hypoxia induces sex-specific impairment in endothelial mechanisms and sex steroid hormone levels in male rat offspring. *Reprod Sci* 29: 1531–1541.
<https://doi.org/10.1007/s43032-021-00739-4>
35. Zhang L (2005) Prenatal hypoxia and cardiac programming. *J Soc Gynecol Invest* 12: 2–13.
<https://doi.org/10.1016/j.jsg.2004.09.004>
36. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducusay CA, Gilbert RD, Zhang L (2003) Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Invest* 10: 265–274.
[https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(03\)00074-1](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(03)00074-1)
37. Niu Y, Kane AD, Lusby CM, Allison BJ, Chua YY, Kaandorp JJ, Nevin-Dolan R, Ashmore TJ, Blackmore HL, Derks JB, Ozanne SE, Giussani DA (2018) Maternal allopurinol prevents cardiac dysfunction in adult male offspring programmed by chronic hypoxia during pregnancy. *Hypertension* 72: 971–978.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11363>
38. Funamoto M, Imanishi M, Tsuchiya K, Ikeda Y (2023) Roles of histone acetylation sites in cardiac hypertrophy and heart failure. *Front Cardiovasc Med* 10: 1133611.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1133611>
39. Yang M, Zhang Y, Ren J (2020) Acetylation in cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866: 165836.
<https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.165836>

Prenatal Hypoxia of Early Organogenesis Period Influence on Heart Rate Variability in Rats of Prepubescent and Pubertal Age

A. V. Graf^{a,b*}, A. S. Maklakova^a, M. V. Maslova^a, Ya. V. Krushinskaya^a, A. A. Guseva^a,
and N. A. Sokolova^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Kurchatov Phystech School of Nature-like, Plasma, and Nuclear Technologies, Moscow, Russia*

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

Risk factors associated with environmental exposure, especially during critical periods of intrauterine development, affect fetal development and increase the risk of certain diseases in adulthood including cardiovascular diseases (CVD). Hypoxia is considered the most common and clinically significant form of intrauterine stress that causes systemic pathological changes, in 78% of cases associated with cardiovascular system disorders. The purpose of this study was to evaluate the effects of acute hypoxia on the 10th day of gestation on heart rate and its regulation in rats' offspring of prepubescent and pubertal age, as well as to analyze the dependence of resulting disorders on gender.

By the beginning of puberty the heart rate of rats survived prenatal hypoxia was significantly higher than in control accompanied by significant decrease in heart rate variability (dX) which naturally leads to stress index (SI) increase indicating growing sympathetic activity in heart rhythm regulation. At the same time the base heart rate in animals suffered intrauterine hypoxia turned out to be lower than in control. The fact that matured animals of both sexes, survived intrauterine hypoxia in early organogenesis, also show changes in dX and SI indicates long-term and irreversible disorders in heart rhythm regulation. Thus hypoxia during early organogenesis is of a programming nature potentially increasing the risk of developing CVD in adult animals. Moreover the autonomic system balance shift towards the activation of sympathetic tone was more pronounced in females making them more vulnerable to the risk of developing cardiac pathology in puberty.

Keywords: prenatal hypoxia, heart rate variability, autonomic nervous system, prenatal programming

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЗАДЕРЖКА ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ НЕ ПРИВОДИТ
К ВЫРАЖЕННЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ
ОТВЕТОВ АРТЕРИЙ КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

© 2024 г. А. А. Швецова¹, Е. К. Селиванова^{1,2}, Л. Д. Шилова¹, О. С. Тарасова^{1,3},
Д. К. Гайнуллина^{1,*}

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

²Научно-исследовательский институт «ХимРар», Химки, Московская область, Россия

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических
проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 23.07.2024 г.

Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) является одной из наиболее частых патологий беременности. В результате данной патологии нарушается функционирование многих систем, в том числе сердечно-сосудистой. У взрослых животных, перенесших ЗВУР, увеличивается вклад проконстрикторных механизмов регуляции сосудистого тонуса (например, сигнального пути Rho-киназы), а вклад антиконстрикторных механизмов (например, эндотелиального NO), напротив, уменьшается, что может приводить к спазмированию сосудов и нарушению кровоснабжения органов. Поскольку NO и Rho-киназа обладают ярко выраженной вазомоторной ролью в раннем постнатальном онтогенезе, целью данной работы стала оценка влияния ЗВУР на вклад этих механизмов в регуляцию сократительных ответов артерий системного кровообращения в раннем постнатальном онтогенезе. ЗВУР моделировали путем ограничения количества потребляемого самками корма (на 50%) с 11-го дня беременности до родов. У потомства в возрасте 11–12 дней исследовали реакции изолированной подкожной артерии в изометрическом режиме, а также оценивали содержание в этой артерии интересующих мРНК и белков. ЗВУР не привела к изменению реактивности артерий потомства на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин. Увеличение сократительных ответов на метоксамин в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NNA, а также уровни экспрессии eNOS (мРНК и белка) и аргиназы-2 (мРНК) не были изменены в артериях крыс с ЗВУР, тогда как чувствительность артерий к экзогенному донору NO DEA/NO у них была выше, чем у контрольных крыс. Несмотря на сравнительно низкое содержание белков RhoA и Rho-киназы II в ткани артерий крыс группы ЗВУР, уменьшение сократительных ответов под действием ингибитора Rho-киназы Y27632 было одинаково выраженным в артериях крыс двух экспериментальных групп. Таким образом, ЗВУР, обусловленная ограничением питания матери во время беременности, не приводит к ярко выраженным изменениям в регуляции тонуса системных сосудов в раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: задержка внутриутробного развития, артерии, гладкая мышца, эндотелий, оксид азота, Rho-киназа, ранний постнатальный онтогенез

ВВЕДЕНИЕ

Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) является одной из наиболее часто встречаемых патологий беременности. Согласно данным медицинской статистики, ЗВУР сопровождает 5–15% всех беременностей в Европе и США и еще чаще встречается в странах с низким уровнем жизни (порядка 30–55% в Центральной Азии, 15–25% в Африке и 10–20% в Латинской Америке) [1]. В отсутствие генетических аномалий самого плода причинами этой патологии могут быть недостаточное питание матери, преэклампсия, ранняя беременность в подростковом возрасте, наличие у матери хронических заболеваний, бактериальные и вирусные инфекции во время беременности, употребление алкоголя или курение [1]. Для исследования ЗВУР в экспериментах на животных были разработаны и применяются различные модели, среди них – модель ограничения потребления пищи, которая часто используется у крыс для имитации недостаточного питания матери [2, 3].

ЗВУР сопряжена с недостаточным снабжением плода кислородом и питательными веществами и, как следствие, – с нарушением роста и дифференцировки тканей и органов, в том числе сердечно-сосудистой системы. В частности, показана связь ЗВУР с развитием гипертензии у детей в возрасте до двух лет [4–6]. К последствиям ЗВУР у взрослых половозрелых потомков относят дисфункцию эндотелия за счет уменьшения биодоступности NO [7–10] или вклада простаглицлина [11] в реакциях эндотелий-зависимого расслабления артерий [7–10]. Также показано, что в коронарных артериях крыс со ЗВУР во взрослом возрасте наблюдается уменьшение тонического антиконстрикторного влияния продуцируемого эндотелием оксида азота NO, что связано с повышенной проконстрикторной активностью Rho-киназы в эндотелиальных клетках [12].

Необходимо отметить, что в периоде раннего постнатального онтогенеза сердечно-сосудистая система претерпевает существенные количественные и качественные изменения. После рождения происходит интенсивный рост и развитие органов и, следовательно, их сосудистого русла: увеличивается количество сосудов, их длина и толщина стенки. На функциональном уровне для еще «незрелой» и нормально развивающейся сосудистой системы характерны специфические изменения механизмов регуляции тонуса артерий, такие как: (1) высокий уровень тонической продукции NO эндотелием сосудов, который ослабляет сократительные ответы артерий, т. е. оказывает антиконстрикторное влияние [13–15]; (2) высокая проконстрикторная активность Rho-киназы, что служит причиной высокой чувствительности сократительного аппарата гладкомышечных клеток к уровню внутриклеточного Ca^{2+} [16, 17].

Целью работы была проверка гипотезы о том, что ограничение питания матери во время беременности будет приводить к изменению механизмов регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде, затрагивая выраженность антиконстрикторного влияния NO и проконстрикторного влияния Rho-киназы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и модель задержки внутриутробного развития

В работе использовали крыс Wistar, полученных из питомника Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии. Животных содержали в стандартных условиях вивария биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова со световым циклом 12 ч день – 12 ч ночь (включение освещения в 09:00, выключение в 21:00). Задержку внутриутробного развития моделировали путем ограничения количества потребляемого корма самками во время беременности (с 11-го дня беременности и до родов), как описано ранее [12].

Для получения потомства половозрелых самцов и самок крыс ссаживали на одну ночь. Самок для ссаживания подбирали накануне путем оценки фазы эстрального

цикла по влагалищным мазкам. На следующий день после ссаживания (между 8 и 9 ч утра) у самок снова брали влагалищные мазки, наступление беременности констатировали по наличию в мазках сперматозоидов, этот день принимали за первый день беременности. Далее самок случайным образом распределяли на группы «Контроль» и «Задержка внутриутробного развития» (ЗВУР) и помещали в индивидуальные клетки. С первого до десятого дня беременности самки обеих групп имели неограниченный доступ к корму. С одиннадцатого дня беременности потребление корма самками группы «ЗВУР» снижали на 50% от среднего значения потребления корма контрольными беременными самками в соответствующие дни беременности. Сразу после родов доступ к корму самок группы «ЗВУР» снова делали неограниченным. Потребление воды было неограниченным как на протяжении всей беременности, так и в период вскармливания потомства. На второй день после родов потомство самок обеих групп ограничивали до 8 крысят в помете, оставляя преимущественно самцов. Эксперименты на изолированных сосудах проводили на потомстве мужского пола в возрасте 11–12 дней. Крысят декапитировали ножницами. Всего в работе было использовано потомство из 11 пометов (из них 5 пометов от контрольных самок и 6 пометов от самок группы «ЗВУР»). У крысят, которых брали в эксперимент на 11-й день жизни, измеряли уровень глюкозы в крови после декапитации с использованием глюкометра (Диаконт, Россия).

Регистрация сократительных ответов изолированных артерий в изометрическом режиме

Объектом исследования служила подкожная артерия (*a. saphena*). Подкожная артерия относится к сосудам мышечного типа и участвует в регуляции кожного кровотока, который составляет до 20% сердечного выброса у новорожденных крыс [18]. Выделение артерий проводили в холодном растворе для препаровки следующего состава (в мМ): NaCl 145; KCl 4.5; CaCl₂ 0.1; MgSO₄ 1; NaH₂PO₄ 1.2; ЭДТА 0.025; HEPES 5 (pH 7.4). Артерию очищали от окружающих тканей, вырезали из нее кольцевые сегменты длиной 2 мм и закрепляли их в многоканальном миографе (модели 410A, 420M или 620M, DMT, Дания) для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме. После нагрева камер с раствором до 37 °C (в течение 20–30 мин) определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления его сократительной активности [19]. В ходе этой процедуры также вычисляли нормализованный внутренний диаметр сосуда, соответствующий давлению 100 мм рт. ст. (d_{100}). После этого раствор в камере миографа сменяли на рабочий (в мМ): NaCl 120; NaHCO₃ 26; KCl 4.5; CaCl₂ 1.6; MgSO₄ 1.0; NaH₂PO₄ 1.2; D-глюкоза 5.5; EDTA 0.025; HEPES 5. Раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂) для оксигенации и поддержания pH 7.4.

В начале каждого эксперимента проводили процедуру активации препарата, которая заключалась в добавлении (1) норэпинефрина (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин); (2) метоксамина (агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов, 10 мкМ, длительность воздействия 5 мин), на фоне которого апплицировали ацетилхолин (10 мкМ) для оценки функциональной активности эндотелия (расслабление на ацетилхолин свидетельствовало о сохранности эндотелиального слоя); (3) метоксамина (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин). После каждого из воздействий проводили отмывку, ее длительность составляла 15 мин, во время отмывки растворов в камере миографа сменяли не менее 5 раз.

Протокол эксперимента заключался в проведении двух последовательных зависимостей «концентрация – эффект» на метоксамин (в диапазоне концентраций от 10 нМ до 100 мкМ, длительность действия метоксамина в каждой концентрации – 3 мин). Первую зависимость проводили спустя 20 мин после окончания процедуры активации препарата, она позволяла убедиться, что исходно разные сегменты одной артерии обладают одинаковой чувствительностью к метоксамину. После отмывки от метоксамина в камеры миографа добавляли либо ингибитор NO-синтаз L-NNA (100 мкМ), либо ингибитор Rho-киназы Y27632 (3 мкМ), либо оба ингибитора совместно, в контрольные

сегменты артерий добавляли эквивалентный объем растворителя, через 20 мин проводили вторую зависимость «концентрация – эффект» на метоксамин, аналогично первой. В ряде экспериментов после второй зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин проводили отмывку препарата в канале с растворителем, добавляли L-NNA (100 мкМ) и через 20 мин проводили зависимость «концентрация – эффект» на донор оксида азота DEA/NO (диапазон концентраций 1 нМ – 3 мкМ) на фоне предсокращения артерий метоксамином (10 мкМ).

При обработке результатов из значения силы при каждой концентрации вазоактивного вещества вычитали значение пассивной силы, соответствующее расслабленному состоянию гладкой мышцы препарата (в растворе для препаровки после окончания процедуры определения оптимального растяжения препарата). Полученные значения активной силы выражали в % от максимальной силы сокращения препарата, определенной по первой зависимости «концентрация – эффект» (для метоксамин), или в % от уровня предсокращения препарата (для DEA/NO).

В работе использовали норэпинефрин, метоксамин, ацетилхолин, DEA/NO фирмы Sigma-Aldrich, Y27632 фирмы Tocris и L-NNA фирмы Alexis Biochemicals.

Оценка экспрессии мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Подкожные артерии быстро очищали от окружающих тканей и помещали в буфер RNeasy lysis buffer (Qiagen, Германия), в котором их хранили при -20°C до выделения мРНК. Каждый образец включал две артерии от одного крысенка. Экстракцию РНК из образцов проводили с помощью набора «Clean RNA Standard» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию нуклеотидов в полученных образцах определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при -20°C до проведения количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Количественную ПЦР проводили в амплификаторе RotorGene 6000 с использованием набора с реакционной смесью для ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по прилагаемой инструкции. Экспрессию мРНК в образцах рассчитывали по формуле $1/E^{C_t}$, где E – эффективность праймеров, а C_t – номер цикла, на котором «экспоненциальный участок» кривой накопления продукта пересекает пороговый уровень флуоресценции. Полученные значения нормировали на среднее геометрическое экспрессии трех референсных генов (*Gapdh*, *Rplp0*, *Rn18s*) в том же образце и представляли в процентах от среднего значения в группе «Контроль». Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия), их последовательности приведены в табл. 1.

Оценка содержания белка в ткани артерий методом Вестерн-блоттинга

Образцы артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения дальнейшего анализа. Каждый образец включал в себя две артерии от одного крысенка. Гомогенизировали образцы в буфере следующего состава: 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.5% SDS, 10% глицерина, 2.47% дитиотреитола с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (апротинин 50 мг/мл, лейпептин 100 мг/мл, пепстатин 30 мг/мл, NaF 2 мг/мл, Na_3VO_4 180 мг/мл), центрифугировали при 16 000 g в течение 5 мин при 4°C ; супернатант отбирали, добавляли к нему бромфеноловый синий (0.002%) и хранили при температуре -20°C . Белки разделяли с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (по Леммли)

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательности праймеров (5' – 3')
<i>Nos3</i>	Прямой: GGA TTC TGG CAA GAC CGA TTA C Обратный: GGT GAG GAC TTG TCC AAA CAC T
<i>Arg2</i>	Прямой: CCA GCC TAG CAG TGG ATG TGA Обратный: CTC TGG AAT GCT GTC GTG AA
<i>Gapdh</i>	Прямой: CAC CAG CAT CAC CCC ATT T Обратный: CCA TCA AGG ACC CCT TCA TT
<i>Rplp0</i>	Прямой: AGG GTC CTG GCT TTG TCT GTG G Обратный: AGC TGC AGG AGC AGC AGT GG
<i>Rn18s</i>	Прямой: CAC GGG TGA CGG GGA ATC AG Обратный: CGG GTC GGG AGT GGG TAA TTT G

и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz) с использованием системы переноса Trans-Blot Turbo (BioRad). Перенос визуализировали с помощью окрашивания мембраны Ponceau S. Ориентируясь на визуализированные полосы белков и молекулярную массу цветных маркеров (28 и 75 кДа (Abcam)), мембрану разрезали на три части, в которых содержались интересующие белки. Все части блокировали 5%-ным обезжиренным молоком (Applichem, Германия) в буфере TBS (20 mM Трис-НCl, pH 7.6; 150 mM NaCl) с 0.1% Twin 20 (TBSt). Затем в течение ночи нижнюю часть мембраны инкубировали с антителами против RhoA (Abcam, rabbit, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока), среднюю часть с антителами против GAPDH (Abcam, mouse, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока), а верхнюю часть с антителами против Rho-киназы II (Abcam, rabbit, 1 : 5000 в TBSt с 5% молока) или eNOS (BD Transduction Lab, mouse, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока). На следующий день мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами: anti-mouse (Cell Signaling, 1 : 5000 в 5%-ном молоке в TBSt) или anti-rabbit (Cell Signaling, 1 : 10 000 в 5%-ном молоке в TBSt) в течение 1 ч. Для прояски сигнала использовали раствор Femto ECL (Thermo Scientific), разведенный в 10 раз в TBSt. Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в приборе ChemiDoc фирмы Bio Rad (США). Регистрацию сигнала и первичную обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США). В каждом образце идентифицировали соотношение интересующего белка к GAPDH, затем среднее соотношение в контрольной группе принимали за 100%.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.). Соответствие распределения данных нормальному оценивали с использованием теста Шапиро – Уилка. При сравнении двух групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений, *t*-тест Стьюдента или непараметрический тест Манна – Уитни. Различия считали статистическими значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего или как медиана и межквартильный размах, *n* – количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффектов модели задержки внутриутробного развития на общие характеристики потомства

Масса тела потомства самок крыс группы «ЗВУР» была снижена относительно группы «Контроль» на 11-й день жизни (табл. 2). Уровень глюкозы в крови не различался между двумя группами крысят в возрасте 11-ти дней (табл. 2).

Таблица 2. Характеристики потомства самок группы «Контроль» и «ЗВУР» на 11-й день жизни

Параметр	Контроль ($n = 16$)	ЗВУР ($n = 16$)
Масса тела, г	24.0 ± 0.4	22.0 ± 0.5 *
Уровень глюкозы в крови, ммоль/л	6.0 ± 0.1	6.2 ± 0.4

* $p < 0.05$ (непарный t -тест Стьюдента).

Оценка эффектов задержки внутриутробного развития на механизмы регуляции сократительных ответов артерий потомства

Нормализованный внутренний диаметр подкожной артерии не различался между двумя группами животных и составил 251 ± 8 мкм в группе «Контроль» ($n = 9$) и 235 ± 8 мкм в группе «ЗВУР» ($n = 9$, $p > 0.05$). Реактивность подкожной артерии 11–12-дневных крысят на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин групп «Контроль» и «ЗВУР» также не различалась (рис. 1). Также не наблюдалось различий в максимальной силе сокращения, развиваемой препаратами: она составила 8.4 ± 0.6 мН в группе «Контроль» ($n = 9$) и 8.2 ± 0.7 мН в группе «ЗВУР» ($n = 9$, $p > 0.05$).

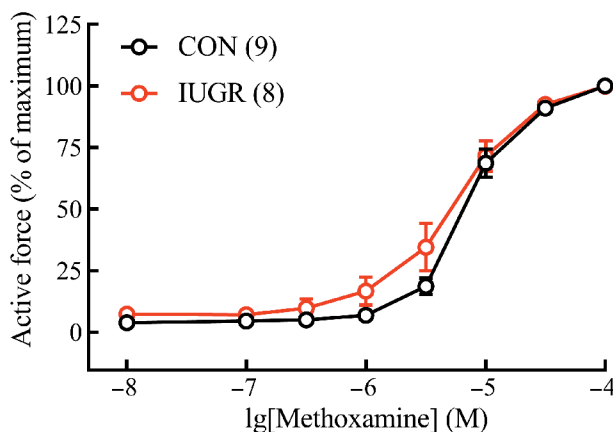


Рис. 1. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению реактивности подкожной артерии 11–12-дневного потомства на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин. Приведены первые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин артерий крысят в возрасте 11–12 дней в группах «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Цифры в скобках обозначают количество животных.

Следующим шагом стало сравнение антиконстрикторного влияния эндотелиального NO в артериях крысят двух экспериментальных групп. Инкубация артерий с ингибитором NO-синтазы L-NNA привела к увеличению сократительных ответов артерий крысят как группы «Контроль», так и группы «ЗВУР» (рис. 2а). Вместе с тем сократительные ответы артерий крысят группы «Контроль» и «ЗВУР» в присутствии L-NNA не различались (рис. 2а), что говорит о сопоставимом антиконстрикторном влиянии эндотелиального NO в подкожной артерии крысят двух групп. При этом расслабление артерий на донор NO DEA-NO (в присутствии L-NNA) было несколько более выраженным в группе «ЗВУР» по сравнению с группой «Контроль» (рис. 2б), что свидетельствует в пользу большей чувствительности гладкомышечных клеток артерий к NO у крысят группы «ЗВУР».

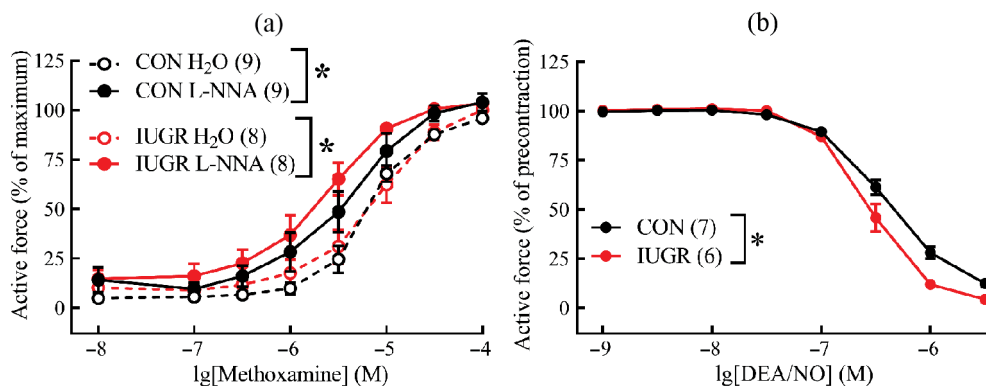


Рис. 2. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению антиконстрикторного вклада NO в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12-днев. (а) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NNA (100 мкМ) или эквивалентного объема растворителя (H₂O, 50 мкл). (б) – Зависимости «концентрация – эффект» на донор NO DEA/NO подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR) в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NNA (100 мкМ). Цифры в скобках обозначают количество животных. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

Далее проводили оценку влияния ЗВУР на активность сигнального пути Rho-киназы в артериях 11–12-дневных крысят. Ингибитор Rho-киназы Y27632 существенно ослабил сократительные ответы подкожной артерии крысят как группы «Контроль», так и группы «ЗВУР» (рис. 3а). При этом не было выявлено межгрупповых различий в реактивности артерий на метоксамин в присутствии Y27632 (рис. 3а). Известно, что Rho-киназа может способствовать сокращению, оказывая влияние как в эндотелии, так и в гладкой мышце артерий [20]. В эндотелии Rho-киназа фосфорилирует eNOS, тем самым подавляя ее активность. В гладкомышечных клетках основной мишенью Rho-киназы является фосфатаза легких цепей миозина, активность которой также снижается в результате фосфорилирования Rho-киназой. Чтобы оценить вклад Rho-киназы в регуляцию сократительных ответов артерий крысят двух групп на уровне гладкомышечных клеток, была проведена серия экспериментов с ингибитором Rho-киназы Y27632 на фоне ингибитора NO-синтазы L-NNA. Как видно из рис. 3б, в присутствии L-NNA сократительные ответы артерий крысят обеих групп также ослаблялись после инкубации с Y27632, при этом различий в эффекте Y27632 между группами обнаружено не было.

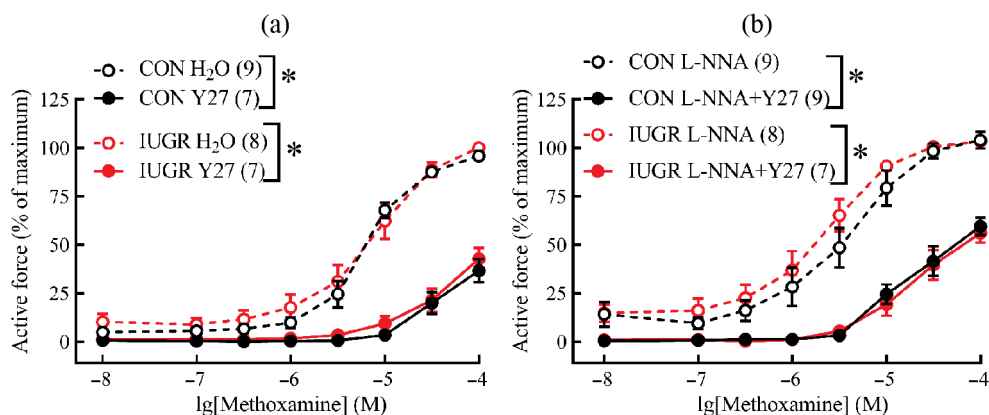


Рис. 3. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению проконстрикторного вклада Rho-киназы в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12-дней. (а) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора Rho-киназы Y27632 (3 мкМ) или эквивалентного объема растворителя (H₂O). (б) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NNA (100 мкМ) или L-NNA совместно с Y27632. Цифры в скобках обозначают количество животных. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

Оценка эффектов задержки внутриутробного развития на содержание мРНК и белка ключевых участников регуляции тонуса сосудов в периоде раннего постнатального онтогенеза

Функциональные измерения были дополнены молекулярно-биологическими экспериментами, в которых мы оценивали на уровне мРНК и белка экспрессию ключевых участников регуляции тонуса артерий.

Содержание как мРНК (рис. 4а), так и белка eNOS (рис. 5а) в ткани подкожной артерии крысят не различалось между группами «Контроль» и «ЗВУР». Экспрессия мРНК аргиназы-2, которая конкурирует с NO-синтазами за субстрат L-аргинин, также не различалась у двух групп (рис. 4б).

Вместе с тем содержание белка RhoA (малый гуанозинтрифосфат-связывающий белок, активирующий Rho-киназу), а также самой Rho-киназы было существенно снижено в ткани артерий крысят группы «ЗВУР» по сравнению с группой «Контроль» (рис. 5б, с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами была применена модель ЗВУР, в которой беременным самкам, начиная с 11 дня беременности, на 50% уменьшали потребление корма. Аналогичная модель была ранее применена в ряде исследований [12, 21–23]. Потомство таких самок характеризовалось сниженной массой тела. Отметим, что ранее при использовании аналогичной модели ЗВУР нами было продемонстрировано уменьшение линейных размеров 11-дневных крысят [12]. Необходимо отметить, что, по-видимому, потомство в возрасте 11–12 дней с признаками ЗВУР не имело выраженных метаболических нарушений, поскольку уровень глюкозы в крови был таким же, как у контрольных животных такого же возраста. Вместе с тем у детей со ЗВУР в возрасте от 5

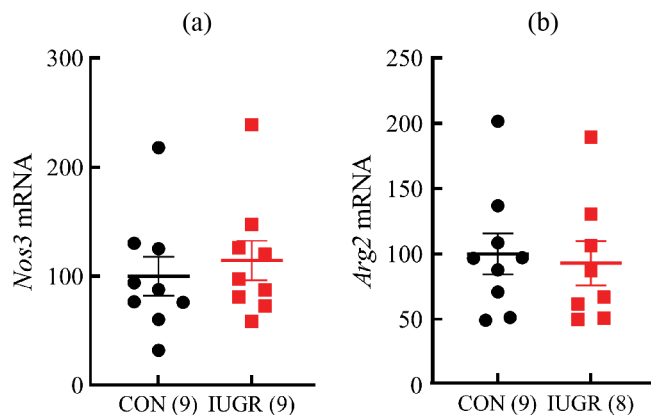


Рис. 4. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не влияет на экспрессию мРНК *Nos3* (eNOS) и *Arg2* (аргиназа-2) в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12 дней. Относительный уровень экспрессии мРНК *Nos3* (a) и *Arg2* (b) в подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Значения экспрессии нормированы на геометрическое среднее экспрессии трех референсных генов (*Gapdh*, *Rplp0*, *Rn18s*) и выражены в процентах от среднего значения в группе «Контроль». Цифры в скобках обозначают количество животных. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.

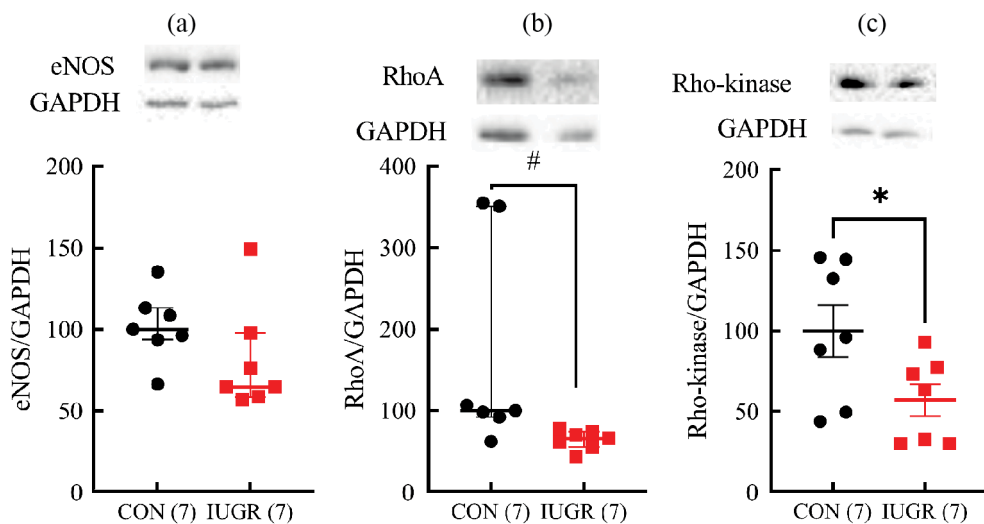


Рис. 5. Относительное содержание белка eNOS (a), RhoA (b) и Rho-киназы II (c) в подкожной артерии крысят в возрасте 11–12 дней групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Значения нормированы на содержание референсного белка GAPDH и выражены в процентах от медианы (a, b) или от среднего (c) в группе «Контроль». Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (a, b) или среднего и стандартной ошибки среднего (c). Цифры в скобках обозначают количество животных. # $p < 0.05$ (непараметрический тест Манна – Уитни), * $p < 0.05$ (непарный *t*-тест Стьюдента).

до 11 лет в анамнезе было показано увеличение уровня глюкозы натощак, так же как и изменение липидного профиля, определяемого в крови [24]. Причины расхождений в результатах исследований неясны, вероятно, они могут быть следствием видовых и/или возрастных различий или же влияния других факторов, которые только предстоит определить. Вероятно, эти же факторы могут лежать в основе расхождений данных о влиянии ЗВУР на интегральные показатели сердечно-сосудистой системы, а именно на уровень артериального давления. Так, для детей в возрасте до 2 лет было показано повышение артериального давления вследствие ЗВУР [4], тогда как для новорожденных и 4-недельных овец со ЗВУР не было обнаружено различий в уровне артериального давления по сравнению с равновозрастным контролем [11].

Важным преимуществом использования животных моделей с экспериментальной патологией по сравнению с исследованиями с участием человека является возможность исследовать тонкие механизмы регуляции отдельных органов, включая кровеносные сосуды. В данном исследовании не было выявлено изменений в сократительных ответах артерий на агонист α_1 -адренорецепторов у 11–12-дневных крысят со ЗВУР по сравнению с равновозрастными контрольными животными. Также не наблюдалось различий во влиянии ингибитора NO-синтазы L-NNA на сократительные ответы артерий крысят контрольной и опытной групп, что указывает на сопоставимое антиконстрикторное влияние NO в двух группах животных в раннем постнатальном периоде и согласуется с отсутствием различий в содержании eNOS (как на уровне мРНК, так и на уровне белка), а также содержания мРНК аргиназы-2 – фермента, конкурирующего с eNOS за субстрат L-аргинин. Однако примечательно, что сравнение влияния донора NO DEA/NO на сосудистый тонус выявило увеличенную реактивность артерий крысят со ЗВУР на экзогенный NO (в присутствии L-NNA, то есть в условиях блокады продукции эндогенного NO), что указывает на повышение реактивности гладкомышечных клеток на NO. Сопоставление функциональных данных об отсутствии изменений во влиянии L-NNA у крысят со ЗВУР (по сравнению с равновозрастными контрольными животными) с увеличенной чувствительностью артерий к экзогенному NO предполагает снижение продукции NO эндотелием сосудов крысят со ЗВУР, которое компенсируется ростом чувствительности к NO на уровне гладкомышечных клеток. Важно, что такие «адаптационные» изменения в чувствительности гладкой мышцы к NO вследствие изменений в его продукции эндотелием у крысят со ЗВУР согласуются с данными литературы об обратной зависимости между синтезом NO эндотелием и чувствительностью гладких мышц к экзогенному NO [25, 26].

Отметим, что проведенные ранее исследования влияния ЗВУР на новорожденных овец не выявили изменений в выраженности эндотелий-зависимого расслабления бедренной артерии на ацетилхолин, а также в чувствительности этой артерии к экзогенному NO [11]. Примечательно, что в возрасте 4-х недель у овец со ЗВУР эндотелий-зависимое расслабление бедренной артерии на ацетилхолин значительно уменьшалось за счет уменьшения сосудорасширительного вклада простаноидов [11], что указывает на постепенное «ухудшение» эндотелий-зависимой регуляции тонуса сосудов у потомков со ЗВУР по мере взросления организма. В соответствии с этим в целом ряде работ для взрослого потомства со ЗВУР показано ослабление эндотелий-зависимой регуляции сосудистого тонуса [7–10, 12, 27].

Еще один механизм регуляции сосудистого тонуса, особенно важный в раннем постнатальном периоде, связан с проконстрикторным влиянием Rho-киназы [17, 28]. Ранее мы показали, что в коронарных артериях взрослых крыс со ЗВУР наблюдается увеличение проконстрикторного влияния Rho-киназы в эндотелии [12]. В данной работе мы впервые исследовали вовлечение этого механизма в регуляцию сосудистого тонуса у животных со ЗВУР в раннем постнатальном периоде. Известно, что Rho-киназа может оказывать свое проконстрикторное влияние как на уровне гладкой мышцы, так и на уровне эндотелия, где она может ингибировать активность eNOS [20]. В связи с этим нами были проведены эксперименты как на фоне L-NNA, так и без него. Однако ни

в тех, ни в других условиях не было выявлено различий во влиянии ингибитора Rho-киназы у контрольных крысят и крысят со ЗВУР. Примечательно, что содержание белка самой Rho-киназы и ее активатора RhoA было снижено в артериях крысят со ЗВУР, в то время как функциональный вклад Rho-киназы в регуляцию сократительных ответов не был изменен. На данный момент нет четкого ответа на вопрос о причине в расхождении результатов биохимических и функциональных экспериментов. Мы можем предполагать, что, несмотря на уменьшение содержания белка Rho-киназы в артериях крысят со ЗВУР, может происходить усиление ее активности, которая регулируется в том числе факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) [29]. Есть ли влияние ЗВУР на активность GEF и, если есть, то какое оно, остается неясным на настоящий момент и может служить предметом будущих исследований. Вместе с тем результаты данного исследования свидетельствуют о неизменном функциональном вкладе Rho-киназы в регуляцию сосудистого тонуса у животных со ЗВУР в раннем постнатальном периоде.

Таким образом, у крыс со ЗВУР не было обнаружено ярко выраженных изменений в регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде (в возрасте 1–2-х недель). Однако наши данные указывают на некоторые изменения в тонких механизмах регуляции тонуса артерий, а именно на возможное снижение продукции NO эндотелием сосудов, которое «компенсируется» на функциональном уровне ростом чувствительности гладкой мышцы к NO. Отметим, что, согласно данным литературы, выраженность последствий ЗВУР для сосудистой системы может градуально нарастать по мере развития организма в раннем постнатальном периоде [11], переходя в достаточно ярко выраженные нарушения регуляции тонуса артерий у взрослого потомства [7–10, 12, 27].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д. К. Г., О. С. Т.), сбор данных (А. А. Ш., Е. К. С., Л. Д. Ш., Д. К. Г.), обработка данных (А. А. Ш., Е. К. С., Л. Д. Ш., Д. К. Г.), написание и редактирование манускрипта (Д. К. Г., А. А. Ш., О. С. Т.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова № 121032300071-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (протокол 94-ж, 27.06.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yzidorczyk C, Armengaud JB, Peyter AC, Chehade H, Cachat F, Juvet C, Siddeek B, Simoncini S, Sabatier F, Dignat-George F, Mitancher D, Simeoni U* (2017) Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J Dev Orig Health Dis* 8: 448–464.
<https://doi.org/10.1017/S2040174417000265>

2. Freije WA, Thamocharan S, Lee R, Shin B, Devaskar SU (2015) The Hepatic Transcriptome of Young Suckling and Aging Intrauterine Growth Restricted Male Rats. *J Cell Biochem* 116: 566–579.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25008>
3. Gibson LC, Shin B, Dai Y, Freije W, Kositamongkol S, Cho J, Devaskar SU (2015) Early leptin intervention reverses perturbed energy balance regulating hypothalamic neuropeptides in the pre- and postnatal calorie-restricted female rat offspring. *J Neurosci Res* 93: 902–912.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23560>
4. Zanardo V, Visentin S, Trevisanuto D, Bertin M, Cavallin F, Cosmi E (2013) Fetal aortic wall thickness: a marker of hypertension in IUGR children? *Hypertens Res* 36: 440–443.
<https://doi.org/10.1038/hr.2012.219>
5. Visentin S, Grumolato F, Battista G, Di B, Grisan E, Cosmi E (2014) Early origins of adult disease : Low birth weight and vascular remodeling. *Atherosclerosis* 237: 391–399.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.027>
6. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, Sachdev HS (2008) Maternal and Child Undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371: 340–357.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61692-4)
7. Torrens C, Brawley L, Anthony FW, Dance CS, Dunn R, Jackson AA, Poston L, Hanson MA (2006) Folate Supplementation During Pregnancy Improves Offspring Cardiovascular Dysfunction Induced by Protein Restriction. *Hypertension* 47: 982–987.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000215580.43711.d1>
8. Franco M do C, Fortes ZB, Akamine EH, Kawamoto EM, Scavone C, De Britto LRG, Muscara MN, Teixeira SA, Tostes RCA, Carvalho MHC, Nigro D (2004) Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in microvessels of intrauterine undernourished rats. *J Physiol* 558: 239–248.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.064055>
9. Oliveira V, de Souza LV, Fernandes T, Junior SDS, de Carvalho MHC, Akamine EH, Michelini LC, de Oliveira EM, Franco M do C (2017) Intrauterine growth restriction-induced deleterious adaptations in endothelial progenitor cells: possible mechanism to impair endothelial function. *J Dev Orig Health Dis* 8: 665–673.
<https://doi.org/10.1017/S2040174417000484>
10. Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L, Hanson MA (2003) Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol* 547: 77–84.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026120>
11. Rock CR, White TA, Piscopo BR, Sutherland AE, Pham Y, Camm EJ, Sehgal A, Polglase GR, Miller SL, Allison BJ (2023) Cardiovascular decline in offspring during the perinatal period in an ovine model of fetal growth restriction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 325: H1266–H1278.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00495.2023>
12. Selivanova EK, Shvetsova AA, Shilova LD, Tarasova OS, Gaynullina DK (2021) Intrauterine growth restriction weakens anticontractile influence of NO in coronary arteries of adult rats. *Sci Rep* 11: 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93491-3>
13. Gaynullina DK, Schubert R, Tarasova OS (2019) Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis – A key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system. *Int J Mol Sci* 20: 1–12.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061421>
14. Gaynullina D, Lubomirov LT, Sofronova SI, Kalenchuk VU, Gloe T, Pfitzer G, Tarasova OS, Schubert R (2013) Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats. *Cardiovasc Res* 99: 612–621.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt138>
15. Sofronova SI, Borzykh AA, Gaynullina DK, Kuzmin IV, Shvetsova AA, Lukoshkova EV, Tarasova OS (2016) Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats. *Nitric Oxide – Biol Chem* 55–56: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.005>
16. Puzdrova VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Mochalov SV, Aalkjaer C, Nilsson H, Vorotnikov AV, Schubert R, Tarasova OS (2014) Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca^{2+} sensitivity during early post-natal development in rats. *Acta Physiol* 212: 128–141.
<https://doi.org/10.1111/apha.12331>
17. Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Kalenchuk VU, Borovik AS, Vorotnikov AV, Tarasova OS, Schubert R (2018) Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol* 223: 1–15.
<https://doi.org/10.1111/apha.13044>

18. Štulcová B (1977) Postnatal Development of Cardiac Output Distribution Measured by Radioactive Microspheres in Rats. *Neonatology* 32: 119–124.
<https://doi.org/10.1159/000241004>
19. Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
20. Тарасова ОС, Гайнуллина ДК (2017) Rho-киназа как ключевой участник регуляции тонуса сосудов в норме и при сосудистых расстройствах. *Артер гипертен* 23: 383–394. [Tarasova OS, Gainullina DK (2017) Rho-kinase as a key participant in the regulation of vascular tone in health and in vascular disorders. *Arter hyperten* 23: 383–394. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-5-383-394>
21. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Lagishetty V, Matveyenko AV, Lee WNP, Devaskar SU (2013) Glucose Intolerance and Lipid Metabolic Adaptations in Response to Intrauterine and Postnatal Calorie Restriction in Male Adult Rats. *Endocrinology* 154: 102–113.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1640>
22. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Thamotharan S, Shin B, Stout D, Devaskar SU (2012) Early Postnatal Caloric Restriction Protects Adult Male Intrauterine Growth – Restricted Offspring From Obesity. *Diabetes* 61: 1391–1398.
<https://doi.org/10.2337/db11-1347>
23. Thamotharan M, Shin B, Suddirikk DT, Thamotharan S, Garg M, Devaskar SU (2005) GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *Am J Physiol Metab* 288: E935–E947.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00342.2004>
24. Zamojska J, Niewiadomska-Jarosik K, Kierzkowska B, Gruca M, Wosiak A, Smolewska E (2023) Lipid Profile in Children Born Small for Gestational Age. *Nutrients* 15.
<https://doi.org/10.3390/nu15224781>
25. Brandes RP, Kim DY, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Gödecke A, Mülsch A, Busse R (2000) Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: Role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35: 231–236.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.1.231>
26. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata KI, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M (1998) Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102: 2061–2071.
<https://doi.org/10.1172/JCI4394>
27. Krause BJ, Peñaloza E, Candia A, Cañas D, Hernández C, Arenas GA, Peralta-Scholz MJ, Valenzuela R, García-Herrera C, Herrera EA (2019) Adult vascular dysfunction in foetal growth-restricted guinea-pigs is associated with a neonate-adult switching in Nos3 DNA methylation. *Acta Physiol* 227: 1–13.
<https://doi.org/10.1111/apha.13328>
28. Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ (1998) Regulation of Ca²⁺ sensitization by PKC and rho proteins in ovine cerebral arteries: Effects of artery size and age. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 275: 930–939.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.3.h930>
29. Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325–1358.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>

Intrauterine Growth Restriction does not Lead to Pronounced Changes in the Regulation of Arterial Contractile Responses in Rats in the Early Postnatal Period

**A. A. Shvetsova^a, E. K. Selivanova^{a, b}, L. D. Shilova^a, O. S. Tarasova^{a, c}
and D. K. Gaynullina^{a, *}**

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*ChemRar Research and Development Institute, Khimki, Moscow Region, Russia*

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

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

Intrauterine growth retardation (IUGR) is one of the most common pathologies of pregnancy. As a result of this pathology, the functioning of many systems, including the cardiovascular system, is disrupted. In adult animals who have suffered IUGR, the contribution of procontractile mechanisms regulating vascular tone (for example, the Rho-kinase signaling pathway) increases, and the contribution of anticontractile mechanisms (for example, endothelial NO), on the contrary, decreases, which can lead to vasospasm and impaired blood supply to organs. Since NO and Rho-kinase have a pronounced vasomotor role in early postnatal ontogenesis, the purpose of this work was to assess the influence of IUGR on the contribution of these mechanisms to the regulation of arterial contractile responses in early postnatal ontogenesis. IUGR was modeled by limiting the amount of food consumed by females (by 50%) from the 11th day of pregnancy until birth. In offspring aged 11 - 12 days, the reactions of the isolated saphenous artery were studied in isometric mode, and the content of mRNA and proteins of interest in this artery was also assessed. IUGR did not lead to a change in the reactivity of the arteries of the offspring to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor agonist methoxamine. The increase in contractile responses to methoxamine in the presence of the NO-synthase inhibitor L-NNA, as well as the expression levels of eNOS (mRNA and protein) and arginase-2 (mRNA) were not changed in the arteries of IUGR rats, while the sensitivity of the arteries to the exogenous NO donor DEA /NO was higher in IUGR compared to control rat pups. Despite the relatively low content of RhoA and Rho-kinase II proteins in the arterial tissue of rat pups from the IUGR group, the decrease in contractile responses under the influence of the Rho-kinase inhibitor Y27632 was equally pronounced in the arteries of rat pups from two experimental groups. Thus, IUGR, caused by maternal nutritional restriction during pregnancy, does not lead to pronounced changes in the regulation of systemic vascular tone in the early postnatal period.

Keywords: intrauterine growth restriction, smooth muscle, endothelium, nitric oxide NO, Rho-kinase, early postnatal ontogenesis, artery

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВОДОРОД УМЕНЬШАЕТ СРЕДНЕЕ
И СИСТОЛИЧЕСКОЕ АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ И ПРОЦЕССЫ
ВОСПАЛЕНИЯ В ЛЕГКИХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ГИПЕРТОНИИ
В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА КРЫСАХ ЛИНИИ WISTAR**

© 2024 г. М. М. Артемьева^{1,*}, Т. А. Куропаткина^{2,3}, В. В. Шишкина⁴,
Д. В. Серебряная^{1,5}, Д. А. Адашева¹, О. С. Медведев^{1,6}, Н. А. Медведева¹

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

²Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова, Москва, Россия

³Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

⁴Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко,
Воронеж, Россия

⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁶Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
имени академика Е. И. Чазова, Москва, Россия

*E-mail: marinka.artemieva@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2024 г.

После доработки 06.10.2024 г.

Принята к публикации 07.10.2024 г.

Молекулярный водород проявляет антиоксидантные и противовоспалительные свойства. Показано его протективное действие при различных сердечно-сосудистых заболеваниях. Целью работы было изучение влияния дыхания атмосферным воздухом, содержащим 4% молекулярного водорода, на степень развития МКТ-легочной гипертензии и ассоциированной с ней интерстициальной болезни легких, а также выраженности реноваскулярной (1П1К) гипертензии в экспериментах на крысах. В качестве модели гипертензии малого круга кровообращения использовали монокроталин-индуцированную легочную гипертензию (МКТ-ЛГ). Эксперименты проводили на трех группах животных: “Контроль” – животным вводили растворитель для монокроталина, “МКТ-Контроль” и “МКТ-Н₂” – группы, которым однократно вводился МКТ. Группы “Контроль” и “МКТ-Контроль” в течение 21 дня дышали атмосферным воздухом, а группа “МКТ-Н₂” – воздухом, содержащим 4% водорода. Ингаляции были постоянными в течение 21-го дня. На 21-й день под уретановым наркозом измеряли гемодинамические параметры и фиксировали образцы легкого для последующего морфологического анализа. В качестве модели гипертензии большого круга использовали реноваскулярную гипертензию 1П1К (РВГ). В эксперименте было две группы: РВГ-К – крысы дышали атмосферным воздухом и РВГ-Н₂ – крысы дышали воздухом, содержащим 4% водорода. В ходе эксперимента измеряли систолическое артериальное давление (САД) и оценивали выделительную функцию почки. На 28-й день под уретановым наркозом измеряли гемодинамические показатели. На модели МКТ водород не влиял на гемодинамические параметры МКТ гипертензии, но уменьшал среднее АД, САД, количество тучных клеток, секрецию триптазы из них, а также маркеры ремоделирования легких – TGF-β1 и MMP-9. На РВГ модели дыхание с водородом уменьшало среднее АД, САД и не влияло на вы-

делительную функцию почки. Ингаляции 4% водорода вызывают уменьшение среднего АД и САД в обеих моделях артериальной гипертензии, снижают выраженность воспалительного процесса и ингибируют активность профиброзных факторов в тканях легкого при МКТ-ЛГ. Возможно, центральное действие водорода сочетается с его противовоспалительным и антифибротическим действием.

Ключевые слова: молекулярный водород, ингаляции, монокроталиновая легочная гипертензия, реноваскулярная гипертензия, среднее артериальное давление, систолическое артериальное давление, крысы, тучные клетки

DOI: 10.31857/S0869813924100073, **EDN:** VRNEGA

ВВЕДЕНИЕ

Артериальное давление (АД) является интегративным показателем состояния сердечно-сосудистой системы. Нормальный уровень давления в организме создается и регулируется нервным, гуморальным, гормональным, местным и др. механизмами. Длительное повышение АД приводит к развитию артериальной гипертензии. Гипертензия – обширная группа заболеваний, которая характеризуется стойким увеличением АД и является одной из ведущих причин возникновения сердечно-сосудистых заболеваний в организме человека [1]. В последнее время появляются данные, что одним из важнейших факторов патогенеза этого заболевания являются оксидативный стресс и воспаление. Оба этих фактора опосредуют патологические изменения миокарда, сосудов и окружающей ткани. Среди перспективных и неспецифических методов предупреждения и терапии гипертензии рассматривается применение антиоксидантов [2]. Молекулярный водород – природный антиоксидант, может избирательно нейтрализовать гидроксильные радикалы (ОН) и пероксинитрит (ONOO-), которые являются очень сильными окислителями и активность которых приводит к необратимым изменениям тканей и гибели клеток. Важно, что молекулярный водород не восстанавливает такие важные сигнальные молекулы в тканях, как H_2O_2 и NO [3]. Влияние молекулярного водорода на организм умеренное, побочных эффектов до сих пор не выявлено [4]. Обладая такими свойствами, молекулярный водород может уменьшать оксидативный стресс, при этом не влияя на сигнальные молекулы, участвующие в физиологических процессах в клетках [5]. Тучные клетки (ТК) рассматриваются потенциальными мишенями для выявления противовоспалительных эффектов молекулярного водорода и иммунного ответа. Ферменты и протеазы (триптаза), высвобождаемые ТК, а также образующиеся во время дегрануляции активные формы кислорода, сопровождают ранние стадии воспалительного процесса [6]. Кроме того, было показано, что H_2 способен ингибировать синтез провоспалительных и воспалительных цитокинов, изменяя внутриклеточные пути реализации их сигналов [7]. Открытие этих свойств H_2 положило начало широкому кругу исследований на животных о возможном влиянии H_2 на течение различных сердечно-сосудистых и других заболеваний. В работах, проведенных на крысах, было показано, что добавление молекулярного водорода к атмосферному воздуху, которым дышат животные, уменьшает ишемическое/реперфузионное повреждение миокарда за счет снижения оксидативного стресса и NLRP3-опосредованного пироптоза у крыс [8]. Защитное действие газообразного водорода продемонстрировано также при изучении ишемического/реперфузионного повреждения спинного мозга. Показано, что транспортер-1 глутамата играет важную роль в этом эффекте [9]. Были получены данные о том, что вдыхание газообразного водорода уменьшает ремоделирование миокарда сердца и фиброз путем регулирования воспаления у крыс с инфарктом миокарда [10] и в легких у животных с легочной гипертензией [11]. Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой группу ферментов, участвующих в деградации большинства компонентов внеклеточного матрикса и, следо-

вательно, в ремоделировании тканей, связанном с патологическими состояниями, в том числе с развитием легочной гипертензии [12]. Матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9), влияя на активацию тканевого фактора, при взаимодействии с ММП-2 вызывает нарушение строения дыхательных путей и базальной мембраны сосудов, что напрямую приводит к повышению их проницаемости. Кроме того, ММП-9 усиливает активность нейтрофилов через NF-κB-путь, увеличивает высвобождение воспалительных факторов, таких как IL-6, и катализирует прогрессирование легочного воспаления [12].

В исследованиях используют несколько способов применения водорода, каждый из которых имеет свои особенности. В настоящее время в экспериментальных и клинических исследованиях часто применяют ингаляции воздухом, содержащим разный процент добавленного водорода. Было показано, что вдыхание газовой смеси с концентрацией водорода от 2 до 4% безопасно [13].

Несмотря на большое количество работ, касающихся изучения защитного действия молекулярного водорода на развитие патологий сердца и мозга, исследования на моделях гипертензии единичны. Так, в одном из них было показано, что ежедневные 4-часовые ингаляции с H₂ у пожилых людей (50–70 лет) с диагностированной артериальной гипертензией приводят к уменьшению систолического артериального давления [14]. Предполагается, что кроме изменения активности ренин-ангиотензиновой системы, в этом эффекте принимает участие уменьшение активности симпатической системы. В связи с этим мы в настоящей работе изучали влияние H₂ на развитие гипертензии на двух моделях. Первая модель воспроизводит гипертензию малого круга кровообращения – легочную гипертензию, которая характеризуется увеличением среднего артериального давления в легочных сосудах более чем на 25 мм рт. ст. Развитие МКТ гипертензии ассоциировано с интерстициальной болезнью легких (ИЗЛ). При этом наблюдается развитие эндотелиальной дисфункции, воспаления, оксидативного стресса, ремоделирование сосудистой стенки и соединительной ткани легких, т. е. все симптомы развития ИЗЛ [15]. Важно, что эта форма гипертензии не сопровождается изменением системного артериального давления. Изучены многие молекулярные механизмы, лежащие в основе ее патогенеза [16]. Уменьшение процессов воспаления и фиброза в легких может явиться маркером действия молекулярного водорода при ингаляциях.

В качестве второй модели была выбрана модель гипертензии большого круга кровообращения – реноваскулярная гипертензия “одна почка – одна клипса” (РВГ 1П1К), которая зависит от ренин-ангиотензиновой системы только в начале заболевания. Показано, что механизм развития РВГ запускается при сужении просвета приносящей почечной артерии не менее чем на 70–80% [17]. Считается, что важную роль в увеличении системного артериального давления и ЧСС играет увеличение симпатической активности [18].

Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение влияния дыхания атмосферным воздухом, содержащим 4% молекулярного водорода, на степень развития МКТ-легочной гипертензии и ассоциированной с ней интерстициальной болезни легких, а также выраженности реноваскулярной (1П1К) гипертензии в экспериментах на крысах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Исследование проводили на самцах крыс линии Wistar, массой 180–220 г, полученных из вивария НИИ общей патологии и патофизиологии (Москва, Россия). При содержании крыс соблюдались условия 12-часового светового дня со свободным доступом к воде и пище при контроле влажности и температуры. Эксперименты начинали не ранее, чем через 7 дней после доставки животных.

Моделирование МКТ-ЛГ. Эксперименты проводились на 24 животных, которые были разделены на три группы по 8 крыс. Для получения модели МКТ-ЛГ животным однократно подкожно вводили монокроталин (МКТ) (60 мг/кг в 60%-ном этиловом спирте) (Sigma Aldrich, Дармштадт, Германия). Контрольной группе (Контроль) вводили только

растворитель для МКТ (эквивалентный объем 60%-ного этилового спирта). Животные этой группы были помещены в пластиковые камеры, так же как и МКТ группы, они дышали атмосферным воздухом. Животные, получавшие МКТ-инъекцию, были разделены на две группы. В 1-й группе крысы дышали атмосферным воздухом (МКТ-Контроль), во 2-й группе – атмосферным воздухом, содержащим 4% водорода (МКТ- H_2). Воздействие было хроническим – в течение 3 недель. В течение этого времени убыль животных не наблюдалась, однако в ходе острого эксперимента не всегда удавалось корректно измерить систолическое давление в правом желудочке сердца как одного из симптомов развития МКТ-ЛГ, или же животные с гипертонией плохо переносили наркоз и умирали. Поэтому в конечном итоге представлены результаты по 5 или 6 животным в группах.

Схема эксперимента. В ходе эксперимента животных помещали в пластиковые контейнеры объемом 130 л (SAMLA 203.764.41, Inter IKEA Systems). Внутри каждого контейнера располагалось по две клетки ТЗ для животных, в каждой из которых помещалось по 4 крысы. Для вентиляции контейнеров использовали воздушный компрессор (Hiblow XP 40, Techno Takatsuki CO, Япония). Водород подавали от генератора молекулярного водорода (Pioneer, Vodorodpomogaet Россия). Подачу водорода и атмосферного воздуха контролировали ротаметрами (LZB-3, LZM-4T, Китай). Она составляла 0.15 л/мин для водорода и 4 л/мин для воздуха. Содержание водорода в этом случае составляло 3.5–4.0% в воздухе, которым дышали крысы (рис. 1).

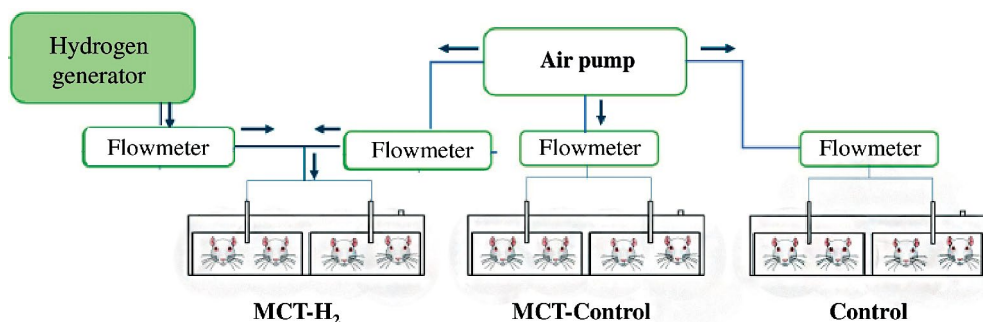


Рис. 1. Схематическое изображение экспериментальной установки.

Моделирование РВК ИПК. Перед началом эксперимента животных взвешивали, измеряли систолическое артериальное давление (САД) плетизмографическим методом и помещали в метаболические клетки производства компании Tecniplast на 22 ч. Животные в метаболических клетках (метабоклетки) имели неограниченный доступ к воде. Сразу после того, как животных извлекали из метабоклеток, у них из хвостовой вены отбирали пробы крови на биохимический анализ, определяли количество выпитой воды и суточный объем выделенной мочи. Полученные образцы крови и мочи замораживали при температуре $-20^{\circ}C$ для последующего анализа. Животные после метабоклеток восстанавливались в течение двух дней для увеличения выживаемости при последующей операции.

Операцию по моделированию РВГ ИПК гипертонии проводили под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг, 20 мг/мл в 0.9%-ном растворе NaCl, внутривенно). У животных удаляли правую почку, а на почечную артерию левой почки накладывали клипсу, которую изготавливали из отрезка серебряной ленты (толщина 0.1 мм) длиной 8–9 мм, шириной 2 мм. Просвет клипсы составлял 0.26–0.27 мм в зависимости от массы тела крысы. После операции крысам внутривенно вводили антибиотик ципрофлоксацин, 5 мг/кг/день, 2 мг/мл, в течение четырех дней (Ciprinol®, раствор для инфузии, KRKA). Оперированных животных помещали в индивидуальные клетки на 7 дней.

Спустя неделю после операции животным измеряли САД плетизмографическим методом и разделяли их на 2 группы – РВГ-К и РВГ-Н₂. Животных распределяли так, чтобы усредненное увеличение САД после операции было статистически равным между двумя группами. Так же как и в предыдущих экспериментах, в течение 3 недель животные в опытной группе (РВГ-Н₂) дышали воздухом, содержащим 4% молекулярного водорода, а животные в контрольной группе (РВГ-К) дышали атмосферным воздухом. За 2 дня до острого эксперимента животных сажали в метаболические клетки, проводили измерение массы до и после метаболических клеток, определяли потребление воды за сутки и объем суточной мочи, проводили отборы проб сыворотки крови и мочи. В пробах крови и мочи проводили измерение содержания креатинина и мочевины коммерческими наборами.

Для регистрации гемодинамических параметров животных анестезировали уретаном (1.2 г/кг, 0.6 г/мл в воде) внутривенно. Среднее артериальное давление (ср. АД), систолическое АД (САД), диастолическое АД (ДАД) и систолическое давление в правом желудочке (СПЖД) в случае МКТ-ЛГ животных и частоту сердечных сокращений (ЧСС) оценивали непосредственно с помощью датчика артериального давления Statham (Statham Instrument Inc., Лос-Анджелес, Калифорния, США). Данные через усилитель и аналого-цифровой преобразователь L-Card E14–140 (версия 1, L-Card, Москва, Россия) передавались на компьютер. Наркотизированным крысам в бедренную артерию вживляли катетер PE10 для регистрации давления и ЧСС. В бедренную вену вставляли катетер PE 50 (Медсил, Москва, Россия) для введения веществ. Для МКТ-ЛГ животных в правую яремную вену вставляли катетер PE 50 и проводили его в правый желудочек под контролем регистрации кривой давления. О степени развития реноваскулярной гипертонии судили по изменению системного АД, а МКТ гипертонии – по величине СПЖД и гипертрофии правого желудочка сердца. Степень гипертрофии правого желудочка (ПЖ) оценивали как отношение массы ПЖ к сумме масс левого желудочка (ЛЖ) и межжелудочковой перегородки (пер) (ПЖ/(ЛЖ + пер)) в процентах.

Биохимический анализ проводили в образцах сыворотки крови и мочи животных с РВГ ИПК. В пробах измеряли содержание креатинина и мочевины с помощью коммерческих наборов Ольвекс-Диагностикум (Россия): Креатинин-Ольвекс, Мочевина-Ольвекс. Спектрофотометрический анализ проводили на анализаторе Multiscan EX (Thermo EC, Delaware, США).

Морфологический анализ. Взятые образцы легких незамедлительно фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина в течение 2–3 дней. После стандартной процедуры пробоподготовки из парафиновых блоков изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм для окрашивания гематоксилином и эозином, а также раствором Гимзы для идентификации ТК; срезы толщиной 2 мкм использовали для иммуногистохимического исследования. Иммуногистохимически определяли секрецию триптазы ТК с использованием мышиных моноклональных антител к триптазе (Abcam #ab2378, разведение 1 : 2000), профиброзные маркеры TGF- β 1 [EPR21143] (Abcam #ab215715, разведение 1 : 500) и MMP-9 [EP127] (#AC-0122RUO, разведение 1 : 200, Cell Marque, Epitomics Inc., США) для оценки ремоделирования легких. Проводили иммунофлуоресцентное выявление триптазы ТК (козий анти-мышинный IgG Ab (#A-11029) Invitrogen, (метка Alexa Fluor 488) и MMP-9 (козий анти-кроличий IgG Ab (#A-11034) Invitrogen, (метка-Cy3)), ядра контрастировали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 5 мкг/мл в PBS). Количественный анализ иммунопозитивных клеток осуществлялся по 30 полям зрения при увеличении $\times 20$. Сводные данные приведены в табл. 1. Все гистологические срезы анализировали слепым способом с использованием микроскопа Zeiss Imager.A2, программного обеспечения ImagePro (Германия).

Статистическая обработка результатов. Данные экспериментов оформлены и представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистический анализ данных проводили в программах Statistica 12.0 (Statistica Inc., США) и GraphPad Prism 8.0. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия

Шапиро – Уилка. One-Way ANOVA использовали для определения наличия статистически значимых различий по одному фактору между средними значениями трех или более независимых групп. Для того чтобы установить одновременное влияние группы и продолжительности воздействия, а также оценить взаимодействие между этими факторами, использовали двухфакторный дисперсионный анализ Two-way ANOVA. Для сравнения ранговых данных использовали тест Краскела – Уоллиса. Исключение статистических выбросов проводили с использованием критерия ROUT при $Q > 1\%$. Качественные данные описывали абсолютными (n) и относительными данными (%). Как статистически значимый рассматривали уровень доверительной вероятности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния молекулярного водорода на развитие МКТ-ЛГ

Влияния добавленного молекулярного водорода к атмосферному воздуху на основные сердечно-сосудистые показатели развития МКТ-ЛГ не было выявлено. Показатели СПЖД для группы МКТ-Контроль и МКТ- H_2 достоверно не отличались друг от друга и составляли 56 ± 7 мм рт. ст. ($n = 5$) и 55 ± 6 мм рт. ст. ($n = 6$) соответственно. Обе величины были достоверно выше СПЖД контрольной группы без МКТ-ЛГ, где оно составляло 29 ± 5 мм рт. ст. ($p < 0.05$), что свидетельствует о развитии МКТ-ЛГ в обеих экспериментальных группах. Индекс гипертрофии ПЖ сердца в группе контроля составил $29.2 \pm 4.0\%$, в группе МКТ-Контроль – $38.3 \pm 6.1\%$ и в группе МКТ- H_2 – $42.1 \pm 6.8\%$. Два последних показателя статистически значимо не отличались друг от друга, но были достоверно больше величины в группе Контроль ($p < 0.05$). Эти данные свидетельствуют о развитии гипертонии в МКТ группах и отсутствии влияния H_2 на этот показатель, что подтверждает полученные ранее данные [11].

Изучение величины САД показало, что в группе животных с МКТ-ЛГ, которые дышали атмосферным воздухом, содержащим 4% молекулярного водорода (МКТ- H_2), наблюдается достоверное уменьшение ср. АД на 11% по сравнению с ср. АД в контрольной группе и на 13% по сравнению с группой МКТ-Контроль ($p < 0.05$) (рис. 2).

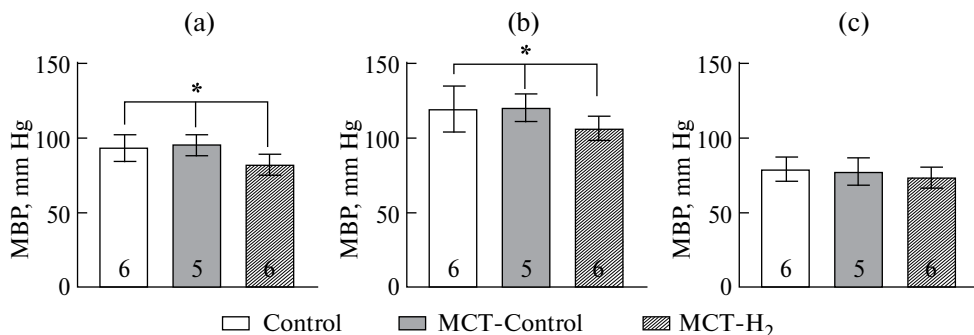


Рис. 2. Среднее артериальное давление (а), систолическое (b) и диастолическое (с) артериальное давление на 21-й день эксперимента. *МСТ- H_2 vs Control, $p < 0.05$, One-way ANOVA. Цифры внутри столбиков обозначают количество животных.

Так как ср. АД представляет собой некоторый усредненный показатель между САД и ДАД, мы посмотрели, за счет какой составляющей наблюдается выявленное нами уменьшение ср. АД. Как показано на рис. 2b, изменение ср. АД обусловлено снижением его систолической составляющей. САД в группе МКТ- H_2 составляет 107 ± 8 мм

рт. ст., а в группе МКТ – 121 ± 9 мм рт. ст., в группе Контроль – 120 ± 15 мм рт. ст. ($p < 0.05$). ДАД и ЧСС при этом не отличались.

МКТ-ЛГ является моделью легочной гипертензии, ассоциированной с интерстициальным заболеванием легких, которое характеризуется воспалением и фиброзом. Морфологический анализ выявил признаки воспалительного процесса, а также изменение активности профиброзных маркеров в сторону активации синтеза фибриллярных структур с образованием фиброзных структур с неравномерной плотностью, утолщение стенок сосудистого русла (рис. 3б). Морфологический анализ образцов группы МКТ-Н₂ показал, что структуры ацинуса приобрели классическую форму; альвеолы имели ячеистый вид и слегка утолщенные стенки с полноценными кровеносными сосудами в интерстиции (рис. 3е). Признаки интерстициального отека уменьшились, но пневмоциты с признаками гипертрофии сохранялись. Реакция ТК показала как количественное, так и функциональное снижение по сравнению с контрольной группой МКТ. Ранее мы описывали, что дыхание воздухом с примесью 4% Н₂ у животных с МКТ приводит к снижению количества и функциональной активности тучных клеток (включая клетки, содержащие триптазу) в среднем на 30% по сравнению с группой МКТ-Контроль, т. е. вызывает уменьшение воспаления в легких (табл. 1). Секретция TGF-β альвеолярными макрофагами и альвеолярными клетками II типа была высокой по сравнению с контролем и МКТ-Н₂ в группах (табл. 1, рис. 4). При общем увеличении количества клеток TGF-β наблюдалось их неравномерное распределение в респираторной части легкого с формированием преимущественного накопления в определенных локусах ацинуса. Продолжая это исследование, в данной работе мы проводили иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализ содержания одного из ферментов семейства матриксных металлопротеиназ – ММП-9. Как уже говорилось выше, при ЛГ наблюдается ремоделирование стенки легочных сосудов. В этом процессе принимает участие и изменение внеклеточного матрикса, которое регулируется как иммунокомпетентными клетками, так и ферментами семейства ММП [19]. Результаты показали, что экспрессия ММП-9 в группе МКТ-Контроль была выше, чем в группах Контроль в 16 раз, а по сравнению с группой МКТ-Н₂ – в 2.3 раза ($p < 0.05$) (табл. 1, рис. 4).

Таблица 1. Среднее количество триптаза-позитивных тучных клеток и клеток, экспрессирующих профиброзные маркеры в 1 мм² легких ($M \pm SD$)

Маркер \ Группа	Контроль ($n = 7$)	МКТ-Контроль ($n = 6$)	МКТ-Н ₂ ($n = 6$)
Триптаза ТК	23 ± 6	$40 \pm 13^*$	$28 \pm 10^{*, \#}$
TGF-β	4 ± 3	$106 \pm 50^*$	$42 \pm 10^{*, \#}$
ММП-9	3 ± 1	$48 \pm 9^*$	$21 \pm 7^{*, \#}$

Примечание. Триптаза ТК – *Контроль vs. МКТ-Control, МКТ-Н₂, $p < 0.05$, # МКТ-Н₂ vs. МКТ-Контроль, $p < 0.05$, one-way ANOVA; TGF-β – *Контроль vs. МКТ-Control, МКТ-Н₂, $p < 0.00001$, # МКТ-Н₂ vs. контроль, МКТ-Контроль односторонний ANOVA; *Контроль vs. МКТ-Контроль, МКТ-Н₂, $p < 0.05$, # МКТ-Н₂ vs. МКТ-Контроль, $p < 0.05$, one-way ANOVA.

Таким образом, в гипертензивной группе, крысы которой дышали воздухом с 4% водорода, количество ММП-9-позитивных клеток было статистически значимо уменьшено по сравнению с МКТ-контрольной группой. ММП-9 в легких, идентифицируемая путем иммунофлуоресцентного окрашивания, экспрессировалась преимущественно в нейтрофилах, в меньшей степени – в ТК. Результаты показали, что экспрессия ММП-9 в группе МКТ-Контроль была выше, иммунопозитивные ММП-9 клетки часто солокализовались с триптаза-позитивными ТК (табл. 1, рис. 4).

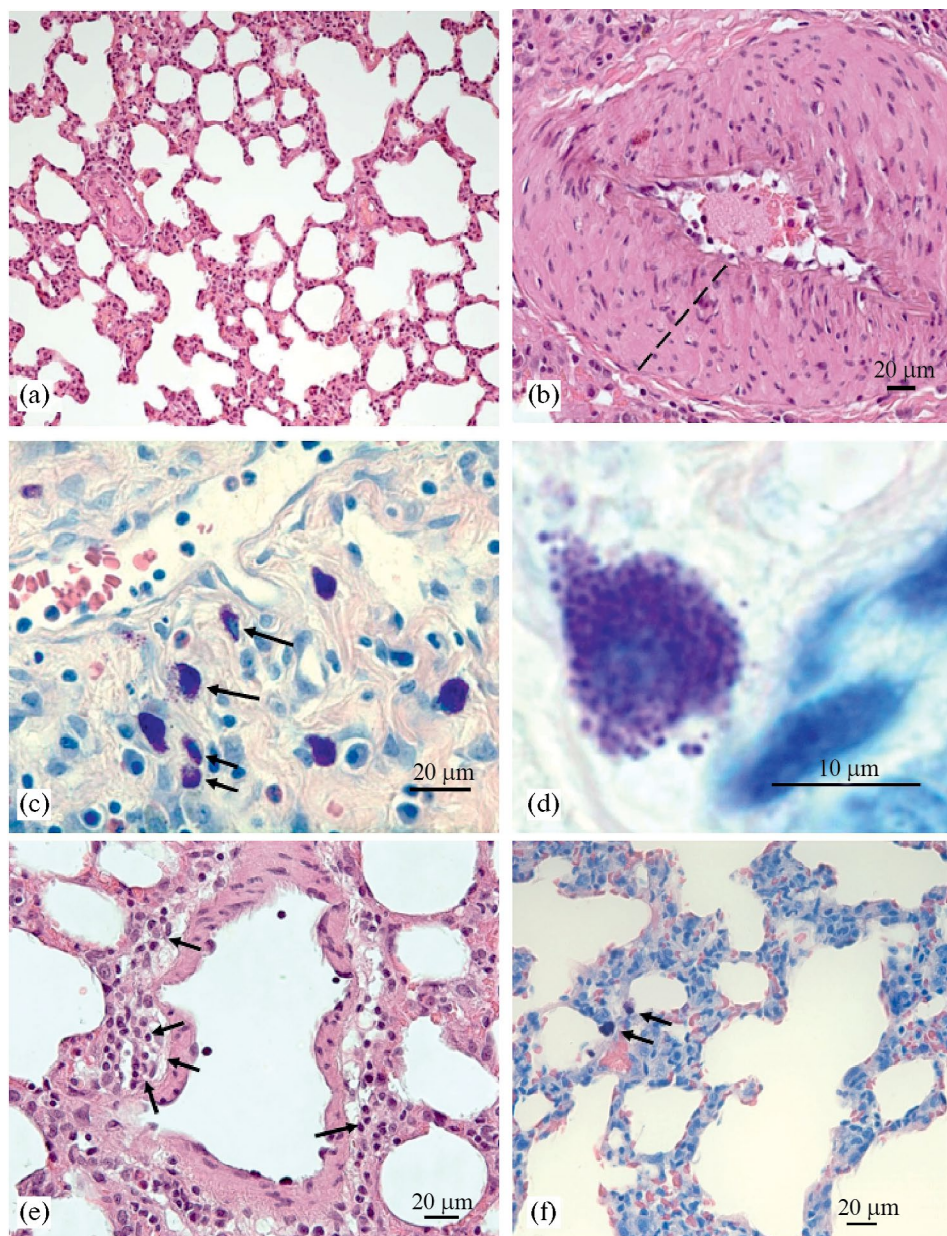


Рис. 3. Морфологические особенности структур легких и тучных клеток крыс линии Вистар при моделировании легочной гипертензии. *Методы окрашивания:* (a), (b), (e) – гематоксин и эозин, (c), (d), (f) – раствор Гимзы. (a) – группа контроля, (b, c, d) – МКТ-Контроль, (e, f) – МКТ-Н₂. (a) – в респираторном отделе легкого удлиненные альвеолярные проходы переходят в тонкостенные альвеолы, признаков воспалительного инфильтрата и отека стромы не наблюдается; (b) – выявляются структурные и функциональные изменения в артериальной стенке и облитерации просвета с гипертрофией меди; (c) – тучные клетки (фиолетовое окрашивание) инфильтрируют строму легочной ткани, активно дегранулируют; (d) – в локусе отмечаются нейтрофилы и плазмощиты; (e) – менее выраженный отек интерстициальных структур и альвеолоцитов легкого, периваскулярно расположено незначительное количество клеток воспалительного инфильтрата; (f) – единичные тучные клетки в поле зрения без признаков дегрануляции. Увеличение (a) – x 200, (b, c, e, f) – x 400, (d) – x 1000.

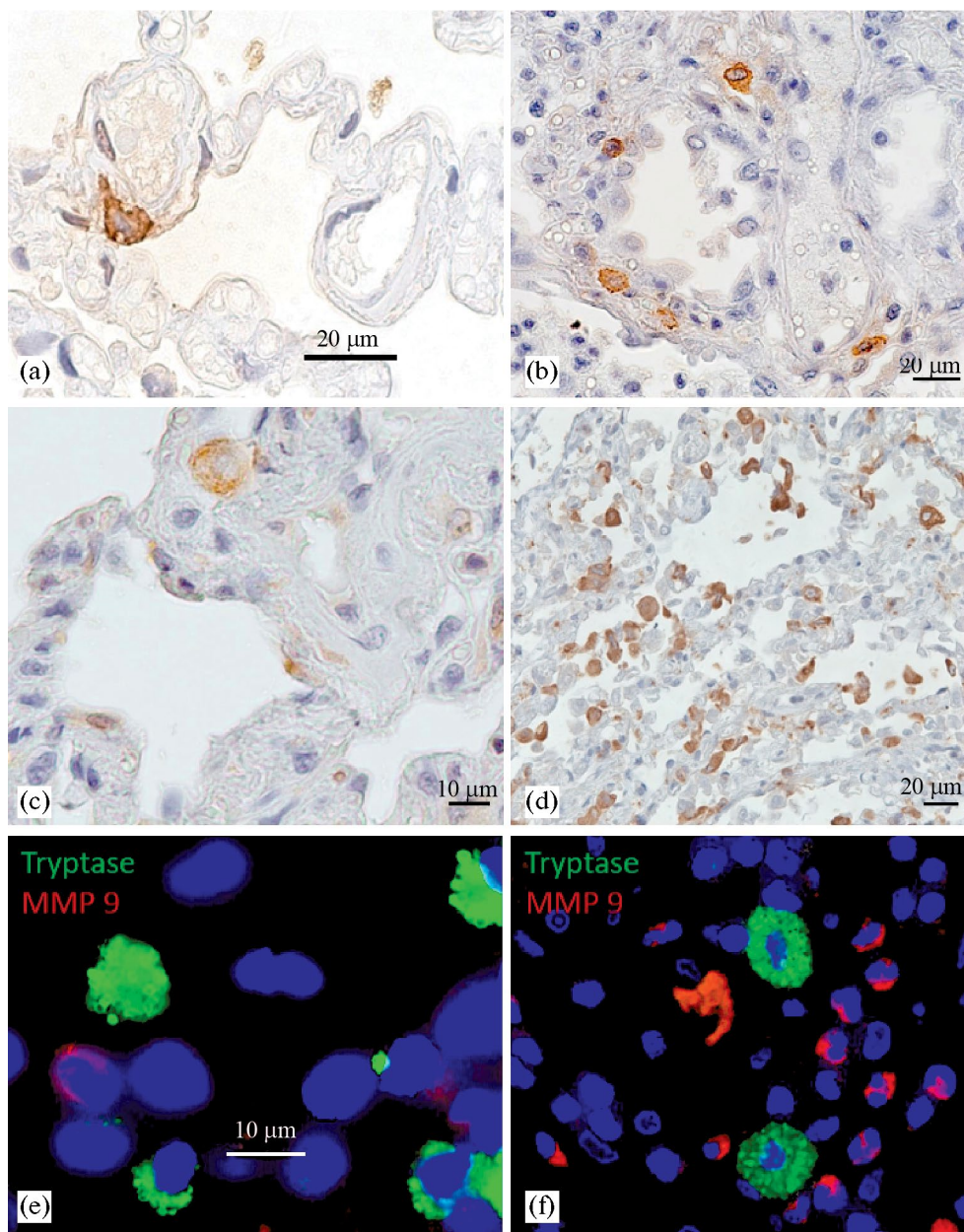


Рис. 4. Гистотопография и характер экспрессии триптазы тучных клеток (а, б), TGF- β (с, д) и ММП-9 (е, ф) в легких при развитии ЛГ (б, д, ф) и при ЛГ с ингаляцией 4% H_2 (а, с, е). Специфическое для иммуногистохимической реакции коричневое окрашивание выявляет скопление триптаза-положительных тучных клеток с признаками дегрануляции в интерстиции легочной ткани (б), в то время как под влиянием ингаляции 4% H_2 снижается экспрессия данной протеазы (а); инфильтрация иммуноположительными клетками с высокой экспрессией TGF- β в группе МКТ-Контроль (д) в сравнении с немногочисленными TGF- β положительными клетками в группе применения молекулярного водорода (с); низкая экспрессия ММП-9 (красный цвет, метка-Су3) на фоне солоколизации с триптаза-положительными тучными клетками (зеленый цвет, метка Alexa Fluor 488) в группе (е) и скопление ММП-9 положительных клеток, преимущественно нейтрофилов (в соответствии с морфологией клеток) в присутствии триптаза-положительных тучных клеток. *Методы окрашивания:* (а, б, с, д) – иммуногистохимическая реакция, (е, ф) – иммунофлуоресцентное окрашивание. Увеличение (а, б, д) – $\times 400$; (с, е, ф) – $\times 1000$.

Таким образом, несмотря на отсутствие влияния H_2 на основные сердечно-сосудистые симптомы развития МКТ, у крыс из группы МКТ- H_2 ингаляция с молекулярным водородом вызывает статистически значимое уменьшение ср. АД, опосредованное уменьшением САД, а также оказывает регуляторное воздействие на функциональный и фенотипический статус ТК, снижает количество TGF- β позитивных клеток и приводит к ингибированию активности MMP-9 – фактора, участвующего в ремоделировании внеклеточного матрикса легких, проявляя антифибротическое и противовоспалительное действие.

Изучение влияния молекулярного водорода на развитие РВГ ИПК

В течение эксперимента в обеих группах с РВГ (РВГ-К и РВГ- H_2) на бодрствующих животных непрямым плетизмографическим методом измеряли САД. На рис. 5а представлена динамика изменения САД за 28 дней опыта.

В “0” точке средняя величина САД составила 122.5 ± 8.5 мм рт. ст. ($n = 16$). Через неделю после проведения операции ИПК у животных измеряли САД, делили их произвольно на две группы (РВГ-К и РВГ- H_2) и начинали эксперимент по ингаляции молекулярным водородом. Измерение САД на 28-й день показало, что оно возросло в обеих группах. Для группы РВГ-К оно составило 151.7 ± 16.5 мм рт. ст. ($n = 5, p < 0.05$), а для группы РВГ- H_2 – 138.6 ± 5.9 мм рт. ст. ($n = 6, p = 0.065$). Таким образом, в обеих группах наблюдалось увеличение ср. АД, однако его степень в группе РВГ- H_2 была меньше, чем в контрольной группе.

Исследования на наркотизированных животных показали статистически значимое уменьшение ($p < 0.01$) ср. АД (рис. 5с) в группе РВГ- H_2 (85.6 ± 5.2 мм рт. ст., $n = 6$) по сравнению с группой РВГ-К (96.5 ± 5.7 мм рт. ст., $n = 5$). Уменьшение ср. АД, так же как и в случае МКТ-ЛГ, было снижено за счет САД (рис. 5d), которое у животных из группы РВГ- H_2 (102.2 ± 9.9 мм рт. ст.) было статистически значимо ($p < 0.05$) меньше по сравнению с группой РВГ-К (116.2 ± 8.7 мм рт. ст.). ДАД (рис. 5е) и ЧСС (рис. 5b) достоверно не изменялись, хотя последний показатель имел тенденцию к уменьшению. Таким образом, и в случае РВГ ИПК гипертонии при добавлении H_2 к атмосферному воздуху наблюдается уменьшение ср. АД за счет САД.

В ходе этого эксперимента проводилось изучение выделительной способности почки. В пробах суточной мочи и крови исследовалось содержание креатинина и мочевины до операции по моделированию РВГ и на 26-й день эксперимента (рис. 6).

Развитие РВГ сопровождалось статистически значимым возрастанием концентрации креатинина (рис. 6а) (на 44% в группе РВГ-К и на 55% в группе РВГ- H_2) и мочевины (рис. 6d) (на 20% в группе РВГ-К и на 78% в группе РВГ- H_2) в пробах крови. Их экскреция с суточной мочой возросла в обеих группах: для креатинина на 91% в группе РВГ-К и на 51% в группе РВГ- H_2 (рис. 6b), для мочевины на 40% в группе РВГ-К и на 58% в группе РВГ- H_2 (рис. 6е). Значимых различий между группами РВГ-К и РВГ- H_2 для этих показателей не выявлено. В качестве показателя скорости клубочковой фильтрации был изучен клиренс эндогенного креатинина (рис. 6с). Наблюдалось некоторое увеличение этого показателя к концу эксперимента, но статистически значимого изменения скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной по креатинину, выявлено не было. Не отличался он и между группами РВГ-К и РВГ- H_2 (0.80 ± 0.29 мл/мин и 1.13 ± 0.17 мл/мин до операции и 1.07 ± 0.16 мл/мин и 1.17 ± 0.62 мл/мин в конце эксперимента соответственно). Таким образом, при данной форме РВГ выделительная способность почки адаптируется к возрастанию катаболизма белков, так как клиренс не меняется. Водород на этот показатель также не влиял.

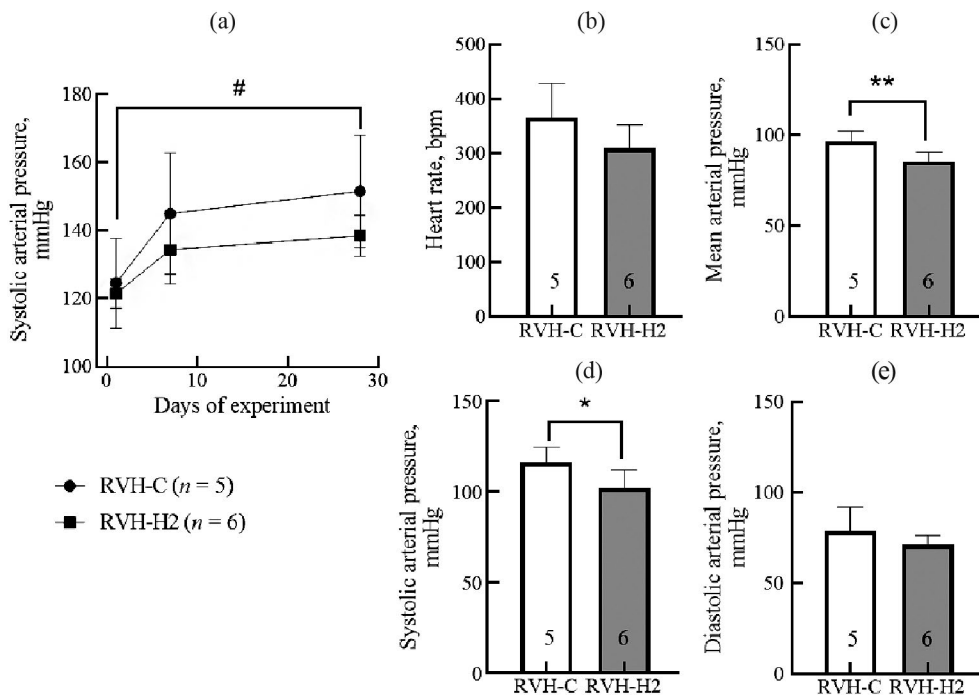


Рис. 5. Параметры гемодинамики бодрствующих (а) и наркотизированных (б – д) крыс линии Wistar с рено-васкулярной почечной гипертензией ИП1К. (а) – динамика САД у бодрствующих крыс, измеренная непрямым плетизмографическим методом. (б – д) гемодинамические показатели у наркотизированных крыс – (б) ЧСС; (с) – ср. АД; (д) – САД; (е) – ДАД. # - статистически значимые различия между 1 и 3 точками ($p < 0.05$) two-way ANOVA. * – статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$) по t -тесту для несвязанных переменных. ** – статистически значимые различия между группами ($p < 0.01$) по t -тесту для несвязанных переменных. Цифры внутри столбиков обозначают количество животных.

Влияние атмосферного воздуха, содержащего 4% молекулярного водорода, на гемодинамические показатели здоровых животных

Для выяснения того, насколько полученный эффект уменьшения ср. АД и САД при МКТ-ЛГ и РВГ ИП1К при дыхании с H_2 связан с развитием патологического процесса, была проведена полностью идентичная серия на здоровых животных. В этой серии экспериментов гипотензивный эффект не был получен, а ср. АД и САД составили в среднем 98 ± 9 и 112 ± 14 мм рт. ст. соответственно ($n = 8$), что не отличалось от показателей контрольной группы ($n = 8$), которая дышала только атмосферным воздухом. Влияния H_2 на ЧСС в этой серии также не наблюдалось, и в среднем величина ЧСС составила 373 ± 74 уд/мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, молекулярный водород обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [1–5, 7]. Именно такой эффект мы получили, изучая маркеры (тучные клетки, триптаза, TGF- β), ассоциированные с МКТ-ЛГ интерстициальной болезнью легких. Было показано их значимое уменьшение в на-

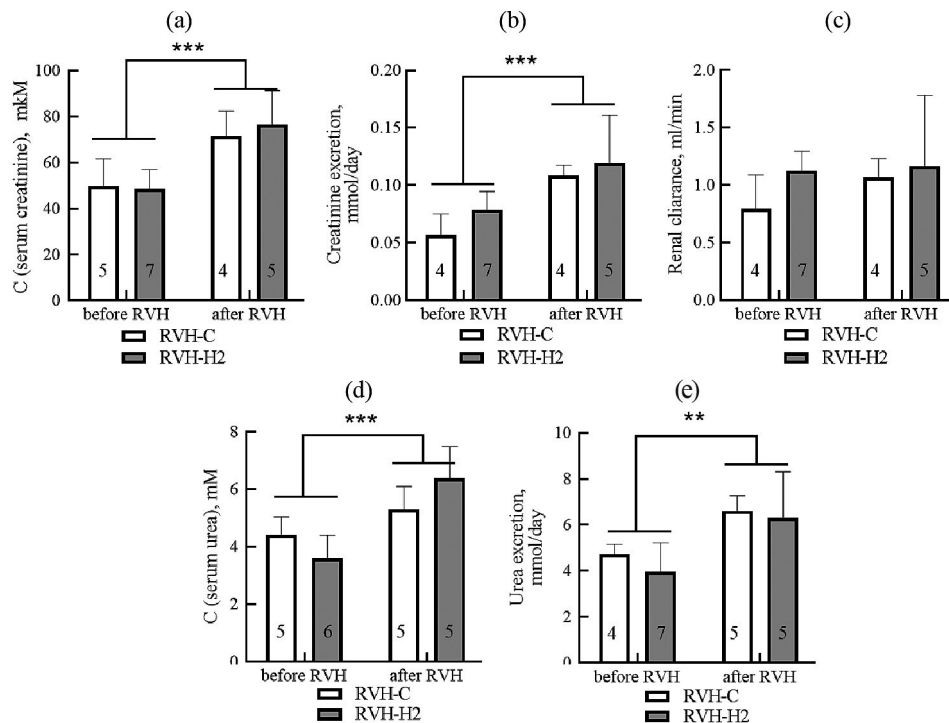


Рис. 6. Оценка выделительной функции почки у крыс линии Wistar с ПВГ. (а) – концентрация креатинина в сыворотке крови; (б) – суточная экскреция креатинина; (с) – клиренс креатинина; (д) – концентрация мочевины в сыворотке крови; (е) – суточная экскреция мочевины. ** – статистически значимые различия между значениями до и после операции ($p < 0.01$) по two-way ANOVA. *** – статистически значимые различия между значениями до и после операции ($p < 0.001$) по two-way ANOVA. Цифры внутри столбиков обозначают количество животных.

стоящей работе и в предыдущих исследованиях [11]. Кроме того, мы выявили снижение экспрессии ММП-9 в легких в группе МКТ-Н₂ по сравнению с группами МКТ-контроль и Контроль. ММП-9 участвует в фиброзе и ремоделировании соединительной ткани легких и легочных кровеносных сосудов [20]. Регуляторную роль на активность ММП-9 могут оказывать многие иммунокомпетентные клетки, в том числе тучные клетки, которые не только регулируют активность ММП-9, но и сами производят данный фермент [12, 21]. Водородная ингаляция уменьшала степень утолщения альвеолярных перегородок и их инфильтрацию воспалительными клетками, что способствовало значительному снижению показателей повреждения легких. Вдыхание водорода значительно улучшило состояние интерстиция легких, снизив воспалительную инфильтрацию, уменьшило отек легких и кровоизлияния, повлияло на активность секреции профиброзных маркеров, тем самым предотвращая воспалительные каскадные структурные изменения дыхательных путей. Воздействие молекулярного водорода на тучные клетки может быть эффективным способом уменьшения воспалительного повреждения и профиброзного состояния тканей легкого в патогенезе легочной гипертензии. Однако несмотря на то, что уменьшение экспрессии ММП-9 предполагает уменьшение ремоделирования не только соединительной ткани легких, но и стенки сосудов, мы не выявили влияния Н₂

на гемодинамические показатели МКТ-ЛГ. Хотя такое взаимодействие можно было бы ожидать, учитывая, что использование терапии, направленной на коррекцию ИЗЛ, приводит к улучшению качества жизни пациентов с ЛГ и уменьшению суммарных расходов на их лечение [22]. По-видимому, для проявления этого взаимодействия необходимо более длительное или более интенсивное действие H_2 .

Несмотря на отсутствие влияния молекулярного водорода на показатели гемодинамики малого круга кровообращения, в нашем исследовании было зарегистрировано значимое снижение ср. АД и САД в большом круге кровообращения в группе МКТ- H_2 . Эффект не наблюдался в группах МКТ-контроль и Контроль. Схожие результаты были получены в исследованиях на людях. В рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании проводилось наблюдение за 60 пациентами с диагностированной артериальной гипертонией в возрасте 50–70 лет. Их подвергали ингаляциям комнатного воздуха или его смеси с водородом (0.2–0.4%) в течение четырех часов в день на протяжении 2 недель. Было отмечено, что систолическое артериальное давление значительно снизилось после водородных ингаляций по сравнению с исходным, чего не наблюдалось в группе плацебо. Эффект сопровождался снижением соотношения альдостерона к ренину и содержания кортизола в крови испытуемых, что позволило авторам высказать предположение о понижении активности симпатической системы при действии молекулярного водорода [14]. В нашем исследовании этот эффект наблюдался при МКТ-ЛГ, которая обычно не сопровождается изменением системного артериального давления, но связана с развитием воспалительного процесса. В последнее время появились исследования, которые показывают, что хроническое воспаление является одним из факторов патогенеза системной гипертонии [23]. Можно предположить, что молекулярный водород, уменьшая воспалительный процесс, снижает и ср. АД. Тот факт, что уменьшение этого показателя происходит за счет его систолической составляющей, позволяет предположить, что этот процесс связан с понижением активности симпатической системы.

Имеются исследования, результаты которых подтверждают такое предположение. В исследовании реноваскулярной гипертонии на крысах, где использовалось хирургическое удаление 5/6 одной почки при удалении второй, ингаляции водородом в течение 1 ч в сутки вызвали уменьшение повышенного АД у этих животных. Спектральный анализ вариабельности АД показал, что H_2 уменьшает дисбаланс вегетативной нервной системы за счет подавления активности симпатической нервной системы [24].

В нашем исследовании мы использовали модель реноваскулярной гипертонии 1П1К. Как уже говорилось выше, механизм повышения АД в этой модели запускается при сужении просвета артерии не менее чем на 70–80% [11]. Считается, что важную роль в увеличении системного артериального давления при этом играет повышение активности симпатической нервной системы [18].

При сравнительном изучении изменения содержания норадреналина в плазме крови животных с разными моделями РВГ (1П1К или 2П1К) было показано его увеличение только в модели 1П1К, что коррелировало с возрастанием ЧСС [25]. В хронической форме эта модель РВГ является ренин-независимой. Используя эту модель, мы показали, что добавление 4% водорода в дыхательную смесь крысам со 2-й недели развития РВГ (группа РВГ- H_2) привело к значимому уменьшению ср. АД и САД по сравнению с группой РВГ-К. Эффект сопровождался тенденцией к уменьшению ЧСС ($p < 0.065$). Молекулярный водород не влиял на повышение уровня креатинина и мочевины в крови крыс обеих групп и выделительную способность почки. Учитывая патогенез данной модели РВГ, уменьшение САД, тенденцию к уменьшению ЧСС и отсутствие влияния на выделительную способность почки можно рассматривать как аргумент в пользу центрального действия молекулярного водорода. Наличие воспалительного процесса при этой форме гипертонии также, вероятно, присутствует, учитывая хирургическое вмешательство.

Возникает вопрос: какое место в этом эффекте занимает противовоспалительное и антиоксидантное действие молекулярного водорода. По-видимому, эти свойства молекулярного водорода реализуются и в этом случае, так как эффект понижения системного АД наблюдается только на животных с гипертензией. На здоровых животных без патологии этот эффект не выявляется, что соответствует литературным данным [13].

Таким образом, мы показали, что добавление 4% молекулярного водорода во вдыхаемый воздух вызывает уменьшение системного АД и САД при гипертензии как малого, так и большого кругов кровообращения. При МКТ-ЛГ уменьшается воспалительный процесс в легких, но сердечно-сосудистые показатели малого круга кровообращения не меняются. В случае РВГ гипертензии уменьшается ср. АД и САД, что не связано с выделительной способностью почки. Предполагается, что эффект уменьшения АД связан с уменьшением активности симпатической системы на фоне уменьшения воспалительного процесса.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента: Н. А. М., О. С. М., В. В. Ш., сбор данных, проведение эксперимента, обработка данных экспериментов: М. М. А., Т. А. К., Д. В. С., Д. А. А., В. В. Ш., написание и редактирование манускрипта: Н. А. М., О. С. М., В. В. Ш., М. М. А., Т. А. К.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета биологического факультета и факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова в рамках научного проекта Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова №№ 121032300071-8 и 118011790188-5, при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 24-25-00051) и Договора о научном сотрудничестве между Воронежским государственным медицинским университетом имени Н. Н. Бурденко и МГУ имени М. В. Ломоносова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, протокол 113-G, 19.06.2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ge L, Yang M, Yang NN, Yin XX, Song WG* (2020) Molecular hydrogen: a preventive and therapeutic medical gas for various diseases. *Oncotarget* 8(60): 102653–102673. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21130>
2. *Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S* (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13(6): 688–694. <https://doi.org/10.1038/nm1577> 2007

3. *Ohta S* (2011) Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic application. *Current Pharmaceutical Design* 17(22): 2241–2252.
<https://doi.org/10.2174/138161211797052664>
4. *Ohta S* (2014) Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol & Therap* 144(1): 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.04.006>
5. *Huang L* (2016) Molecular hydrogen: a therapeutic antioxidant and beyond. *Med Gas Res* 6(4): 219–222.
<https://doi.org/10.4103/2045-9912.196904>
6. *Atiakshin D, Kostin A, Volodkin A, Nazarova A, Shishkina V, Esaulenko D, Buchwalow I, Tiemann M, Noda M* (2023) Mast Cells as a Potential Target of Molecular Hydrogen in Regulating the Local Tissue Microenvironment. *Pharmaceuticals* 16(6): 817.
<https://doi.org/10.3390/ph16060817>
7. *Nicolson G, de Mattos G, Settineri R, Costa C, Ellithrope R, Rosenblatt S, La Valle J, Jimenez A, Ohta Sh* (2016) Clinical effects of hydrogen administration: from animal and human diseases to exercise medicine. *Int J Clin Med* 7(1): 32–76.
<https://doi.org/10.4236/ijcm.2016.71005>
8. *Nie C, Ding X, A R, Zheng M, Li Z, Pan S, Yang W* (2021) Hydrogen gas inhalation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by the inhibition of oxidative stress and NLRP3-mediated pyroptosis in rats. *Life Sci* 1(272): 119248.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119248>
9. *Kimura A, Suehiro K, Mukai A, Fujimoto Y, Funao T, Yamada T, Mori T* (2022) Protective effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 164(6): e269–e283.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2021.04.077>
10. *Nie C, Zou R, Pan S, Gao Y, Yang H, Bai J, Xi S, Wang X, Hong X, Yang W* (2021) Hydrogen gas inhalation ameliorates cardiac remodelling and fibrosis by regulating NLRP3 inflammasome in myocardial infarction rats. *J Cell Mol Med* 25(18): 8997–9010.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16863>
11. *Куропаткина Т, Гуфранов Х, Сычев Ф, Артемьева М, Бондаренко Г, Есауленко Д, Самойленко Т, Шишкина В, Медведева Н, Медведев О* (2024) Влияние ингаляций водорода на сердечно-сосудистые и интерстициальные компоненты легочной гипертензии в экспериментах на крысах. *Пульмонология* 34 (1): 19–30. [*Kuropatkina T, Gufranov Kh, Sychev F, Artemyeva M, Bondarenko G, Esaulenko D, Samoilenko T, Shishkina B, Medvedeva N, Medvedev O* (2024) Vliyaniye Effect of hydrogen inhalation on cardiovascular and interstitial components of pulmonary hypertension in rats. *Pul'monologiya* 34 (1): 19–30. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18093/0869-0189-2024-34-1-19-30>
12. *Шишкина В, Антакова Л, Золотарева С, Атякишин Д* (2022) Матриксные металлопротеиназы в ремоделировании внеклеточного матрикса: молекулярные, клеточные и тканевые аспекты. *Журн анатом гистопатол* 11(3): 93–108. [*Shishkina V, Antakova L, Zolotareva S, Atiakshin D* (2022) Matrix metalloproteinases in extracellular matrix remodeling: molecular, cellular and tissue aspects. *J Anatom Histopathol* 11 (3): 93–108. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-93-108>
13. *Cole AR, Raza A, Ahmed H, Polizzotti BD, Padera RF, Andrews N, Kheir JN* (2019) Safety of inhaled hydrogen gas in healthy mice. *Med Gas Res* 9(3): 133–138.
<https://doi.org/10.4103/2045-9912.266988>
14. *Liu B, Jiang X, Xie Y, Jia X, Zhang J, Xue Y, Qin S* (2022) The effect of a low dose hydrogen-oxygen mixture inhalation in midlife/older adults with hypertension: A randomized, placebo-controlled trial. *Front Pharmacol* 7(13): 1025487.
<https://doi.org/10.3389/fphar>
15. *Poch D, Mandel J* (2021) Pulmonary Hypertension. *Ann Intern Med* 174(4): ITC49–ITC64.
<https://doi.org/10.7326/AITC202104200>
16. *Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T* (2015) Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmon Pharmacol Therap* 35: 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.09.007>
17. *Textor SC, Lerman L* (2010) Renovascular hypertension and ischemic nephropathy. *Am J Hypertens* 23(11): 1159–1169.
<https://doi.org/10.1038/ajh.2010.174>
18. *Souza HCD, Martins-Pinge MC, Dias da Silva VJ, Borghi-Silva A, Gastaldi AC, Blanco JHD, Tezini GCSV* (2008) Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *Auton Neurosci* 139: 38–45
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2008.01.001>

19. Biasin V, Marsh LM, Egemnazarov B, Wilhelm J, Ghanim B, Klepetko W, Wygrecka M, Olschewski H, Eferl R, Olschewski A, Kwapiszewska G (2014) Meprin β , a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. *J Pathol* 233(1): 7–17.
<https://doi.org/10.1002/path.4303>
20. Zhang H, Huang W, Liu H, Zheng Y, Liao L (2020) Mechanical stretching of pulmonary vein stimulates matrix metalloproteinase-9 and transforming growth factor- β 1 through stretch-activated channel/MAPK pathways in pulmonary hypertension due to left heart disease model rats. *PLoS One* 15(9): e0235824.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235824>
21. Xu L, Cai Z, Yang F, Chen M (2017) Activation-induced upregulation of MMP9 in mast cells is a positive feedback mediator for mast cell activation. *Mol Med Rep* 15(4): 1759–1764.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6215>
22. Waxman AB, Elia D, Adir Y, Humbert M, Harari S (2022) Recent advances in the management of pulmonary hypertension with interstitial lung disease. *Eur Respir Rev* 31: 210–220.
<https://doi.org/10.1183/16000617.0220-2021>
23. Zhang Z, Zhaj L, Zhou X, Meng X, Zhou X (2023) Role of inflammation, immunity and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Front Immunol* 13: 1098725.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1098725>
24. Sugai K, Tamura T, Sano M, Uemura S, Fujisawa M, Katsumata Y, Endo J, Yoshizawa J, Homma K, Suzuki M, Kobayashi E, Sasaki J, Hakamata Y (2020) Daily inhalation of hydrogen gas has a blood pressure-lowering effect in a rat model of hypertension. *Sci Rep* 10(1): 20173.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77349-8>
25. Walker SM, Bing RF, Swales JD, Thurston H (1986) Plasma noradrenaline in Goldblatt models of renovascular hypertension in the rat, before and after surgical reversal. *Clin Sci (Lond)* 71(2): 199–204.
<https://doi.org/10.1042/cs0710199>

Molecular Hydrogen Reduces Mean and Systolic Blood Pressure in Various Forms of Hypertension, as Well as Inflammatory Processes in Lung Tissue, in Wistar Rats
M. M. Artemieva^{a,*}, T. A. Kuropatkina^{b,c}, V. V. Shishkina^d, D. V. Serebryanaya^{a,c},

D. A. Adasheva^a, O. S. Medvedev^{a,f}, and N. A. Medvedeva^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, Russia*

^c*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*

^d*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia*

^e*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^f*National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russia*

[#] *e-mail: marinka.artemieva@gmail.com*

Molecular hydrogen demonstrates antioxidant and anti-inflammatory properties. It has been shown to have a protective effect in several cardiovascular diseases. The aim of this work was to study the effect of breathing atmospheric air containing 4% hydrogen on the degree of development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and associated lung tissue inflammation, as well as the severity of renovascular hypertension in Wistar rats. Methods. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension (MCT-PH) was used as a model of small circle hypertension. Three groups of animals were used in the experiment: "Control" – animals injected with monocrotaline solvent, "MCT-Control" and "MCT-H₂" – groups injected with MCT once. The "Control" and "MCT-Control" groups breathed atmospheric air for 21 days, and the "MCT-H₂" group breathed air containing 4% hydrogen. Inhalations were kept constant until 21 days. On day 21, haemodynamic parameters were measured under urethane anesthesia and lung samples were fixed for subsequent morphological analysis. Renovascular hypertension 1R1C (RVH) was used as a model of systemic hypertension. There were two groups in the experiment: RVH-C – rats breathed atmospheric air and RVH-H₂ rats breathed air containing 4% hydrogen. During the experiment, systolic blood pressure (SBP) was measured and renal excretory function was assessed. On day 28, haemodynamic parameters were measured under urethane anesthesia. Results. In the MCT model, hydrogen had no effect on the haemodynamic symptoms of MCT hypertension, but decreased mean blood pressure (MBP), SBP and the measured markers of connective tissue remodeling in the lungs, TGF- β and MMP-9, and resulted in decreased tryptase secretion and mast cell counts. In the RVG model, hydrogen breathing decreased MBP, SBP and had no effect on renal excretory function. Conclusion. Inhalation of 4% hydrogen reduces systemic MBP and SBP in both models of arterial hypertension, reduces the severity of the inflammatory process, regulates the phenotypic and functional status of mast cells and inhibits the activity of profibrotic factors in lung tissue in MCT-PH. It is likely that the central action of hydrogen is combined with its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects.

Keywords: molecular hydrogen, inhalation, monocrotaline pulmonary hypertension, renovascular hypertension, mean blood pressure, systolic blood pressure, mast cells rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СВЯЗАННАЯ С ДВИЖЕНИЕМ ДЕСИНХРОНИЗАЦИЯ
СЕНСОМОТОРНЫХ РИТМОВ ЭЭГ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМИПАРЕЗОМ
В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНСУЛЬТА**

© 2024 г. А. С. Медведева¹, Н. В. Сыров^{1,4,*}, Л. В. Яковлев^{1,4}, Я. А. Алиева^{2,3},
Д. А. Петрова¹, Г. Е. Иванова^{2,3}, М. А. Лебедев^{4,5}, А. Я. Каплан^{1,4}

¹Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана Сколковского
института науки и технологий, Москва, Россия

²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова
Минздрава России, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт Петербург, Россия

*E-mail: kolascoco@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2024 г.

После доработки 17.09.2024 г.

Принята к публикации 22.09.2024 г.

Нарушение двигательной функции является одним из наиболее распространенных последствий инсульта и требует разработки эффективных методов диагностики и реабилитации. Оценка активности сенсомоторных отделов коры головного мозга во время подготовки и выполнения движений предоставляет важную информацию о состоянии двигательных областей после инсульта и потенциале восстановления. Целью настоящего исследования была оценка пространственно-временных характеристик связанной с событием десинхронизации (event-related desynchronization, ERD) сенсомоторных ритмов ЭЭГ у пациентов с гемипарезом после инсульта при движениях паретичной и здоровой руками. В исследовании приняли участие 19 пациентов с гемипарезом после инсульта. Регистрация ЭЭГ проводилась во время выполнения зрительно-моторной задачи. Анализировались реакции ERD в альфа- (6–15 Гц) и бета- (15–30 Гц) диапазонах. Была обнаружена асимметрия ERD с преобладанием реакции в интактном полушарии, независимо от того, какой рукой выполнялось движение. Величина альфа-/бета-ERD в пораженном полушарии коррелировала с оценкой по шкале Fugl-Meyer. Также была показана значимая корреляция между величиной бета-ERD в пораженном полушарии при движениях здоровой конечностью и степенью восстановления двигательной функции пораженной руки. Результаты демонстрируют информативность оценки паттернов ERD для диагностики состояния сенсомоторных сетей после инсульта и расширяют возможности использования ЭЭГ для оценки состояния пациентов даже с полным отсутствием движений в паретичной конечности.

Ключевые слова: ЭЭГ, инсульт, связанная с событием десинхронизация, гемипарез, реабилитация

DOI: 10.31857/S0869813924100084, **EDN:** VRFIIM

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение двигательной функции представляет собой одно из наиболее распространенных последствий инсульта. В основе восстановления нарушений после инсульта лежит свойство нейрональной пластичности, обеспечивающее появление новых нейронных связей и их реорганизацию во время реабилитационной терапии [1]. После инсульта зона поражения и характер ее связей с остальными областями мозга динамически меняется, что особенно выражается в изменении баланса тормозных и возбуждающих влияний между полушариями, а также включении регионов, соседствующих с зоной поражения, в процесс восстановления утраченных двигательных функций [2]. Таким образом, различные неповрежденные области мозга могут взять на себя функции поврежденных [3]. Эффективная и своевременная терапия способна реализовать потенциал пластичности нейронных сетей мозга и способствовать успешному восстановлению утраченных двигательных навыков. Однако при наличии огромного спектра реабилитационных техник и методов воздействия как на центральное, так и периферическое звено моторного контроля в индивидуальных случаях не все подходы могут оказаться эффективными. Решение о выборе конкретной стратегии реабилитации принимается на основе МРТ картины поражения и результатов тестов и шкал оценки состояния пациента. Однако эта информация не может предоставить полную картину о характере нарушения мозговых контуров двигательного контроля, так как не включает в себя результаты функциональной оценки состояния сенсомоторных нейронных сетей. В то же время эту информацию необходимо принимать во внимание при планировании программы реабилитации (например, при выборе протокола ритмической транскраниальной магнитной стимуляции и определении зоны воздействия нужно иметь представление о наличии остаточных нисходящих кортикоспинальных проекций из пораженного полушария). В связи с этим на передний план постинсультной диагностики выходит необходимость понимания характера изменений активности сенсомоторных отделов коры головного мозга во время подготовки и выполнения движения. Актуальным оказывается поиск функциональных маркеров нарушения и компенсаторной реорганизации двигательных областей после инсульта, которые имели бы практическую применимость в диагностике и динамической оценке эффекта реабилитационных процедур.

Удобным и достаточно эффективным методом для оценки состояния сенсомоторных систем мозга у пациентов после инсульта является метод электроэнцефалографии (ЭЭГ). Он прост в имплементации и может быть использован для отслеживания динамики изменений в сетях коры мозга в ходе двигательного восстановления. Однако для его применения необходимо определить чувствительные и специфичные ЭЭГ-маркеры, описывающие состояние сенсомоторных кортикальных сетей. В ряде работ были описаны закономерности изменения ритмов ЭЭГ у пациентов после инсульта. Так, Brito с соавт. [4] и Finnigan с соавт. [5] наблюдали увеличение мощности медленной ритмической активности мозга в частотных диапазонах дельта- (1–4 Гц) и тета- (4–8 Гц) ритмов в отведениях над пораженным полушарием у пациентов с кортикальным инсультом. При этом изменения сопровождались снижением мощности осцилляций в альфа- (8–14 Гц) и бета- (15–30 Гц) диапазонах. В период реабилитации при этом в ЭЭГ наблюдался сдвиг в сторону нормального спектрального распределения [5].

Особое внимание в исследованиях нарушения двигательных навыков после инсульта уделяется феномену связанной с движением депрессии ритмической активности ЭЭГ в альфа- и бета-диапазонах (в контексте сенсомоторных областей альфа-ритм принято называть также мю-ритмом). Эта реакция, называемая также связанной с событием десинхронизацией (event-related desynchronization, ERD), и в норме она развивается в ЭЭГ-отведениях противоположного к активной конечности полушария [6, 7]. Однако у пациентов с гемипарезом в результате инсульта кортикальной и подкорковой локализации во время выполнения/попыток выполнения движений пораженной конеч-

ностью десинхронизация развивается в интактном полушарии аналогично движению здоровой конечностью [8–10]. В то же время считается, что наилучшее восстановление двигательной функции достигается не за счет компенсаторного включения интактного полушария в контроль движений паретичной конечности, но за счет реактивации сенсомоторных зон пораженного полушария. И здесь информативным показателем может быть восстановление контралатерального паттерна ERD при выполнении/попытках движений пораженной конечности [8]. Таким образом, изменения десинхронизации ритмической ЭЭГ-активности у пациентов после инсульта может быть информативным маркером функционального состояния сенсомоторных отделов коры. Эта метрика уже широко используется в нейрореабилитации для контроля нейротренажеров на базе технологии интерфейсов мозг-компьютер [10–12], однако до сих пор не вошла в практику диагностики и оценки двигательного восстановления у пациентов после инсульта [13].

В настоящем исследовании была поставлена задача оценить пространственно-временные характеристики связанной с событием десинхронизации сенсомоторной ритмической активности мозга в альфа- и бета-диапазонах у пациентов, перенесших инсульт, во время движений паретичной и здоровой руками. Была поставлена цель установить взаимосвязь величины ERD в разных полушариях с оценкой сохранности у пациентов сенсомоторных навыков. В отличие от большинства ЭЭГ-исследований с подобным дизайном, которые в основном уделяют внимание анализу ERD при движениях пораженной конечности, в настоящей работе проводилась подробная оценка характеристик альфа/бета-десинхронизации также при движениях здоровой рукой и ее взаимосвязь со степенью сохранности сенсомоторных навыков пораженной конечности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники исследования

В исследовании приняли участие 19 пациентов (34–80 лет, средний возраст 62.0 года; 5 женщин, 14 мужчин, все правши) на ранней и поздней стадии восстановления после ишемического (18) и геморрагического (1) инсульта односторонней кортикальной локализации, подтвержденного КТ или МРТ головного мозга. Поражение привело к парезу правой (11 в результате нарушения кровотока в области левой мозговой артерии) и левой руки (7 в результате нарушения кровотока в области правой мозговой артерии; 1 в результате геморрагического инсульта в правом полушарии). При анализе данных пациенты были разделены на две группы: с право- и левополушарными нарушениями.

В качестве контрольной группы были отобраны 18 здоровых добровольцев (32–63 лет, средний возраст 55.8 лет; 10 женщин, 8 мужчин, все правши). Все добровольцы контрольной группы сообщили об отсутствии у них истории неврологических и психических расстройств на момент исследования.

Перед началом исследования участники из группы пациентов проходили оценку двигательной функции верхних конечностей при помощи стандартных клинических шкал Fugl-Meyer [14] и по шкале ARAT [15] для оценки двигательной недостаточности. На момент начала исследования баллы по шкале Fugl-Meyer у участников находились в диапазоне 48–116 со средним значением 81.1. По шкале ARAT: 0–50, среднее значение – 12.1. По шкале Рэнкина (Rankin scale) [16] всем пациентам была установлена оценка в 3 балла, то есть все они имели умеренное нарушение жизнедеятельности.

Процедура исследования

Экспериментальная задача представляла собой моторный тест на скорость реакции. Участники сидели за столом, при этом их руки помещались в специальный бокс ладонями вниз. Над руками участника находились две кнопки, им соответствовали две лампочки на внешней стороне бокса над каждой из кнопок. Одна экспериментальная

сессия состояла из нескольких блоков, в которых участники выполняли зрительно-моторное задание на скорость реакции: в ответ на визуальный сигнал (вспышка одной лампочки) участникам нужно было нажать соответствующую кнопку тыльной стороны пальцев кисти, выполнив разгибание запястья. При этом до начала каждого блока участнику сообщалось, какая из лампочек является целевой, то есть, на вспышки какой лампочки нужно реагировать движением. Например, если целевой была лампочка, расположенная над правой рукой, то участник должен был совершать нажатие правой рукой, а вспышки левой лампочки (нецелевой) должны были игнорироваться, соответственно, левая рука в рамках этого блока должна была оставаться в покое. Таким образом, в разных блоках участники выполняли движения либо здоровой, либо паретичной конечностью. Если у участника группы пациентов парез конечности был настолько сильным, что участник не мог выполнить полное нажатие кнопки, ему предлагалось сделать максимально возможное движение, например, напрячь мышцы-разгибатели пальцев, разогнуть большой палец или же совершить попытку к движению.

Каждый блок включал в себя предъявление 30 вспышек, по 15 на каждую лампочку. Лампочки подсвечивались в псевдо-случайной последовательности, длительность подсветки составляла 200 мс, интервал между подсветками варьировал от 1 до 2.5 с. Межстимульный интервал регулировался для подбора комфортного для каждого участника темпа. Одна экспериментальная сессия включала в себя выполнение 8 блоков, по 4 на каждую руку.

В рамках всего исследования пациенты проходили курс реабилитации со стационарным размещением в ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий». Каждый из них участвовал минимум в двух экспериментальных сессиях, проводимых в разные дни. Испытуемые контрольной группы участвовали каждый в одной экспериментальной сессии, в рамках которой выполняли те же задания, что и пациенты.

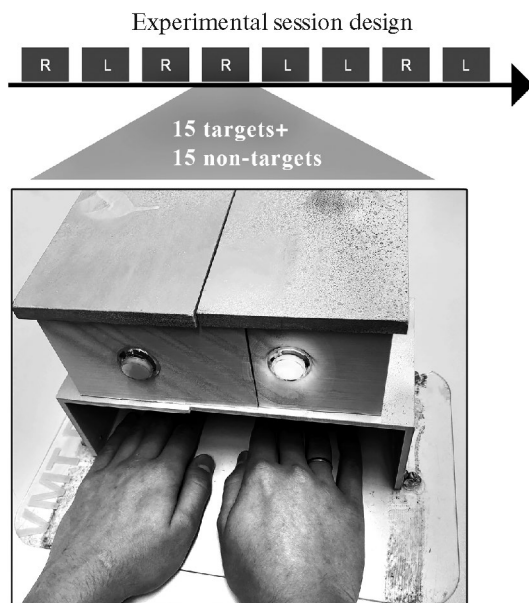


Рис. 1. Схема экспериментальной сессии. Прямоугольниками показаны отдельные блоки. “R” – блоки с движениями правой рукой, “L” – блоки с движениями левой рукой. Каждый блок включал в себя предъявление 30 зрительных стимулов, по 15 на каждую кнопку. Испытуемый совершал нажатия только целевой кнопки в ответ на вспышку соответствующей ей лампочки. Показан внешний вид бокса с кнопками и лампочками.

Регистрация и обработка сигнала

Регистрация ЭЭГ сигнала осуществлялась с использованием электроэнцефалографа NVX-36 (МКС, Зеленоград, Россия) и 17 точечных пассивных Ag+/AgCl электродов (MCSCAP-E) в позициях на скальпе, соответствующих международной системе "10/20": 'F3', 'Fz', 'F4', 'F8', 'T3', 'C3', 'Cz', 'C4', 'T4', 'T5', 'P3', 'Pz', 'P4', 'T6', отведения 'T9' и 'T10' использовались в качестве референтных электродов. Стандартная система размещения электродов "10/20" была максимально упрощена для удобства проведения эксперимента в клинических условиях, поэтому из нее были исключены отведения 'O1' и 'O2', удаленные от зоны интереса.

Контактное сопротивление для всех электродов не превышало 20 кОм. Частота дискретизации составляла 500 Гц. Кроме того, проводилась регистрация активности мышц разгибателей пальцев кисти (*m. extensor digitorum communis*) для обеих рук. Регистрация электромиографического (ЭМГ) сигнала осуществлялась в биполярном отведении при помощи двух поверхностных электродов, установленных на брюшко мышцы и сухожилие в области запястья. Запись ЭМГ производилась при помощи того же усилителя.

Предварительная обработка ЭЭГ сигналов включала применение к сигналу режекторного (notch) фильтра 50 Гц для подавления помехи электросети, полосного фильтра в диапазоне 1–30 Гц. Далее к сигналу применялся метод разложения на независимые компоненты (использовался алгоритм *fastICA*). Компоненты, связанные с окулографической активностью и активностью мышц лица и скальпа удалялись из сигнала. Независимые компоненты, подлежащие удалению, определялись на основании оценки их топографического распределения и спектральных характеристик. Так, для компонента, содержащего глазодвигательные артефакты, была свойственна строго фронтальная локализация и низкая частота колебаний, в то время как ЭМГ артефакт выделялся в компонент с височной локализацией и повышенной спектральной мощностью в диапазоне более 20 Гц при сниженной мощности при более низких частотах.

После предварительной обработки ЭЭГ сигнал был сегментирован на эпохи 0.2–2 с относительно момента предъявления зрительного стимула. Для коррекции базовой линии использовался интервал 0.2–1 с относительно момента предъявления стимула. Таким образом, анализ десинхронизации проводился в эпохах, синхронизированных с моментом предъявления стимула, а не началом движения. Это было связано с тем, что у части пациентов миографические ответы не регистрировались стабильно, а у некоторых они отсутствовали вовсе, что затруднило бы единообразное сравнение групп пациентов между собой и с контрольной группой. Более того, для тех, у кого мышечная сила была достаточной для нажатия кнопки и четко детектировались ЭМГ-ответы (6 пациентов с правосторонним и 4 с левосторонним поражением), была рассчитана скорость реакции для пораженной конечности, которая сравнивалась со скоростью реакции здоровой конечности. Также эти показатели сравнивались с данными участников контрольной группы. Распределения скорости реакций значимо не различались ни между здоровой и пораженной конечностью, ни между пациентами и контрольной группой. Диаграммы распределения скорости реакций представлены в Приложении 1.

Расчет (де-)синхронизации

К эпохам сигнала применялось вейвлет-преобразование. Использовался сет комплексных вейвлетов Морле с переменным числом циклов для разных частот в диапазоне 1–30 Гц с шагом 1 Гц. В результате для каждой эпохи в каждом ЭЭГ отведении была получена *timefrequency* матрица вейвлет-коэффициентов.

Для расчета связанной с движением десинхронизации *timefrequency* матрицы целевых эпох (где было совершено движение) нормализовались через операцию деления на вектор коэффициентов для каждой частоты, рассчитанный по *timefrequency* матрицам для нецелевых эпох путем взятия медианы по всем эпохам и отрезку вре-

мени 0.2–1 с. После нормализации проводилась конверсия значений в децибелы. Положительные значения интерпретировались как связанная с событием синхронизация (event-related synchronization, ERS), а отрицательные – как десинхронизация (ERD) относительно состояния покоя в нецелевых попытках.

Далее нормализованные *timefrequency* матрицы целевых эпох использовались для оценки динамики ERD/S и топографического распределения очагов, связанных с движением реакций. Реакции ERD/S оценивались в двух диапазонах частот – альфа (6–15 Гц) и бета (15–30 Гц). Для анализа временной эволюции значения нормализованной матрицы усреднялись внутри каждого поддиапазона частот с получением кривой динамики ERD/S. Для оценки топографического распределения проводилось дополнительное усреднение значений ERD/S в отрезке 0.3–0.6 с. Эти же значения в отведениях C3 и C4 использовались для статистического анализа. Эти отведения соответствуют правому (C4) и левому (C3) полушариям и располагаются над центральным/постцентральным регионами, что позволяет трактовать сигнал в этих отведениях как отражающий активность сенсомоторных отделов коры [18]. Анализ ЭЭГ активности проводился при помощи авторских скриптов, написанных на языке Python, с использованием методов из библиотеки *mne MNE-Python v1.3.1* [17].

Статистический анализ

В рамках статистического анализа связанной с движением реакций ERD/S использовался трехфакторный дисперсионный анализ ANOVA с двухуровневыми внутрииндивидуальными факторами: ДВИЖЕНИЕ (движение правой/левой рукой), ПОЛУШАРИЕ (данные отведения C3/C4) и межиндивидуальными: СТОРОНА ИНСУЛЬТА (правополушарный/левополушарный). Парный двусторонний тест Стьюдента был использован для проведения *post-hoc* анализа, полученные значения *p* были скорректированы поправкой Холма – Бонферрони. Для оценки связей между величиной альфа и бета-ERD в пораженном и интактном полушариях со значениями шкалы Fugl-Meyer как метрики оценки сохранности и успешности восстановления сенсомоторных функций пациентов использовались смешанные линейные модели (Linear mixed models, LMMs). Этот анализ был выполнен отдельно для каждого частотного диапазона в каждом условии (движения здоровой и паретичной рукой). Значения ERD в интактном и пораженном полушарии в отведениях C3 и C4 были взяты как фиксированный эффект, значения шкалы Fugl-Meyer – как зависимый, а группа инсульта (правополушарный/левополушарный) – как случайный эффект. Коэффициенты LMM были подобраны с использованием метода ограниченного максимального правдоподобия (restricted maximum likelihood, REML). Использование LMM позволило оценить корреляцию баллов Fugl-Meyer с ERD одновременно в двух группах пациентов, учитывая вариативность в каждой из них. Для реализации анализа были использованы методы из библиотеки *python statsmodels (v.0.15)* [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты группы здоровых добровольцев

Контрольная группа продемонстрировала реакцию десинхронизации в альфа- и бета-диапазонах, вызванную движением, с типичным контралатеральным распределением по отношению к активной конечности. Данный результат полностью соответствует широко известному представлению о закономерностях реактивности сенсомоторных ритмов ЭЭГ при движении, описанному в литературе [20, 21]. Графики частотно-временного распределения ERD/S при движении правой и левой рукой, а также пространственное распределение максимума альфа-/бета-десинхронизации представлены в Приложении 2.

Результаты группы пациентов

Для группы пациентов после инсульта было обнаружено, что после зрительной вспышки в период выполнения или попытки выполнить движение в ЭЭГ развивалось стойкое снижение амплитуды ЭЭГ-осцилляторной активности в альфа- и бета-диапазонах. На рис. 2 представлены графики усредненной по группам пациентов временной динамики ERD. Рис. 2а иллюстрирует частотно-временные диаграммы ERD для пациентов в условиях движения правой и левой руками. Видно, что в обеих группах пациентов реакция десинхронизации развивается в альфа- и бета-диапазонах. На рис. 2б показана динамика ERD отдельно в данных диапазонах. Примечательно, что в ЭЭГ-отведениях над областью поражения ERD была слабее, чем в отведениях над интактным полушарием, и этот результат наиболее выражен в условиях с движениями паретичной конечностью (на рисунке эти графики выделены рамкой). Также было отмечено, что ERD над пораженным полушарием была сильнее при движении здоровой конечностью.

Для пациентов с инсультом в правом полушарии было обнаружено, что после реакции десинхронизации в бета-диапазоне развивается так называемый “отскок” – повышение мощности или синхронизация. Этот феномен был наиболее выражен в временном отрезке 1–1.5 с, и этот интервал использовался для оценки топографического распределения реакции бета-ERS и статистического анализа.

Наблюдаемые на графиках временной динамики ERD особенности пространственного распределения изучаемой реакции были обнаружены при анализе топографических карт скальпового распределения пиковой десинхронизации. На рис. 3 видно, что вне зависимости от латерализации движения наибольшая десинхронизация как в альфа-, так и в бета-диапазонах регистрируется в отведениях над здоровым полушарием. Причем при движении пораженной конечностью ERD имеет более латерализованный топографический паттерн, это согласуется с наблюдением, что альфа/бета-ERD в отведениях пораженного полушария сильнее при движении здоровой рукой.

Анализ топографического распределения реакции синхронизации в бета-диапазоне показал, что эта реакция выражена в большей степени при движении здоровой конечностью и локализована контралатерально. Статистический анализ выявил значимый эффект взаимодействия факторов ПОЛУШАРИЕ и СТОРОНА ИНСУЛЬТА на амплитуду ERD в альфа- и бета-диапазонах частот (табл. 1). Это указывает на то, что эффект фактора ПОЛУШАРИЕ на величину десинхронизации (то есть, различается ли распределение ERD в отведениях над правым и левым полушарием при движении) зависит от того, в каком полушарии локализован очаг поражения. При этом эффекты этих факторов на величину ERD оказались незначимы, как и эффект фактора ДВИЖЕНИЕ.

Для реакции бета-синхронизации было обнаружено значимое влияние фактора СТОРОНА ИНСУЛЬТА. Это указывает на то, что величина бета-ERS различалась у пациентов с право- и левосторонним инсультом (это также заметно на рис. 2, из которого видно, что реакция синхронизации в бета-диапазоне наиболее выражена при движениях здоровой конечностью у пациентов с поражением правого полушария).

Попарные сравнения показали, что при левостороннем инсульте величина десинхронизации была значительно снижена в пораженном полушарии (в отведении C3) по сравнению с ERD в здоровом полушарии (в отведении C4). Этот эффект наблюдался как для альфа-ERD ($T = 2.54, p = 0.020$), так и для бета-ERD ($T = 3.76, p = 0.001$). Этот эффект можно проследить на рис. 4, где представлены групповые тенденции величин ERD/S у пациентов в разных условиях. Для бета-синхронизации t -тест подтвердил статистически более высокие значения бета-ERS после движения у пациентов с инсультом левого полушария ($T = -3.44, p = 0.001$).

Также был проведен анализ мощности альфа- и бета-колебаний ЭЭГ у участников в каналах C3 и C4 в нецелевых попытках, когда движения не совершались. Целью такого анализа была оценка референтной мощности, на величину которой проводилась нормализация при расчете ERD/S. Асимметрия выраженности осцилляторной актив-

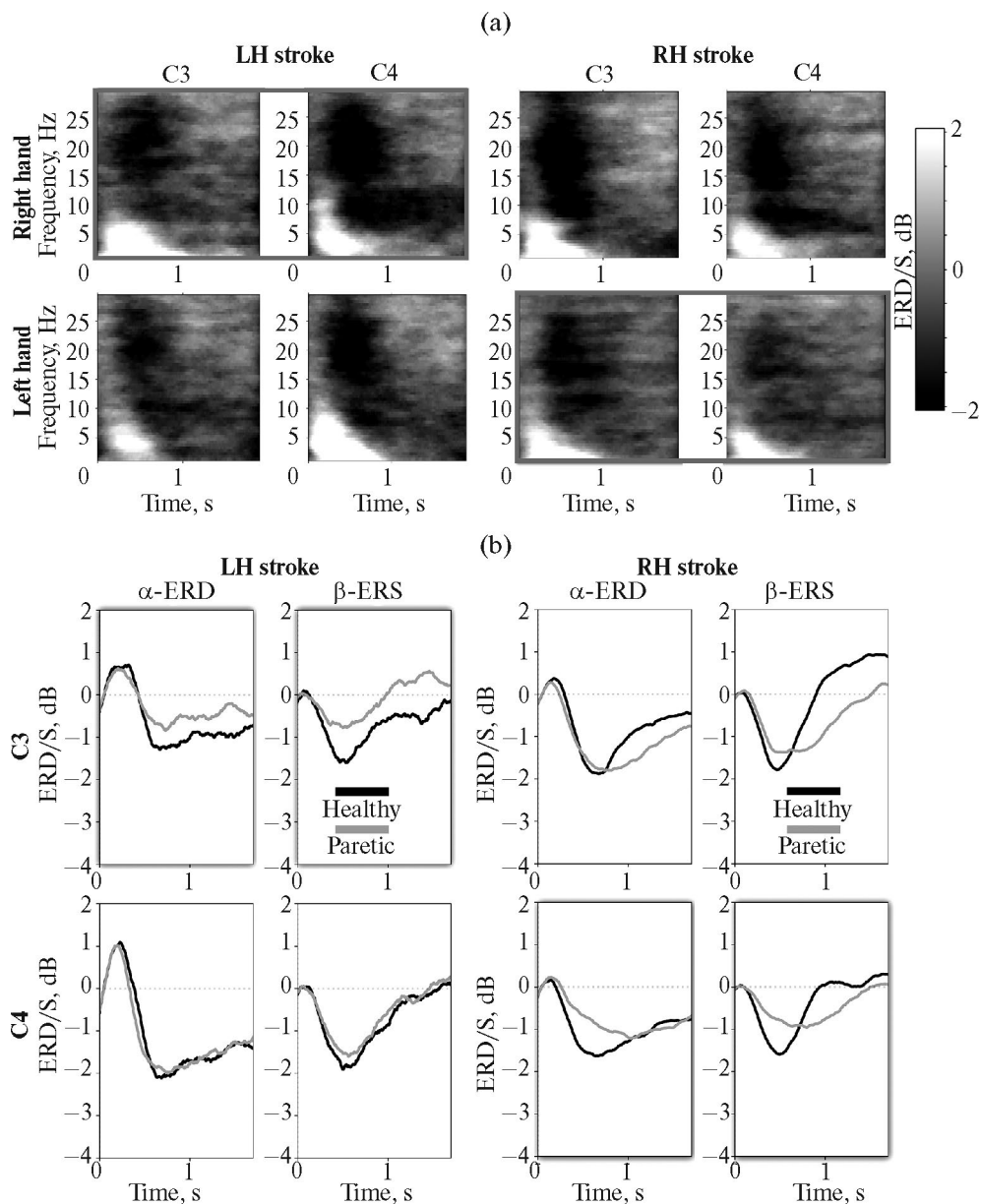


Рис. 2. Динамика ERD/S у двух групп пациентов (LH stroke – группа пациентов с левополушарным инсультом; RH stroke – правополушарным). (a) – динамика ERD/S в отведениях C3 и C4 при движении правой и левой рукой. Динамика представлена в координатах частоты – времени. Диаграммы для условий движения пораженной конечностью выделены темной рамкой. (b) – усредненные значения ERD/S в альфа- и бета-диапазонах приведены отдельно для блоков с движениями здоровой и пораженной конечностью. Рамкой выделены графики для ERD в отведениях над пораженным полушарием (C3 для группы LH и C4 для RH).

Таблица 1. Результаты проведенных серий дисперсионного анализа

альфа-ERD			
Фактор	F	p-unc	np2
ПОЛУШАРИЕ	1.44	0.21	0.02
ДВИЖЕНИЕ	0.01	0.25	0.00
СТОРОНА ИНСУЛЬТА	1.91	0.27	0.02
ПОЛУШАРИЕ x СТОРОНА ИНСУЛЬТА	4.05	0.035	0.05
бета-ERD			
Фактор	F	p-unc	np2
ПОЛУШАРИЕ	0.04	0.83	0.00
ДВИЖЕНИЕ	2.17	0.14	0.03
СТОРОНА ИНСУЛЬТА	2.88	0.09	0.04
ПОЛУШАРИЕ x СТОРОНА ИНСУЛЬТА	7.62	0.007	0.10
бета-ERS			
Фактор	F	p-unc	np2
ПОЛУШАРИЕ	0.01	0.90	0.00
ДВИЖЕНИЕ	2.97	0.08	0.04
СТОРОНА ИНСУЛЬТА	10.93	0.001	0.13

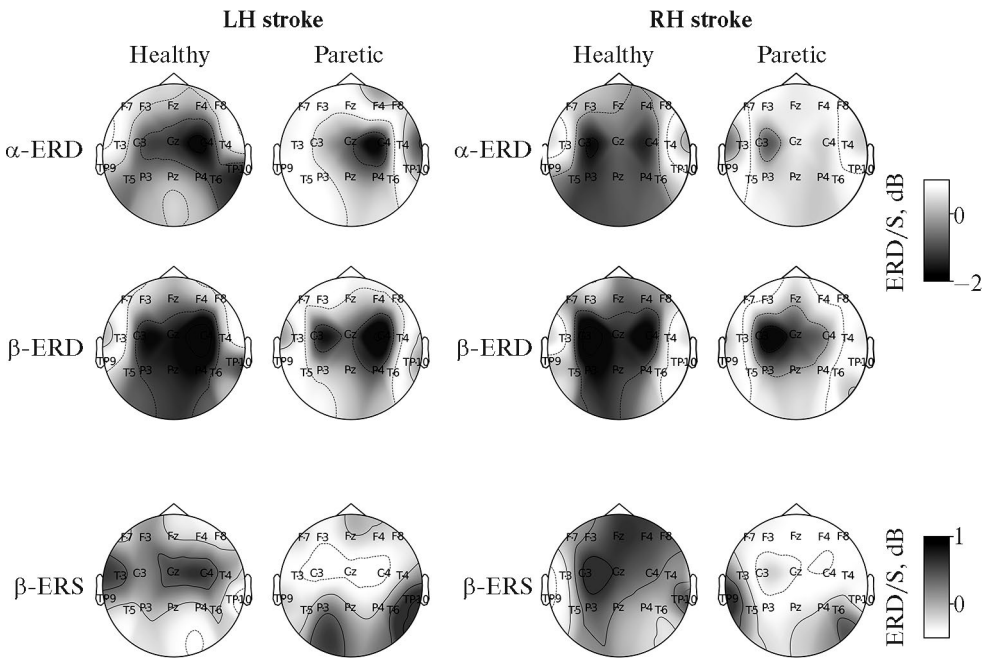


Рис. 3. Карты топографического распределения реакций альфа- и бета-ERD и бета-ERS для двух групп пациентов (LH stroke – группа пациентов с левополушарным инсультом, RH stroke – правополушарным). Показаны карты для блоков с движениями здоровой и паретичной конечности. Более темные значения на карте отражают более высокие значения исследуемой реакции (более отрицательные для ERD, более положительные для ERS).

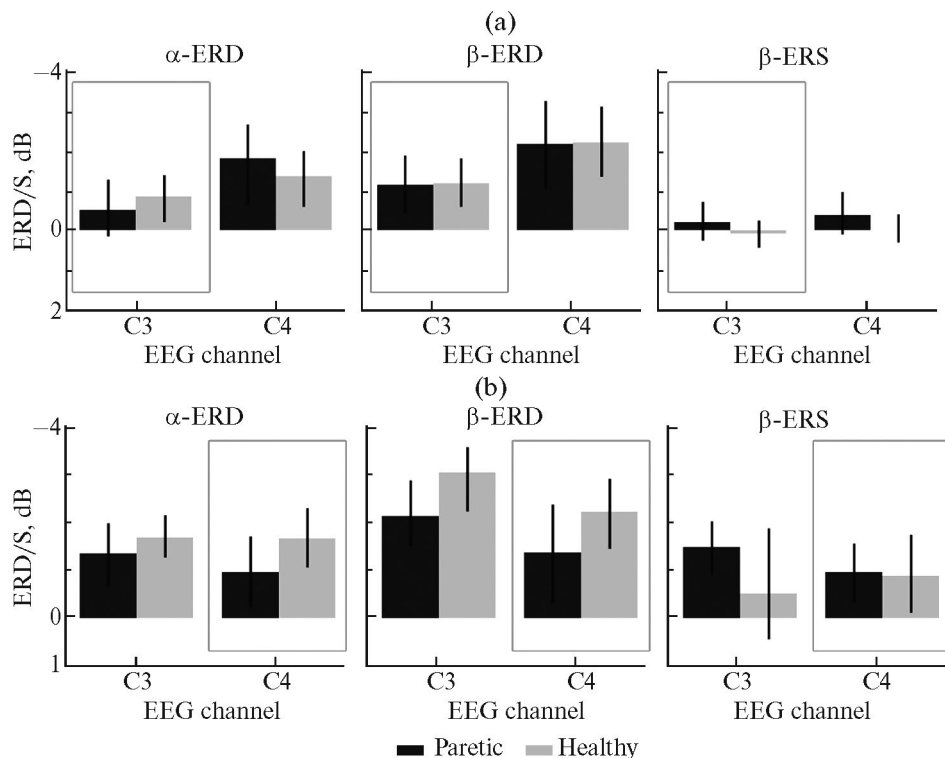


Рис. 4. Групповая динамика реакций ERD/S при движениях здоровой и паретичной конечностью у двух групп пациентов – с поражением в левом (а) и правом полушарии (б). В рамку обведены значения для отведений над пораженным полушарием (C3 для группы с поражением, локализованным в левом полушарии, и C4 для группы с поражением в правом).

ности в изучаемых диапазонах между интактным и пораженным полушарием могла привести к наблюдаемым в исследовании эффектам асимметричного распределения реакций десинхронизации. На рис. 5а видно, что у обеих групп участников отсутствует межполушарная асимметрия, групповое распределение мощности как альфа-, так и бета-ритмической активности в отведениях C3 и C4 в значительной степени перекрываются между собой.

На рис. 5b показаны диаграммы взаимосвязи альфа- и бета-ERD в пораженном полушарии при движении паретичной рукой у обеих групп пациентов. Также приведена диаграмма для бета-ERD в пораженном полушарии при движении здоровой рукой (то есть ипсилатеральная ERD). Для всех трех исследованных зависимостей была обнаружена значимость связи между переменными. Для альфа-ERD в отведениях над пораженным полушарием при движении паретичной конечности LMM анализ показал значимость связи со значением $\text{Log-Likelihood} = -81.7$; $p = 0.002$. Для бета-ERD в отведениях над пораженным полушарием при движении паретичной конечности $\text{Log-Likelihood} = -80.1$, $p < 0.001$; для бета-ERD в отведениях над пораженным полушарием при движении здоровой конечностью $\text{Log-Likelihood} = -82.0$; $p < 0.001$. Также для всех тестов была показана значимость случайного эффекта, то есть проявление наблюдаемой реакции зависело от группы пациентов с разной латерализацией инсульта.

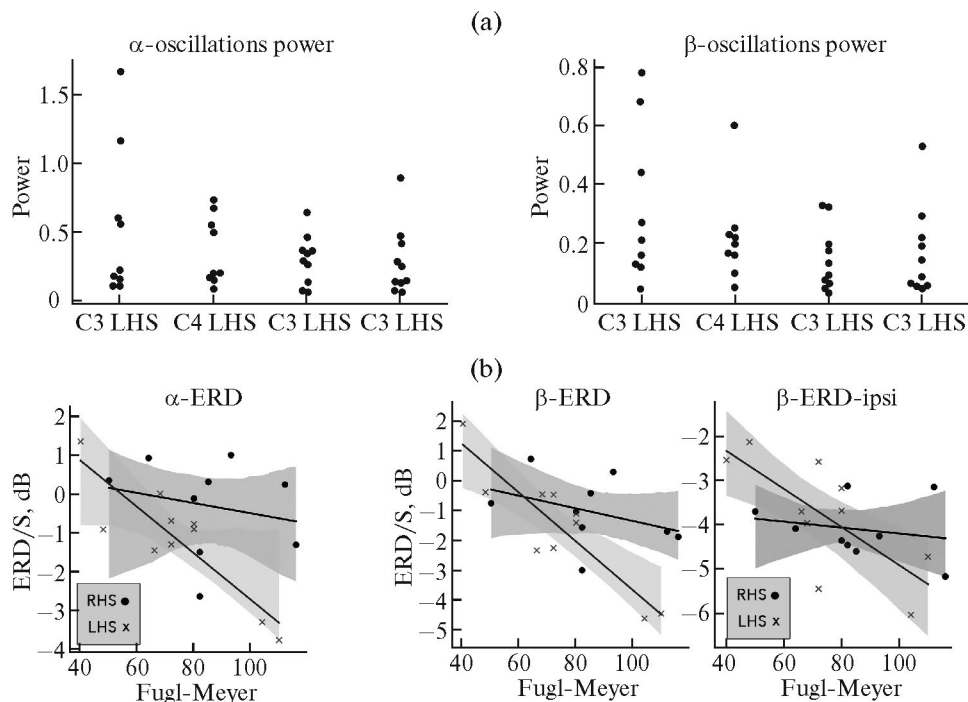


Рис. 5. (а) — оценка мощности ритмической активности в альфа- и бета-диапазонах в двух группах пациентов в отведениях над пораженным и интактным полушарием. “LHS” — данные для пациентов из группы с левосторонним инсультом, “RHS” — для пациентов из группы с правосторонним инсультом. (б) — графики зависимости величины альфа/бета – ERD в отведении над пораженным полушарием и оценки сенсомоторных навыков по шкале Fugl-Meyer. Для первых двух диаграмм значения ERD взяты для блоков с движением паретичной конечностью, для крайней правой диаграммы “бета-ERD-ipsi” значения взяты из блока с движением здоровой рукой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Асимметрия реакции десинхронизации сенсомоторных ритмов

В настоящем исследовании, проведенном в группе пациентов с гемипарезом правой или левой руки после инсульта, удалось обнаружить развитие связанной с движением или попыткой к движению десинхронизации (ERD) в альфа- и бета-частотных диапазонах. При этом величина альфа- и бета-ERD была выше в отведениях над здоровым полушарием вне зависимости от того, какой рукой выполнялось движение. Проведенный дисперсионный анализ выявил значимое взаимодействие факторов ПОЛУШАРИЕ и СТОРОНА ИНСУЛЬТА, но не ПОЛУШАРИЕ и ДВИЖЕНИЕ, предполагая, что то, какой рукой совершалось движение, не влияло на латерализацию реакции десинхронизации, как это описано у здоровых участников [6]. В то же время сторона инсульта значимо определяла асимметрию десинхронизации при движении. Снижение ERD над пораженным полушарием по сравнению со здоровым не было связано с изменениями мощности осцилляторной активности и, следовательно, отражало специфическую связанную с движением активацию нейронов сенсомоторных отделов коры. Аналогичные результаты были описаны ранее в исследованиях [8, 22]. Авторы наблюдали асимметрию реакций альфа-ERD у пациентов с кортикальным инсультом,

вызванную значительным снижением десинхронизации над пораженным полушарием и развитием ипсилатеральной альфа-ERD при движении пораженной конечностью. Мы наблюдали также асимметрию ERD и в бета-диапазоне.

Как отмечалось ранее, амплитуда ЭЭГ-осцилляций пропорциональна количеству синхронно активных нейронов коры мозга [23]. При повышении нагрузки на нейронную популяцию развивается десинхронизация, а нарушение связей внутри нее, например, вследствие инсульта может влиять на реактивность нейронных сетей, что, в свою очередь, приводит к ослаблению реакции ERD над пораженным полушарием, как и показано в настоящем и в ряде других исследований [9, 23, 24].

В то же время движения пораженной руки были ассоциированы с выраженной десинхронизацией в отведениях интактного полушария, что указывает на вовлечение механизмов ипсилатеральной компенсации в процессе восстановления двигательной функции после инсульта [25, 26]. Вовлечение здорового полушария в контроль движений парализованной ипсилатеральной конечности, однако, некоторыми исследователями считается не самой эффективной стратегией восстановления двигательных функций, так, авторы [4, 5] утверждают, что ипсилатеральная активация может играть важную роль в восстановлении движений на ранних этапах реабилитации и для наилучшего исхода реабилитации, но со временем активация должна вернуться в контралатеральное (пораженное) полушарие [27]. Также авторы [28] с помощью транскраниальной магнитной стимуляции показали, что роль первичной моторной коры здорового полушария в контроле движений паретичной конечности значительно ниже у пациентов с хорошо восстановленными двигательными функциями в сравнении с пациентами с медленной динамикой восстановления.

Однако следует отметить, что при парных сравнениях в настоящей работе значимые различия в величине ERD между интактным и пораженным полушариями были обнаружены только для группы с правополушарным инсультом, что, вероятно, может быть связано с большим размером группы и наличием в данной группе пациентов с более тяжелыми нарушениями. Так, в работе [29] на выборке из более 100 пациентов авторы показали, что повреждение правого полушария в результате инсульта связано с более серьезными нарушениями двигательной функции по сравнению с повреждением левого полушария, так как в среднем затрагивает большее число корковых и подкорковых областей, включая волокна белого вещества. Поэтому контраст между активацией здорового и пораженного полушария может быть более выражен в группе с правополушарным инсультом. Также авторами [30] было описано, что ипсилатеральная ERD в альфа- и бета-диапазонах сильнее всего выражена в группах пациентов с нарушениями первичной моторной коры, тогда как группы, где моторная кора оставалась сохранной, а двигательная функция была утеряна из-за поражения других отделов – пространственное распределение ERD было более похожем на группу здоровых участников. Учитывая небольшую группу участников, в настоящей работе не проводилось деление пациентов на более специфичные подгруппы (например, по тяжести двигательного дефицита или на группы с кортикальными и подкорковыми нарушениями). Таким образом, интерпретация настоящих результатов должна проводиться с осторожностью с учетом высокой вариативности клинической картины участников.

Обсуждая обнаруженный феномен бета-синхронизации, стоит обратить внимание, что развитие бета-ERS сразу после движения вслед за реакцией десинхронизации, в совокупности с описанным для бета-ERS центральным топографическим распределением свидетельствуют в пользу того, что это повышение мощности бета-ритма является так называемым феноменом “бета-отскока”, но не следствием артефактной ЭМГ активности, загрязняющий эффект которой часто может мешать адекватной оценке высокочастотных ЭЭГ осцилляций [31]. Феномен бета-отскока связывают с процессами торможения моторной коры при завершении движений, а также процессами обработки

сенсомоторной информации. Этот феномен в контексте пост-инсультных нарушений кортикальной функции может стать предметом будущих исследований.

Связь десинхронизации сенсомоторных ритмов и сохранности двигательной функции

Предыдущие ЭЭГ исследования показали, что альфа-ERD пораженного полушария положительно коррелирует с остаточной моторной функцией верхней конечности у пациентов после инсульта [32]. Также авторы [33] предположили, что наличие выраженной альфа-ERD в пораженном полушарии может свидетельствовать об эффективности протекания реабилитации. Дальнейшие исследования подтвердили это, показав, что прогрессирующий сдвиг очага десинхронизации в сторону пораженного полушария значимо коррелирует с улучшением двигательной функции после инсульта [34].

Полученные в настоящей работе результаты согласуются с этими данными. Было обнаружено, что величина как альфа-, так и бета-ERD в пораженном полушарии коррелировала положительно с оценкой шкалы Fugl-Meyer. То есть для пациентов с более выраженной контралатеральной ERD при движении больной конечностью были характерны большие значения по шкале Fugl-Meyer, что свидетельствовало о лучшем восстановлении сенсомоторных функций. Этот результат логичен, так как более точные и амплитудные движения сопровождаются усиленной афферентацией и, следовательно, большей десинхронизацией. Однако мы обнаружили, что степень восстановления значимо коррелировала с величиной бета-ERD в пораженном полушарии и при движениях здоровой конечностью. Этот интересный результат подчеркивает тесную взаимосвязь обоих полушарий в контроле двигательных функций каждой конечностью и указывает на важность оценки кортикальной активации при движении здоровой конечностью для анализа степени двигательного восстановления после инсульта.

В продолжение этой идеи стоит обратить внимание на то, что при движениях здоровой рукой величина альфа- и бета-ERD в пораженном (ипсилатеральном) полушарии выше, чем при движениях пораженной конечности (как видно на топографических картах и из анализа временной динамики рис. 2–4). Хотя мы не обнаружили значимости данной тенденции, наблюдаемый феномен был описан в других исследованиях [8]. Ипсилатеральная ERD считается нормотипическим феноменом и ранее была описана у здоровых добровольцев как маркер “подключения” ипсилатеральных зон при выполнении сложных двигательных задач [35, 36], а также как результат формирования межполушарных коактиваций в ходе бимануального двигательного опыта [37]. Ее присутствие при движениях здоровой рукой, таким образом, может отражать сохранность первичных сенсомоторных отделов пораженного полушария и участие их в контроле выполнения здорового движения и анализе афферентного потока, очевидно, более интенсивного при здоровом полноценном движении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе описаны характеристики реакций десинхронизации сенсомоторной ритмической ЭЭГ-активности у пациентов после инсульта при движениях здоровой и пораженной конечностями. Было показано, что при движении паретичной рукой наблюдается ипсилатеральный паттерн ERD, что указывает на роль интактного полушария в контроле и восстановлении нарушенных двигательных функций. Также было обнаружено, что интенсивность ERD в пораженном полушарии коррелирует с успешностью восстановления сенсомоторных навыков. Причем, если в предыдущих исследованиях эту связь обнаруживали только для движений пораженной руки, то в настоящей работе была исследована также корреляция активации в пораженном полушарии при движениях здоровой конечностью. Этот результат является важным, во-первых, потому, что свидетельствует о сохранении роли сенсомоторных отделов

пораженного полушария в контроле не затронутой парезом стороны тела, а во-вторых, имеет ценность для клинической применимости оценки паттернов десинхронизации сенсомоторных ритмов ЭЭГ. Он указывает на возможность проведения оценки состояния пациентов даже с полным отсутствием мышечной силы в пораженной конечности через пробы с движениями интактной руки. Несмотря на активное использование ЭЭГ в рамках нейрореабилитации с использованием технологий интерфейсов мозг – компьютер [38], этот метод регистрации мозговой активности, согласно авторам [13], не является широко распространенным инструментом пост-инсультной диагностики сенсомоторных сетей. Однако настоящая работа, наряду с упомянутыми выше исследованиями, подчеркивает информативность данного метода для оценки состояния пациента, планирования программы реабилитации и прогнозирования ее эффектов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А. С. М. – проведение исследования, обработка данных, поиск и обработка литературы, написание текста статьи; Н. В. С. – разработка дизайна исследования, проведение исследования, обработка данных, написание текста статьи; Л. В. Я. – проведение исследования, написание текста статьи; Я. А. А. – отбор и обследование больных для исследования, клиническое исследование, проведение исследования; Д. А. П., Г. Е. И., М. А. Л., А. Я. К. – общее руководство, планирование и ресурсное обеспечение исследования, дизайн исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-30024). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по этике Сколковского института науки и технологий (протокол № 10 от 18.05.2023 г.), Москва, Россия.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen R, Cohen LG, Hallett M* (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 111(4): 761–773.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00025-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00025-8)
2. *Zhang H, Guo J, Liu J, Wang C, Ding H, Han T, Chen J, Yu C, Qin W* (2024) Reorganization of Cortical Individualized Differential Structural Covariance Network is Associated with Regional Morphometric Changes and Functional Recovery in Chronic Subcortical Stroke. *NeuroImage: Clinical*.
<https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4868458>
3. *Cauraugh J, Summers J* (2005) Neural plasticity and bilateral movements: A rehabilitation approach for chronic stroke. *Progress Neurobiol* 75(5): 309–320.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.001>

4. Brito R, Baltar A, Berenguer-Rocha M, Shirahige L, Rocha S, Fonseca A, Piscitelli D, Monte-Silva K (2021) Intrahemispheric EEG: A New Perspective for Quantitative EEG Assessment in Poststroke Individuals. *Neural Plasticity* 5664647.
<https://doi.org/10.1155/2021/5664647>
5. Finnigan SP, Walsh M, Rose SE, Chalk JB (2007) Quantitative EEG indices of sub-acute ischaemic stroke correlate with clinical outcomes. *Clin Neurophysiol* 118(11): 2525–2532.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.07.021>
6. Pfurtscheller G (2000) Spatiotemporal ERD/ERS patterns during voluntary movement and motor imagery. *Suppl Clin Neurophysiol* 53: 196–198.
[https://doi.org/10.1016/s1567-424x\(09\)70157-6](https://doi.org/10.1016/s1567-424x(09)70157-6)
7. Syrov N, Vasilyev A, Solovieva A, Kaplan A (2022) Effects of the mirror box illusion on EEG sensorimotor rhythms in voluntary and involuntary finger movements. *Neurosci Behav Physiol* 52(6): 936–946.
<https://doi.org/10.1007/s11055-022-01318-z>
8. Stepien M, Conradi J, Waterstraat G, Hohlefeld FU, Curio G, Nikulin VV (2011) Event-related desynchronization of sensorimotor EEG rhythms in hemiparetic patients with acute stroke. *Neurosci Lett* 488(1): 17–21.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.072>
9. Ezquerro S, Barios J, Bertomeu-Motos A, Diez J, Sanchez-Aparicio J, Donis-Barber L, Fernandez E, Garcia N (2019) Bihemispheric Beta Desynchronization During an Upper-Limb Motor Task in Chronic Stroke Survivors. *Metrology*: 371–379.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-19651-6_36
10. Biryukova E, Frolov A, Kozlovskaya I, Bobrov P (2017) Robotic devices in poststroke rehabilitation. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 67: 394–413.
<https://doi.org/10.7868/S004446771704-0017>
11. Khan MA, Das R, Iversen HK, Puthusserypady S (2020) Review on motor imagery based BCI systems for upper limb post-stroke neurorehabilitation: From designing to application. *Comput Biol Med* 123: 103843.
<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103843>
12. Silvoni S, Ramos-Murguialday A, Cavinato M, Volpato C, Cisotto G, Turolla A, Piccione F, Birbaumer N (2011) Brain-computer interface in stroke: a review of progress. *Clin EEG Neurosci* 42(4): 245–252.
<https://doi.org/10.1177/155005941104200410>
13. Milani G, Antonioni A, Baroni A, Malerba P, Straudi S (2022) Relation Between EEG Measures and Upper Limb Motor Recovery in Stroke Patients: A Scoping Review. *Brain Topogr* 35(5–6): 651–666.
<https://doi.org/10.1007/s10548-022-00915-y>
14. Gebruers N, Truijen S, Engelborghs S, De Deyn PP (2014) Prediction of upper limb recovery, general disability, and rehabilitation status by activity measurements assessed by accelerometers or the Fugl-Meyer score in acute stroke. *Am J Phys Med Rehabil* 93(3): 245–252.
<https://doi.org/10.1097/phm.0000000000000045>
15. Lyle RC (1981) A performance test for assessment of upper limb function in physical rehabilitation treatment and research. *Int J Rehabil Res* 4(4): 483–492.
<https://doi.org/10.1097/00004356-198112000-00001>
16. Rankin J (1957) Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J* 2(5): 200–215.
<https://doi.org/10.1177/003693305700200504>
17. Gramfort A, Luessi M, Larson E, Engemann DA, Strohmeier D, Brodbeck C, Goj R, Jas M, Brooks T, Parkkonen L, Hämäläinen M (2013) MEG and EEG data analysis with MNE-Python. *Front Neurosci* 7: 267.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00267>
18. Neuper C, Wörtz M, Pfurtscheller G (2006) ERD/ERS patterns reflecting sensorimotor activation and deactivation. *Prog Brain Res* 159: 211–222.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)59014-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)59014-4)
19. Seabold S, Perktold J (2010) Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python. *Proc Python Sci Conf*.
<https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-011>
20. Chatrian GE, Petersen MC, Lazarte JA (1959) The blocking of the rolandic wicket rhythm and some central changes related to movement. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 11(3): 497–510.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(59\)90048-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(59)90048-3)
21. Pfurtscheller G, Da Silva FL (1999) Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clin Neurophysiol* 110(11): 1842–1857.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(99)00141-8)

22. *Pfurtscheller G, Aranibar A, Wege W* (1980) Changes in central EEG activity in relation to voluntary movement. II. Hemiplegic patients. *Prog Brain Res* 54: 491–495.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61665-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61665-9)
23. *Nunez PL, Srinivasan R* (2006) *Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG*. Oxford University Press. USA.
24. *Gerloff C, Bushara K, Sailer A, Wassermann EM, Chen R, Matsuoka T, Waldvogel D, Wittenberg GF, Ishii K, Cohen LG, Hallett M* (2006) Multimodal imaging of brain reorganization in motor areas of the contralesional hemisphere of well recovered patients after capsular stroke. *Brain* 129(3): 791–808.
<https://doi.org/10.1093/brain/awh713>
25. *Li H, Huang G, Lin Q, Zhao J, Fu Q, Li L, Mao Y, Wei X, Yang W, Wang B, Zhang Z, Huang D* (2020) EEG Changes in Time and Time-Frequency Domain During Movement Preparation and Execution in Stroke Patients. *Front Neurosci* 14: 827.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00827>
26. *Starkey ML, Bleul C, Zörner B, Lindau NT, Mueggler T, Rudin M, Schwab ME* (2012) Back seat driving: hindlimb corticospinal neurons assume forelimb control following ischaemic stroke. *Brain* 135(11): 3265–3281.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws270>
27. *Carey JR, Kimberley TJ, Lewis SM, Auerbach EJ, Dorsey L, Rundquist P, Ugurbil K* (2002) Analysis of fMRI and finger tracking training in subjects with chronic stroke. *Brain* 125(4): 773–788.
<https://doi.org/10.1093/brain/awf091>
28. *Werhahn KJ, Conforto AB, Kadom N, Hallett M, Cohen LG* (2003) Contribution of the ipsilateral motor cortex to recovery after chronic stroke. *Ann Neurol* 54(4): 464–472.
<https://doi.org/10.1002/ana.10686>
29. *Frenkel-Toledo S, Fridberg G, Ofir S, Bartur G, Lowenthal-Raz J, Granot O, Handelzalts S, Soroker N* (2019) Lesion location impact on functional recovery of the hemiparetic upper limb. *PloS one* 14(7): e0219738.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219738>
30. *Park W, Kwon GH, Kim Y* (2016) EEG response varies with lesion location in patients with chronic stroke. *J Neuroeng Rehabil* 13: 21.
<https://doi.org/10.1186/s12984-016-0120-2>
31. *Goncharova II, McFarland DJ, Vaughan TM, Wolpaw JR* (2003) EMG contamination of EEG: spectral and topographical characteristics. *Clin Neurophysiol* 114(9): 1580–1593.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(03)00093-2)
32. *Bartur G, Pratt H, Soroker N* (2019) Changes in mu and beta amplitude of the EEG during upper limb movement correlate with motor impairment and structural damage in subacute stroke. *Clin Neurophysiol* 130(9): 1644–1651.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.06.008>
33. *Remsik AB, Williams L, Jr Gjini K, Dodd K, Thoma J, Jacobson T, Walczak M, McMillan M, Rajan S, Young BM, Nigogosyan Z, Advani H, Mohanty R, Tellapragada N, Allen J, Mazrooyisebdani M, Walton LM, van Kan PLE, Kang TJ, Sattin JA, Prabhakaran V* (2019) Ipsilesional Mu Rhythm Desynchronization and Changes in Motor Behavior Following Post Stroke BCI Intervention for Motor Rehabilitation. *Front Neurosci* 13: 53.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00053>
34. *Ray AM, Figueiredo TDC, López-Larraz E, Birbaumer N, Ramos-Murguialday A* (2020) Brain oscillatory activity as a biomarker of motor recovery in chronic stroke. *Hum Brain Mapp* 41(5): 1296–1308.
<https://doi.org/10.1002/hbm.24876>
35. *Gueugneau N, Bove M, Avanzino L, Jacquin A, Pozzo T, Papaxanthis C* (2013) Interhemispheric inhibition during mental actions of different complexity. *PloS One* 8(2): e56973.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056973>
36. *Armatas CA, Summers JJ, Bradshaw JL* (1994) Mirror movements in normal adult subjects. *J Clin Exp Neuropsychol* 16(3): 405–413.
<https://doi.org/10.1080/01688639408402651>
37. *Vasiliev A, Liburkina S, Kaplan A* (2016) Lateralization of EEG patterns in humans when imagining hand movements in a brain-computer interface. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 66(33): 302–302.
https://doi.org/10.7868/S0044467716030126_38
38. *Mokienko O, Chernikova L, Frolov A, Bobrov P* (2013) Movement imagination and its practical application. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 63(2): 195–195.
<https://doi.org/10.7868/S0044467713020056>

Event-Related Desynchronization of EEG Sensorimotor Rhythms in Hemiparesis Post-Stroke Patients

A. S. Medvedeva^a, N. V. Syrov^{a, d, *}, L. V. Yakovlev^{a, d}, Y. A. Alieva^{b, c}, D. A. Petrova^a,
G. E. Ivanova^{b, c}, M. A. Lebedev^{d, e}, and A. Ya. Kaplan^{a, d}

^aVladimir Zelman Center for Neurobiology and Brain Rehabilitation, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

^bFederal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the federal medical biological agency, Moscow, Russia

^cPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^dLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^eSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

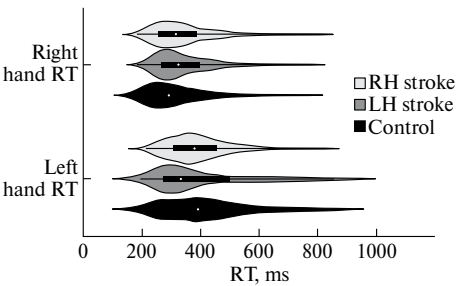
*e-mail: kolascoco@gmail.com

Motor impairment is one of the most prevalent consequences of a stroke, necessitating the implementation of efficacious diagnostic and rehabilitative techniques. An evaluation of alterations in sensorimotor cortical activity during the processes of movement preparation and execution can provide valuable insights into the state of motor circuits following a stroke and the potential for recovery. The objective of the present study was to evaluate the spatiotemporal characteristics of event-related desynchronization (ERD) of sensorimotor EEG rhythms in patients with hemiparesis following a stroke, during movements with the paretic and healthy hands. A total of 19 patients with hemiparesis following a stroke participated in the study. An EEG was recorded while the subject performed a visual-motor task. The analysis focused on the event-related desynchronization in the alpha (6–15 Hz) and beta (15–30 Hz) bands. An asymmetry in the ERD was observed, with a predominant response in the intact hemisphere, regardless of the hand performing the movement. The magnitude of the ERD in the affected hemisphere demonstrated a correlation with the Fugl-Meyer score. Furthermore, a notable correlation was identified between the magnitude of beta-ERD in the affected hemisphere during movements of the healthy limb and the degree of motor function recovery. The results demonstrate the utility of ERD pattern assessment for diagnosing the state of sensorimotor networks after stroke. The detection of a correlation between the magnitude of ERD during movements of the healthy arm and the assessment of sensorimotor functions of the patient expands the possibilities of using EEG to assess patients even with complete absence of movements in the paretic limb.

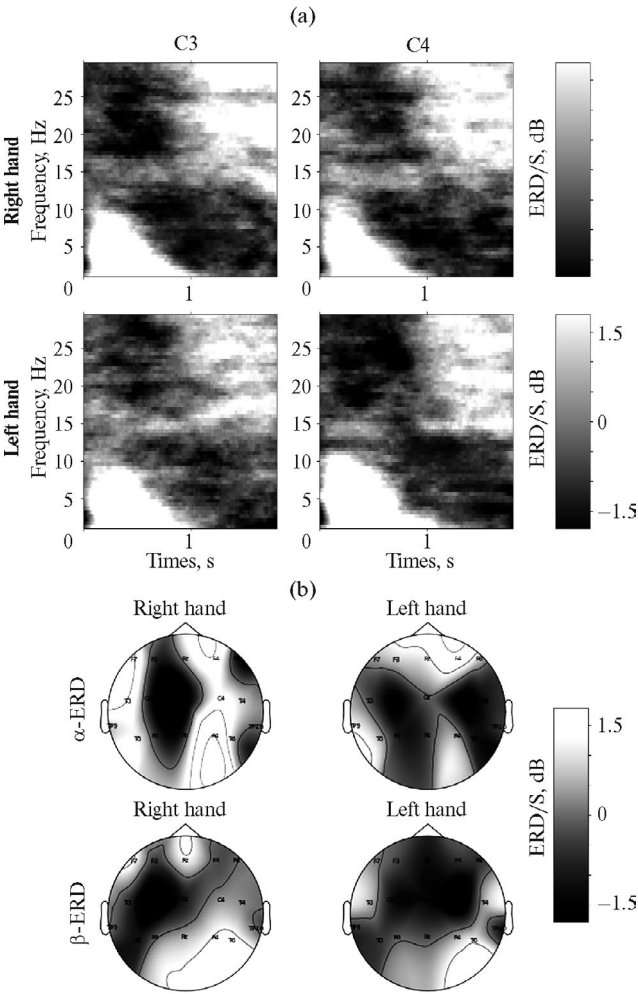
Keywords: EEG, Stroke, event-related desynchronization, hemiparesis, rehabilitation

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Распределение скорости реакции для групп пациентов и участников контрольной группы при движении правой и левой руками.



Приложение 2. Результаты анализа реакции десинхронизации у контрольной группы здоровых добровольцев. (а) – частотно-временные диаграммы реакции десинхронизации, связанной с движением правой и левой руками для участников контрольной группы. (б) – пространственное распределение паттернов альфа- и бета-десинхронизации при движениях правой и левой руками для участников контрольной группы.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ БЕГОВОЙ
ТРЕНИРОВКИ В КОЛЕСЕ НА НЕРВНУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ЧАСТОТЫ
СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ У КРЫС**

© 2024 г. А. А. Борzych¹, Е. К. Селиванова², А. С. Боровик¹, И. В. Кузьмин²,
О. Л. Виноградова¹, О. С. Тарасова^{1, 2, *}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

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

*E-mail: ost.msu@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2024 г.

После доработки 06.11.2024 г.

Принята к публикации 07.11.2024 г.

Физическая тренировка в аэробном режиме нагрузки используется для предотвращения и коррекции многих нарушений в сердечно-сосудистой системе. Для исследования эффектов такой физической нагрузки используются различные способы тренировки грызунов, среди которых особый интерес представляет методика произвольной беговой нагрузки в колесе, которая по паттерну двигательной активности близка к естественной локомоции крыс и при этом лишена стрессирующего влияния. Целью данной работы было комплексное исследование эффектов беговой тренировки в колесе на нервную регуляцию частоты сердечных сокращений (ЧСС) у крыс. В возрасте 6 недель животных делили на две группы: тренировка (TR, свободный доступ к колесам, $n = 11$) и сидячий контроль (CON, $n = 12$). После 6-недельной тренировки проводили регистрацию ЭКГ у свободноподвижных крыс при помощи накожных электродов в спокойном состоянии, после блокады нервных влияний на сердце и при air-jet стрессе (4 мин). Анализ влияний автономной нервной системы проводили путем введения животным β_1 -адреноблокатора и М-холиноблокатора периферического действия, а также анализа вариабельности сердечного ритма с использованием методов спектрального и вейвлет-анализа. В спокойном состоянии у крыс группы TR по сравнению с группой CON наблюдалось снижение уровня ЧСС. Снижение ЧСС при введении атенолола (2 мг/кг) не различалось между группами, однако метилатропин (1 мг/кг) вызывал более значительное повышение ЧСС в группе TR, чем в группе CON. При совместном действии атенолола и метилатропина уровни ЧСС не различались между группами. У крыс группы TR наблюдалось увеличение вклада высокочастотных (0.75–3 Гц) колебаний в общую мощность спектра RR-интервала. Во время эмоционального (air-jet) стресса у крыс группы TR происходило более выраженное повышение ЧСС по сравнению с группой CON. Кроме того, в группе TR во время стресса наблюдалось снижение амплитуды высокочастотных колебаний сердечного ритма, у крыс группы CON такое снижение отсутствовало. Таким образом, произвольный бег крыс в колесе сопровождается увеличением парасимпатических влияний на сердце в спокойном состоянии, что проявляется как в изменении вариабельности сердечного ритма, так и в увеличении тахикардии при введении М-холинолитика. Умеренная брадикардия в покое обеспечивает возможность более выраженного повышения ЧСС при стрессе в результате подавления парасимпатических влияний на сердце.

Ключевые слова: крыса, физическая тренировка, симпатическая нервная система, парасимпатическая нервная система, спектральный анализ, вейвлет-анализ

DOI: 10.31857/S0869813924100095, EDN: VREZAI

ВВЕДЕНИЕ

Физические тренировки в аэробном режиме нагрузки (тренировки выносливости) эффективно применяются для профилактики и коррекции сердечно-сосудистых расстройств [1, 2]. Изучение механизмов влияния регулярной физической активности на функционирование сердца и сосудов часто проводят в экспериментах с использованием различных моделей тренировки лабораторных животных, среди которых особое место занимает произвольная беговая тренировка крыс в колесе [3]. Эта модель обладает рядом очевидных преимуществ по сравнению с традиционно используемой беговой тренировкой крыс на тредбане: она имитирует естественный паттерн двигательной активности животных (как и в природе, в колесе крысы перемещаются короткими перебежками [4, 5]). Кроме того, тренировка в колесе не сопряжена со стрессированием животных – в отличие от принуждения к бегу она не приводит к повышению содержания кортикостерона в крови [6, 7]. Произвольная тренировка в колесе обладает кардиопротективным действием [8, 9], в том числе за счет влияния на регуляцию коронарного русла [10].

Один из наиболее ярких и сравнительно быстро развивающихся эффектов аэробной физической тренировки – это снижение уровня ЧСС в спокойном состоянии [11, 12]. Такую «брадикардию покоя» обычно связывают с повышением парасимпатических и/или снижением симпатических кардиотропных влияний [11, 13–15]. Для оценки вагосимпатического баланса в регуляции сердца можно использовать два комплементарных подхода: анализ спонтанной вариабельности сердечного ритма и регистрацию изменений ЧСС при фармакологической блокаде нервных влияний на сердце. Первый из них позволяет оценить вариации сердечного ритма, возникающие в результате нерегулярности разрядной активности в экстракардиальных нервных путях, а второй – итог взаимодействия тонических влияний двух отделов автономной нервной системы. В результате физической тренировки у лабораторных крыс описаны менее выраженное снижение ЧСС при блокаде симпатических влияний [16, 17], более выраженное повышение ЧСС под действием М-холинолитиков [17–19], а также увеличение мощности высокочастотных (связанных с дыхательными экскурсиями) колебаний сердечного ритма [17, 20], которые имеют парасимпатическую природу [21].

Согласно альтернативной точке зрения, основным механизмом снижения ЧСС в результате аэробной физической тренировки служит изменение экспрессии ионных каналов, проводящих пейсмейкерные токи в клетках синоатриального узла сердца [22, 23]. В этом случае снижение ЧСС наблюдается и в условиях полной блокады нервных влияний (снижение т. н. «собственной» ЧСС). Однако, по данным многих работ, брадикардия покоя далеко не всегда связана со снижением собственной ЧСС [18–20].

Есть основания полагать, что механизмы, за счет которых происходит изменение деятельности сердца при аэробной тренировке, могут зависеть от режима тренировочной нагрузки: при умеренной нагрузке адаптация сердца к физической активности происходит по регуляторному типу, а при высокой – за счет ремоделирования синоатриального узла. Как правило, снижение собственной ЧСС наблюдается при использовании интенсивных тренировочных нагрузок, в этих условиях влияние вагуса на сердечный ритм может не изменяться [22] или даже быть сниженным [24]. Следует отметить, что изменения «физического» и тонического компонентов нервной регуляции сердца в результате физической тренировки не всегда одинаковы: например, тренировка на тредбане может сопровождаться снижением реакции ЧСС на введение β -адреноблокатора в отсутствие характерных для снижения симпатической активности изменений вариабельности сердечного ритма [16]. В целом вопрос о механизмах снижения ЧСС в результате аэробной физической тренировки до сих пор не закрыт, как следует из его обсуждения в сравнительно недавно опубликованном обзоре [11] и экспериментальной статье [13].

Таким образом, характеристика изменений нервной регуляции ритма сердца в той или иной экспериментальной модели аэробной физической тренировки должна учитывать различные аспекты такой регуляции. Следует отметить, что в предыдущих работах с использованием такой привлекательной модели как произвольная беговая тренировка, как правило, исследовался только один из аспектов регуляции сердца. Наиболее полными по набору методических подходов к исследованию изменений нервной регуляции сердечного ритма при произвольной тренировке в колесе являются две работы [9, 25]. Однако в них обеих часть исследований была выполнена в условиях анестезии, к тому же работа [25] выполнена на мышах, которые отличаются от крыс по уровню ЧСС и регуляции этого показателя, особенно в потенциально стрессогенных условиях [26]. В связи с этим целью нашей работы являлось комплексное изучение эффектов произвольной беговой тренировки в колесе на нервную регуляцию сердца крыс: по уровню ЧСС и показателям вариабельности сердечного ритма в спокойном состоянии, а также по изменениям ЧСС при блокаде кардиотропных нервных влияний и в условиях эмоционального стресса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и их содержание

В опытах использовали самцов крыс линии Вистар, полученных из вивария Института медико-биологических проблем РАН. Животных содержали в помещении вивария с контролируемой температурой (21–23 °С) и световым циклом 12 ч «день» (освещенность ~50 лк, газоразрядная лампа 2700 К) – 12 ч «ночь» (менее 1 лк, свет красной лампы), включение освещения в 9-00, выключение в 21-00. Воду и стандартный корм для грызунов (ООО «Лабораторкорм», Москва) крысы получали *ad libitum*.

Методика тренировки

В начале эксперимента возраст животных составлял 5 недель (по нашим наблюдениям, в этом возрасте крысы имеют более высокую мотивацию к бегу в колесе). Крысы были распределены на две группы («тренировка» – TR, $n = 11$; «контроль» – CON, $n = 12$) и рассажены по две (или три) в клетки стандарта ТЗ (46 х 30 х 16 см), снабженные беговыми колесами (TR) или без колес (CON) – для адаптации к условиям эксперимента. В возрасте 6 недель животных рассаживали индивидуально, при этом крысы группы TR имели неограниченный доступ к беговым колесам (диаметр 29.6 см, длина окружности 93 см, ширина беговой поверхности 10 см).

Для регистрации и обработки данных во время тренировки крыс использовался разработанный нами аппаратно-программный комплекс [4, 5]. На колесе, диаметрально по отношению друг к другу, были установлены два магнита, что позволяло регистрировать каждый полуоборот колеса в момент прохождения магнита перед детектором. Для сбора и анализа данных использовали оригинальное программное обеспечение, которое обеспечивало непрерывный дистанционный контроль хода эксперимента через сеть интернет. Путем подсчета полуоборотов колеса в интервалах длительностью 5 с определяли пробег и время бега в течение суток. Также вычисляли мгновенные значения скорости бега (учитывали только 5-с интервалы, в которых крысы проявляли беговую активность). Анализ скорости бега проводили только для темного времени суток, когда крысы были активными: в данном эксперименте, как и в предыдущих [4, 5], дневной пробег составил менее 2% от ночного. Длительность тренировочного цикла составила 6 недель. По данным литературы, такая длительность тренировки достаточна для снижения уровня ЧСС в спокойном состоянии [9, 20].

Регистрация ЭКГ у свободноподвижных крыс

Регистрацию ЭКГ проводили во второй половине суток (между 12⁰⁰ и 18⁰⁰) при ограничении звуковых раздражителей, уровень освещенности комнаты соответствовал привычному для крыс в дневное время. Крыс помещали индивидуально в клетки с размерами 30 x 30 x 30 см, где они могли свободно перемещаться. В большинстве случаев ЭКГ регистрировали одновременно у двух крыс группы CON и двух крыс группы TR, чтобы учесть возможные изменения регуляции сердечного ритма в течение суток.

Для регистрации использовали накожные электроды Skintact F-301, которые наклеивали на предварительно (за сутки до регистрации) выбритые участки поверхности грудной клетки в положении, соответствующем II стандартному отведению [27]. Затем на крысу надевали шлейку с клеммами для электродов и разъемом для соединения с усилителем. Усиленный в полосе частот от 3 до 300 Гц сигнал регистрировали на компьютере с использованием аналого-цифрового преобразователя USB-6211 (National Instruments, США) и оригинального программного обеспечения, разработанного в среде программирования LabView 2011 (National Instruments, США) докт. биол. наук Е. В. Лукошковой. Частота опроса сигнала составляла 1000 Гц.

После подключения к установке крыс адаптировали к экспериментальной обстановке не менее 30 мин. Далее эксперимент включал три этапа:

запись ЧСС в спокойном состоянии (30–60 мин) – для анализа спонтанной вариабельности ритма сердца;

исследование изменений ЧСС при эмоциональном стрессе, который моделировали подачей струи воздуха на холку крысы (air-jet стресс). Такое воздействие вызывает у крыс ориентировочно-оборонительную реакцию и изменение активности автономной нервной системы, что проявляется в повышении ЧСС и перераспределении минутного объема сердца в пользу скелетной мускулатуры [28]. Воздух поступал в течение 4 мин от компрессора через трубку с внутренним диаметром 3 мм. Скорость потока воздуха подбирали так, чтобы он производил легкое шипение, а струя из трубки приподнимала шерсть на холке крысы;

исследование изменений ЧСС после введения блокатора М-холинорецепторов (метилатропин, 1 мг/кг), а затем блокатора β_1 -адренорецепторов (атенолол, 2 мг/кг). Этот этап начинали через 30 мин после air-jet стресса (после восстановления уровня ЧСС). Растворы блокаторов вводили подкожно в области холки в объеме 500 мкл/кг, затем регистрировали ЭКГ в течение 15 мин. Следует отметить, что в отличие от атропина метилатропин не проникает через гематоэнцефалический барьер, то есть его влияние направлено только на периферические М-холинорецепторы [29, 30].

После регистрации ЭКГ крыс возвращали в домашние клетки.

Анализ записей ЭКГ

Анализ результатов проводили с использованием оригинального программного обеспечения Data Processing in Physiology and Pharmacology, разработанного в среде программирования LabView 2011 (National Instruments, США) докт. биол. наук Е. В. Лукошковой. На записи ЭКГ идентифицировали R-зубцы, соответствующие индивидуальным сердечным циклам, ошибки программной идентификации устраняли в режиме ручного редактирования.

При спектральном анализе колебаний RR-интервала записи ЭКГ длительностью 30–60 мин разбивали на полуперекрывающиеся сегменты длительностью 50 с. Каждый из сегментов приводили к нулевому среднему, проводили линейную интерполяцию пиковых значений RR-интервала и вторичный опрос данных с частотой 20.48 Гц (1024 значений в каждом 50-секундном сегменте). Затем для каждого сегмента вычисляли спектр мощности с использованием быстрого преобразования Фурье, полученные спектры усредняли. Колебания RR-интервала анализировали в трех диапазонах: очень

низкочастотном (VLF, 0.05–0.25 Гц), низкочастотном (LF, 0.25–0.6 Гц) и высокочастотном (HF, 0.75–3 Гц) [31, 32]. Мощность колебаний в этих частотных диапазонах вычисляли в процентах от общей мощности спектра (в диапазоне 0.005–3 Гц), такое нормирование минимизирует влияние среднего уровня RR-интервала на вариабельность этого показателя [33].

При анализе изменений ЧСС во время air-jet стресса вычисляли поминутные значения ЧСС, а также разность значений ЧСС для двух интервалов длительностью 4 мин: во время воздействия и непосредственно перед ним. Динамику высокочастотных (связанных с дыханием) колебаний ЧСС во время стресса оценивали с помощью вейвлет-анализа, который проводили с использованием оригинальной программы в среде MATLAB (MathWorks, США). После линейной интерполяции поударных значений ЧСС проводили вторичный опрос данных с частотой 10 Гц, а затем – дискретное вейвлет-преобразование данных с использованием вейвлета Symlet восьмого порядка [34].

Эффекты метилатропина и атенолола оценивали по разности значений ЧСС для двух интервалов длительностью 5 мин: с 10-й по 14-ю мин после введения блокатора (к этому времени исчезала «острая» реакция крыс на процедуру инъекции и ЧСС стабилизировалась) и перед введением блокатора.

Заключительный этап эксперимента

В конце эксперимента всех крыс анестезировали CO_2 и декапитировали гильотиной. Брали образцы крови, выделяли и взвешивали отделы сердца, скелетные мышцы передних и задних конечностей, а также надпочечники.

Образцы крови выдерживали 20 мин при комнатной температуре и 40 мин в холодильнике (4 °C), затем центрифугировали (4300 g, 15 мин), отбирали сыворотку и хранили ее при –20 °C. Содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке измеряли в автоматическом анализаторе (A-25 Biosystems, Испания).

С целью оценки влияния беговой тренировки на активность митохондриальных ферментов в локомоторных мышцах определяли активность цитратсинтазы в трехглавой мышце плеча, которая активно рекрутируется при беге в колесе [35]. Активность фермента измеряли по методу Srere [36], полученные значения нормировали на концентрацию белка, измеренную с использованием бицинхоновой кислоты (метод BCA). Такие измерения проводили у 6 крыс из каждой группы, выборки формировали случайным образом.

Статистический анализ данных

Распределение крыс на группы проводили с использованием программы GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/randomize2/>). Объем выборок при планировании эксперимента (11–12 крыс в группе) выбирали с использованием программы G*Power 3.1.9.7. [37] при уровне значимости 0.05 и вероятности ошибки второго рода 0.8, величину эффекта вычисляли по изменению ЧСС и вариабельности этого показателя у крыс в раннее опубликованных работах [9, 20].

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Соответствие распределения данных нормальному было подтверждено с использованием критерия Шапиро – Уилка. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (в случае нормального распределения), кроме показателей беговой активности крыс и данных по активности цитратсинтазы, распределение которых отличалось от нормального (представлены в виде медианы и межквартильного размаха), n – количество крыс в выборке. В зависимости от характера распределения данных использовали непараметрические критерии (Фридмана и Манна – Уитни) или параметрические (непарный t -критерий Стьюдента или двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом

Сидака). Использованные статистические критерии указаны при представлении результатов в тесте, в примечании к таблице и в подписях на рисунках. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика беговой активности крыс

Данные по динамике показателей беговой активности крыс представлены на рис. 1. Пробег за сутки составлял около 2–3 км, явных изменений этого показателя в течение тренировочного цикла не наблюдалось (рис. 1а). Скорость бега крыс в ходе тренировки несколько повышалась (рис. 1б). Следует также отметить, скорость бега в выборке крыс варьировала меньше, чем суточный пробег (рис. 1а, б).

Влияние тренировки на массу тела, массу органов и показатели крови

Масса тела двух групп крыс в ходе эксперимента не различалась (рис. 1с), хотя тренировка проводилась в период интенсивного роста и полового созревания животных. В конце эксперимента между группами CON и TR не выявлено различий по массе

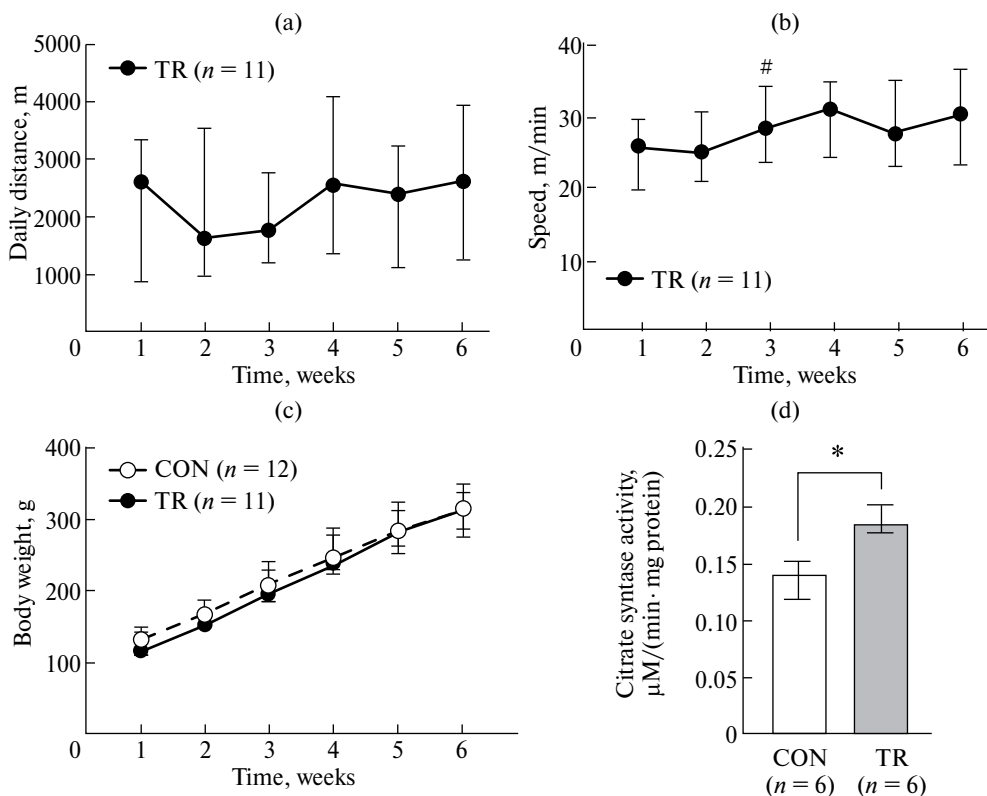


Рис. 1. Динамика показателей беговой активности (а – суточный пробег, б – скорость бега) и массы тела (с) крыс в течение эксперимента, а также активность цитратсинтазы в трехглавой мышце плеча (д). CON – контрольная группа, TR – тренированная группа. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, в скобках указано количество животных в выборке. * $p < 0.05$ по сравнению со значением на первой неделе тренировочного цикла (критерий Фридмана); * $p < 0.05$ (критерий Манна – Уитни).

скелетных мышц, желудочков сердца и надпочечников (табл. 1). Биохимические показатели сыворотки крови (содержание общего холестерина и триглицеридов) также не различались между двумя группами крыс (табл. 1). Вместе с тем активность цитрат-синтазы в трехглавой мышце плеча в результате тренировки в группе TR была значимо повышенной по сравнению с группой CON (рис. 1d).

Таблица 1. Масса органов и биохимические показатели крови у двух групп крыс в конце эксперимента

Показатели	Контроль ($n = 12$)	Тренировка ($n = 11$)
Медиальная головка икроножной мышцы, мг/100 г	231.9 ± 27.3	236.3 ± 17.2
Медиальная головка трехглавой мышцы плеча, мг/100 г	39.8 ± 10.0	40.2 ± 12.2
Правый желудочек, мг/100 г	51.5 ± 4.2	52.9 ± 5.0
Левый желудочек (с перегородкой), мг/100 г	226.5 ± 10.4	232.5 ± 18.9
Надпочечники (левый + правый), мг/100 г	15.3 ± 4.5	16.4 ± 3.0
Общий холестерин, ммоль/л	2.44 ± 0.24	2.51 ± 0.13
Триглицериды, ммоль/л	2.20 ± 0.55	2.04 ± 0.93

Примечание. Масса органов приведена к 100 г массы тела. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

Влияние тренировки на нервную регуляцию ритма сердца в покое

Уровень ЧСС в покое в группе TR был ниже, чем в группе CON (в среднем на 27 уд/мин) (рис. 2a). Наряду со снижением ЧСС для группы TR было характерно повышение мощности колебаний RR-интервала на частоте около 1.5 Гц (соответствует частоте дыхания) (рис. 2b). Общая мощность спектра RR-интервала не различалась между двумя группами крыс (CON 33.5 ± 15.6 мс², TR 35.7 ± 18.0 мс², $p > 0.05$, непарный критерий Стьюдента). Также между двумя группами не наблюдалось различий по относительной мощности спектра RR-интервала в очень низкочастотном и низкочастотном диапазонах (рис. 2c). Вместе с тем относительная мощность колебаний RR-интервала в высокочастотном диапазоне была повышенной после тренировки (рис. 2c). Соответственно соотношение мощности высокочастотных и низкочастотных колебаний RR-интервала, характеризующее вагосимпатический баланс в регуляции сердца, было значительно выше в группе TR (рис. 2d).

Влияние тренировки на регуляцию сердечного ритма при стрессе

Стрессирование животных путем подачи струи воздуха (air-jet stress) приводило к выраженному повышению ЧСС (рис. 3a). Во время 4-минутного интервала времени, предшествовавшего стрессу, ЧСС в группе TR была ниже, чем в группе CON (370 ± 27 уд/мин по сравнению с 398 ± 28 уд/мин, $p < 0.05$ по непарному критерию Стьюдента),

тогда как во время 4-минутного стресса различий между группами не наблюдалось (459 ± 77 уд/мин и 466 ± 54 уд/мин, $p > 0.05$ по непарному критерию Стьюдента). Таким образом, повышение ЧСС в ответ на стрессирующее воздействие у тренированных крыс было более выраженным, чем в контроле (рис. 3б).

Изменения вариабельности сердечного ритма при стрессе также различались у двух групп крыс. Использование метода вейвлет-анализа позволило нам охарактеризовать динамику изменения высокочастотных колебаний RR-интервала во времени. Было показано, что при стрессе амплитуда высокочастотных (связанных с дыханием) колебаний ЧСС снижается в группе TR, но не изменяется в группе CON (рис. 3с, d).

Влияние тренировки на изменения ЧСС при блокаде нервных влияний на сердце

Повышение ЧСС при введении метилатропина, который блокирует только периферические М-холинорецепторы [29, 30], у крыс группы TR было более значительным, чем в группе CON (рис. 4а). Реакции на блокаду β_1 -адренорецепторов атенололом после тренировки не изменялись (рис. 4б). Следует отметить, что при блокаде влияния

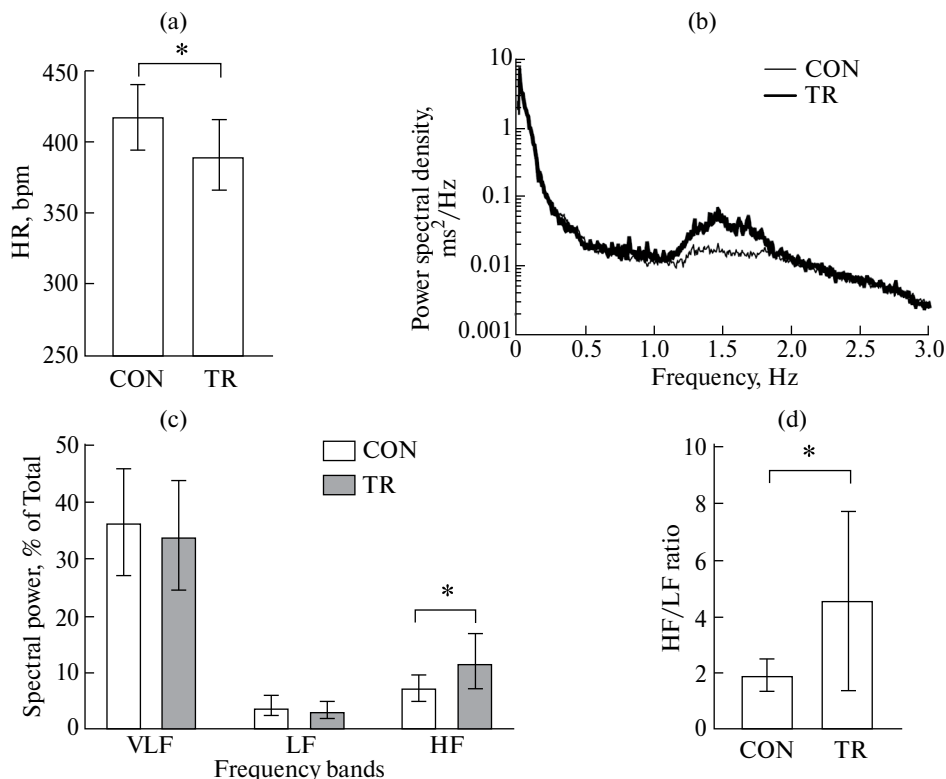


Рис. 2. Значения ЧСС и показателей спонтанной вариабельности сердечного ритма в спокойном состоянии у контрольной группы крыс (CON, $n = 12$) и тренированной группы крыс (TR, $n = 11$). На рисунках приведены результаты анализа записей ЭКГ длительностью 30–60 мин: значения ЧСС (а), спектры мощности RR-интервала (каждая линия – результат усреднения спектров мощности для всех крыс в группе) (б), значения мощности спектра в трех частотных диапазонах (с) и отношение значений мощности высокочастотных и низкочастотных колебаний (д). Частотные диапазоны: VLF – очень низкочастотный (0.05–0.25 Гц), LF – низкочастотный (0.25–0.6 Гц), HF – высокочастотный (0.75–3 Гц). Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * $p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента).

обоих отделов автономной нервной системы (введение атенолола на фоне действия атропина) уровни ЧСС у двух групп крыс не различались: CON – 415 ± 26 уд/мин, TR – 397 ± 22 уд/мин ($p > 0.05$, непарный критерий Стьюдента).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Произвольный бег в колесе является моделью аэробной физической нагрузки умеренной интенсивности

Мы исследовали изменения регуляции сердечного ритма у крыс, которые в течение довольно длительного времени (6 недель) бегали в колесе без принуждения. Величина пробега в нашей работе находилась в среднем диапазоне значений: по данным литературы, суточный пробег крыс в колесе может варьировать от 1 [6, 38] до 6–7 км и более [6, 38]. Пробег значительно варьировал в группе крыс, тогда как скорость бега различалась меньше. Следует отметить, что скорость произвольного бега отражает функциональное

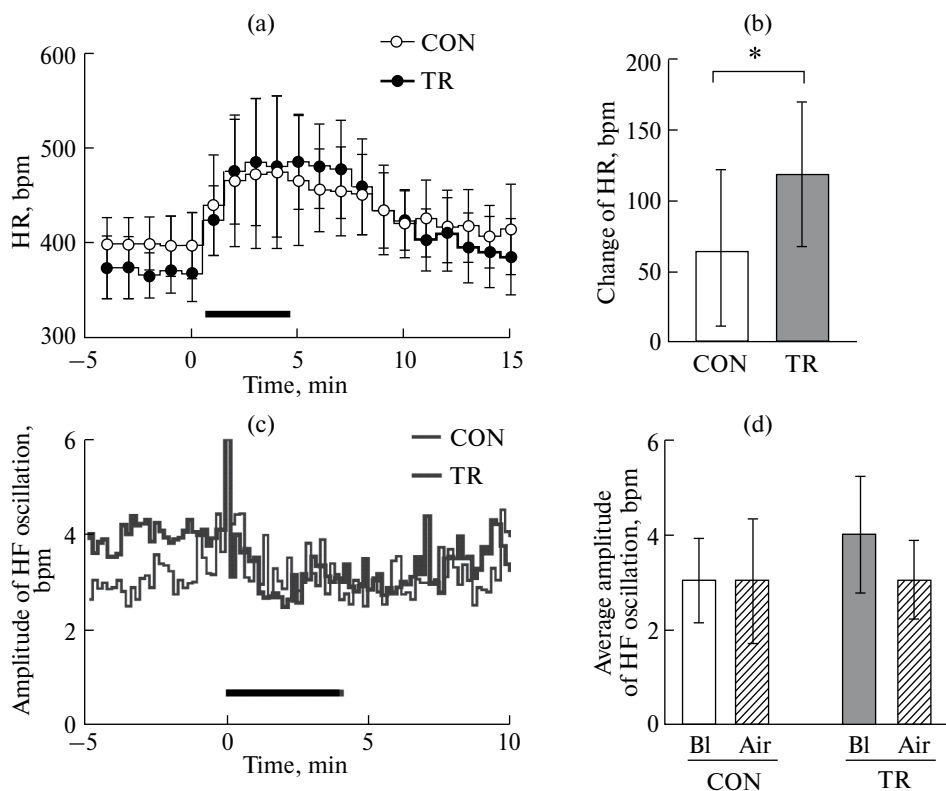


Рис. 3. Влияние air-jet стресса на ЧСС и амплитуду высокочастотных колебаний ЧСС у контрольных (CON, $n = 10$) и тренированных (TR, $n = 10$) крыс. На рисунках приведены динамика ЧСС (а), изменение ЧСС при стрессе (разность значений для двух 4-минутных интервалов – во время подачи воздуха и непосредственно перед воздействием) (б), динамика амплитуды высокочастотных колебаний ЧСС (каждая линия – результат усреднения данных для всех крыс в экспериментальной группе) (с) и значения амплитуды высокочастотных колебаний ЧСС, усредненные для двух 4-минутных интервалов – до воздействия (BL) и во время стресса (Air) (д). Период air-jet стресса (4 мин) отмечен на рисунках (а) и (с) горизонтальной линией. На рисунках а, б и д данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. * $p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента); # $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений с апостериорным тестом Сидака).

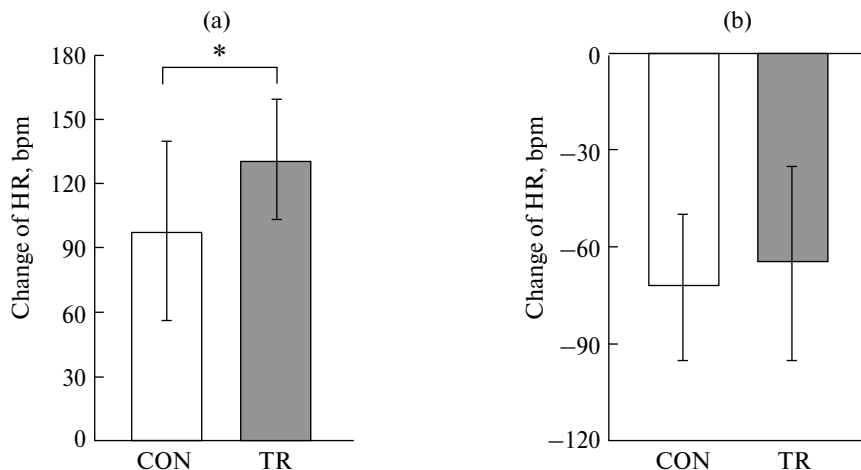


Рис. 4. Влияние блокады парасимпатических и симпатических нервных влияний на ЧСС у контрольных (CON, $n = 12$) и тренированных (TR, $n = 11$) крыс. На рисунках приведены изменения ЧСС после введения метилатропина (а) и атенолола на фоне действия метилатропина (б). Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. $*p < 0.05$ (непарный критерий Стьюдента).

состояние организма: например, у крыс с сердечной недостаточностью скорость бега в колесе в полтора раза ниже, чем у здоровых животных [39].

Нами не было выявлено различий по динамике массы тела, массе органов и показателям липидного обмена в крови между тренированной и контрольной группами крыс, что говорит об умеренном уровне беговой нагрузки в нашей работе. Вместе с тем после тренировки в локомоторной мышце наблюдалось повышение активности цитратсинтазы, что говорит о повышении окислительных возможностей мышц, характерном для тренировки выносливости [40]. Аэробный характер нагрузки при произвольной тренировке может поддерживаться на основе отрицательной обратной связи: закисление мышечного интерстиция в результате повышенной продукции лактата может вызывать у животных неприятные ощущения в мышцах и прекращение бега.

Произвольная беговая тренировка в колесе не сопровождается снижением ЧСС в условиях блокады нервных влияний на сердце

В соответствии с представлениями о влиянии регулярной аэробной нагрузки на деятельность сердца [11–15] в нашей работе уровень ЧСС в спокойном состоянии у тренированных крыс был сниженным. При тренировке в колесе снижение ЧСС в спокойном состоянии было описано ранее [9, 25], хотя и не во всех работах [38, 41]. Возможно, влияние произвольной тренировки на уровень ЧСС в покое определяется уровнем беговой нагрузки, который зависит от мотивации животных к бегу.

Различие в уровне ЧСС между тренированной и контрольной группами крыс исчезало после совместной блокады симпатических и парасимпатических кардиотропных влияний, то есть «собственная» ЧСС после тренировки не изменялась. Сходные данные были получены в работах с тренировкой крыс на тредбане [18, 20] или при аэробной нагрузке плаванием [19]. При произвольной тренировке грызунов «собственная» ЧСС также не изменяется [25], но может и снижаться [9].

Таким образом, в нашей работе умеренная беговая нагрузка умеренной интенсивности не оказывала влияния на собственную биоэлектрическую активность синоатриального узла, но, как будет рассмотрено далее, сопровождалась изменениями нервной регуляции сердца.

Произвольная беговая тренировка в колесе сопровождается усилением вагусных влияний на сердце

Опираясь на многочисленные данные литературы [11–15], мы предположили, что снижение уровня ЧСС у тренированных крыс в наших экспериментах также связано с повышением вагусных влияний на сердце. Действительно, у тренированных крыс наблюдалось увеличение высокочастотных (связанных с дыханием) колебаний RR-интервала. Мощность колебаний сердечного ритма мы оценивали относительно общей мощности спектра, что позволило учесть различие в длительности RR-интервала между двумя группами крыс: как известно, чем больше среднее значение RR-интервала, тем выше его вариабельность [33, 42, 43]. Высокочастотные колебания сердечного ритма синхронны с дыхательными движениями и являются отражением респираторной синусовой аритмии, мощность таких колебаний значительно снижается после блокады парасимпатических влияний [34, 44]. Напротив, повышение мощности высокочастотных колебаний сердечного ритма связывают с усилением кардиотропных вагусных влияний [14, 15]. В экспериментах на животных повышение респираторной синусовой аритмии было показано после принудительной физической тренировки плаванием [17] или на тредбане [20]. После длительной беговой нагрузки в колесе мощность высокочастотных колебаний сердечного ритма также повышается [9, 25], но не изменяется, если пробег крыс очень низкий – менее 1 км за сутки [38].

В низкочастотном диапазоне колебания сердечного ритма у крыс, как и у человека [45], имеют смешанную симпато-парасимпатическую природу: они уменьшаются при блокаде как симпатических, так и парасимпатических влияний [34]. Соответственно отношение значений мощности высокочастотных (парасимпатической природы [34]) и низкочастотных («смешанной» природы) колебаний сердечного ритма может служить мерой вагосимпатического баланса в регуляции сердца. У тренированных крыс это отношение было значительно повышенным, что говорит об усилении вагусной регуляции сердца после бега в колесе.

Повышение ЧСС под действием М-холинолитика также увеличивалось под влиянием произвольной беговой тренировки. Такие изменения уже были описаны для крыс при тренировке плаванием [17, 19] и на тредбане [18, 46]. Однако, насколько нам известно, после беговой тренировки в колесе увеличение тахикардии, вызванной атропином, ранее было показано только у мышей, причем в состоянии наркоза [25].

По данным недавно опубликованной работы, тренировка в колесе в течение 6 недель сопровождается повышением активности преганглионарных парасимпатических нейронов в фоне, а также при активации механорецепторов в мышцах при их сокращениях, вызванных электрическим раздражением седалищного нерва (эксперименты приводились на наркотизированных крысах) [13]. Таким образом, произвольная тренировка может изменять функционирование центрального звена парасимпатической регуляции сердца. Состояние периферического звена при аэробной тренировке также может изменяться: после бега на тредбане реакции ЧСС на раздражение эфферентных волокон вагуса уменьшаются при использовании высокой тренировочной нагрузки [24], но становятся более выраженными при умеренной нагрузке [18]. Можно предположить, что «умеренная» тренировка в колесе также приводит к повышению эффективности парасимпатической нейротрансмиссии в сердце, но напрямую этот вопрос пока не исследован.

Таким образом, произвольная тренировка крыс в колесе сопровождается усилением вагусной регуляции сердечного ритма. Очевидных изменений симпатической регуляции сердца в нашей работе не наблюдалось, как и в других работах [18, 46], хотя при более интенсивной тренировочной нагрузке симпатический тонус может снижаться [17, 25].

Произвольная тренировка в колесе способствует расширению диапазона регуляции ЧСС при функциональной нагрузке

Известно, что у людей снижение базального уровня ЧСС в результате тренировки выносливости создает резерв для более выраженной тахикардии при функциональной нагрузке, так как максимальная ЧСС остается неизменной [14]. В нашей работе повышение ЧСС при оборонительной реакции, вызванной эмоциональным (air-jet) стрессом, у тренированных крыс также было более выраженным, чем в контроле. В ранее опубликованной работе сходные изменения регуляции сердца (снижение ЧСС в покое и увеличение реакции ЧСС на стресс) у тренированных к бегу в колесе крыс наблюдались при иммобилизации в рестрейнере [9]. Следует отметить, что если уровень ЧСС в спокойном состоянии при тренировке в колесе не снижается, реакции ЧСС на стресс у тренированных крыс могут быть такими же или даже меньше, чем в контроле [41]. Причиной увеличения реакции ЧСС на стресс у тренированных крыс в нашей работе могло служить более выраженное снижение вагусной активности, уровень которой в спокойном состоянии после тренировки был выше. С такой точкой зрения согласуются результаты проведенного нами вейвлет-анализа, который позволяет оценивать временную динамику амплитуды колебаний определенной частоты [34]. Во время стресса у тренированных крыс, в отличие от контрольных, происходило снижение респираторной синусовой аритмии, что указывает на подавление влияний вагуса на сердце. Такое снижение могло происходить в результате формирования ориентировочно-оборонительной реакции, которая часто сопряжена с напряжением локомоторных мышц и активацией мышечного механорефлекса, влияние которого угнетает вагусную активность [13].

Подводя итог полученным результатам, можно сказать, что беговая тренировка крыс в колесе не вызывает ремоделирования самого сердца (его гипертрофии или изменения собственной биоэлектрической активности клеток синоатриального узла), но сопровождается изменениями нервной регуляции сердечного ритма, характерными для аэробной тренировки умеренной интенсивности. Такая тренировка приводит к усилению кардиотропных парасимпатических влияний в покое и, следовательно, способствует расширению диапазона изменений ритма сердца при функциональной нагрузке. С учетом данных о связи вагусного тонуса с аэробной работоспособностью организма [47] и о его кардиопротекторном влиянии [48], можно полагать, что такой «регуляторный» тип адаптации благоприятен для функционирования сердца. Следует отметить, что при сердечно-сосудистых патологиях изменения нервной регуляции сердца развиваются при использовании менее интенсивной тренировочной нагрузки, чем в здоровом организме [16, 49, 50], порог для развития нежелательного состояния перетренированности в этом случае также ниже [51]. Проведение тренировок в режиме произвольного выбора нагрузки самим индивидуумом (в зависимости от его текущего функционального состояния) должно снижать риск развития состояния перетренированности. Соответственно использование экспериментальной модели такой тренировки (бег крыс в колесе) может служить информативным подходом к изучению механизмов влияния произвольной физической тренировки на функционирование сердечно-сосудистой и других систем организма человека.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. А. Б., Е. К. С., О. Л. В., О. С. Т.), сбор данных (А. А. Б., Е. К. С., И. В. К., О. С. Т.), обработка данных (А. А. Б., Е. К. С., И. В. К., А. С. Б., О. С. Т.), написание и редактирование статьи (А. А. Б., Е. К. С., И. В. К., А. С. Б., О. Л. В., О. С. Т.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда фундаментальных исследований (проект № 23-15-00331). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 648 от 28.09.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li G, Li J, Gao F (2020) Exercise and Cardiovascular Protection. *Adv Exp Med Biol* 1228: 205–216. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_14
2. Rueggsegger GN, Booth FW (2018) Health Benefits of Exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A029694>
3. Poole D, Copp S, Colburn T, Craig J, Allen D, Sturek D, O'Leary D, Zucker I, Musch T (2020) Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318: H1100–H1138. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00697.2019>
4. Borzykh AA, Kuzmin IV, Nesterenko AM, Selivanova EK, Martyanov AA, Nikolaev GM, Mamonov PA, Sharova AP, Tarasova OS (2017) Dynamics of rats' voluntary run characteristics following 8 weeks of training. *Aviakosmich Ekol Med* 51: 66–73. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2017-51-3-66-73>
5. Borzykh AA, Gaynullina DK, Shvetsova AA, Kiryukhina OO, Kuzmin IV, Selivanova EK, Nesterenko AM, Vinogradova OL, Tarasova OS (2022) Voluntary wheel exercise training affects locomotor muscle, but not the diaphragm in the rat. *Front Physiol* 13: 1003073. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1003073>
6. Sato C, Tanji K, Shimoyama S, Chiba M, Mikami M, Koeda S, Sumigawa K, Akahira K, Yamada J (2020) Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats. *Neuroreport* 31: 189–196. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001396>
7. Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng X-X, Tong K-Y (2011) The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One* 6: e16643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016643>
8. Pósa A, Szabó R, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka A, Veszelka M, Gyöngyösi M, Radák Z, Ménéser R, Pávó I, Berkó AM, Varga C (2015) Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 876805. <https://doi.org/10.1155/2015/876805>
9. Beig MI, Callister R, Saint DA, Bondarenko E, Walker FR, Day TA, Nalivaiko E (2011) Voluntary exercise does not affect stress-induced tachycardia, but improves resistance to cardiac arrhythmias in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38: 19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05456.x>
10. Gaynullina DK, Borzykh AA, Sofronova SI, Selivanova EK, Shvetsova AA, Martyanov AA, Kuzmin IV, Tarasova OS (2018) Voluntary exercise training restores anticontractile effect of NO in coronary arteries of adult rats with antenatal/early postnatal hypothyroidism. *Nitric Oxide* 74: 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.01.001>
11. Gourine AV, Ackland GL (2019) Cardiac vagus and exercise. *Physiology* 34: 71–80. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2018>
12. Carnevali L, Sgoifo A (2014) Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. *Front Physiol* 5: 118. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00118>
13. Korsak A, Kellett DO, Aziz Q, Anderson C, D'Souza A, Tinker A, Ackland GL, Gourine AV (2023) Immediate and sustained increases in the activity of vagal preganglionic neurons during exercise and after exercise training. *Cardiovasc Res* 119: 2329–2341. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad115>
14. Coote JH (2010) Recovery of heart rate following intense dynamic exercise. *Exp Physiol* 95: 431–440. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.047548>

15. Coote JH, White MJ (2015) CrossTalk proposal: Bradycardia in the trained athlete is attributable to high vagal tone. *J Physiol* 593: 1745–1747.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284364>
16. Neto OB, de Sordi CC, da Mota GR, Marocolo M, Chrighuer RS, da Silva VJD (2017) Exercise training improves hypertension-induced autonomic dysfunction without influencing properties of peripheral cardiac vagus nerve. *Auton Neurosci Basic Clin* 208: 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.09.012>
17. Tezini GCSV, Dias DPM, Souza HCD (2013) Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. *Exp Gerontol* 48: 147–153.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.11.009>
18. Mizuno M, Kawada T, Kamiya A, Miyamoto T, Shimizu S, Shishido T, Smith SA, Sugimachi M (2011) Exercise training augments the dynamic heart rate response to vagal but not sympathetic stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: 969–977.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00768.2010>
19. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC (2004) Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazil J Med Biol Res* 37: 1909–1917.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004001200018>
20. Hsu YC, Tsai SF, Yu L, Chuang JJ, Wu F Sen, Jen CJ, Kuo YM (2016) Long-term moderate exercise accelerates the recovery of stress-evoked cardiovascular responses. *Stress* 19: 125–132.
<https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1108305>
21. Vinogradova OL, Borovik AS, Zhedyaev RYu, Tarasova OS (2024) Respiratory sinus arrhythmia: physiological mechanisms and relationship with systemic blood pressure fluctuations. *Human Physiology* 50: 276–284.
<https://doi.org/10.1134/S0362119724700749>
22. D'Souza A, Bucchi A, Johnsen AB, Logantha SJRJ, Monfredi O, Yanni J, Prehar S, Hart G, Cartwright E, Wisloff U, Dobryznski H, Difrancesco D, Morris GM, Boyett MR (2014) Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat Commun* 5:3775.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4775>
23. D'Souza A, Sharma S, Boyett MR (2015) CrossTalk opposing view: Bradycardia in the trained athlete is attributable to a downregulation of a pacemaker channel in the sinus node. *J Physiol* 593: 1749–1751.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284356>
24. Negrão CE, Moreira ED, Santos MCLM, Farah VMA, Krieger EM (1992) Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* 72: 1749–1753.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.5.1749>
25. Lakin R, Guzman C, Izaddoustdar F, Polidovitch N, Goodman JM, Backx PH (2018) Changes in Heart Rate and Its Regulation by the Autonomic Nervous System Do Not Differ Between Forced and Voluntary Exercise in Mice. *Front Physiol* 9: 841.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00841>
26. Andreev-Andrievskiy AA, Popova AS, Borovik AS, Dolgov ON, Tsvirkun DV, Custaud M, Vinogradova OL (2014) Stress-associated cardiovascular reaction masks heart rate dependence on physical load in mice. *Physiol Behav* 132: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.033>
27. Тарасова ОС, Борзых АА, Кузьмин ИВ, Боровик АС, Лукошкова ЕВ, Шарова АП, Виноградова ОЛ, Григорьев АИ (2012) Динамика изменения частоты сердечных сокращений у крыс при ступенчатом изменении скорости бега по беговой дорожке. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 98: 1372–1379. [Tarasova OS, Borzykh AA, Kuz'min IV, Borovik AS, Lukoshkova EV, Sharova AP, Vinogradova OL, Grigor'ev AI (2012) Dynamics of heart rate changes in rats following stepwise change of treadmill running speed. *Russ J Physiol* 98: 1372–1379. (In Russ)].
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23431767>
28. Zhang ZQ, Julien C, Barrès C (1996) Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv Syst* 60: 23–30.
[https://doi.org/10.1016/0165-1838\(96\)00023-9](https://doi.org/10.1016/0165-1838(96)00023-9)
29. Witter A, Slangen JL, Terpstra GK (1973) Distribution of 3H-methylatropine in rat brain. *Neuropharmacology* 12: 835–841.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(73\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0028-3908(73)90036-1)
30. Brezenoff H, Xiao Y-F, Vargas H (1988) A comparison of the central and peripheral antimuscarinic effects of atropine and methylatropine injected systemically and into the cerebral ventricles. *Life Sci* 42: 905–911.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90389-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90389-x)

31. *Cerutti C, Barres C, Paultre C* (1994) Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol Circ Physiol* 266: H1993–H2000.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.5.H1993>
32. *Stauss HM* (2007) Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 362–368.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04588.x>
33. *Sacha J* (2014) Interaction between heart rate and heart rate variability. *Ann Noninvasiv Electrocardiol* 19: 207–216.
<https://doi.org/10.1111/anec.12148>
34. *Negulyaev VO, Tarasova OS, Tarasova NV, Lukoshkova EV, Vinogradova OL, Borovik AS* (2019) Phase synchronization of baroreflex oscillations of blood pressure and pulse interval in rats: the effects of cardiac autonomic blockade and gradual blood loss. *Physiol Meas* 40: 054003.
<https://doi.org/10.1088/1361-6579/ab10d6>
35. *Cohen AH, Gans C* (1975) Muscle activity in rat locomotion: movement analysis and electromyography of the flexors and extensors of the elbow. *J Morphol* 146: 177–196.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051460202>
36. *Srere PA* (1969) Citrate Synthase. In: *Methods in Enzymology*. Acad Press. New York. 3–11.
37. *Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A* (2007) G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39: 175–191.
<https://doi.org/10.3758/BF03193146>
38. *Kumae T* (2012) Assessment of training effects on autonomic modulation of the cardiovascular system in mature rats using power spectral analysis of heart rate variability. *Environ Health Prev Med* 17: 415–422.
<https://doi.org/10.1007/s12199-012-0272-z>
39. *Schultz RL, Kullman EL, Waters RP, Huang H, Kirwan JP, Gerdes AM, Swallow JG* (2013) Metabolic adaptations of skeletal muscle to voluntary wheel running exercise in hypertensive heart failure rats. *Physiol Res* 62: 361–369.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932330>
40. *Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR* (2014) Integrative biology of exercise. *Cell* 159: 738–749.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.029>
41. *Morimoto K, Tan N, Nishiyasu T, Sone R, Murakami N* (2000) Spontaneous wheel running attenuates cardiovascular responses to stress in rats. *Pflugers Arch* 440: 216–222.
<https://doi.org/10.1007/s004240000265>
42. *Stauss HM* (2014) Heart rate variability: Just a surrogate for mean heart rate? *Hypertension* 64: 1184–1186.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03949>
43. *Monfredi O, Lyashkov AE, Johnsen AB, Inada S, Schneider H, Wang R, Nirmalan M, Wisloff U, Maltsev VA, Lakatta EG, Zhang H, Boyett MR* (2014) Biophysical characterization of the underappreciated and important relationship between heart rate variability and heart rate. *Hypertension* 64: 1334–1343.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03782>
44. *Obrezchikova MN, Tarasova OS, Borovik AS, Koshelev VB* (2000) Adaptation to periodic high-altitude hypoxia inhibits baroreflex vagal bradycardia in rats. *Bull Exp Biol Med* 129: 327–329.
<https://doi.org/10.1007/BF02439257>
45. *Camm A, Malik M, Bigger J* (1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* 17: 354–381.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8598068/>
46. *Negrao CE, Moreira ED, Brum PC, Denadai ML, Krieger EM* (1992) Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. *Brazil J Med Biol Res* 25: 1045–1052.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1342828>
47. *Machhada A, Trapp S, Marina N, Stephens RCM, Whittle J, Lythgoe MF, Kasparov S, Ackland GL, Gourine AV* (2017) Vagal determinants of exercise capacity. *Nat Commun* 2017 81(8): 1–7.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15097>
48. *Machhada A, Hosford PS, Dyson A, Ackland GL, Mastitskaya S, Gourine AV* (2020) Optogenetic Stimulation of Vagal Efferent Activity Preserves Left Ventricular Function in Experimental Heart Failure. *JACC Basic to Transl Sci* 5: 799–810.
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.06.002>

-
49. Ichige MHA, Santos CR, Jordão CP, Ceroni A, Negrão CE, Michelini LC (2016) Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. *J Physiol* 594: 6241–6254.
<https://doi.org/10.1113/JP272730>
 50. Dellacqua LO, Gomes PM, Batista JS, Michelini LC, Antunes VR (2024) Exercise-induced neuroplasticity in autonomic nuclei restores the cardiac vagal tone and baroreflex dysfunction in aged hypertensive rats. *J Appl Physiol* 136: 189–198.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00433.2023>
 51. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, Raglin J, Rietjens G, Steinacker J, Urhausen A, European College of Sport Science, American College of Sports Medicine (2013) Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc* 45: 186–205.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318279a10a>

Comprehensive Analysis of Voluntary Wheel Training Effects on Neural Control of The Heart Rate in Rats

A. A. Borzykh^a, E. K. Selivanova^b, A. S. Borovik^a, I. V. Kuzmin^b, O. L. Vinogradova^a,
O. S. Tarasova^{a, b, *}

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

^b*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

*e-mail: ost.msu@gmail.com

Aerobic physical training is used to prevent and correct many cardiovascular disorders. To study the effects of such physical exercise, various methods of training are used in rodents, among which voluntary wheel running is of particular interest, because it is close to the natural rat locomotion in terms of the pattern of motor activity and is devoid of stressful influence. The aim of this work was a comprehensive study of the effects of wheel running on the nervous control of heart rate (HR) in rats. At the age of 6 weeks, the animals were divided into two groups: training (TR, free access to wheels, $n = 11$) and sedentary control (CON, $n = 12$). After 6 weeks of training, ECG was recorded in freely moving rats using skin electrodes in baseline, after blockade of cardiac nervous influences and under air-jet stress (4 min). The effects of the autonomic nervous system were analyzed by administering a $\beta 1$ -adrenergic blocker and a peripherally acting M-cholinoceptor blocker, and by analyzing cardiac rhythm variability using spectral and wavelet analyses. TR group showed a decrease in the baseline HR level compared to the CON group. The decrease in HR upon administration of atenolol (2 mg/kg) did not differ between the groups, but methylatropine (1 mg/kg) caused a more significant increase in HR in the TR group than in the CON group. With the combined action of atenolol and methylatropine, HR levels did not differ between the groups. The rats of the TR group showed an increase in the contribution of high-frequency (0.75–3 Hz) oscillations to the total spectrum power of the RR interval. During air-jet stress, TR group showed a more pronounced increase in HR compared to the CON group. In addition, in the TR group, a decrease in the amplitude of HR high-frequency oscillations was observed during stress, while in the CON group, such a decrease was absent. Thus, the voluntary wheel running is accompanied in the rat by an increase in parasympathetic influences on the heart, which is manifested in an increase in respiratory sinus arrhythmia and in an increase in vagal influence on the resting HR level. Moderate bradycardia at rest provides the possibility of a more pronounced increase in HR during emotional stress because of the suppression of parasympathetic cardiac influences.

Keywords: rat, exercise training, sympathetic nervous system, parasympathetic nervous system, spectral analysis, wavelet analysis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПОВРЕЖДЕНИЕ МОЗГА ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ
В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА
У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА БЕЛКА ПАННЕКСИНА 1**

© 2024 г. М. А. Николаенко¹, М. В. Гуляев¹, А. А. Волкова^{1,2}, Л. Р. Горбачева^{1,2,*}

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

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова
Минздрава России, Москва, Россия

* E-mail: gorbi67@mail.ru

Поступила в редакцию 06.08.2024 г.

После доработки 11.10.2024 г.

Принята к публикации 14.10.2024 г.

Сахарный диабет, наряду с ишемией, входит в десятку патологий, являющихся причиной смертности населения планеты, по последним данным ВОЗ. Данные клинических исследований выявили высокий риск инсульта и инфаркта у пациентов, страдающих диабетом. Вместе с тем в настоящее время нет четкого представления об участии белка паннексина 1 (Panx1) в ишемии мозга на фоне диабета. В представленном исследовании с использованием линии мышей с нокаутом гена Panx1 на моделях стрептозотоцин-вызванного диабета и фотоиндуцированной ишемии было изучено влияние белка Panx1 на выраженность ишемического поражения мозга и системное воспаление у мышей на фоне сочетания ишемии мозга и диабета. Установлено, что в условиях экспериментального диабета нокаут гена Panx1 значительно снижает размер ишемического очага, стабилизирует вызванное ишемией повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, снижает количество ошибок животных в сенсомоторном тесте и уровень нейтрофилов в крови. Важно отметить, что нокаут Panx1 проявляет протекторное действие только на фоне сахарного диабета, не оказывая значимого воздействия на выраженность ишемического поражения мозга у мышей без стрептозотоцин-вызванного диабета. Нокаут гена Panx1 также не влиял на выраженность гипергликемии у животных в этой модели диабета. Можно предположить, что эффективность лечения инсульта в сочетании с сахарным диабетом может быть повышена включением в комплексную терапию блокаторов паннексиновых каналов как нового направления лечения таких тяжелых заболеваний.

Ключевые слова: диабет, ишемия, паннексин 1, фототромбоз, нокаут, воспаление

DOI: 10.31857/S08698139241000105, **EDN:** VREWNE

ВВЕДЕНИЕ

Инсульт является одной из основных причин смертности населения планеты, составляя 11% от общего числа смертей за 2020 г. [1]. К настоящему времени сахарный диабет (СД) также вошел в список десяти основных причин смертности населения [2]. При этом СД дает двукратный избыточный риск для широкого спектра сосудистых за-

болеваний, включая инсульт [3]. Данные клинических исследований указывают на повышение риска неблагоприятного краткосрочного исхода инсульта у больных на фоне диабета [4], что свидетельствует о необходимости дополнительного обследования и коррекции фармакотерапии с учетом наличия данного заболевания у пациентов с инсультом. На данный момент отсутствуют специфические терапевтические подходы для лечения последствий ишемического инсульта, осложненного диабетом, а признанные методы терапии инсульта ограничены тромболизом. Поэтому остается актуальной как для фундаментальной, так и для клинической медицины задача поиска новых мишеней коррекции такого состояния.

Одной из таких мишеней могут быть открытые в 2000 г. каналы, сформированные белком паннексином-1 (Panx1). В физиологических условиях эти каналы участвуют в транспорте нуклеотидов как из нейронов и астроцитов, так и из эндотелия сосудов и эритроцитов в условиях недостатка кислорода [5]. Данные литературы свидетельствуют о вовлечении данного белка в ряд патологических реакций при ишемии, таких как нарушение ионного гомеостаза, потенцирование глутаматной эксайтотоксичности, кальциевой перегрузки клеток [6]. Однако данные экспериментов *in vivo* не дают однозначного ответа об участии Panx1 в ишемическом повреждении головного мозга. Было показано, что нокаут Panx1 не влиял на выраженность повреждения мозга в модели окклюзии средней мозговой артерии (МСАО) у мышей [7]. В то же время были продемонстрированы протекторные эффекты как блокады канала Panx1 инъекциями мефлохина и пробеницида, так и системного нокаута гена данного белка в модели кратковременной МСАО на мышах, что выражалось в уменьшении очага повреждения, нейровоспаления, реактивности микроглии и сенсомоторного дефицита, уменьшении отека за счет снижения экспрессии аквапорина-4 и повышения выживаемости нейронов [8, 9]. В работе Freitas-Andrade с соавт. сообщалось о проявлении протекторного действия нокаута данного белка только у самок мышей в модели постоянной МСАО, что авторы связывают с вовлечением Panx1 в передачу сигнала от эстрогеновых рецепторов типа β . При этом у самок линии дикого типа, на основе которой был сделан тотальный нокаут, общая экспрессия Panx1 в условиях ишемии была выше, чем у самцов [10].

Таким образом, несмотря на существующие данные о вовлеченности каналов, формируемых Panx1, в развитие ишемического поражения, эксперименты на животных с использованием модели МСАО не дают однозначного представления о протекторной роли блокады комплекса Panx1 или нокаута гена данного белка. Сами авторы исследований отмечают, что противоречивость полученных результатов в значительной степени может быть связана с использованием различных экспериментальных подходов к моделированию ишемического инсульта. В связи с этим становится очевидным, что для всестороннего исследования участия каналов Panx1 в развитии ишемического поражения мозга необходимо использовать различные модели данной патологии. В этом отношении фотоиндуцированная ишемия является одной из наиболее перспективных моделей ишемического инсульта ввиду малоинвазивности и высокой воспроизводимости четко заданной локализации ишемического очага [11].

Наряду с ишемией, в десятку патологий, являющихся причиной смерти населения планеты, по последним данным ВОЗ, входит СД. Пациенты, страдающие диабетом, входят в группу риска развития инсульта и инфаркта. В литературе мы не обнаружили данных о вовлечении Panx1 в развитие ишемического поражения мозга на фоне СД. Однако было показано, что экспрессия Panx1 была повышена как в мозге крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, так и в культуре нейронов через 24 ч после воздействия среды с высокой концентрацией глюкозы. Обработка культуры пробенцидом, блокирующим каналы Panx1, в гипергликемических условиях снижала содержание активной каспазы-1 и уровень секреции IL-18, повышала жизнеспособность нейронов. В качестве механизма, посредством которого каналы Panx1 вносят вклад в воспаление на фоне повышенного уровня глюкозы, авторы рассматривают паннек-

син-зависимую активацию рецепторных белков инфламмасом NLRP. АФК, продукция которых повышается при гипергликемии, могут увеличивать проводимость поры канала Panx1. В то же время окислительный стресс, сопровождающий диабет, индуцирует появление молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), которые проникают в клетку через расширенную пору канала и активируют рецепторные белки NLRP, опосредуя сборку инфламмасама [12]. Наличие в литературе данных о протекторной роли блокады каналов Panx1 в нейронах на фоне гипергликемии указывает на возможность участия данного белка в диабет-индуцированных изменениях физиологических процессов в нервной ткани.

Несмотря на то, что каналы Panx1 представляют собой перспективную и активно изучаемую мишень коррекции патологий, нами не обнаружено данных о его роли в ишемии мозга на фоне СД, в связи с чем представляется актуальной задача выяснения его роли в условиях сочетания этих патологий.

Цель работы – изучить влияние нокаута гена Panx1 на последствия ишемии головного мозга у мышей в модели стрептозототин-индуцированного диабета.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Эксперименты были проведены на самцах мышей линии C57BL/6J и родственной линии с нокаутом гена паннексина-1 (Panx1^{–/–}) (любезно предоставлены Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск [13]) массой 20–35 г в возрасте 10–12 недель. Животных содержали в условиях вивария с контролируемой температурой 22 °С и режимом освещения 12 ч свет (9:00–21:00)/12 ч темнота без ограничения доступа к воде.

Использованные вещества и препараты

Во всех процедурах с наркотизированными животными, кроме магнитно-резонансной томографии (МРТ), в качестве общей анестезии использовали смесь коммерческих препаратов «Золетил100 ©» (VirbacSanteAnimale, Франция) и «Ксила ©» (Interchemiewerken «DeAdelaar» B.V., Нидерланды) в дозах 35 и 3.5 мг/кг (в/б) соответственно. Во время проведения МРТ использовали ингаляционный наркоз (Изофлуран, Laboratorios Karizoo, Испания). Для моделирования диабета был использован неселективный токсичный алкилирующий агент стрептозототин (Sigma Aldrich Co., США). В качестве фотосенсибилизатора при моделировании ишемического инсульта использовали 0.15%-ный раствор бенгальского розового (БР, Sigma Aldrich Co., США). Для измерения проницаемости гематоэнцефалического барьера использовали 2.4%-ный раствор красителя Эванса синего (ЭС, Sigma Aldrich Co., США), а также диметилсульфоксид (ДМСО) (MPBiochemicals, Франция). При оценке соотношения числа нейтрофилов и лимфоцитов препарат фиксировали метанолом (FisherChemical, Германия) и окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия).

Моделирование ишемии мозга на фоне сахарного диабета

Животных случайным образом разделяли на 4 группы, по ≥ 5 животных в каждой: две группы без диабета, дикого типа (WT) и с нокаутом гена паннексина-1 (KO), и две группы со стрептозототин-индуцированным диабетом тех же линий (WTd и KOd). Животных содержали в условиях вивария с контролируемой температурой 22 °С и режимом освещения 12 ч свет (9:00–21:00)/12 ч темнота без ограничения доступа к воде и к стандартному комбикорму, за исключением дней измерения уровня глюкозы, когда за 3 ч до измерения животным ограничивали доступ к корму. У всех животных до начала эксперимента определяли базовый уровень глюкозы в крови, массу тела,

соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в мазке крови. Диабет индуцировали серией внутрибрюшинных инъекций стрептозотоцина, растворенного в натрий-цитратном буфере (рН 4.5) в дозе 55 мг/кг, ежедневно в течение 5 последовательных дней. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили растворитель в эквивалентном объеме. Уровень глюкозы у животных измеряли с помощью глюкометра Diacont Classic 2598 (OK Biotech Co., Ltd., Тайвань) на 8-, 10-, 12- и 16-й дни. Критерием развития устойчивой гипергликемии был уровень глюкозы 16.7 мМ (300 мг/дл) на момент последнего измерения (перед катетеризацией яремной вены) [14]. Каплю крови для анализа в глюкометре отбирали пункцией латеральной вены хвоста с помощью иглы 27G. Животных взвешивали ежедневно в первые две недели с первой инъекции стрептозотоцина и ежедневно после операции катетеризации яремной вены. Животным ограничивали доступ к корму на 4–6 ч в вечернее время в дни инъекций стрептозотоцина и измерения концентрации глюкозы.

На 13-й день после первой инъекции стрептозотоцина всем животным проводили операцию введения полиуретанового катетера во внутреннюю яремную вену для последующего моделирования ишемического инсульта посредством фототромбоза (ФТ) по ранее описанной методике [15]. Через двое суток после катетеризации с помощью стереотаксической установки устанавливали лазер (λ 532 нм, диаметр апертуры 3 мм, величина освещенности на поверхности черепа 55–60 лк, Viacho, Китай) так, чтобы он светил в область сенсомоторной коры ($ML = -2.2$ мм, $AP = 0$ мм [16]). В качестве фотосенсибилизатора использовали 0.15%-ный раствор бенгальского розового (БР, Sigma, США), который вводили внутривенно через катетер в дозе 10 мг/кг в течение 15 с (объем введения не превышал 300 мкл), и через 3 минуты включали лазерную установку на 5 мин.

Измерение объема ишемического поражения головного мозга

Объем повреждения головного мозга, вызванного ишемией, оценивали с помощью МРТ через 48 ч после фототромбоза на томографе BRUKER BioSpec 70/30 USR (Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл, на основе T2-взвешенных изображений. Область сканирования 16 срезов толщиной 0.4 мм составила 18×18 мм², матрица сканирования – 180×180 , общее время сканирования для каждого животного не превышало 30 мин. Изображения серий фронтальных срезов мозга анализировали в программе ImageJ (National Institutes of Health, США). Чтобы скорректировать вычисляемый объем с учетом отека поврежденного полушария, вводили множитель $1/k$. Степень отека ипсилатерального повреждению полушария (k) подсчитывали по формуле $k = d^*(\sum A_{\text{ипсилат.}} / \sum A_{\text{контралат.}})$, где $\sum A_{\text{ипсилат.}}$ и $\sum A_{\text{контралат.}}$ – сумма площадей ипсилатерального и контралатерального полушария в серии срезов толщиной d . Объем поражения определяли по формуле $(d^* \sum A)/k$, где $\sum A$ – сумма площадей области повреждения в серии срезов толщиной d .

Измерение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)

Для измерения проницаемости ГЭБ через сутки после ФТ животным внутривенно через катетер вводили 2.4%-ный раствор витального красителя Эванса синего (ЭС, Sigma, США) в дозе 80 мг/кг (объем введения не превышал 150 мкл). Далее через сутки проводили транскардиальную перфузию гепаринизированным физиологическим раствором (40 ед/мл) по стандартной методике [17] для выведения крови и красителя ЭС из кровеносного русла. Проницаемость ГЭБ оценивали по предложенной ранее методике, определяя содержание ЭС в гомогенате выделенных полушарий мозга животных после экстракции красителя в ДМСО (MPBiochemicals, Франция) на термошейкере (48 ч, 37 °С) и центрифугирования (9000 g, 25 мин) с последующим определением оптической плотности (λ 620 нм) полученного экстракта [18]. На основе калибровочного графика рассчи-

тывали концентрацию красителя в образце (массу красителя, содержащуюся в 100 мг ткани мозга) и вычисляли его относительное содержание в ипсилатеральном полушарии (в контралатеральном полушарии данный показатель был принят за 100%) [14].

Тест «Решетка»

Для оценки неврологического статуса непосредственно перед и через двое суток после фототромбоза проводили сенсомоторный тест «Решетка» [19]. На 5-минутной видеозаписи подсчитывали два параметра: общую двигательную активность животного, оцениваемую как число шагов, которые мышь совершает задней ипсилатеральной конечностью – n общ., и число случаев свободного проскальзывания лап мыши в ячейки – n (моторные ошибки). Вычисляли число моторных ошибок, нормированное на 100 шагов животного, по формуле $(n/n \text{ общ.} \times 100)$, результаты представляли в виде разности соответствующих показателей до и после индукции ишемии: $(n \text{ после}/n \text{ общ.} - n \text{ до}/n \text{ общ.}) \times 100$.

Оценка воспалительного статуса животных

Для оценки системного воспаления определяли процентное соотношение нейтрофилов в мазках крови из латеральной хвостовой вены у мышей исследуемых групп. Референсными значениями для взрослых мышей линии C57BL/6J считали: сегментоядерные нейтрофилы: 8–20%, лимфоциты 76–91% [20]. Каплю крови наносили на предметное стекло и делали тонкий мазок пластиковым шпательем. После высушивания на воздухе препарат фиксировали метанолом (FisherChemical, Германия) и высушивали в химическом шкафу с вытяжкой, а затем окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 7 мин. Затем стекла промывали водой, удаляя остатки красителя. Число лимфоцитов и нейтрофилов подсчитывали на микроскопе (ЛОМО, Россия) вручную с помощью программы WBC Counter (Kazuyoshi Sasaoka, Япония). Для каждого мазка подсчет клеток продолжали до достижения общего числа лейкоцитов 100, после чего рассчитывали процент нейтрофилов, поскольку именно его увеличение отражает выраженность воспалительного процесса.

Статистический анализ

Статистический анализ был выполнен с использованием программы GraphPadPrism 8.4.3 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения полученных данных определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непарного t -теста или трехфакторного дисперсионного анализа. Множественные сравнения проводили с помощью апостериорного теста Шидака. Для исключения выпадающих значений использовали метод ROUT. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика развития стрептозотоцин-вызванного диабета у мышей

Используемый нами протокол введения стрептозотоцина приводил к развитию диабета у животных на 10–12-й день эксперимента, что подтверждалось стойким повышением уровня глюкозы (рис. 1). Концентрация глюкозы в крови мышей КО уже на 8-й день достигала 13.9 ± 6.6 мМ, что значимо отличалось от исходных показателей и от значений у контрольной группы животных. Стойкая гипергликемия (содержание глюкозы в крови выше 16 мМ) у мышей с нокаутом гена *Panx1* развивалась на 10-й день, а у животных дикого типа на 12-й, на что указывает наличие достоверных отличий измеряемого показателя в сравнении с 1-м днем эксперимента.

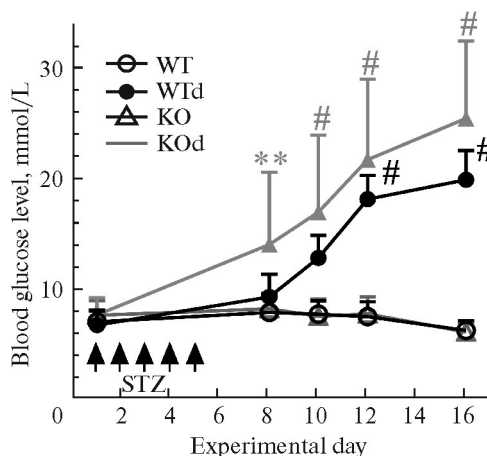


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови у мышей исследуемых групп. WT – дикий тип (без диабета), Panx1 KO – нокаут гена паннексина 1 (без диабета), WTd, KOd – соответствующие группы мышей с экспериментальным диабетом. WT $n = 7$, WTd $n = 9$, KO $n = 18$, KOd $n = 15$. Данные представлены в виде средних $\pm$ стандартное отклонение. Трехфакторный ДА, апостериорный тест Шидака, различия достоверны: ** – $p < 0.01$, # – $p < 0.0001$ (по сравнению с той же группой в 1-й день эксперимента).

Наряду с гипергликемией, другим симптомом, характерным для СД, является снижение массы тела, поэтому данный параметр оценивали регулярно наряду с изменением концентрации глюкозы. Было установлено, что при 2-недельном диабете снижение массы тела составило 4.43 ± 1.97 г у животных дикого типа ($n = 9$) и 5.23 ± 3.04 г у мышей с нокаутом гена Panx1 ($n = 15$, рис. 2). Снижение массы тела наблюдали и у контрольных групп (1.5 ± 1.4 г и 1.97 ± 1.46 г у дикого типа, $n = 6$, и нокаут по Panx1, $n = 17$ соответственно), однако оно было статистически значимо ниже, чем в группах соответствующего генотипа с диабетом. При этом ни в контроле, ни при диабете между животными, нокаутными по Panx1 и с полноценной экспрессией данного белка в изменении уровня глюкозы в крови и массы тела, статистический анализ не выявил значимых различий.

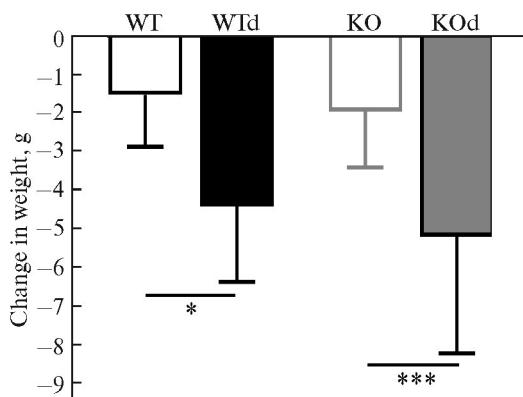


Рис. 2. Изменение массы тела у мышей исследуемых групп в последний день эксперимента в сравнении с первым днем. WT – дикий тип (без диабета, $n = 6$), KO – нокаут гена паннексина 1 (без диабета, $n = 17$); WTd ($n = 9$), KOd ($n = 15$) – соответствующие группы мышей с сахарным диабетом. Данные представлены в виде средних $\pm$ стандартное отклонение. Трехфакторный ДА, апостериорный тест Шидака, различия достоверны: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$.

Влияние нокаута гена $Panx1$ на развитие поражения мозга при фототромбоз-вызванной ишемии у мышей на фоне диабета

Размер очага повреждения является основным показателем тяжести ишемии. В результате анализа T2-взвешенных изображений было установлено, что нокаут гена $Panx1$ в 1.5 (1.2–1.7) раза снижал размер очага у животных на фоне 2-недельного диабета (рис. 3). Следует отметить, что у контрольных животных, которым не вводили стрептозотцин, нокаут гена $Panx1$ не влиял на размер ишемического очага (рис. 3), не было достоверных отличий и в выраженности ишемического повреждения (всех измеряемых параметров за исключением теста «Решетка») у мышей при сравнении групп дикого типа с диабетом и без него.

Площадь экстравазации красителя эванса синего (ЭС) может применяться для оценки размера повреждения мозговой ткани при ишемии наряду с МРТ-методом [21]. Изменения, наблюдаемые при оценке экстравазации ЭС, были сопоставимы с результатами МРТ (рис. 4). Так, в условиях 2-недельного диабета площадь экстравазации у мышей с нокаутом гена $Panx1$ ($n = 14$) была в 1.8–2 раза меньше, чем у мышей дикого типа ($n = 8$).

Влияние нокаута гена $Panx1$ на индуцированное ишемией нарушение ГЭБ у мышей на фоне диабета

Нокаут гена $Panx1$ также существенно изменял фототромбоз-вызванное нарушение ГЭБ у мышей при 2-недельном диабете. При этом проницаемость ГЭБ у животных дикого типа была в 3.8 раза выше, чем у животных, нокаутных по гену $Panx1$ (рис. 4b).

Влияние нокаута гена $Panx1$ на развитие фототромбоз-вызванного нарушения сенсомоторного статуса у мышей на фоне диабета

Оценка сенсомоторного статуса животных при моделировании ишемии коры больших полушарий в области пре- и постцентральной извилин является комплексным показателем выраженности ишемического повреждения. В нашей работе индукция ишемии приводила у животных всех групп к значимому увеличению числа моторных ошибок в тесте «Решетка». Нокаут гена $Panx1$ приводил к почти 3-кратному снижению количества моторных ошибок у животных на фоне 2-недельного диабета (рис. 5).

Влияние нокаута гена $Panx1$ на развитие воспаления, вызванного фотоиндуцированной ишемией, у мышей на фоне диабета

В качестве показателя системного воспаления в данном исследовании оценивали долю нейтрофилов в периферической крови с использованием окрашивания по Романовскому – Гимзе. Уровень нейтрофилов на фоне диабета до ФТ показал, что у группы с нокаутом гена $Panx1$ ($n = 15$) количество нейтрофилов было значимо ниже, чем у животных дикого типа ($n = 9$) (рис. 6a). При этом изолированное действие диабета не вызывало значимого повышения уровня нейтрофилов по сравнению с данным показателем в контрольной группе (дикий тип без диабета).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Терапия сочетанных патологий сопряжена с многочисленными трудностями, часто связанными со сложной системой взаимодействия повреждающих факторов различной природы и механизмов их патогенеза. Больных СД относят к группе риска возникновения инфарктов и инсультов, занимающих лидирующую позицию в списке причин смертности населения планеты, что, безусловно, требует пристального внимания со стороны исследователей и клиницистов. В представленной работе предпринята попытка выявить вовлечение белка паннексина 1 в ишемическое повреждение мозга на фоне СД у мышей. Ранее

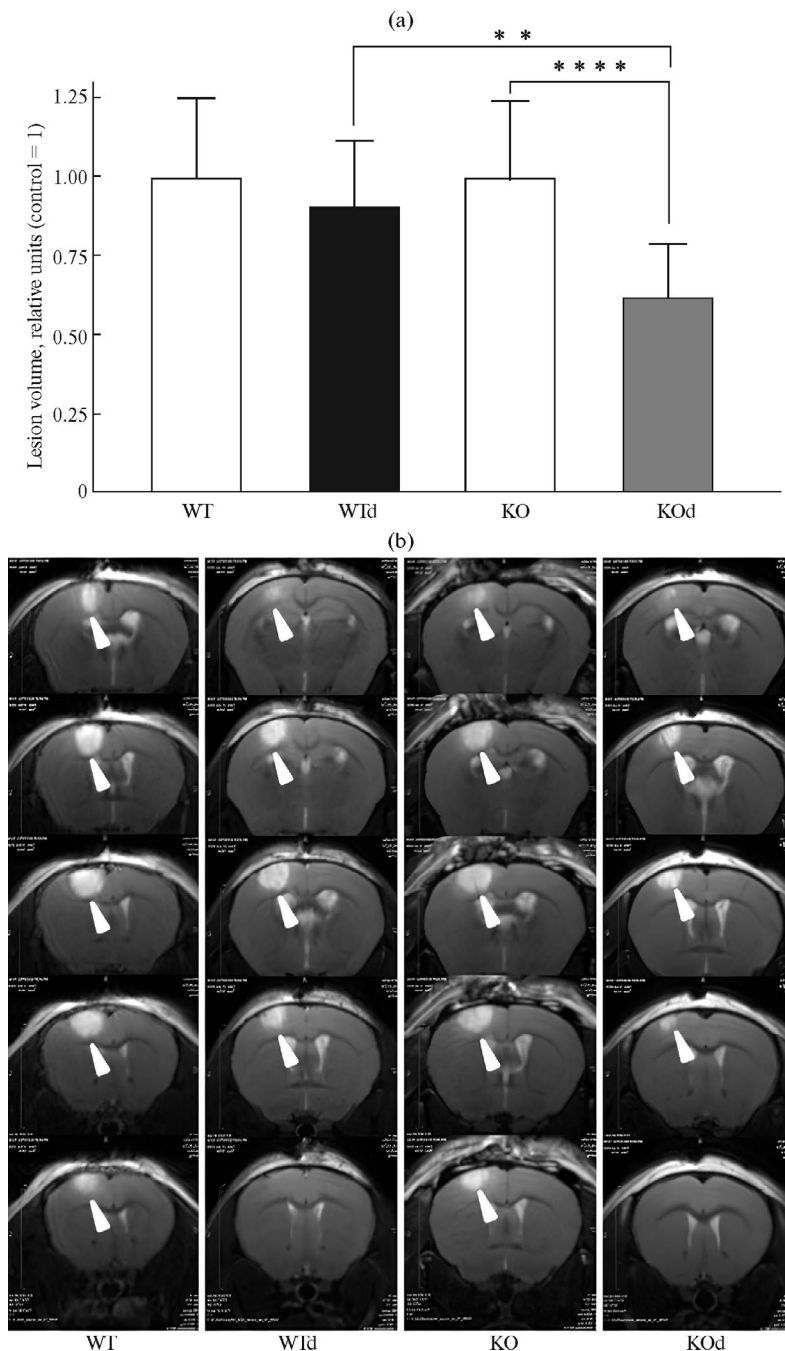


Рис. 3. Вызванное фотоиндуцированной ишемией повреждение мозга у мышей дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* на фоне диабета. (a) – объем ишемического очага поражения после фототромбоза у мышей дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* на фоне диабета (данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1)), (b) – наглядные T2-взвешенные МРТ-изображения повреждения мозга у исследуемых групп животных. WT $n = 11$, WTd $n = 7$, KO $n = 21$, KOd $n = 13$. Различия достоверны: ** – $p < 0.01$.

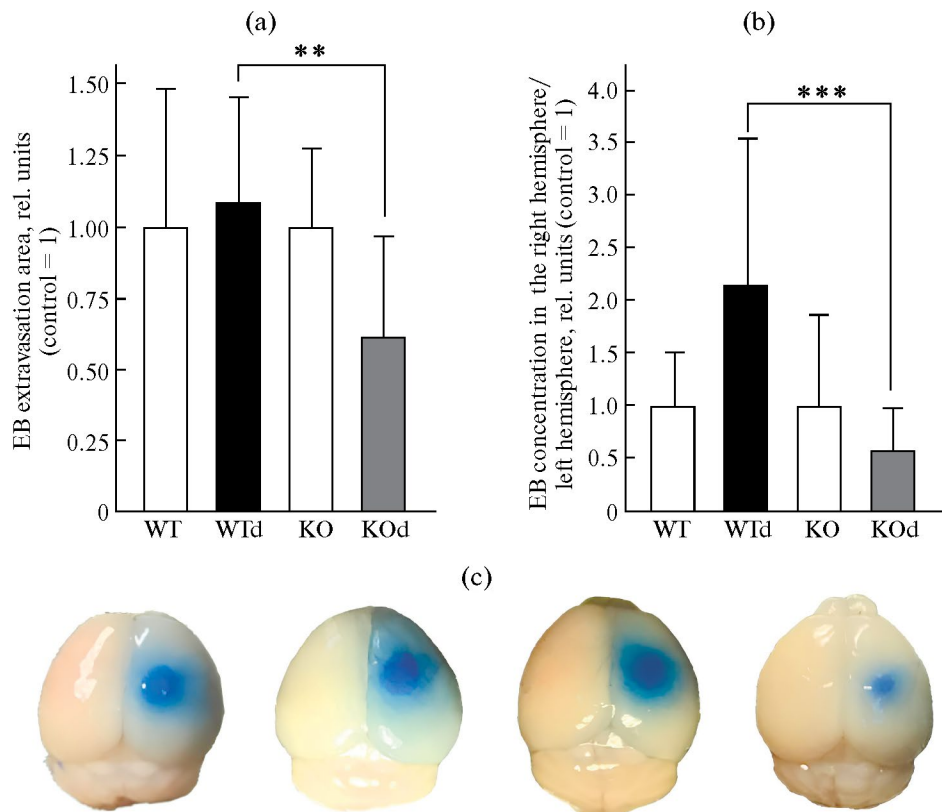


Рис. 4. Оценка экстравазации красителя Эванса синего (ЭС) и проницаемости ГЭБ после фотоиндуцированной ишемии у мышей дикого типа (WTd) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd) на фоне диабета. (а) – сравнение экстравазации ЭС у изучаемых групп животных (WT $n = 5$, WTd $n = 8$, KO $n = 16$, KOd $n = 14$), (б) – сравнение проницаемости ГЭБ у изучаемых групп животных (WT $n = 9$, WTd $n = 4$, KO $n = 21$, KOd $n = 9$), (в) – наглядные фотографии головного мозга после фототромбоза, введения ЭС через сутки и перфузии на вторые сутки после ишемического повреждения у мышей. Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

исследования роли паннексина 1 и сформированных им каналов для такого сочетания не проводились. Для моделирования диабета у мышей нами была выбрана стрептозотоциновая модель СД 2-го типа. Развитие диабета у мышей мы наблюдали на 10–12-й день введения стрептозотоцина, что согласуется с данными литературы [14]. Выбор проблемы стрептозотоцин-вызванного диабета у мышей, нокаутных по гену *Panx1*, был основан на том, что моделирование экспериментального диабета у таких животных ранее не было изучено. В настоящем исследовании показано, что характер нарастания уровня глюкозы в крови у животных дикого типа и с нокаутом гена *Panx1* в целом был сходным, однако первые значимые признаки гипергликемии были обнаружены у мышей, нокаутных по гену *Panx1*, на 8-й, а у мышей дикого типа – на 12-й день эксперимента. В литературе также нет однозначного указания на характер участия паннексина в регуляции метаболизма глюкозы. Например, было показано, что фармакологическая блокада *Panx1* и тканеспецифичный нокаут целевого гена ухудшали поглощение глюкозы адипоцитами в ответ на инсулин, а в экспериментах *in vivo* приводили к тяжелой инсулинорезистентности у мышей

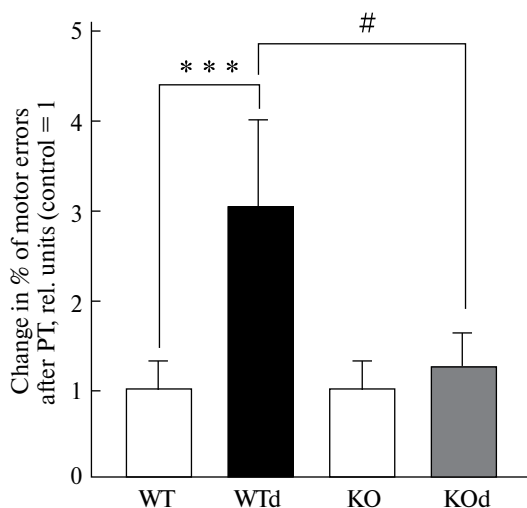


Рис. 5. Сенсомоторный статус животных исследуемых групп, оцененный с помощью теста «Решетка». Изменение доли (в процентах) моторных ошибок на 100 шагов животного после ФТ по сравнению с показателями до ФТ у мышей дикого типа (WTd, $n = 8$) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd, $n = 13$) на фоне диабета. WT $n = 5$, KO $n = 16$. Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: *** – $p < 0.001$; # – $p < 0.0001$.

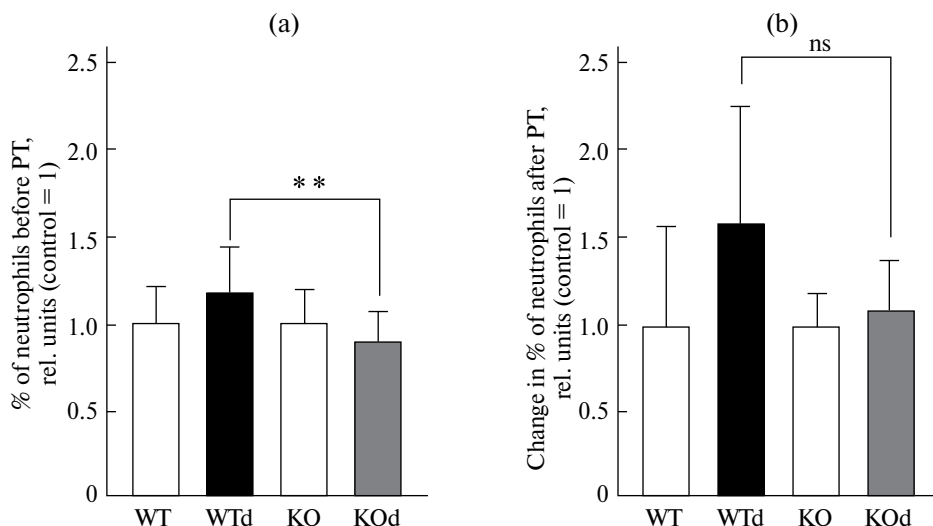


Рис. 6. Оценка уровня нейтрофилов у мышей дикого типа (WTd) и с нокаутом гена *Panx1* (KOd) на фоне диабета. (a) – сравнение доли нейтрофилов у экспериментальных групп с диабетом до фототромбоза (WT $n = 5$, WTd $n = 9$, KO $n = 17$, KOd $n = 15$), (b) – изменение уровня нейтрофилов на последнем дне эксперимента по сравнению с первым днем (24 ч после фототромбоза на фоне диабета, WT $n = 6$, WTd $n = 9$, KO $n = 16$, KOd $n = 13$). Данные нормированы на средние значения в соответствующих контрольных группах, у животных без диабета (control = 1). Различия достоверны: ** – $p < 0.01$.

с ожирением [22]. Вместе с тем согласно другим данным, нокаут гена *Panx2* увеличивал тяжесть диабета за счет увеличения чувствительности β -клеток к сигналам апоптоза, в то время как *Panx1* не оказывал существенного влияния на выраженность диабета [23].

Наблюдаемое нами снижение массы тела у животных, которым вводили стрептозотоцин, что является одним из симптомов диабета, также подтверждает развитие патологии у животных в выбранной нами модели стрептозотоцин-вызванного диабета.

Индукция ишемии у животных исследуемых групп на фоне экспериментального диабета сопровождалась развитием очага поражения мозга у мышей дикого типа большего размера по сравнению с животными, не экспрессирующими ген белка паннексина 1. Снижение размера ФТ-индуцированного ишемического очага у мышей с нокаутом *Panx1* по сравнению с животными дикого типа свидетельствует о вовлечении данного белка в патогенез инсульта у мышей только на фоне диабета, поскольку при изолированной фотоиндуцированной ишемии у мышей дикого типа и с нокаутом *Panx1* отличий не было обнаружено. Основным известным на данный момент механизмом вовлечения каналов *Panx1* в индуцированные гипергликемией процессы в мозге является активация белков NLRP1, рецепторов к молекулярным фрагментам, ассоциированным с повреждениями (DAMPs), проникновение которых в клетку может быть опосредовано каналом *Panx1* [12]. У нокаутных животных, вероятно, данный повреждающий фактор был исключен, и на фоне 2-недельного диабета мы наблюдали уменьшение размера ишемического очага у животных в сравнении с мышами с полноценной экспрессией данного белка. Изучению особенностей влияния экспериментального диабета на выраженность ишемии посвящены единичные исследования. Так, стрептозотоцин-вызванный диабет у мышей усугублял ишемический инсульт, повышая ферроптоз в клетках мозга, что было вызвано повышением экспрессии липокалина 2 (LCN2) в нейтрофилах, инфильтрация которых была повышена у животных с диабетом [24]. В указанной работе исследователи использовали для индукции ишемии модель окклюзии средней мозговой артерии, возможно, что отсутствие выраженного увеличения очага поражения у животных дикого типа на фоне диабета в настоящем исследовании связано с особенностями используемой нами модели фототромбоза.

Ранее нами и другими авторами продемонстрировано значимое повышение проницаемости ГЭБ при фототромбоз-вызванной ишемии [15], в настоящем исследовании мы оценили проницаемость ГЭБ через сутки после индукции ишемии у исследуемых групп мышей. Нокаут гена *Panx1* практически в 4 раза снижал повышение данного показателя у животных в условиях диабета, что согласуется с полученными нами данными по объему ишемического очага у этих групп мышей. Ранее нами показано, что блокада канала *Panx1* в культивируемых астроцитах крыс снижает тромбин- и липополисахарид-вызванную активацию клеток [25], что может свидетельствовать о возможной роли белка паннексина 1 в регуляции проницаемости ГЭБ, одним из компонентов которого выступают астроциты.

Логичным следствием протекторного действия нокаута *Panx1* в моделируемом нами на мышах сочетании ишемии и экспериментального диабета была стабилизация сенсомоторного статуса мышей в отсутствие белка *Panx1*. Безусловно, что снижение размера очага ишемического повреждения в области сенсомоторной коры и стабилизация барьерной функции ГЭБ приведут к снижению числа моторных ошибок в используемом нами тесте «Решетка», что мы и наблюдали у нокаутных по гену *Panx1* животных.

Известно, что не только диабет 2-го типа, но и диабет 1-го типа сопряжен с повышением провоспалительного статуса организма, на что указывает нарастание уровня провоспалительных цитокинов (TNF-альфа, IL-6), С-реактивного белка в крови таких пациентов, а также изменение хемотаксиса иммунокомпетентных клеток, например, нейтрофилов [26–28]. Повышенный уровень TNF- α наблюдался у крыс со стрептозотоцин-вызванным диабетом, что указывает на повышение провоспалительного статуса [29].

В нашей работе группы с нокаутом гена *Panx1* демонстрировали значимо более низкий уровень нейтрофилов по сравнению с животными дикого типа, что согласуется с имею-

Таким образом, результаты представленного исследования впервые демонстрируют вовлечение белка паннексина 1 в ишемическое повреждение мозга, вызванное сочетанным действием 2-недельного диабета и фототромбоза у мышей. Молекулярные механизмы обнаруженного протекторного действия нокаута белка Panx1 у мышей в условиях фотоиндуцированной ишемии на фоне экспериментального диабета еще предстоит исследовать. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что эффективность терапии сочетанных с СД патологий может быть повышена включением в фармакологический комплекс препаратов блокаторов паннексиновых каналов как нового направления лечения таких тяжелых заболеваний.

Идея работы и планирование эксперимента (Л. Р. Г. и М. А. Н.), сбор данных (М. А. Н., М. В. Г., А. А. В.), обработка данных (М. А. Н., М. В. Г., Л. Р. Г.), написание и редактирование манускрипта (М. А. Н., Л. Р. Г., А. А. В.).

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 24-75-00164). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 23/2021 от 13 декабря 2021 г.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Campbell BCV, De Silva D, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA* (2019) Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 70.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
2. *Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee* (2021) *IDF DIABETES ATLAS* [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation.
3. *Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J* (2010) Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375: 2215–2222.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9)
4. *Bloomgarden Z, Chilton R* (2021) Diabetes and stroke: An important complication. *J Diabetes* 13(3): 184–190.
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.13142>
5. *Bennett MVL, Garré JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Sáez JC* (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487: 3–15.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.042>
6. *De Freitas PHM, da Silva Ferreira NC, Fioravante-Rezende JG, de Menezes Santos L, Luiz Alves A, Rozental R* (2019) Dispelling myths about connexins, pannexins and P2X7 in hypoxic-ischemic central nervous system. *Neurosci Lett* 695: 76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.11.044>
7. *Bargiotas P, Antje K, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwanninger M* (2011) Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20772–20777.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1018262108>
8. *Cisneros-Mejorado A, Gottlieb M, Cavaliere F, Magnus T, Koch-Nolte F, Scemes E, Pérez-Samartín A, Matute C* (2015) Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 35(5): 843–850.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.262>
9. *Xiong X-X, Gu L-J, Shen J, Kang X-H, Zheng Y-Y, Yue S-B, Zhu S-M* (2014) Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice. *Neurochem Res* 39(1): 216–224.
<https://doi.org/10.1007/s11064-013-1212-z>
10. *Freitas-Andrade M, Bechberger JF, MacVicar BA, Viau V, Naus CC* (2017) Pannexin1 knockout and blockade reduces ischemic stroke injury in female, but not in male mice. *Oncotarget* 8(23): 36973–36983.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16937>
11. *Labat-gest V, Tomasi S* (2013) Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *J Vis Exp* (76): 50370.
<https://doi.org/10.3791/50370>
12. *Meng XF, Wang XL, Tian XJ, Yang ZH, Chu GP, Zhang J, Li M, Shi J, Zhang C* (2014) Nod-like receptor protein 1 inflammasome mediates neuron injury under high glucose. *Mol Neurobiol* 49(2): 673–684.
<https://doi.org/10.1007/s12035-013-8551-2>
13. *Battulin N, Kovalzon VM, Korablev A, Serova I, Kiryukhina OO, Pechkova MG, Bogotskoy KA, Tarasova OS, Panchin Y* (2021) Pannexin 1 Transgenic Mice: Human Diseases and Sleep-Wake Function Revision. *Int J Mol Sci* 22(10): 5269.
<https://doi.org/10.3390/ijms22105269>
14. *Furman BL* (2021) Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* 1(4): e78.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.78>
15. *Galkov M, Gulyaev M, Kiseleva E, Andreev-Andrievskiy A, Gorbacheva L* (2020) Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application. *J Neurosci Methods* 329: 108457.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108457>
16. *Franklin KBJ, Paxinos G* (2001) *Mouse brain in stereotaxic coordinates*. London. Acad Press.
17. *Wu J, Cai Y, Wu X, Ying Y, Tai Y, He M* (2021) Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation. *Bio Protoc* 11(5): e3988.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3988>

18. Kim GW, Lewén A, Copin J, Watson BD, Chan PH (2001) The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience* 105(4): 1007–1018. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00237-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00237-8)
19. Baskin YK, Dietrich WD, Green EJ (2003) Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. *J Neurosci Methods* 129: 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00212-7)
20. Santos E, Cunha de Oliveira D, Hastreiter A, Silva G, Beltran J, Tsujita M, Crisma A, Neves S, Fock R, Borelli P (2016) Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz J Veter Res Animal Sci* 53: 138. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145>
21. Knezic A, Broughton BRS, Widdop RE, McCarthy CA (2022) Optimising the photothrombotic model of stroke in the C57BL/6 and FVB/N strains of mouse. *Sci Rep* 12(1): 7598. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11793-6>
22. Adamson SE, Meher AK, Chiu YH, Sandilos JK, Oberholtzer NP, Walker NN, Hargett SR, Seaman SA, Peirce-Cottler SM, Isakson BE, McNamara CA, Keller SR, Harris TE, Bayliss DA, Leitinger N (2015) Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Mol Metab* 4(9): 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.009>
23. Berchtold LA, Miani M, Diep TA, Madsen AN, Cigliola V, Colli M, Krivokapic JM, Pociot F, Eizirik DL, Meda P, Holst B, Billestrup N, Størling J (2017) Pannexin-2-deficiency sensitizes pancreatic β -cells to cytokine-induced apoptosis in vitro and impairs glucose tolerance in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.001>
24. Wang H, Wang Z, Gao Y, Wang J, Yuan Y, Zhang C, Zhang X (2024) STZ-induced diabetes exacerbates neurons ferroptosis after ischemic stroke by upregulating LCN2 in neutrophils. *Exp Neurol* 377: 114797. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114797>
25. Babkina II, Mazeeva VV, Morozova MP, Gorbacheva LR (2024) Effect of probenecid on astrocyte activation *in vitro*. *Bulletin of RSMU* 1: 40–48. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2024.00526>
26. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K (2007) Relationship between serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in diabetes mellitus type 1 children. *Centr Eur J Immunol* 32 (3): 124–128.
27. Vinolo MA, Ferguson GJ, Kulkarni S, Damoulakis G, Anderson K, Bohlooly YM (2011) SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor. *PLoS One* 6: e21205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021205>
28. Sina C, Gavrilova O, Förster M, Till A, Derer S, Hildebrand F (2009) G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol* 183: 7514–7522. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900063>
29. Dallak M, Al-Ani B, Abdel Kader DH, Eid RA, Haidara MA (2019) Insulin Suppresses Type 1 Diabetes Mellitus-Induced Ventricular Cardiomyocyte Damage Associated with the Inhibition of Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Rats. *Pharmacology* 104(3–4): 157–165. <https://doi.org/10.1159/000500898>
30. Adamson SE, Leitinger N (2014) The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. *FEBS Lett* 588(8): 1416–1422. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.009>
31. Pettersson US, Christoffersson G, Massena S, Ahl D, Jansson L, Henriksnäs J, Phillipson M (2011) Increased recruitment but impaired function of leukocytes during inflammation in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *6(7): e22480*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022480>

Brain Damage in Photoinduced Ischemia under Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice with Pannexin 1 Protein Gene Knockout

M. A. Nikolaenko¹, M. V. Gulyaev¹, A. A. Volkova^{1,2}, and L. R. Gorbacheva^{1,2,*}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

**e-mail: gorbi67@mail.ru*

Diabetes mellitus (DM), along with ischemia, is one of the top ten causes of death in the global population, according to the latest World Health Organization (WHO) data. Clinical research data have revealed a high risk of stroke and heart attacks in patients with diabetes. However, there is still a lack of understanding of the involvement of pannexin 1 (Pnx1) protein in cerebral ischemia combined with DM. In the presented study, we used the Pnx1 gene knockout mice in models of streptozotocin-induced diabetes and photoinduced ischemia to investigate the effect of the Pnx1 on the severity of ischemic brain damage and systemic inflammation in mice with a combination of cerebral ischemia and diabetes. It has been found that under conditions of experimental diabetes, the knockout of the Pnx1 gene significantly reduces the size of the ischemic lesion, stabilizes the ischemia-induced increase in the blood-brain barrier permeability, reduces the number of errors in the sensorimotor test and the level of neutrophils in the blood. It is important to note that the Pnx1 knockout exhibits a protective effect only in the presence of diabetes mellitus, without significantly affecting the severity of ischemic brain injury in mice without streptozotocin-induced diabetes. Pnx1 knockout also did not affect the severity of hyperglycemia in animals in this diabetes model. It can be assumed that the efficacy of the treatment for pathologies combined with diabetes mellitus can be enhanced by incorporating pannexin channel blockers into the complex therapy, representing a novel approach to addressing these serious conditions.

Keywords: diabetes, ischemia, pannexin 1, photothrombosis, knockout, inflammation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2024 г. К. Р. Аббасова¹, С. М. Кужугет¹, Е. Т. Цыба¹

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

*E-mail: abbasovakr@my.msu.ru

Поступила в редакцию 12.07.2024 г.

После доработки 17.08.2024 г.

Принята к публикации 27.08.2024 г.

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью абсансной эпилепсии. Около 15–50% крыс данной линии предрасположены к аудиогенным судорогам. Крысы WAG/Rij демонстрируют депрессивноподобное поведение, а в субпопуляции крыс WAG/Rij с предрасположенностью к аудиогенным судорогам отмечается повышенный уровень тревожности после предварительной звуковой стимуляции. Электрофизиологические и поведенческие исследования указывают на вовлеченность дофаминергической системы как в абсансную, так и в аудиогенную эпилепсию. В дорсальном стриатуме обнаружена область, где плотность дофаминовых рецепторов у предрасположенных к аудиогенным судорогам крыс WAG/Rij (WAG/Rij-AGS) была выше, чем у неаудиогенных крыс WAG/Rij (WAG/Rij-nonAGS). Целью исследования было выяснить: (1) являются ли поведенческие изменения у крыс WAG/Rij генетически обусловленными или вызваны предварительной звуковой стимуляцией; (2) как вовлечены области дорсального стриатума с разной плотностью дофаминовых рецепторов в контроль абсансной эпилепсии у разных субпопуляций крыс WAG/Rij. Исследование проводили на самцах крыс WAG/Rij, разделенных на группы: WAG/Rij-nonAGS (с абсансной эпилепсией) и WAG/Rij-AGS (со смешанной формой эпилепсии – абсансной и аудиогенной). Использовали тесты “Приподнятый крестообразный лабиринт”, “Вынужденное плавание” и “Трехкамерный социальный лабиринт”. Для оценки вовлеченности дорсального стриатума в контроль абсансных судорог применяли метод прямой высокочастотной стимуляции мозга. Тестирование животных на аудиогенную эпилепсию проводили после окончания экспериментов. Показали, что повышенный уровень тревожности у крыс WAG/Rij-AGS генетически обусловлен, а депрессивноподобное поведение у крыс WAG/Rij не зависит от предрасположенности к аудиогенным судорогам. У крыс WAG/Rij-AGS зарегистрировали отклонения в социальном поведении. Высокочастотная стимуляция области дорсального стриатума, в которой отличается плотность дофаминовых рецепторов у аудиогенных и неаудиогенных групп крыс, указала на различия вовлеченности дорсального стриатума в контроль абсансной и смешанной форм эпилепсии у WAG/Rij-AGS и WAG/Rij-nonAGS субпопуляций.

Ключевые слова: линия WAG/Rij, абсансная эпилепсия, аудиогенная эпилепсия, тревожность, депрессивноподобное поведение, дофаминовый рецептор, электростимуляция, дорсальный стриатум

ВВЕДЕНИЕ

Примерно 50% больных, страдающих эпилепсией, имеют сопутствующие аффективные состояния, такие как депрессия, тревожное состояние, психоз и расстройства аутистического спектра [1]. Распространенность депрессии и тревоги у пациентов с эпилепсией, по данным разных исследований, варьирует от 20 до 55% [2]. Крысы линии WAG/Rij являются общепризнанной линией крыс с неконвульсивной генерализованной формой абсансной эпилепсии [3]. Как оказалось, 15–50% от общего числа крыс линии WAG/Rij предрасположены к аудиогенным судорогам (конвульсивная форма) [4]. Это перекликается и с клиническими данными: у 40% больных с абсансной эпилепсией регистрируются конвульсивные формы эпилепсии [5]. Субпопуляцию крыс линии WAG/Rij с генетически детерминированной абсансной эпилепсией и предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии (WAG/Rij-AGS) рассматривают как модель смешанной формы эпилепсии [4]. Экспериментальные исследования показывают связь между конвульсивными формами эпилепсии и тревожностью [6, 7]. Сравнение субпопуляций крыс линии WAG/Rij показало повышенный уровень тревожности у WAG/Rij-AGS со смешанной формой эпилепсии, так же как и для крыс Wistar с предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии. Для определения предрасположенности к аудиогенной эпилепсии в этих экспериментах животные предварительно подвергались двухразовой звуковой стимуляции. Нельзя исключить, что предварительное воздействие аудиогенной стимуляции могло повлиять на результаты поведенческих тестов, особенно на уровень тревожности. Предполагается, что стрессовая звуковая стимуляция может влиять на уровень тревожности [8]. Депрессивноподобное поведение обнаружено у всех крыс линии WAG/Rij независимо от их предрасположенности к аудиогенным судорогам [8]. Таким образом, было предположено, что повышенный уровень тревожности связан с фактором «аудиогенность», а депрессивноподобное поведение крыс линии WAG/Rij связано с фактором «абсансность» [8]. Вопрос, являются ли наблюдаемые поведенческие нарушения генетическими или могут быть последствиями судорожного опыта вследствие звуковой стимуляции и могли повлиять на результаты экспериментов, остается открытым.

Электрофизиологические и поведенческие исследования показывают вовлеченность дофаминергической системы как в абсансную, так и в аудиогенную эпилепсию. Предполагается, что депрессивноподобное поведение, обнаруженное у крыс линии WAG/Rij в поведенческих тестах, связано с гипофункцией дофаминергической системы: острое введение селективного антагониста D2/D3-рецепторов раклоприда усиливало выраженность депрессии и подавляло антидепрессивный эффект при хроническом введении имипрамина. Введение неселективного агониста D1- и D2-подобных дофаминовых рецепторов апоморфина подавляло абсансную активность, в то время как введение неселективного антагониста D1- и D2-подобных дофаминовых рецепторов галоперидола оказывало противоположное действие [9].

Показано, что стриатум способен модулировать активность верхнего двухолмия (SC) [10], тем самым участвуя в регуляции аудиогенной эпилепсии. Передача возбуждения на глубокие слои SC критически необходима для формирования двигательного возбуждения при аудиогенном припадке [11]. Введение субконвульсивной дозы антагониста ГАМК-рецепторов пикротоксина в верхнее двухолмие (SC) на фоне фокальных микроинъекций апоморфина в стриатум стимулировало развитие дикого бега [12], который является первой фазой аудиогенного припадка.

В инициации и поддержании абсансной эпилепсии критическую роль отводят кортико-галамическому контуру [13, 14]. Экспериментальные исследования показали, что базальные ганглии и их основной нейротрансмиттер дофамин играют роль «системы дистанционного управления абсансной эпилепсии» [15]. Результаты экспериментальных исследований и клинические данные подтверждают, что связанные с эпилепсией

изменения в аминергическом балансе мозга могут быть субстратом для ряда психических и поведенческих сопутствующих заболеваний [16, 17]. У крыс линии WAG/Rij плотность как D1-, так и D2-рецепторов в дорсальном стриатуме ниже по сравнению с ACI – линией крыс, устойчивой к эпилепсии. В то же время во фронтальной и теменной областях коры плотность D2-рецепторов у WAG/Rij выше, чем у ACI [18].

Ранее нами было показано различие в плотности распределения дофаминовых рецепторов в стриатуме у четырех групп крыс: у аудиогенных крыс линии Крушинского – Молодкиной (KM), WAG/Rij-nonAGS (крысы линии WAG/Rij с абсансной эпилепсией), WAG/Rij-AGS (крысы линии WAG/Rij с абсансной и аудиогенной эпилепсией) и у крыс Wistar без абсансной и аудиогенной эпилепсии. В дорсальном стриатуме была обнаружена область, где плотность дофаминовых рецепторов у аудиогенных крыс (когорты KM и у WAG/Rij-AGS) была выше, чем у неаудиогенных крыс контроля (WAG/Rij-nonAGS и Wistar) [9]. Отличие уровня тревожности у WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS, корреляция между каталепсией и уровнем тревожности у WAG/Rij-AGS, а также вовлеченность дофаминовой системы в модуляцию абсансной эпилепсии позволили нам предположить, что стриатные области с разной плотностью дофаминовых рецепторов у WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS могут по-разному контролировать судороги различного типа. Для проверки этого предположения мы использовали метод прямой высокочастотной электрической стимуляции структур мозга, вызывающей десинхронизацию контуров, вовлеченных в эпилептическую активность.

Целью данного исследования было выяснить, во-первых, являются ли сопутствующие коморбидные состояния, наблюдаемые в поведенческих тестах у обеих субпопуляций крыс линии WAG/Rij, генетически обусловленными или вызваны предварительными звуковыми стимуляциями. И во-вторых, как вовлечены области дорсального стриатума с разной плотностью D1- и D2-подобных дофаминовых рецепторов у двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij (только с абсансной или и с абсансной, и с аудиогенной активностью) в контроль судорог разного типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Исследование проведено на половозрелых самцах крыс линии WAG/Rij ($n = 32$) в возрасте 6–7 месяцев и крыс стока Wistar ($n = 13$) того же возраста и пола. Исследование субпопуляций крыс WAG/Rij было поделено на два этапа: исследование поведения (WAG/Rij, $n = 20$, Wistar, $n = 13$) и электрофизиологическое исследование областей стриатума с разной плотностью дофаминовых рецепторов (WAG/Rij, $n = 12$). Тестирование на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии проводилось после проведения всех экспериментов.

Крысы линии WAG/Rij были рождены и выращены на биологическом факультете МГУ имени М. В. Ломоносова, крысы стока Wistar приобретены в питомнике лабораторных животных «Столовая». Все животные содержались в виварии в стандартных условиях с 12-часовым световым циклом (09:00–21:00) при комнатной температуре 20 ± 2 °C и относительной влажности воздуха около 60%. Животных размещали в стандартных пластиковых клетках группами по 4–5 животных в клетке. Все животные получали стандартный пищевой рацион (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм, ООО «ЛАБОРАТОРКОРМ», Россия) и имели свободный доступ к пище и воде. В постоперационный период животных содержали в специальных индивидуальных боксах размером 30 x 30 x 30 см со свободным доступом к воде и корму. После проведения всех серий экспериментов по результатам тестирования на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии животные были разделены на группы: AGS – предрасположенные к аудиогенной эпилепсии крысы, nonAGS – не предрасположенные.

Поведенческое исследование

Поведение животных (WAG/Rij, $n = 20$, Wistar, $n = 13$) исследовали при помощи следующих тестов: «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Вынужденное плавание» (ВП), социальное поведение оценивали в тесте «Трехкамерный социальный лабиринт» (ТСЛ). Тесты проводились в разные дни с интервалом не менее 3 дней и были упорядочены по возрастанию стрессогенности (ПКЛ – ТСЛ – ВП). Тестирование крыс на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии проводили после завершения всех поведенческих тестов (рис. 1), чтобы исключить предварительное влияние звуковых стимуляций.

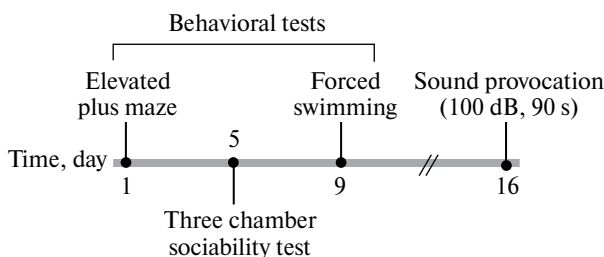


Рис. 1. Схема исследования.

Поведенческие тесты: Приподнятый крестообразный лабиринт, Трехкамерный социальный лабиринт, Вынужденное плавание. Интервал между тестами – 3 дня. Спустя 7 дней после завершения исследования поведения проводили тестирование на аудиогенную эпилепсию.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт». Оценку уровня тревожности животных проводили в тесте ПКЛ [19]. Экспериментальная камера лабиринта состояла из четырех расходящихся из центра рукавов (длина рукавов – 50 см, ширина – 15 см, высота стенок – 30 см). Два противоположных рукава были закрыты с торцов стенками (освещенность 10 лк); два других – открыты и ярко освещены (400 лк). Лабиринт был установлен на высоте 55 см от пола. Животное помещали в центр лабиринта напротив закрытого рукава и в течение 5 мин оценивали следующие показатели: латентный период захода в закрытый отсек, общее время нахождения на открытых рукавах, количество выходов на открытые рукава, количество свешиваний с открытых рукавов, количество выглядываний из закрытых рукавов, вертикальную двигательную активность (стойки), количество актов грумминга.

Тест «Трехкамерный социальный лабиринт». Тест ТСЛ изначально был описан для мышей [20], а позже адаптирован для крыс [21]. Для оценки социального взаимодействия был использован Т-образный лабиринт с двумя отсеками (центральный отсек был закрыт). Тест состоял из двух сессий длительностью 10 мин. Перед экспериментом испытуемую крысу предварительно помещали в лабиринт с двумя пустыми камерами для адаптации в течение 2 мин.

В первую сессию (оценка социального поведения) в один из боковых отсеков Т-образного лабиринта, отделенных двойной решеткой, помещали крысу того же возраста и пола, ранее незнакомую для испытуемого животного (стимул), а второй боковой отсек оставляли пустым. Во время второй сессии (оценка стремления к социальной новизне) в ранее пустой боковой отсек помещали другую незнакомую крысу, кото-

рая представляла собой «новый стимул», а крыса с первой сессии оставалась на том же месте и являлась «старым стимулом». Между сессиями испытуемое животное отсаживали в переноску. После каждого животного пол лабиринта тщательно очищали 10%-ным раствором этанола. Во время эксперимента оценивалось время, проведенное у каждого бокового отсека, количество контактов (просовывание носа между прутьями решетки), количество стоек и актов груминга.

Тест «Вынужденное плавание». В тесте ВП, основанном на методе Порсолта [22] в модификации Щетинина с соавт. [23], оценивали депрессивноподобное поведение. Для этого крыс помещали в цилиндр высотой в 50 см и диаметром 25 см, заполненный водопроводной водой до уровня 35 см. Температура воды составляла 25 ± 1 °C. Экспериментальные сессии длились 10 мин. Оценивали следующие параметры:

- латентный период первого акта активного плавания – крыса совершает энергичные движения всеми лапами, активно перемещаясь внутри емкости (включая карабканье);
- суммарную длительность активного плавания – крыса совершает активные плавательные движения, перемещаясь внутри емкости (включая карабканье);
- латентный период и длительность первого акта неподвижности – отсутствие плавательных движений;
- суммарную длительность периодов неподвижности – животное практически неподвижно, движения направлены только на поддержание тела на поверхности воды.

Электрофизиологическое исследование

Для регистрации ЭЭГ-сигналов, а также стимуляции с обратной связью (импульсы подаются в момент появления разрядов на ЭЭГ) экспериментальным животным (WAG/Rij, $n = 12$, самцы) унилатерально имплантировали биполярные электроды. Электрод состоял из основания в виде скрученной нихромовой проволоки диаметром 0.25 мм, спаянного в двух местах с медной проволокой, остающейся на поверхности черепа. Перед операцией животное помещали в камеру, в которую на протяжении 3 мин подавали ингаляционный наркоз Изофлуран (Baxter, США) в концентрации 5%. Затем крысу помещали в стереотаксис, продолжая подавать Изофлуран через маску, закрепленную поверх зубного держателя, постепенно снижая концентрацию с 2.5% до 1.5%. В качестве местной анестезии использовали 2%-ный раствор новокаина для инъекций. После успешной анальгезии над поверхностью черепа состригали шерсть, с помощью ножниц и 30%-ного раствора перекиси водорода удаляли кожу и мягкие ткани. Далее тщательно высушивали череп и, используя бур, просверливали небольшие отверстия для электродов и крепежных винтов. Электроды припаивали к наружному контакту одним быстрым движением и закрепляли с помощью самозатвердевающего полимерного материала «Белакрил»-М ХО Р («ВладМиВа», Россия). Электроды, используемые в эксперименте, были изготовлены из нихрома в лаковой изоляции.

Координаты для вживления электродов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга крысы [24]. Биполярные электроды вживляли в соматосенсорную кору (SSC) (AP = -1.5; ML = +4.5; H = -2) и дорсальный стриатум (DS) (AP = +1; ML = +2.6; H = -4.2). В затылочную кость вживляли электрод заземления и крепежный винт. После операции и в течение всего эксперимента животных содержали в индивидуальных прозрачных пластиковых боксах размером 30 x 30 x 30 см с доступом к воде и корму *ad libitum*. Реабилитационный период после операции составлял не менее 7 дней.

Регистрация ЭЭГ и стимуляция с обратной связью. После семидневного реабилитационного периода проводили регистрацию ЭЭГ и стимуляцию структур. Биполярные электроды использовали как для регистрации ЭЭГ, так и для стимуляции структур от координат, представленных в статье. К электродам присоединяли кабель, соединенный с регистрирующим устройством и стимулятором. Запись осуществляли при помощи датчика BioRecorder 8Channels (BioRecorder, Россия), полученные данные от устройства визуализировали в программе EDFbrowser (Teunis van Beelen, Нидерланды).

В первый день регистрировали базовую ЭЭГ. Запись базовой ЭЭГ проводили через те же биполярные электроды. На следующий день осуществляли поиск порога стимуляции для исследуемых структур. Для этого в ответ на начало разряда вручную подавали короткую пачку импульса частотой 130 Гц длительностью 1 с. Задержка после появления разряда составляла не менее 1 с (для генерализации приступа) и не более 3 с. Длительность импульса составляла 300 мкс. Стимуляцию начинали со значения амплитуды импульса 25 мкА, затем постепенно повышали с шагом 25 мкА. Пороговыми считались те параметры, в ответ на воздействие которых последовательно прерывалось три разряда. Диапазон значений составил 150–250 мкА.

В последующие дни записи поочередно проводили высокочастотную (130 Гц) стимуляцию с обратной связью для соматосенсорной коры и дорсального стриатума с перерывом между стимуляциями не менее 7 дней. В день записи первый час регистрировали базовую запись, во второй час проводили высокочастотную стимуляцию выбранной структуры (соматосенсорной коры или дорсального стриатума), далее – регистрировали возможные отставленные эффекты в течение 3 ч. Схема эксперимента приведена на рис. 2. Сравнивали процент прерванных разрядов во время стимуляции между аудиогенной и неаудиогенной группами крыс, а также количество, среднюю продолжительность разрядов для базовой записи во время и после стимуляции. После окончания экспериментов крысы тестировались на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, как и после поведенческих тестов.

После окончания эксперимента проводили морфоконтроль. Крыс наркотизировали комбинацией препаратов Золетил (5 мг/100г) + Ксилазин и проводили транскардиальную перфузию физиологическим раствором и 4%-ным раствором формальдегида. Затем мозг извлекали. Для дополнительной фиксации мозг помещали в 4%-ный раствор формальдегида на неделю, затем перемещали в 30%-ный раствор сахарозы. Когда мозг погружался на дно сосуда, его извлекали и нарезали на микротоме, соединенном с криотомом. Под микроскопом уточняли место локализации кончиков электродов во вживляемых структурах, делали снимки в программе ScopePhoto. Анализировали данные только тех крыс, у которых было подтверждено верное положение кончиков электродов.

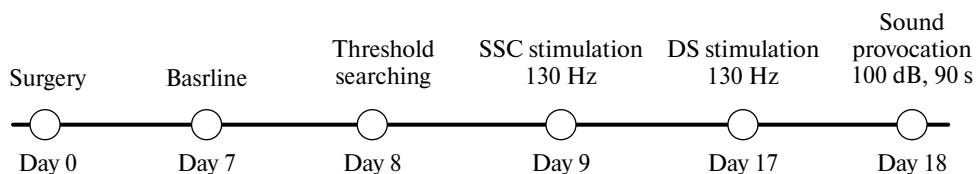


Рис. 2. Схема электрофизиологического эксперимента. SSC – соматосенсорная кора, DS – дорсальный стриатум.

Тестирование на аудиогенную эпилепсию

После проведения всех экспериментов для тестирования на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии крыс однократно помещали в звукоизолированную камеру и подвергали действию звука громкостью 120 дБ максимально в течение 90 с.

Звуковой стимул прерывали в том случае, если у животного развивались судороги. Если в ответ на звуковой стимул не было судорог, то длительность звукового стимула составляла 90 с. Во время тестирования регистрировали латентный период начала припадка, длительность двигательного возбуждения. Тяжесть судорог оценивали по шкале Крушинского:

- 0 – отсутствие реакции;
- 1 – «дикий бег»;
- 2 – падение на брюшко и клонические судороги;
- 3 – падение на бок с тоническим напряжением мышц туловища и резко выраженными клоническими судорогами конечностей;
- 4 – тонические судороги всей мускулатуры и приостановка дыхания.

Крысы, у которых в ответ на звуковую стимуляцию не развивалось никакой реакции (отсутствие двигательного возбуждения и судорог), считались неаудиогенными (nonAGS), а крысы, у которых регистрировали развитие судорожного припадка, считались предрасположенными к аудиогенной эпилепсии (AGS).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8.4.3 (PraphPad Software, Inc., 2020, США). Для проверки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро – Уилка. Данные экспериментов оформлены и представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$) при нормальном распределении и в виде медианы $\pm$ интерквартильного размаха ($Me \pm IQR$) при распределении, отличном от нормального. В тексте значения представлены в виде $M \pm SEM$, в ином случае вид указан в скобках. Для статистической обработки в случае нормального распределения использовали *t*-критерий Стьюдента, а при распределении, отличном от нормального – тест Манна – Уитни. При сравнении трех и выше групп применяли дисперсионный анализ. Для установления влияния одного фактора использовали однофакторный дисперсионный анализ One-way ANOVA, а для установления влияния двух факторов – двухфакторный дисперсионный анализ Two-way ANOVA. Для исключения статистических выбросов использовали критерий ROUT при $Q > 1\%$. Как статистически значимый уровень доверительной вероятности приняли $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При тестировании на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии у 40% от общего числа исследуемых крыс линии WAG/Rij в ответ на звуковой стимул развились судороги низкой интенсивности, характеризующиеся разделением первой фазы припадка двигательного возбуждения на две волны тормозной паузой длительностью 15.1 ± 5.4 с. Длительный латентный период начала аудиогенного припадка (14.2 ± 2.9 с) указывает на его низкую интенсивность.

Поведенческое исследование

Оценка параметров поведения в тесте ПКЛ выявила повышенный уровень тревожности у субпопуляции крыс линии WAG/Rij, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии (WAG/Rij-AGS). One-way ANOVA показал статистически значимые отличия по фактору «Группа» во времени пребывания в закрытых рукавах лабиринта ($F_{2,26} = 4.7$, $p < 0.05$) и во времени на свету (суммарное время, проведенное в центральном отсеке и в открытых рукавах) ($F_{2,26} = 4.7$, $p < 0.05$). Крысы WAG/Rij-AGS достоверно больше времени провели в закрытых рукавах ПКЛ (рис. 3а) по сравнению с крысами WAG/Rij-nonAGS (Wistar-nonAGS: 230.4 ± 2.1 с, $n = 9$; WAG/Rij-nonAGS: 222.3 ± 15.1 с,

$n = 12$; WAG/Rij-AGS: 270.0 ± 6.7 с, $n = 8$; сравнение WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS: $p < 0.05$, One-way ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение). Не обнаружили достоверных отличий во времени в закрытых рукавах между группами «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-nonAGS» ($p = 0.8$), «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-AGS» ($p = 0.07$). Время пребывания на свету (рис. 3b) у WAG/Rij-AGS было достоверно короче, чем у неаудиогенных WAG/Rij-nonAGS (Wistar-nonAGS: 69.6 ± 2.1 с, $n = 9$; WAG/Rij-nonAGS: 77.8 ± 15.1 с, $n = 12$; WAG/Rij-AGS: 30.0 ± 6.7 с, $n = 8$; сравнение WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS: $p < 0.05$, One-way ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение). Достоверных отличий во времени на свету между группами «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-nonAGS» ($p = 0.8$), «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-AGS» ($p = 0.07$) не обнаружили. Тест Крускала – Уоллиса показал значимое отличие по фактору «Группа» в количестве свешиваний с открытых рукавов лабиринта ($p < 0.05$). Крысы WAG/Rij-AGS совершали меньшее количество свешиваний (рис. 3c) с открытых рукавов ПКЛ (Wistar-nonAGS: 2.0 ± 7.5 ($Me \pm IQR$), $n = 9$; WAG/Rij-nonAGS: 7.0 ± 10.0 ($Me \pm IQR$), $n = 12$; WAG/Rij-AGS: 2.0 ± 1.8 ($Me \pm IQR$), $n = 8$; сравнение WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS: $p < 0.05$, тест Данна). Не обнаружили достоверных отличий в количестве свешиваний между группами «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-nonAGS» ($p = 0.07$), «Wistar-nonAGS» и «WAG/Rij-AGS» ($p > 1$). Достоверных отличий между группами по количеству выглядываний из закрытого рукава, количеству стоек и количеству актов грумминга не обнаружили.

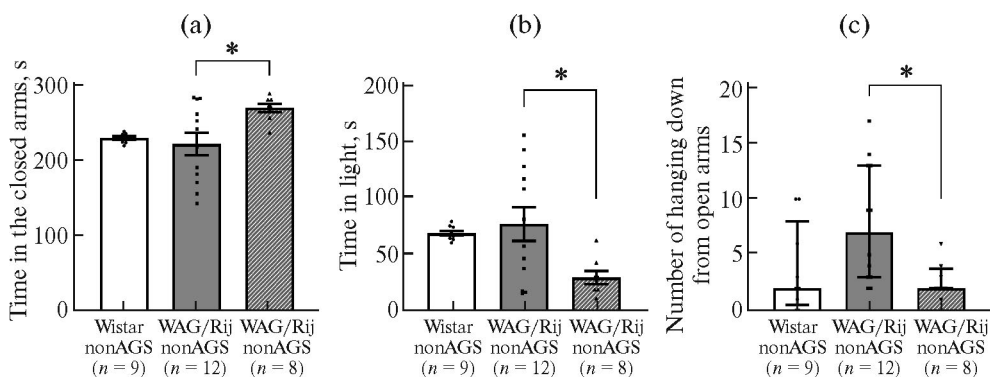


Рис. 3. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт». Сравнение групп «Wistar-nonAGS», «WAG/Rij-nonAGS» и «WAG/Rij-AGS». (a) – время в закрытых рукавах, $*p < 0.05$, One-way ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение, данные представлены в виде $M \pm SEM$; (b) – время на свету, $*p < 0.05$, One-way ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение, $M \pm SEM$; (c) – количество свешиваний с открытых рукавов, $*p < 0.05$, критерий Крускала – Уоллиса с использованием теста Данна для множественного сравнения, $Me \pm IQR$.

В тесте ТСЛ в первой посадке теста с помощью Two-way ANOVA (факторы анализа – «Группа» и «Отсек») обнаружили статистически значимое отличие по фактору «Отсек» ($F_{2,36} = 24.02$, $p < 0.0001$). Крысы WAG/Rij-nonAGS и Wistar-nonAGS значимо больше времени проводили рядом со стимульной крысой по сравнению с пустым отсеком, в то время как крысы WAG/Rij-AGS не отдавали значимого предпочтения отсеку рядом с животным (рис. 4). Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Результаты первой посадки теста «Трехкамерный социальный лабиринт»

Отсек	Wistar-nonAGS <i>n</i> = 9	WAG/Rij-nonAGS <i>n</i> = 12	WAG/Rij-AGS <i>n</i> = 8
stimulus	386.6 ± 67.2	402.1 ± 40.1	300.0 ± 55.5
center	37.1 ± 8.9****	42.3 ± 13.0****	46.7 ± 9.9**
empty	176.3 ± 60.5**	155.7 ± 41.1***	184.3 ± 41.4 ns

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. * – время, проведенное в отсеке (в секундах), сравнивали со временем в стимульном отсеке для каждой группы. Использовали Two-way ANOVA с поправкой Сидака для множественного сравнения.

При сравнении времени, проведенного в каждом отсеке, между группами статистически значимых отличий не обнаружили. По количеству контактов, количеству стоек и актов груминга группы Wistar-nonAGS, WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS не отличались. Во время второй посадки (оценка стремления к социальной новизне) различий между исследованными группами не обнаружили.

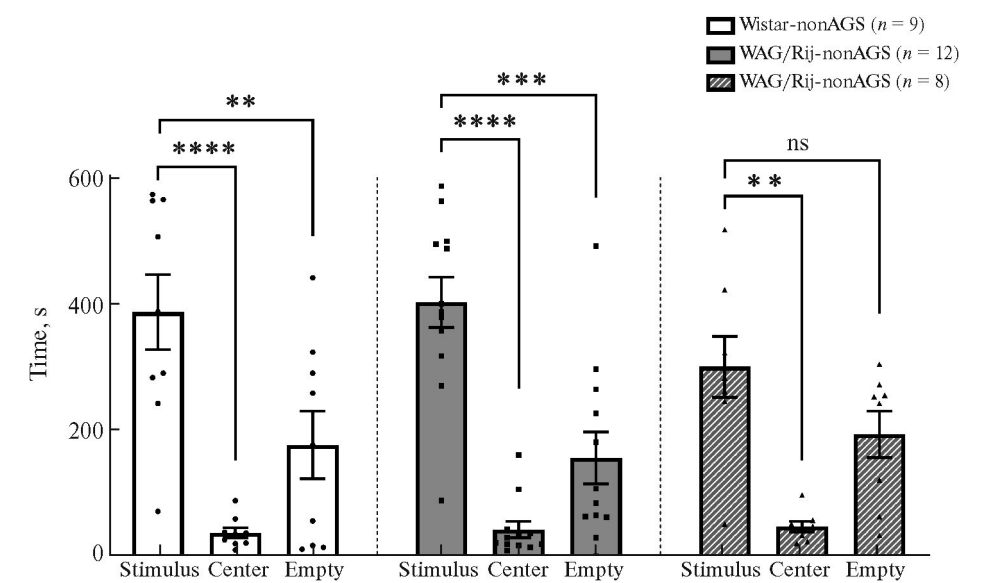


Рис. 4. Тест «Трехкамерный социальный лабиринт», первая посадка. * – достоверные отличия от времени, проведенного в отсеке рядом со стимулом (Two-way ANOVA, поправка Сидака для множественного сравнения). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

В тесте ВП One-way ANOVA показал статистически значимые отличия по фактору «Группа» во времени активного плавания ($F_{2,26} = 7.2, p < 0.001$) и в длительности периодов неподвижности ($F_{2,26} = 6.1, p < 0.001$). Результаты представлены в табл. 2. Крысы WAG/Rij-nonAGS не отличались от крыс WAG/Rij-AGS по времени активного плавания и неподвижности, но обе группы отличались от крыс Wistar-nonAGS (рис. 5а, б). Было проведено сравнение крыс линии WAG/Rij с крысами стока Wistar без деления по признаку аудиогенности (рис. 5с, d), при этом у крыс линии WAG/Rij (WR) зафиксиро-

вали меньшее время активного плавания и большее время неподвижности по сравнению с крысами Wistar (WS).

Таблица 2. Результаты теста «Вынужденное плавание»

Параметр	Wistar-nonAGS <i>n</i> = 9	WAG/Rij-nonAGS <i>n</i> = 12	WAG/Rij-AGS <i>n</i> = 8	Wistar <i>n</i> = 13	WAG/Rij <i>n</i> = 20
Время активного плавания, с	90.7 ± 15.8	42.9 ± 5.6**	39.0 ± 9.8**	80.3 ± 12.4	44.1 ± 5.0##
Длительность периодов неподвижности, с	267.9 ± 23.9	356.8 ± 15.4 **	348.8 ± 21.6*	260.4 ± 21.7	352.2 ± 12.5###

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. * – сравнение с Wistar-nonAGS (One-way ANOVA с поправкой Тьюки), # – сравнение Wistar и WAG/Rij (непарный *t*-критерий).

Электрофизиологическое исследование

При высокочастотной стимуляции соматосенсорной коры и дорсального стриатума оценивали эффективность прерывания характерных для абсансной эпилепсии пиковых разрядов (ПБР). Для этого количество прерванных ПБР делили на общее количество ПБР во время стимуляции без учета пропущенных приступов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Процент прерванных разрядов во время высокочастотной стимуляции соматосенсорной коры (SSC) и дорсального стриатума (DS) для крыс линии WAG/Rij с предрасположенностью к аудиогенным судорогам (WAG/Rij-AGS) и без нее (WAG/Rij-nonAGS)

Стимулируемые структуры	WAG/Rij-nonAGS	WAG/Rij-AGS
SSC 130 Гц	70.2% (<i>n</i> = 6)	51.5% (<i>n</i> = 6)
DS 130 Гц	0% (<i>n</i> = 6)	92.6% (<i>n</i> = 6)

Было показано, что высокочастотная стимуляция (130 Гц) дорсального стриатума эффективно прерывает ПБР только у крыс линии WAG/Rij-AGS, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии. У крыс WAG/Rij-nonAGS данный режим стимуляции не прерывал ПБР (AGS: 92.6 ± 19.9%, *n* = 6; non-AGS: 0 ± 0%, *n* = 6, *p* = 0.03, тест Манна – Уитни, табл. 3) (рис. 6а, б). Высокочастотная стимуляция соматосенсорной коры прерывала ПБР у обеих субпопуляций крыс линии WAG/Rij. При высокочастотной стимуляции соматосенсорной коры достоверных различий между аудиогенными и неаудиогенными группами крыс получено не было (*p* > 0.05, тест Уэлча) (рис. 6с, d).

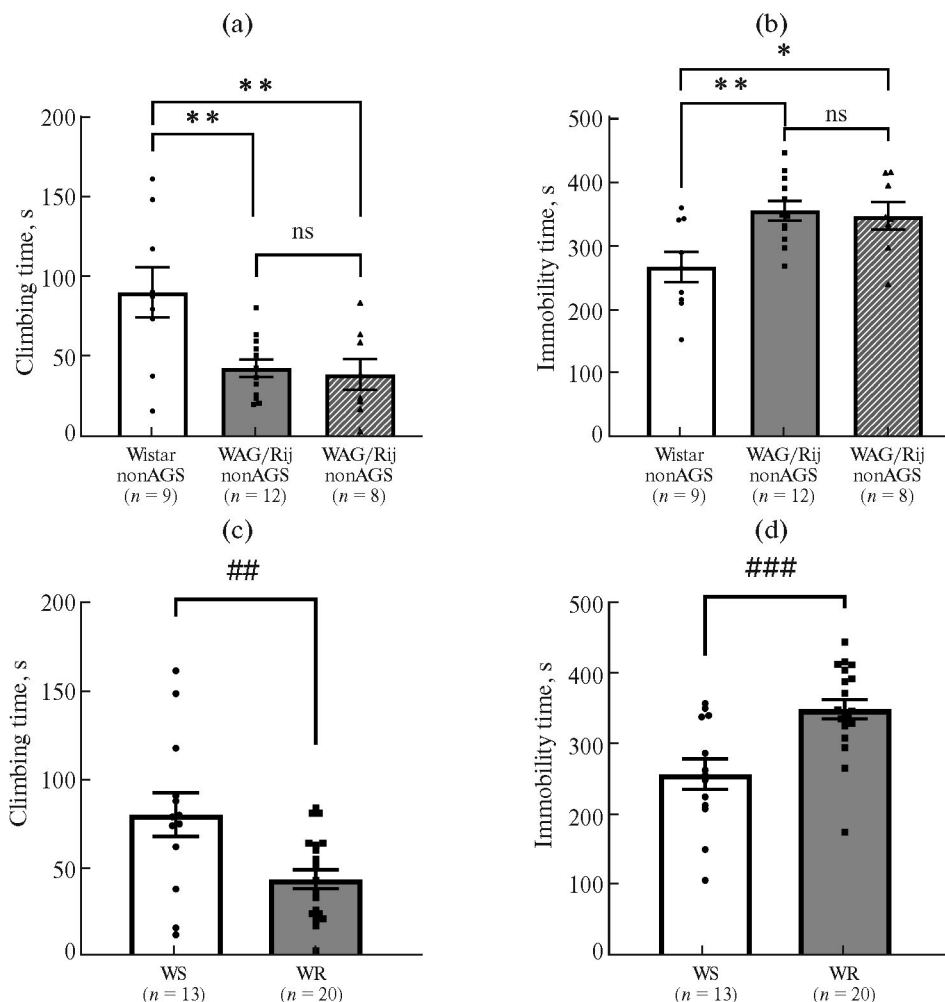


Рис. 5. Тест «Вынужденное плавание». Сравнение времени активного плавания (а) и времени неподвижности (б) у крыс Wistar-nonAGS, WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS. * – достоверные отличия от Wistar-nonAGS (One-way ANOVA с поправкой Тьюки), значимых отличий между крысами WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS не обнаружили. Сравнение времени активного плавания (с) и времени неподвижности (д) у крыс Wistar (WS) и WAG/Rij (WR). # – достоверные отличия, непарный t -критерий. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

В течение высокочастотной стимуляции дорсального стриатума у аудиогенной группы (рис. 6b) однофакторный дисперсионный анализ показал значимый эффект фактора «Стимуляция» ($F_{1,6,7,8} = 17.8$), а проведенный апостериорный тест Холма – Сидака выявил различия между средними значениями групп «baseline» (9.1 ± 1.2 с) и «stimulation 130 Hz» (4.3 ± 1.7 с), $p < 0.01$. Также в течение высокочастотной стимуляции соматосенсорной коры у неаудиогенной (рис. 6с) группы крыс линии WAG/Rij наблюдали достоверное снижение средней продолжительности разрядов (baseline: 4.5 ± 1.3 с; stimulation 130 Hz: 3.1 ± 1.0 с, $p < 0.05$). Анализ данных в течение трех часов после стимуляции достоверных различий не показал. По параметру «количество разрядов» статистически значимых отличий не было обнаружено.

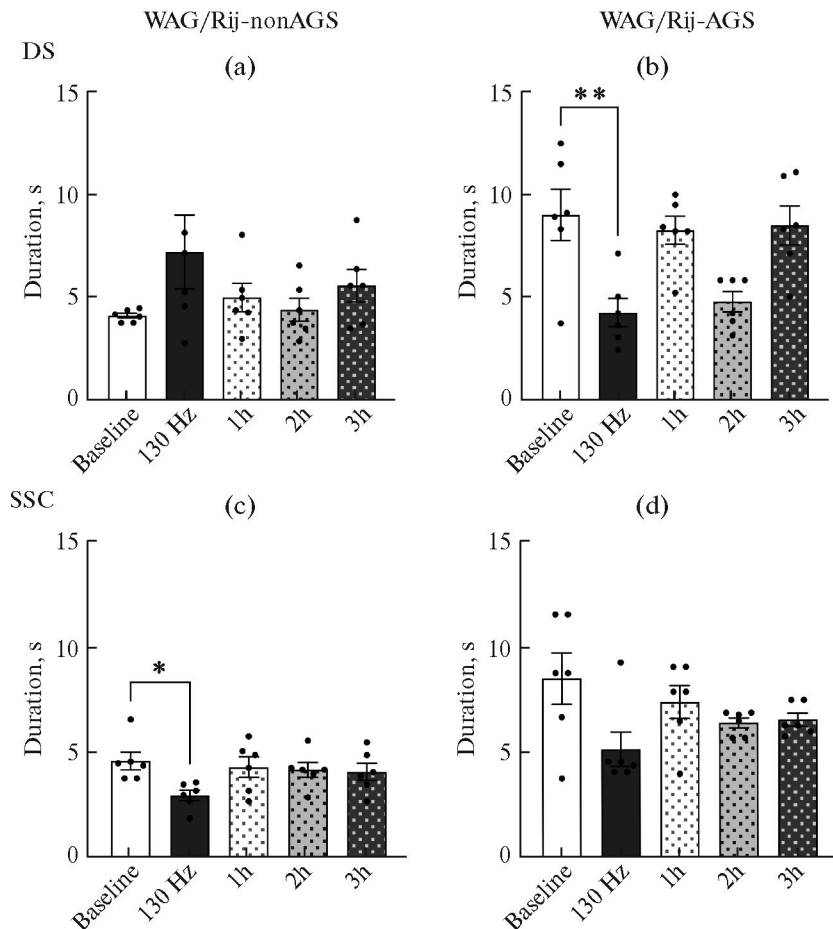


Рис. 6. Средняя продолжительность разрядов до (baseline), во время (130 Hz) и после (1/2/3h) высокочастотной стимуляции дорсального стриатума (a, b) и соматосенсорной коры (c, d) у неаудиогенной и у аудиогенной группы крыс линии WAG/Rij. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (DS – однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Холма – Сидака; SSC – критерий Фридмана). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поведенческое исследование

Результаты нашего исследования показали повышенный уровень тревожности у субпопуляции крыс линии WAG/Rij, чувствительных к аудиогенной эпилепсии, по сравнению с неаудиогенными крысами WAG/Rij до запуска эпилептического контура, участвующего в развитии аудиогенного припадка. На это указывают статистически значимо повышенное время нахождения аудиогенных крыс линии WAG/Rij в темных рукавах ПКЛ, сниженное время нахождения на свету и меньшее количество свешиваний с открытых рукавов по сравнению с неаудиогенными крысами. Можем предположить, что повышенная тревожность у аудиогенной субпопуляции крыс не является следствием воздействия звуковых стимуляций на структуры, участвующие в генера-

ции аудиогенного припадка, а обусловлена генетическими особенностями развития и функционирования мозга. Связанное с аудиогенностью повышение плотности связывания с D1DR и D2DR было показано в дорсальном стриатуме и моторной коре [9]. Из клинических исследований известна положительная корреляция между эффективностью когнитивно-поведенческой терапии и снижением показателя связывания меченого антагониста D2-рецепторов у пациентов с социальной тревожностью [25]. Это может указывать на связь между высоким уровнем рецепторной активности D2-рецепторов и проявлениями тревожности.

В тесте ВП, где оценивали депрессивноподобное поведение, при сравнении двух субпопуляций крыс WAG/Rij различий не зарегистрировали, однако обнаружили отличие обеих групп от неаудиогенных крыс Wistar. Тест ВП является одним из наиболее часто используемых тестов для оценки депрессивноподобного поведения у грызунов, в том числе в моделях психических расстройств [26]. Но в последнее время интерпретация результатов этого теста подвергается сомнению. Предполагается, что тест ВП оценивает стратегии преодоления острого неизбежного стресса, а не депрессивноподобное поведение у животных [27]. В этом случае неподвижность отражает пассивную стратегию, а активное плавание – активную стратегию преодоления стресса, вызванного неизбежным плаванием [27, 28]. Было высказано предположение, что неподвижность в тесте ВП является адаптивной реакцией и отражает переход от активных стратегий выживания к пассивным, а увеличение длительности активного поведения связано с повышенной тревожностью [28]. Тест ВП позволяет зарегистрировать поведенческую реакцию на действие неизбежного стрессора, которая может быть нарушена при депрессии и ряде других расстройств. Состояния, которые, как считается, способствуют развитию депрессии у людей, как правило, смещают показатели теста ВП у грызунов в сторону пассивной стратегии преодоления [29]. Мы предполагаем, что увеличение длительности неподвижности, зарегистрированное в наших экспериментах, может свидетельствовать о депрессивноподобном поведении крыс WAG/Rij обеих субпопуляций.

Ранее было показано, что проявления депрессивноподобного поведения у крыс линии WAG/Rij снижаются при фармакологическом подавлении ПБР. Крысы WAG/Rij, получавшие длительное лечение в раннем возрасте противоабсансным препаратом Ethosuximide, не проявляли симптомов депрессивноподобного поведения, в отличие от крыс WAG/Rij того же возраста, не получавших лечения [30]. У них также снижалась абсансная активность. Другими словами, снижение абсансной активности приводило к отмене депрессивноподобного поведения. Известны три генетические животные модели депрессии: Flinders Sensitive (FSL) [31], Maudsley Reactive [32] и римская модель низкого избегания [33]. Крысы WAG/Rij более схожи с крысами FSL: у обеих линий депрессивноподобные изменения поведения не связаны с повышенной тревожностью. Особенностью животных FSL является то, что у них депрессивноподобное поведение появляется после хронического легкого стресса [34]. Наши результаты показывают, что крысы линии WAG/Rij обладают признаками депрессивноподобного поведения в исходных условиях, т. е. депрессивноподобное поведение генетически обусловлено и не зависит от предрасположенности к аудиогенной эпилепсии и экспозиции звуковой стимуляции.

В нашем исследовании статистически значимые отклонения в социальном поведении крыс WAG/Rij-AGS были зарегистрированы только в первой сессии теста ТСЛ. Крысы WAG/Rij-nonAGS, как и крысы Wistar-nonAGS, проявляли заинтересованность в социальном объекте, в то время как у крыс WAG/Rij-AGS подобного социального предпочтения не обнаружили. Во время второй сессии (оценка стремления к социальной новизне) различий между группами Wistar-nonAGS, WAG/Rij-nonAGS и WAG/Rij-AGS не обнаружили. У крыс линии KM, выведенной из материнского стока Wistar по признаку аудиогенности, были зарегистрированы отклонения в социальном пове-

дении в обеих сессиях – в условиях латентной аудиогенной эпилепсии [35]. Позже было показано, что после предварительного трехразового предъявления аудиогенной стимуляции у крыс КМ также наблюдается социальный дефицит без существенных изменений [36].

Наши результаты показывают, что у крыс линии WAG/Rij с латентной аудиогенной эпилепсией наблюдаются отклонения в социальном поведении, однако нарушения в стремлении к социальной новизне, подобные обнаруженным у аудиогенных крыс КМ [35], отсутствуют. Можем предположить, что социальные нарушения у крыс линии WAG/Rij генетически обусловлены, но выраженность проявления зависит от степени развития аудиогенной эпилепсии. Действительно, у крыс WAG/Rij-AGS в ответ на звуковой стимул развивались судороги низкой интенсивности с разделением на две волны с тормозной паузой, длительным латентным периодом, что указывает на низкую интенсивность аудиогенного припадка. Крысы КМ, в отличие от WAG/Rij-AGS, демонстрируют судороги максимальной интенсивности с коротким латентным периодом начала без тормозной паузы.

Электрофизиологическое исследование

В этой серии экспериментов проводилась высокочастотная электрическая стимуляция соматосенсорной коры и дорсального стриатума. Область стимуляции соматосенсорной коры групп WAG/Rij-AGS и WAG/Rij-nonAGS не отличалась по плотности дофаминовых рецепторов, а область дорсального стриатума крыс WAG/Rij-AGS имела большую плотность дофаминовых рецепторов по сравнению с крысами WAG/Rij-nonAGS. Соматосенсорную кору можно рассматривать как область сравнения. С одной стороны, эта критическая область, где инициируется абсансная активность, с другой стороны, отличий по плотности дофаминовых рецепторов в данном регионе обнаружено не было. В нашем исследовании высокочастотная стимуляция (130 Гц) соматосенсорной коры у субпопуляции WAG/Rij-nonAGS эффективно прерывала 70.2% ПБР. На эффективность прерывания указывало статистически достоверное снижение продолжительности разрядов во время стимуляции. У крыс группы WAG/Rij-AGS количество прерываемых разрядов было ниже: высокочастотная стимуляция соматосенсорной коры была эффективна в 51.5% случаев. Таким образом, высокочастотная стимуляция соматосенсорной коры подавляла ПБР у обеих субпопуляций крыс линии WAG/Rij.

Реакция на десинхронизирующую высокочастотную стимуляцию области дорсального стриатума с разной плотностью дофаминовых рецепторов у WAG/Rij-AGS и WAG/Rij-nonAGS различалась между группами. Было показано, что электрическая стимуляция дорсального стриатума эффективно прерывает 92.6% ПБР у крыс с предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии. Данная область дорсального стриатума отличалась высокой плотностью дофаминовых рецепторов по сравнению с крысами WAG/Rij-nonAGS и Wistar. При этом высокочастотная стимуляция этой же области не прерывала ни одного разряда у крыс линии WAG/Rij-nonAGS. Предполагается, что нигростриарная дофаминергическая проекция является частью дистанционного управления абсансных припадков: разрушение нигростриарного дофаминергического пути приводило к достоверному снижению как общей продолжительности пик-волновых разрядов, так и к снижению продолжительности каждого из пик-волновых разрядов [15].

Для абсансной эпилепсии характерны функциональные корреляции между уровнями метаболизма дофамина и серотонина в стриатуме, что подчеркивает тесную взаимосвязь между этими системами мозга у абсансных крыс вне зависимости от предрасположенности к аудиогенным судорогам. Было показано, что часто повторяющиеся ПБР оказывают большее влияние на аминергическую систему мозга, чем аудиогенные припадки или генетическая предрасположенность к ним [37]. У крыс линии WAG/Rij показана низкая дофаминергическая реактивность нигростриарной проекции. В оптогенетическом исследовании была показана роль нигростриарного пути и разных проекций от сетчатой

части черной субстанции (SNpr) в контроле судорог разного типа. Ингибирование SNpr приводило к прекращению нескольких видов генерализованных припадков, в том числе абсансных и аудиогенных за счет подавления проекции в средние и глубокие слои верхнего двухолмия (DLSC). Селективное ингибирование проекций на педункулопонтинное ядро (PPN) показало неоднозначные результаты: ослабевали абсансные припадки, а на аудиогенную эпилепсию это воздействие не влияло. PPN имеет проекции в базальные ганглии и таламус. Активация DLSC или PPN приводит к десинхронизации активности коры [38]. Результаты нашего исследования также указывают на вовлеченность дорсального стриатума в контроль судорог разного типа. В настоящее время продолжают исследования влияния низкочастотной стимуляции дорсального стриатума, а также вентрального стриатума с низко- и высокочастотной стимуляцией у крыс линии WAG/Rij обеих субпопуляций групп. Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что сопутствующие эпилепсии состояния, такие как тревожность, депрессивно-подобное поведение и социальный дефицит, не обусловлены предварительной звуковой стимуляцией. Показано, что существуют различия вовлеченности дорсального стриатума в контроль абсансной и смешанной форм эпилепсии.

Тревожность и депрессия – самые распространенные коморбидные состояния у больных эпилепсией. Вопрос о том, как этиологически могут быть связаны проявления эпилепсии и коморбидные ей состояния, до сих пор остается мало изученным. Эти состояния оказывают существенное влияние не только на качество жизни пациентов, но и осложняют фармакотерапию [39]. Ряд антиконвульсантов обладает негативным психотропным профилем, утяжеляя проявления депрессии и тревожности [40], а отмена вальпроатов приводит к отягощению депрессии [41]. Показано, что именно депрессия снижает качество жизни у фармакорезистентных пациентов, а не частота эпилептических приступов [42]. Депрессия снижает эффективность лечения, увеличивает риск развития побочных эффектов как из-за нежелательных явлений, вызванных противосудорожными препаратами, так и на фоне лекарственного взаимодействия. Помимо этого, проблема гиподиагностики депрессии у эпилептических пациентов остается актуальной. Результаты проведенных ретроспективных экспериментов указывают на вовлеченность стриатума как в поведенческие нарушения, так и в контроль абсансной активности у крыс линии WAG/Rij. В настоящее время продолжают исследования влияния низкочастотной стимуляции дорсального стриатума, а также вентрального стриатума с низко- и высокочастотной стимуляцией у крыс линии WAG/Rij обеих групп. Возможно, фармакологические исследования с введением агонистов и антагонистов дофаминовых рецепторов двум группам крыс WAG/Rij и оптогенетические исследования, направленные на активацию или торможение исследованных структур, позволят расширить понимание наблюдаемых нарушений. Исследования в этом направлении могут обеспечить более дифференцированный подход к лечению больных эпилепсией с коморбидными психическими симптомами, а дофаминергическая система может рассматриваться как терапевтическая мишень.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента – А. К. Р., проведение экспериментов и обработка данных, подготовка иллюстраций – А. К. Р., К. С. М., Ц. Е. Т., обсуждение результатов – А. К. Р., К. С. М., Ц. Е. Т., подготовка и редакция рукописи – А. К. Р., К. С. М., Ц. Е. Т.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова № 121032300071-8. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М. В. Ломоносова, протоколы 154-ж от 26.04.2023 г. и 155-ж от 10.05.2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yuen AWC, Keezer MR, Sander JW* (2018) Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. *Epilepsy Behav* 78: 57–61.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.10.010>
2. *Alsaadi T, El Hammami K, Shahrour TM, Shakra M, Turkawi L, Almaskari B, Diab L, Raoof M* (2015) Prevalence of depression and anxiety among patients with epilepsy attending the epilepsy clinic at Sheikh Khalifa Medical City, UAE: A cross-sectional study. *Epilepsy Behav* 52(Pt A): 194–199.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.09.008>
3. *Coenen AM, Van Luijckelaar EL* (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 33(6): 635–655.
<https://doi.org/10.1023/a:1026179013847>
4. *Midzyanovskaya IS, Kuznetsova GD, Vinogradova LV, Shatskova AB, Coenen AML, van Luijckelaar G* (2004) Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats. *Epilepsy Behav* 5: 655–661.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.06.021>
5. *Hughes JR* (2009) Absence seizures: A review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav* 15(4): 404–412.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.06>
6. *Clément Y, Bondoux D, Launay JM, Chapouthier G* (1997) Convulsive effects of a benzodiazepine receptor inverse agonist: are they related to anxiogenic processes? *J Physiol (Paris)* 91(1): 21–29.
[https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(99\)80162-4](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(99)80162-4)
7. *Depaulis A, Helfer V, Deransart C, Marescaux C* (1997) Anxiogenic-like consequences in animal models of complex partial seizures. *Neurosci Biobehav Rev* 21(6): 767–774.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00060-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00060-7)
8. *Sarkisova KY, Kulikov MA* (2006) Behavioral characteristics of WAG/Rij rats susceptible and non-susceptible to audiogenic seizures. *Behav Brain Res* 166(1): 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.024>
9. *Tsyba E, Midzyanovskaya I, Birioukova L, Tuomisto L, van Luijckelaar G, Abbasova K* (2023) Striatal Patchwork of D1-like and D2-like Receptors Binding Densities in Rats with Genetic Audiogenic and Absence Epilepsies. *Diagnostics* 13: 587.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13040587>
10. *Ross KC, Coleman JR* (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 24(6): 639–653.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00029-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00029-4)
11. *Gale K, Proctor M, Veliskova J, Nehlig A* (2008) BASAL GANGLIA AND BRAINSTEM ANATOMY AND PHYSIOLOGY. *Epilepsy Comprehensive Textbook* 3: 367.
<https://www.researchgate.net/publication/281392567>
12. *Cools AR, Coolen JMM, Smit JCA, Ellenbroek BA* (1984) The striato-nigro-collicular pathway and explosive running behaviour: Functional interaction between neostriatal dopamine and collicular GABA. *Eur J Pharmacol* 100(1): 71–77.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90316-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90316-9)
13. *Meeren H, van Luijckelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A* (2005) Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62(3): 371–376.
<https://doi.org/10.1001/archneur.62.3.371>

14. *Abbasova KR, Chepurinov SA, Chepurnova NE, van Luijtelaaar G* (2010) The role of perioral afferentation in the occurrence of spike-wave discharges in the WAG/Rij model of absence epilepsy. *Brain Res* 1366: 257–262.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.007>
15. *Tugba EK, Medine GIO, Ozlem A, Deniz K, Filiz OY* (2022) Prolongation of absence seizures and changes in serotonergic and dopaminergic neurotransmission by nigrostriatal pathway degeneration in genetic absence epilepsy rats. *Pharmacol Biochem Behav* 213: 173317.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173317>
16. *Kanner AM* (2008) Mood disorder and epilepsy: a neurobiologic perspective of their relationship. *Dialogues Clin Neurosci* 10(1): 39–45.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2008.10.1/amkanner>
17. *Jones NC, O'Brien TJ* (2013) Stress, epilepsy, and psychiatric comorbidity: how can animal models inform the clinic? *Epilepsy Behav* 26(3): 363–369.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.09.002>
18. *Birioukova LM, Midzyanovskaya IS, Lensu S, Tuomisto L, van Luijtelaaar G* (2005) Distribution of D1-like and D2-like dopamine receptors in the brain of genetic epileptic WAG/Rij rats. *Epilepsy Res* 63(2–3): 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2004.12.001>
19. *Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M* (1985) Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3): 149–167.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
20. *Landauer MR, Balster RL* (1982) A new test for social investigation in mice: Effects of d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 78(4): 322–325.
<https://doi.org/10.1007/BF00433734>
21. *Wee B* (1995) Mate preference and avoidance in female rats following treatment with scopolamine. *Physiol Behav* 58(1): 97–100.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)00029-i](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)00029-i)
22. *Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M* (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47(4): 379–391.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8)
23. *Щетинин ЕВ, Батуринов ВА, Арушанян ЕБ, Ованесов КБ, Попов АВ* (1989) Биоритмологический подход к оценке вынужденного плавания как экспериментальная модель «депрессивного» состояния. *Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова* 39(5): 958–964. [*Shchetinin EV, Baturin VA, Arushanian EB, Ovanesov KB, Popov AV* (1989) A biorhythmologic approach to evaluating forced swimming as an experimental model of a "depressive" state. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 39(5): 958–964. (In Russ)].
24. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. The New Coronal Set. 5th Edition.
25. *Cervenka S, Hedman E, Ikoma Y, Djurfeldt DR, Rück C, Halldin C, Lindefors N* (2012) Changes in dopamine D2-receptor binding are associated to symptom reduction after psychotherapy in social anxiety disorder. *Transl Psychiatry* 2(5): e120.
<https://doi.org/10.1038/tp.2012.40>
26. *Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF* (2013) Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118: 227–239.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012>
27. *Molendijk ML, de Kloet ER* (2022) Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration. *Eur J Neurosci* 55: 2813–2831.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15139>
28. *Anyan J, Amir S* (2018) Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology* 43: 931–933.
<https://doi.org/10.1038/npp.2017.260>
29. *Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG* (2017) The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci* 8(5): 955–960.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00042>
30. *Sarkisova KY, Kuznetsova GD, Kulikov MA, van Luijtelaaar G* (2010) Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia* 51(1): 146–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02260.x>
31. *Overstreet DH* (1993) The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 17(1): 51–68.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80230-1](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80230-1)

32. *Broadhurst PL* (1975) The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet* 5(4): 299–319.
<https://doi.org/10.1007/BF01073201>
33. *Broadhurst PL, Bignami G* (1965) Correlative effects of psychogenetic selection: a study of the Roman high and low avoidance strains of rats. *Behav Res Ther* 3: 273–280.
[https://doi.org/10.1016/0005-7967\(64\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0005-7967(64)90033-6)
34. *Overstreet DH, Friedman E, Mathé AA, Yadid G* (2005) The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29(4–5): 739–759.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.015>
35. *Rebik AA, Riga VD, Smirnov KS, Sysoeva OV, Midzyanovskaya IS* (2022) Social Behavioral Deficits in Krushinsky-Molodkina Rats, an Animal Model of Audiogenic Epilepsy. *J Pers Med* 12(12): 2062.
<https://doi.org/10.3390/jpm12122062>
36. *Rebik A, Broshevitskaya N, Kuzhuget S, Aleksandrov P, Abbasova K, Zaichenko M, Midzyanovskaya I* (2023) Audiogenic Seizures and Social Deficits: No Aggravation Found in Krushinsky – Molodkina Rats. *Biomedicines* 11(9): 2566.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11092566>
37. *Midzyanovskaya IS, Shatskova AB, MacDonald E, Van Luijckelaar G, Tuomisto L* (2020) Brain Aminergic Deficiency in Absence Epileptic Rats: Dependency on Seizure Severity and Their Functional Coupling at Rest. *J Behav Brain Sci* 10: 29–45.
<https://doi.org/10.4236/jbbs.2020.101003>
38. *Wicker E, Beck VC, Kulick-Soper C, Kulick-Soper CV, Hyder SK, Campos-Rodriguez C, Khan T, N'Gouemo P, Forcelli PA* (2019) Descending projections from the substantia nigra pars reticulata differentially control seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(52): 27084–27094.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1908176117>
39. *Lu E, Pyatka N, Burant CJ, Sajatovic M* (2021) Systematic Literature Review of Psychiatric Comorbidities in Adults with Epilepsy. *J Clin Neurol* 17(2): 176–186.
<https://doi.org/10.3988/jcn.2021.17.2.176>
40. *Gómez-Arias B, Crail-Meléndez D, López-Zapata R, Martínez-Juárez IE* (2012) Severity of anxiety and depression are related to a higher perception of adverse effects of antiepileptic drugs. *Seizure* 21(8): 588–594.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.06.003>
41. *Nanau RM, Neuman MG* (2013) Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem* 46(15): 1323–1338.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.012>
42. *Boylan LS, Flint LA, Labovitz DL, Jackson SC, Starner K, Devinsky O* (2004) Depression but not seizure frequency predicts quality of life in treatment-resistant epilepsy. *Neurology* 62(2): 258–261.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000103282.62353.85>

Behavioural and Electrophysiological Features of WAG/Rij Rats with Different Forms of Genetic Epilepsy

K. R. Abbasova^{a,*}, S. M. Kuzhuget^a, and E. T. Tsyba^a

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: abbasovakr@my.msu.ru*

WAG/Rij rats are widely used as a genetic model of absence epilepsy. Approximately 15–50% rats of the strain are susceptible to audiogenic seizures. WAG/Rij rats demonstrate depressive-like behavior. After preliminary sound provocation an increased level of anxiety was found in audiogenic susceptible WAG/Rij subgroup. Electrophysiological and behavioral studies suggest the involvement of the dopaminergic system in both absence and audiogenic epilepsy. An increased binding density to dopamine receptors was found in the dorsal striatum subregions in audiogenic prone rats compared to non-audiogenic. The study aims were (1) to determine whether behavioral changes in WAG/Rij rats were genetically determined or induced by prior sound stimulation; (2) how regions of the dorsal striatum with different density of dopamine receptors in subpopulations of WAG/Rij rats are involved in the absence epilepsy control. The study was conducted using two rat groups: WAG/Rij-nonAGS (absence epilepsy) and WAG/Rij-AGS (mixed epilepsy). The study was performed using tests: “Elevated plus maze”, “Forced swimming” and “Three chamber sociability test”. High-frequency deep brain stimulation was performed for evaluation of dorsal striatum involvement in the absence seizure control. After experiments animals were tested for the susceptibility to audiogenic seizures. It demonstrated that the increased level of anxiety in WAG/Rij-AGS rats is genetically determined, while depressive-like behavior in WAG/Rij rats is not dependent on a predisposition to audiogenic seizures. Deviations in social behavior were observed in WAG/Rij-AGS rats. Stimulation of the dorsal striatum indicates differences in the control of absence and mixed forms of epilepsy in the WAG/Rij-AGS and WAG/Rij-non-AGS subpopulations.

Keywords: WAG/Rij strain, absence epilepsy, audiogenic epilepsy, anxiety, depressive-like behavior; dopamine receptors, electrostimulation, dorsal striatum

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ АКТГ/МСГ
НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ, БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
И УРОВНИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И VEGF
В ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ НЕЙРОНОВ МОЗГА КРЫСЫ**

© 2024 г. Н. Ю. Глазова^{1,2}, Д. М. Манченко¹, Е. А. Себенцова^{1,2}, Л. А. Андреева²,
И. А. Гривенников², О. В. Долотов^{1,2}, Н. Ф. Мясоедов², Н. Г. Левицкая^{1,2,*}

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

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: nlevitskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 25.06.2024 г.

После доработки 03.09.2024 г.

Принята к публикации 01.10.2024 г.

АКТГ/МСГ-подобные пептиды (меланокортины) обладают широким спектром нейротропных эффектов, в том числе влияют на процессы обучения и памяти, нейропротекцию, эмоциональный статус и болевую чувствительность. Данная работа посвящена сравнению нейротропных эффектов пептидов, структура которых включает в себя природный фрагмент АКТГ и стабилизирующий трипептид PGP. В работе были использованы пептиды – АКТГ₄₋₇PGP (семакс), АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP. Изучалось влияние этих пептидов на исследовательское поведение, уровень тревожности и болевую чувствительность белых крыс, а также на уровни нейротрофических факторов BDNF (brain derived neurotrophic factor) и VEGF (vascular endothelial growth factor) в первичных культурах нейронов мозга крысы. Сравнительное исследование эффектов аналогов различных фрагментов АКТГ/МСГ позволило выявить как сходство, так и различия их нейротропной активности. Пептиды, в структуре которых присутствует фрагмент АКТГ₄₋₇ или АКТГ₆₋₉, обладают ноотропной, анксиолитической и анальгетической активностью, а также вызывают повышение уровней VEGF в культуре нейронов гиппокампа. Пептид, содержащий в структуре последовательность АКТГ₇₋₁₀, проявляет анксиолитическую активность, увеличивает исследовательское поведение, не влияет на болевую чувствительность и оказывает стимулирующее влияние на уровни BDNF и VEGF в нейрональных культурах. Полученные данные свидетельствуют о том, что разные участки N-концевой области молекулы АКТГ ответственны за проявление определенных нейротропных эффектов меланокортинов. Результаты исследования могут быть использованы при разработке лекарственных препаратов на основе природных меланокортинов.

Ключевые слова: меланокортины, фрагменты АКТГ, синтетические аналоги, тревожность, болевая чувствительность, нейротрофические факторы, крысы

ВВЕДЕНИЕ

Меланокортины – это семейство нейропептидных гормонов, которое включает в себя аденокортикотропный гормон (АКТГ), три различные формы меланоцитстимулирующего гормона (α -, β - и γ -МСГ), фрагменты этих гормонов и их синтетические аналоги. Меланокортины (МК), рецепторы МК и эндогенные антагонисты этих рецепторов образуют меланокортиновую систему организма [1]. МК система вовлечена в регуляцию широкого круга физиологических функций, включая стероидогенез, пигментацию, иммунную систему, нейропротекцию, память и внимание, эмоциональный статус, болевую чувствительность и другие функции [2–4]. МК система играет важную роль в модуляции ряда патологических процессов, в том числе при нейродегенеративных и нервно-психических заболеваниях [4, 5]. В настоящее время охарактеризовано 5 типов МК-рецепторов (MCR1 – MCR5), которые различаются по распределению в тканях и по сродству к различным лигандам [6]. Все эндогенные МК содержат в своей структуре последовательность HFRW, соответствующую фрагменту АКТГ/ α -МСГ_{6,9} [7]. Тетрапептид HFRW является минимальным фрагментом, который способен активировать MCR, но этот пептид обладает очень низкой активностью и селективностью, что свидетельствует о важности остатков вне общей последовательности [8, 9].

Ответственной за нейротропные эффекты МК является N-концевая область молекулы АКТГ/МСГ – фрагмент АКТГ₄₋₁₀ (МЕНFRWG) [7]. Гептапептид АКТГ₄₋₁₀ способен связываться с MCR, обладает ноотропной, нейропротекторной и анальгетической активностью, участвует в регуляции ответа организма на стрессорные воздействия [2, 10, 11]. Нейротропную активность сохраняют также фрагменты природных пептидов и их аналоги, в структуре которых присутствуют последовательности АКТГ₄₋₇, АКТГ₆₋₉ или АКТГ₇₋₁₀ [10, 12, 13]. Предполагается, что активные центры для различных нейротропных эффектов могут находиться в разных локусах N-концевой области молекулы АКТГ [13, 14]. Фрагменты АКТГ/МСГ могут взаимодействовать с МК-рецепторами как смещенные лиганды, что приводит к активации различных сигнальных каскадов, опосредующих разные эффекты пептидов [4, 15]. Кроме того, МК могут выступать в роли аллостерических модуляторов активности рецепторов других нейромедиаторных систем [16]. Такие свойства могут определять разнообразные поведенческие эффекты коротких фрагментов АКТГ/МСГ.

Зависимость нейротропных эффектов МК от структуры в настоящее время недостаточно исследована. Изучение взаимосвязи структура – активность позволит выявить последовательности, ответственные за проявление определенных эффектов, что необходимо для разработки новых аналогов МК с заданными свойствами [17].

Короткие фрагменты АКТГ либо не способны активировать известные МК-рецепторы (АКТГ₄₋₇ и АКТГ₇₋₁₀), либо обладают очень низкой активностью (АКТГ₆₋₉), что может быть связано с их быстрой протеолитической деградацией [8, 14]. Ранее было показано, что присоединение последовательности, обогащенной пролином, к природным пептидам, обладающим нейротропной активностью, приводит к увеличению выраженности действия и пролонгации их эффектов [18, 19]. Такой подход был использован при разработке гептапептида семакс (МЕНFPGP), структура которого включает в себя фрагмент АКТГ₄₋₇ и стабилизирующий трипептид PGP (АКТГ₄₋₇PGP). Исследования показали, что семакс обладает ноотропной, анксиолитической и анальгетической активностью [20–22]. Кроме того, семакс оказывал нейротрофическое действие в экспериментах *in vivo* и *in vitro* – увеличивал экспрессию нейротрофического фактора мозга (brain derived neurotrophic factor, BDNF) в первичной культуре глиальных клеток [23] и в структурах мозга крыс при системном введении [24]. В дальнейшем были синтезированы и исследованы пептиды АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP (HFRWPGP и FR-WPGP). Было показано, что гептапептид АКТГ₆₋₉PGP, как и семакс, проявляет ноо-

тропную активность, однако длительность его действия меньше, чем у семакса [25]. АКТГ₆₋₉PGP оказывал антистрессорное действие в моделях острого и хронического стресса, проявлял нейропротекторную активность, а также снижал реакцию животных на болевое термическое раздражение [3, 26, 27]. Изучение физиологической активности АКТГ₇₋₁₀PGP показало, что этот пептид проявляет анксиолитическую активность, способен улучшать обучение крыс в тестах с отрицательным подкреплением, однако, в отличие от семакса, его введение приводит к росту числа ошибочных реакций при обучении с положительным подкреплением [28]. Влияние АКТГ₇₋₁₀PGP на болевую чувствительность ранее не исследовалось.

В настоящее время показано, что фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), первоначально рассматривавшийся как фактор, специфический для эндотелия, оказывает прямое воздействие на нейроны и глиальные клетки, регулируя их рост и дифференцировку [29]. Наряду с более изученным BDNF, VEGF является важным участником ряда гиппокамп-зависимых процессов, в том числе связанных с регуляцией когнитивных функций и эмоций. VEGF способен стимулировать синаптическую пластичность, усиливать нейрогенез, улучшать обучение и эмоциональное состояние животных [29, 30]. Показано, что α -МСГ стимулирует экспрессию VEGF в первичной культуре астроцитов гиппокампа крысы, что указывает на возможную роль этого фактора в нейропротекторных и когнитивных эффектах МК [31]. Влияние N-концевых фрагментов АКТГ/МСГ и их аналогов на экспрессию VEGF ранее не исследовалось.

Изучение нейротропных эффектов семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP проводилось в различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, с использованием разных доз и способов введения пептидов, что затрудняет сравнение полученных результатов. Для сопоставления активности пептидов нами было проведено исследование нейротрофических, анксиолитических и анальгетических эффектов аналогов N-концевых фрагментов АКТГ в одинаковых экспериментальных условиях.

Целью представленной работы явилось сравнительное исследование эффектов гептапептидов семакс, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на болевую чувствительность и уровень тревожности крыс, а также на уровни нейротрофических факторов BDNF и VEGF в первичных культурах нейронов мозга крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие синтетические меланокортины – АКТГ₄₋₇PGP (МЕНFPGP, семакс), АКТГ₆₋₉PGP (HFRWPGP) и АКТГ₇₋₁₀PGP (FRWGPGP). Пептиды были синтезированы в Лаборатории молекулярной фармакологии пептидов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”.

Эксперименты на первичных культурах нейронов гиппокампа и коры больших полушарий мозга крысы

В работе использовали первичные культуры нейронов гиппокампа и коры больших полушарий эмбрионов (E17) крыс линии Sprague-Dawley. Ткани механически диссоциировали, клетки высевали плотностью 150 тысяч клеток на лунку в обработанные поли-L-лизинном 96-луночные полистирольные планшеты (Nunc) и культивировали при 37 °C в 100 мкл стандартной бессывороточной среды N2 [32], содержащей дополнительно 15 мМ NEPES. После культивирования в течение 5 суток в культуральную среду вносили стерильные растворы исследуемых пептидов до указанной концентрации. В качестве контроля добавляли эквивалентный объем растворителя. Через 24 ч после внесения пептидов отбирали культуральную среду и вносили холодный (4 °C) экстракционный буфер [33]. После инкубации в течение 15 мин

при 4 °С и четырех циклов замораживания – размораживания клеточные экстракты центрифугировали 1 ч при 15000 g (4 °С), супернатанты отбирали и хранили при –70 °С. Оценку уровней BDNF и VEGF в полученных лизатах проводили с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов “BDNF Emax” (Promega) и “Rat VEGF Construction Kit” (Antigenix) согласно методикам и рекомендациям производителей.

Эксперименты на животных

Работа выполнена на 170 самцах крыс Wistar массой 220–250 г, полученных из питомника “Столбовая” (Московская область, Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением 12-часового светового режима и свободным доступом к воде и стандартному лабораторному корму. До начала эксперимента для всех крыс проводили 10-дневную адаптацию – ежедневный хэндлинг в течение 1–2 мин.

При изучении влияния пептидов на поведение крыс препараты вводили интраназально (и/н) за 15 мин до тестирования. Пептиды вводили бодрствующим животным в дозе 0.05 мг/кг в водном растворе в объеме 0.1 мл/кг массы тела. Дозы пептидов, время и способ введения были выбраны на основании ранее проведенных исследований влияния аналогов фрагментов АКТГ на поведение животных [20, 25, 28]. При изучении влияния пептидов на болевую чувствительность крыс препараты вводили внутрибрюшинно (в/б) в дозе 0.5 мг/кг в водном растворе в объеме 1 мл/кг массы тела. Ранее нами было показано, что семакс при в/б введении оказывает анальгетическое действие, при этом наиболее эффективной является доза 0.5 мг/кг. При и/н введении семакс не оказывал влияния на болевую чувствительность крыс [34]. На основании этих данных были выбраны дозы и способ введения пептидов для исследования их влияния на болевую чувствительность крыс. Во всех экспериментах контрольным животным вводили эквивалентный объем воды для инъекций в соответствующие сроки и соответствующим способом.

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт”

Для оценки исследовательского поведения и уровня тревожности животных использовали тест “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ). Экспериментальная камера лабиринта состоит из четырех расходящихся из центра рукавов. Два противоположных рукава закрыты с торцов стенками; два других – открыты. Проводили две серии независимых экспериментов на разных животных. В первом случае животных тестировали при однородном неярком освещении (освещенность открытых рукавов – 45 лк, закрытых – 20 лк), во втором – при контрастном освещении рукавов (закрытые рукава затемнены – 8 лк, открытые – ярко освещены – 450 лк). Крысу помещали в центр лабиринта и в течение 5 мин регистрировали время нахождения на открытых и закрытых рукавах лабиринта, количество заходов в открытые и закрытые рукава, а также число стоек и свешиваний с открытых рукавов.

Тест “сдавливания задней лапы”

Для оценки болевой чувствительности животных использовали тест “сдавливания задней лапы”, в котором было ранее зарегистрировано анальгетическое действие семакса. В данном тесте болевым раздражителем служит равномерно нарастающее давление на заднюю конечность. Измерение проводили с помощью анальгезиметра фирмы “Ugo Basile” (Италия). Уровень болевой чувствительности определяли по величине давления на конечность в момент отдергивания лапы. Давление измерялось в условных единицах прибора (одна условная единица соответствует возрастанию нагрузки на 20 г/см²). Максимальная нагрузка на конечность составляла 25 условных единиц. До

введения препаратов проводили три измерения исходной болевой чувствительности. При анализе результатов для вычисления фоновой болевой чувствительности исходные значения усредняли. После инъекции проводили 6 измерений болевой чувствительности с интервалом 15 мин. Выраженность анальгетического действия оценивали в процентах к максимально возможному эффекту. Для этого при статистической обработке данных для каждого животного при каждом измерении вычисляли относительное изменение болевой чувствительности по формуле: $(P_i - P_0) / (P_{\max} - P_0) \times 100$, где P_i – величина болевого порога при измерении, P_0 – фоновая болевая чувствительность, $P_{\max}$ – максимальная нагрузка на конечность [35].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных производили при помощи пакетов программ “Statistica 10” и “GraphPad Prism 8”. Анализ выборок показал соответствие распределения критериям нормального ($p > 0.20$; критерии Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка) и равенство дисперсий ($p > 0.10$, тест Брауна – Форсайта), что позволило нам использовать дисперсионный анализ (ANOVA). Анализ результатов теста ПКЛ и уровней BDNF и VEGF проводили с использованием однофакторного ANOVA для межгруппового фактора ПЕПТИД (контроль vs. семакс vs. АКТГ₆₋₉PGP vs. АКТГ₇₋₁₀PGP) с последующим post hoc анализом с использованием критерия Даннетта. При анализе влияния каждого пептида на изменения болевого порога применяли двухфакторный ANOVA с повторными измерениями (repeated ANOVA) для межгруппового фактора ПЕПТИД (контроль vs. пептид) и внутригруппового фактора ВРЕМЯ (время после введения препарата). В случае достоверного влияния указанных факторов или их взаимодействия проводили post hoc анализ с использованием критерия Фишера (Fisher LSD test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные на графиках представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на уровни нейротрофических факторов в первичных культурах нейронов гиппокампа и коры больших полушарий мозга крысы

Исследовалось влияние гептапептидов в концентрации 0.1 нМ на содержание BDNF и VEGF в нейрональных культурах. Использование однофакторного ANOVA показало значимое влияние фактора ПЕПТИД на уровни BDNF в культуре нейронов коры больших полушарий ($F_{3,20} = 6.75$; $p < 0.003$). Множественное сравнение показало статистически значимое увеличение уровней BDNF при введении АКТГ₇₋₁₀PGP относительно контрольных значений ($p < 0.02$) (рис. 1). Значимых изменений уровней BDNF в культивируемых нейронах коры больших полушарий мозга крысы через 24 ч после введения семакса или АКТГ₆₋₉PGP в концентрации 0.1 нМ обнаружено не было ($p > 0.70$). При оценке влияния препаратов на уровни BDNF в культуре нейронов гиппокампа было зарегистрировано статистически значимое влияние фактора ПЕПТИД ($F_{3,12} = 9.08$; $p < 0.002$; ANOVA). Введение АКТГ₇₋₁₀PGP приводило к значимому увеличению содержания BDNF в культуре по сравнению с контролем ($p = 0.001$). Введение семакса или АКТГ₆₋₉PGP в концентрации 0.1 нМ не приводило к значимому изменению уровней BDNF ($p > 0.30$). Оценка воздействия пептидов на уровни VEGF в культуре нейронов гиппокампа продемонстрировала статистически значимое влияние фактора ПЕПТИД ($F_{3,12} = 9.09$; $p < 0.002$; ANOVA). Дальнейший анализ показал, что введение всех исследуемых пептидов в концентрации 0.1 нМ приводит к значимому повышению уровней нейротрофина в культуре ($p < 0.03$).

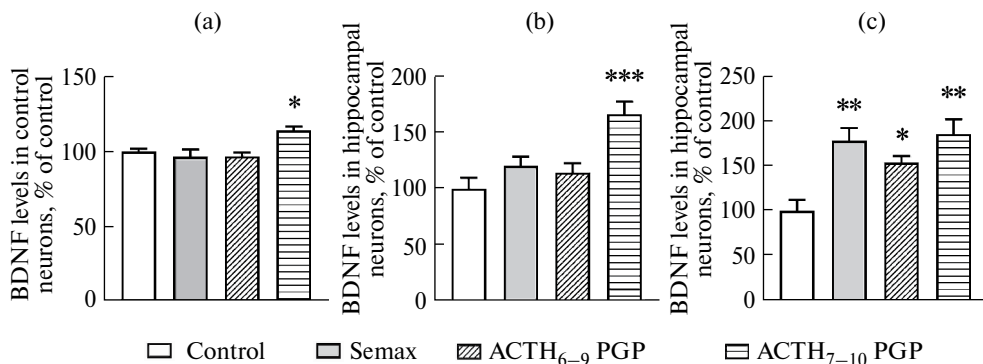


Рис. 1. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на уровни BDNF и VEGF в культивируемых нейронах коры больших полушарий и гиппокампа эмбрионов крысы. (а) – уровни BDNF в нейронах коры больших полушарий; (б) – уровни BDNF в нейронах гиппокампа; (с) – уровни VEGF в нейронах гиппокампа. Уровни BDNF и VEGF в белковых экстрактах клеток измеряли через 24 ч после внесения пептидов в концентрации 0.1 нМ. В каждой группе по 6 (кора БП) или 4 (гиппокамп) клеточных культуры. Средние значения уровней BDNF в контрольных клеточных культурах нейронов гиппокампа и коры составляли 4.63 и 2.38 пг/100 тысяч высеванных клеток соответственно; среднее значение уровней VEGF в контрольных клеточных культурах нейронов гиппокампа составляло 56.21 пг/100 тысяч высеванных клеток. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистически значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) и *** ($p < 0.001$).

2. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на исследовательское поведение и уровень тревожности животных в различных экспериментальных условиях

Влияние пептидов на уровень тревожности и исследовательское поведение крыс оценивали в тесте ПКЛ. Пептиды вводили и/н за 15 мин до тестирования. Проводили 2 серии экспериментов на разных животных. В первой серии использовалось контрастное, а во второй – однородное неяркое освещение рукавов лабиринта. В каждой серии было 4 группы животных (контрольная группа и три группы с введением пептидов).

При контрастном освещении рукавов (в условиях высокой стрессорной нагрузки) использование однофакторного ANOVA продемонстрировало значимое влияние фактора ПЕПТИД на время, проведенное в открытых рукавах ($F_{3,36} = 9.76$; $p < 0.001$), число заходов в открытые рукава ($F_{3,36} = 5.76$; $p < 0.003$) и число свешиваний с открытых рукавов лабиринта ($F_{3,36} = 7.25$; $p < 0.001$). Дальнейший анализ показал, что введение всех исследованных пептидов приводит к статистически значимому увеличению перечисленных параметров относительно контрольных значений (рис. 2). Отличий между пептидами выявлено не было ($p > 0.20$). Значимого влияния исследуемых препаратов на число стоек и заходов в закрытые рукава лабиринта отмечено не было ($F_{3,36} < 1.8$; $p > 0.15$, 1-way ANOVA).

При использовании однородного неяркого освещения лабиринта (в условиях пониженной стрессорной нагрузки) ANOVA показал статистически значимое влияние фактора ПЕПТИД на число стоек ($F_{3,36} = 6.44$; $p < 0.001$) и число заходов в закрытые рукава лабиринта ($F_{3,36} = 4.33$; $p < 0.01$). Дальнейший анализ показал, что введение АКТГ₇₋₁₀PGP приводит к значимому увеличению этих показателей как относительно контрольных значений, так и по сравнению с группами крыс, получавшими инъекции семакса или АКТГ₆₋₉PGP (рис. 3).

В группах крыс, которым вводили семакс или АКТГ₆₋₉PGP, число стоек и заходов в закрытые рукава лабиринта не отличались от контрольных значений ($p > 0.17$). Значимого влияния фактора ПЕПТИД на время в открытых рукавах, число свешиваний и заходов в открытые рукава в данной модификации теста зарегистрировано не было ($F_{3,36} < 1.5$; $p > 0.20$).

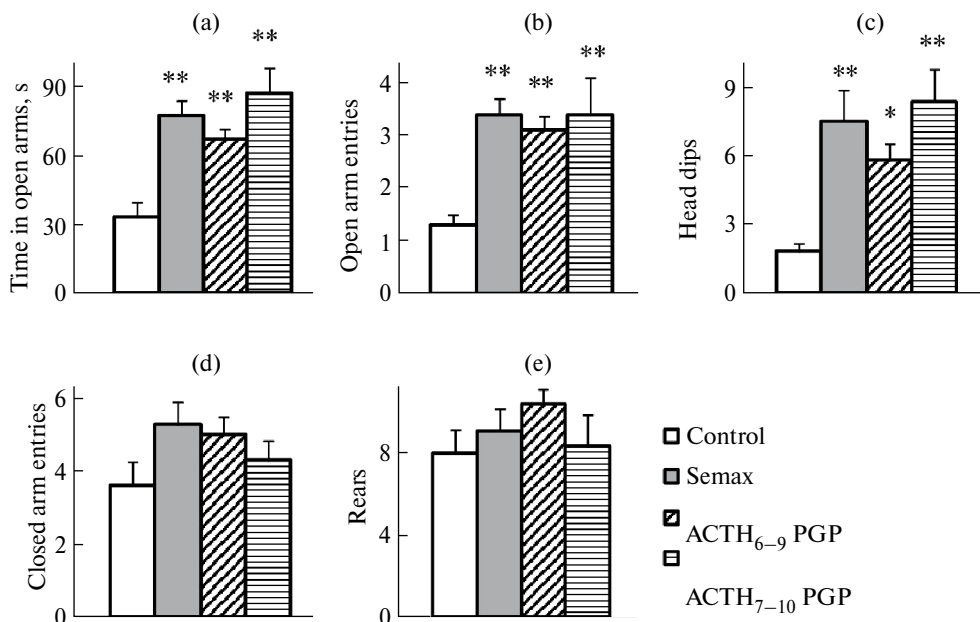


Рис. 2. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на поведение крыс в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” при контрастном освещении рукавов лабиринта. (а) – время, проведенное в открытых рукавах лабиринта (с); (б) – число заходов в открытые рукава; (с) – число свешиваний; (д) – число заходов в закрытые рукава; (е) – число стоек. Пептиды вводили интраназально в дозе 0.05 мг/кг за 15 мин до тестирования. В каждой группе было по 10 крыс. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистически значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$).

3. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на болевую чувствительность крыс

Влияние пептидов на болевую чувствительность крыс изучали в тесте “сдавливания задней лапы”. Пептиды вводили в/б в дозе 0.5 мг/кг. Эффекты каждого пептида изучали в отдельном эксперименте. В каждом эксперименте было 2 группы крыс (контрольная группа и группа с введением пептида).

При исследовании эффектов семакса двухфакторный ANOVA выявил статистически значимое влияние фактора ПЕПТИД ($F_{1,28} = 14.42$; $p < 0.001$), а также значимое взаимодействие факторов ПЕПТИД и ВРЕМЯ ($F_{8,224} = 4.20$; $p < 0.0001$) для величины болевого порога. Дальнейший анализ показал статистически значимое увеличение этого показателя в группе крыс, получавших инъекцию семакса, с 15-й по 75-ю мин после введения пептида относительно контрольных значений. Кроме того, с 15-й по 60-ю мин после инъекции величина болевого порога в этой группе крыс статистически значимо превышала фоновые значения. В контрольной группе животных значимых отличий от фоновых значений отмечено не было ($p > 0.16$) (рис. 4).

При изучении эффектов АКТГ₆₋₉PGP двухфакторный ANOVA выявил статистически значимое влияние факторов ПЕПТИД ($F_{1,28} = 14.42$; $p < 0.001$) и ВРЕМЯ ($F_{8,224} = 5.71$; $p < 0.001$), а также значимое взаимодействие этих факторов ($F_{8,224} = 2.70$; $p < 0.01$) для величины болевого порога. Post hoc анализ показал статистически значимое увеличение болевого порога в группе крыс, которым вводили АКТГ₆₋₉PGP, с 15-й по 45-ю мин после инъекции по сравнению с контролем. Величина этого показателя через 15 и 45 мин после введения пептида статистически значимо превышала исходные

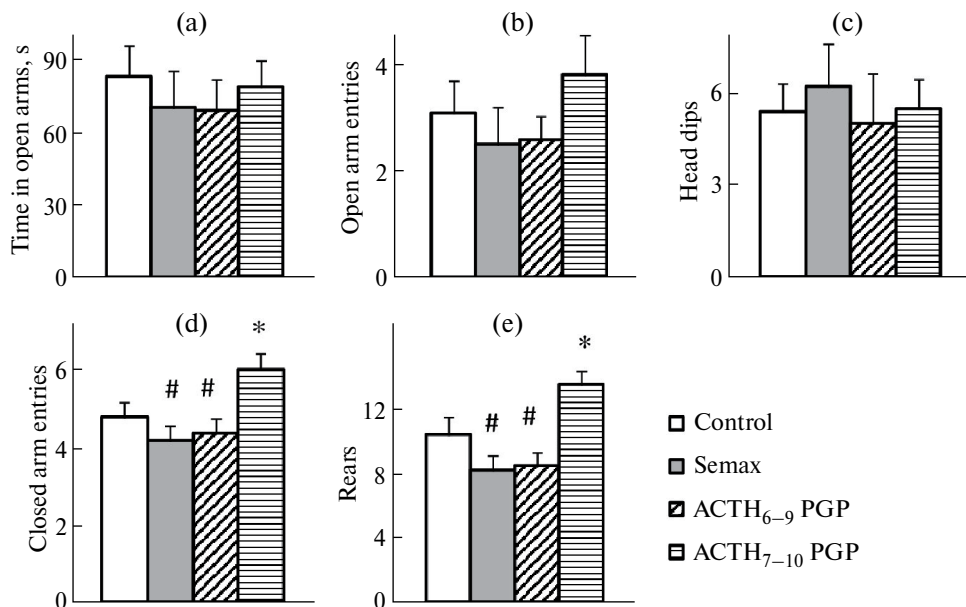


Рис. 3. Влияние семакса, АКТГ₆₋₉PGP и АКТГ₇₋₁₀PGP на поведение крыс в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” при однородном слабом освещении рукавов лабиринта. (а) – время, проведенное в открытых рукавах лабиринта – секунды; (б) – число заходов в открытые рукава; (с) – число свешиваний; (д) – число заходов в закрытые рукава; (е) – число стоек. Пептиды вводили интраназально в дозе 0.05 мг/кг за 15 мин до тестирования. В каждой группе было по 10 крыс. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Статистически значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$), от группы с введением АКТГ₇₋₁₀PGP – # ($p < 0.05$) и ## ($p < 0.01$).

значения, а через 30 мин увеличение относительно исходных значений было на уровне тенденции ($p < 0.06$). В контрольной группе крыс значимых отличий от фоновых значений отмечено не было ($p > 0.11$) (рис. 4).

При исследовании влияния АКТГ₇₋₁₀PGP на болевую чувствительность крыс ANOVA не выявил значимого влияния факторов ПЕПТИД и ВРЕМЯ, а также взаимодействия этих факторов для величины болевого порога крыс в тесте “сдавливания задней лапы” ($F < 1.6$; $p > 0.15$) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МК обладают широким спектром нейротропных эффектов, в том числе влияют на процессы обучения и памяти, нейропротекцию, эмоциональный статус и болевую чувствительность [2–4]. Участком, ответственным за нейротропную активность МК, является фрагмент АКТГ₄₋₁₀ [7]. Результаты структурно-функциональных исследований позволяют предположить, что последовательность этого фрагмента включает в себя несколько различных, возможно, перекрывающихся сайтов, которые способны, воздействуя на рецепторы и активируя разные сигнальные пути, вызывать различные эффекты [4]. Данная работа была посвящена сравнению эффектов пептидов, структура которых включала в себя природный фрагмент АКТГ – АКТГ₄₋₇, АКТГ₆₋₉ или АКТГ₇₋₁₀ – и стабилизирующий трипептид PGP.

Ранее нами было показано, что семакс (АКТГ₄₋₇PGP) и АКТГ₆₋₉PGP при и/н введении улучшают обучение крыс в моделях с положительным (пищевым) и отрицатель-

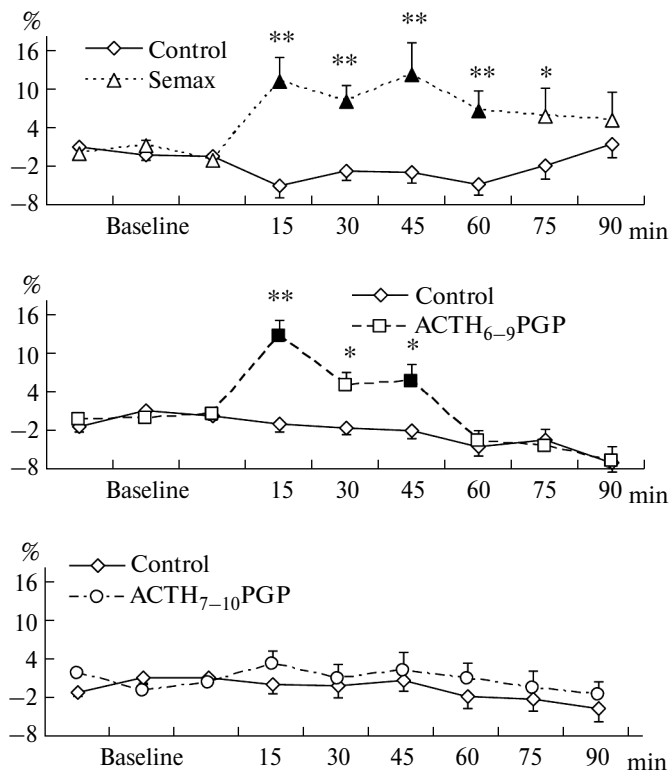


Рис. 4. Влияние семакса, АКГГ₆₋₉PGP и АКГГ₇₋₁₀PGP на болевую чувствительность крыс в тесте “сдавливание задней лапы”. Пептиды вводили внутривенно в дозе 0.5 мг/кг. По оси абсцисс – время относительно момента введения препарата (мин); по оси ординат – величина болевого порога в процентах к максимально возможному эффекту. В каждой группе было по 15 крыс. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистически значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$). Статистически значимые отличия от фоновых значений ($p < 0.05$) отмечены закрашенными символами.

ным (болевым) подкреплением [25, 28]. Аналогичное введение АКГГ₇₋₁₀PGP улучшало воспроизведение рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя, но негативно влияло на выработку пищевого рефлекса на место [28].

В данной работе для оценки влияния пептидов на поведение крыс нами был использован тест ПКЛ в двух модификациях (в условиях низкой и высокой стрессорной нагрузки), что позволило оценить зависимость эффектов пептидов от условий тестирования. Условия эксперимента (в том числе различия в освещенности установки) определяют базовый уровень исследовательской активности и тревожности и, как следствие, могут влиять на выраженность анксиолитических/анксиогенных эффектов различных препаратов и воздействий [36, 37]. Сравнение поведения контрольных крыс в тесте ПКЛ в различных условиях показало, что возрастание освещенности открытых рукавов приводит к снижению времени, проведенного в открытых рукавах лабиринта, числа свешиваний и заходов в открытые рукава. При этом не изменяются показатели, связанные с исследовательской активностью, – число стоек и заходов в закрытые рукава (рис. 2 и 3). Такие изменения свидетельствуют о возрастании у животных реакции тревоги и страха при изменении уровня освещенности экспериментальной установки [38].

Оценка влияния исследуемых препаратов на эмоциональное состояние животных показала, что семакс и АКТГ₆₋₉PGR не влияют на поведение крыс в условиях незначительной стрессорной нагрузки, однако в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха, оказывают анксиолитическое действие. Введение АКТГ₇₋₁₀PGR также приводило к снижению тревожности животных в стрессогенных условиях. Однако этот пептид, в отличие от семакса и АКТГ₆₋₉PGR, стимулировал исследовательскую активность крыс в условиях незначительной стрессорной нагрузки.

Таким образом, исследованные аналоги фрагментов АКТГ в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха (при обучении с болевым подкреплением или в ситуации яркого контрастного освещения рукавов ПКЛ), оказывают положительное ноотропное и анксиолитическое действие. В условиях незначительной стрессорной нагрузки (при выработке пищедобывательного рефлекса на место в лабиринте или в ситуации неяркого однородного освещения рукавов ПКЛ) пептиды семакс и АКТГ₆₋₉PGR улучшают обучение и не влияют на эмоциональное состояние животных. В таких условиях пептид АКТГ₇₋₁₀PGR стимулирует исследовательское поведение, что может приводить к росту ошибочных реакций при обучении в лабиринте.

Известно, что АКТГ-подобные пептиды играют важную роль в процессах восприятия боли. В зависимости от структуры, дозы и способа их введения может наблюдаться как снижение, так и повышение болевой чувствительности [39]. Ранее нами было показано, что фрагмент АКТГ₄₋₁₀ и семакс при в/б введении оказывают анальгетическое действие в тесте “сдавливания задней лапы” [11, 34]. В данной работе в/б введение семакса вызывало повышение болевого порога у крыс в этом тесте, что согласуется с полученными ранее данными. Инъекция АКТГ₆₋₉PGR также приводила к снижению болевой чувствительности, однако продолжительность эффекта этого пептида была меньше, чем семакса. Пептид АКТГ₇₋₁₀PGR не оказывал влияния на болевую чувствительность крыс. Следовательно, для сохранения анальгетической активности необходимо наличие в структуре пептида последовательности АКТГ₄₋₇ или АКТГ₆₋₉.

Исследование влияния аналогов фрагментов АКТГ на содержание нейротрофических факторов в культуре нейронов показало, что только АКТГ₇₋₁₀PGR в использованной концентрации (0.1 нМ) способен стимулировать уровни BDNF в первичных культурах нейронов гиппокампа и коры больших полушарий мозга крысы. Введение семакса или АКТГ₆₋₉PGR в использованной концентрации не влияло на содержание этого нейротрофина в культурах. Все три исследованных пептида оказывали стимулирующее влияние на уровни VEGF в культуре нейронов гиппокампа.

BDNF мозга, в частности, коры больших полушарий, рассматривается как важный участник регуляции исследовательской активности [40, 41]. Полученные нами данные о стимуляции исследовательской активности пептидом АКТГ₇₋₁₀PGR, но не семаксом и АКТГ₆₋₉PGR, согласуются со способностью АКТГ₇₋₁₀PGR повышать уровни BDNF. Пептид, в структуре которого присутствует последовательность АКТГ₇₋₁₀, способен оказывать стимулирующее влияние на содержание как BDNF, так и VEGF в культуре нейронов. Пептиды, содержащие последовательности АКТГ₄₋₇ или АКТГ₆₋₉, в использованных условиях эксперимента были менее активны и оказывали влияние только на уровень VEGF в культуре нейронов гиппокампа. В настоящее время показано, что VEGF оказывает нейропротекторное и нейротрофическое действие, играет важную роль в регуляции когнитивных функций и эмоций [29, 42]. Увеличение экспрессии VEGF приводит к усилению нейрогенеза, улучшает гиппокамп-зависимое обучение и нормализует уровень тревожности и депрессивности [30, 43]. Одним из возможных механизмов нейропротекторных и когнитивных эффектов природных МК и их аналогов может быть регуляция продукции нейротрофических факторов клетками мозга [31].

Таким образом, сравнительное исследование эффектов синтетических МК-аналогов различных фрагментов N-концевой области АКТГ/МСГ позволило выявить как сходство, так и различия их нейротропной активности. Пептиды, в структуре которых

присутствует фрагмент АКТГ₄₋₇ или АКТГ₆₋₉, обладают ноотропной, анксиолитической и анальгетической активностью, а также вызывают повышение уровней VEGF в культуре нейронов гиппокампа. Пептид, содержащий в структуре последовательность АКТГ₇₋₁₀, проявляет анксиолитическую активность, увеличивает исследовательское поведение, не влияет на болевую чувствительность и оказывает стимулирующее влияние на уровни BDNF и VEGF в нейрональных культурах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разные участки N-концевой области молекулы АКТГ ответственны за проявление определенных нейротропных эффектов МК. Результаты исследования могут быть использованы при разработке лекарственных препаратов на основе природных меланокортинов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Н. Ф. М., И. А. Г., О. В. Д., Н. Г. Л.), сбор данных (Н. Ю. Г., Е. А. С., Д. М. М., Л. А. А.), обработка данных (Н. Ю. Г., Е. А. С., О. В. Д., Н. Г. Л.), написание и редактирование манускрипта (И. А. Г., О. В. Д., Н. Г. Л.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственных заданий Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (№ 121032300071-8) и Научно-исследовательского центра “Курчатовский институт”. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (протокол 97-ж-3 от 26.12.2022 г. и № 12.4-сод от 16.11.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feng W, Zhou Q, Chen X, Dai A, Cai X, Liu X, Zhao F, Chen Y, Ye C, Xu Y, Cong Z, Li H, Lin S, Yang D, Wang MW* (2023) Structural insights into ligand recognition and subtype selectivity of the human melanocortin-3 and melanocortin-5 receptors. *Cell Discov* 9: 81. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00586-4>
2. *Bertolini A, Tacchi R, Vergoni AV* (2009) Brain effects of melanocortins. *Pharmacol Res* 59: 13–47. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.10.005>
3. *Akimov MG, Fomina-Ageeva EV, Dudina PV, Andreeva LA, Myasoyedov NF, Bezuglov VV* (2021) ACTH(6–9)PGP peptide protects SH-SY5Y cells from H₂O₂, tert-butyl Hydroperoxide, and cyanide cytotoxicity via stimulation of proliferation and induction of prosurvival-related genes. *Molecules* 26: 1878. <https://doi.org/10.3390/molecules26071878>
4. *Gebrie A* (2023) The melanocortin receptor signaling system and its role in neuroprotection against neurodegeneration: Therapeutic insights. *Ann N Y Acad Sci* 1527: 30–41. <https://doi.org/10.1111/nyas.15048>
5. *Micioni Di Bonaventura E, Botticelli L, Del Bello F, Giorgioni G, Piergentili A, Quaglia W, Romano A, Gaetani S, Micioni Di Bonaventura MV, Cifani C* (2022) Investigating the role of the central melanocortin system in stress and stress-related disorders. *Pharmacol Res* 185: 106521. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106521>

6. Markov DD, Dolotov OV, Grivennikov IA (2023) The Melanocortin System: A Promising Target for the Development of New Antidepressant Drugs. *Int J Mol Sci* 24: 6664.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076664>
7. Ericson MD, Lensing CJ, Fleming KA, Schlasner KN, Doering SR, Haskell-Luevano C (2017) Bench-top to clinical therapies: A review of melanocortin ligands from 1954 to 2016 *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863: 2414–2435.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.020>
8. Mowlazadeh Haghighi S, Zhou Y, Dai J, Sawyer JR, Hraby VJ, Cai M (2018) Replacement of Arg with Nle and modified D-Phe in the core sequence of MSHs, Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂, leads to hMC1R selectivity and pigmentation. *Eur J Med Chem* 151: 815–823.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.021>
9. Todorovic A, Ericson MD, Palusak RD, Sorensen NB, Wood MS, Xiang Z, Haskell-Luevano C (2016) Comparative Functional Alanine Positional Scanning of the α -Melanocyte Stimulating Hormone and NDP-Melanocyte Stimulating Hormone Demonstrates Differential Structure-Activity Relationships at the Mouse Melanocortin Receptors. *ACS Chem Neurosci* 7: 984–994.
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00098>
10. Strand FL (2000) David and Goliath – the slingshot that started the neuropeptide revolution. *Eur J Pharmacol* 405: 3–12.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00536-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00536-7)
11. Ivanova DM, Levitskaya NG, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF (2007) Comparative study of analgesic potency of ACTH4-10 fragment and its analog semax. *Bull Exp Biol Med* 143: 5–8.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0002-5>
12. Catania A (2008) Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci* 31: 353–360.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.002>
13. Wolterink G, van Ree JM (1989) Behavioral and neurotrophic activity of ACTH-(7-16)NH₂. *Life Sci* 45: 703–710.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(89\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(89)90089-1)
14. De Wied D (1999) Behavioral pharmacology of neuropeptides related to melanocortins and the neurohypophyseal hormones. *Eur J Pharmacol* 375: 1–11.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00339-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00339-8)
15. Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S (2018) Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* 17: 243–260.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>
16. Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, Glazova NY, Sebentsova EA, Levitskaya NG, Myasoedov NF (2023) Synthetic corticotropins and the GABA receptor system: Direct and delayed effects. *Chem Biol & Drug Design* 101: 1393–1405.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14221>
17. Singh A, Haslach EM, Haskell-Luevano C (2010) Structure-activity relationships (SAR) of melanocortin and agouti-related (AGRP) peptides. *Adv Exp Med Biol* 681: 1–18.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6354-3_1
18. Ashmarin IP, Samonina GE, Lyapina LA, Kamenskii AA, Levitskaya NG, Grivennikov IA, Dolotov OV, Andreeva LA, Myasoedov NF (2005) Natural and hybrid (“chimeric”) stable regulatory glyproline peptides. *Pathophysiology* 11: 179–185.
<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2004.10.001>
19. Kolomin T, Shadrina M, Slominsky P, Limborska S, Myasoedov N (2013) A new generation of drugs: Synthetic peptides based on natural regulatory peptides. *Neurosci and Med* 4: 223–252.
<https://doi.org/10.4236/nm.2013.44035>
20. Levitskaya NG, Glazova NY, Sebentsova EA, Manchenko DM, Vilensky DA, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF (2008) Investigation of the Spectrum of Physiological Activities of the Heptapeptide Semax, an ACTH 4–10 Analogue. *Neurochem J* 2: 95–101.
<https://doi.org/10.1007/s11710-008-1018-0>
21. Levitskaya NG, Vilenskii DA, Sebentsova EA, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF (2010) Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol Bull* 37: 186–192.
<https://doi.org/10.1134/S1062359010020147>
22. Ivanova DM, Vilenskii DA, Levitskaya NG, Andreeva LA, Alfeeva LY, Kamenskii AA, Myasoedov NF (2006) Study of the relationship between analgesic activity and structure of synthetic melanocortin analogs. *Biol Bull* 33: 162–166.
<https://doi.org/10.1134/S1062359006020105>

23. Shadrina MI, Dolotov OV, Grivennikov IA, Slominsky PA, Andreeva LA, Inozemtseva LS, Limborska SA, Myasoedov NF (2001) Rapid induction of neurotrophin mRNAs in rat glial cell cultures by Semax, an adrenocorticotrophic hormone analog. *Neurosci Lett* 308: 115–118. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01994-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01994-2)
24. Dolotov OV, Karpenko EA, Inozemtseva LS, Seredenina TS, Levitskaya NG, Rozyczka J, Dubynina EV, Novosadova EV, Andreeva LA, Alfeeva LY, Kamensky AA, Grivennikov IA, Myasoedov NF, Engele J (2006) Semax, an analog of ACTH(4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus. *Brain Res* 1117: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.108>
25. Левицкая НГ, Глазова НЮ, Себенцова ЕА, Манченко ДМ, Андреева ЛА, Каменский АА, Мясоедов НФ (2019) Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКГГ6-9Pro-Gly-Pro. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 761–770. [Levitskaya NG, Glazova NY, Sebensova EA, Manchenko DM, Andreeva LA, Kamensky AA, Myasoedov NF (2019) Nootropic and anxiolytic effects of heptapeptide ACTH6-9Pro-Gly-Pro. *Russ J Physiol* 105: 761–770. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0869813919060049>
26. Filippenkov IB, Stavchansky VV, Glazova NY, Sebensova EA, Remizova JA, Valieva LV, Levitskaya NG, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV (2021) Antistress action of melanocortin derivatives associated with correction of gene expression patterns in the hippocampus of male rats following acute stress. *Int J Mol Sci* 22: 10054. <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>
27. Vorvul AO, Bobyntsev II, Medvedeva OA, Mukhina AY, Svishcheva MV, Azarova IE, Andreeva LA, Myasoedov NF (2022) ACTH(6-9)-Pro-Gly-Pro ameliorates anxietylike and depressive-like behaviour and gut mucosal microbiota composition in rats under conditions of chronic restraint stress. *Neuropeptides* 93: 102247. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102247>
28. Glazova NYu, Atanov MS, Pyzgareva AV, Andreeva LA, Manchenko DM, Markov DD, Inozemtseva LS, Dolotov OV, Levitskaya NG, Kamensky AA, Grivennikov IA, Myasoedov NF (2011) Neurotropic Activity of ACTH7–10PGP, an Analog of an ACTH Fragment. *Dokl Biol Sci* 440: 270–274. <https://doi.org/10.1134/S0012496611050140>
29. Licht T, Goshen I, Avital A, Kreisel T, Zubedat S, Eavri R, Segal M, Yirmiya R, Keshet E (2011) Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5081–5086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007640108>
30. De Rossi P, Harde E, Dupuis JP, Martin L, Chounlamountri N, Bardin M, Watrin C, Benetollo C, Pernet-Gallay K, Luhmann HJ, Honnorat J, Malleret G, Groc L, Acker-Palmer A, Salin PA, Meissirel C (2016) A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Mol Psychiatry* 21: 1768–1780. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.195>
31. Dubynina EV, Inozemtseva LS, Markov DD, Yatsenko KA, Dolotov OV, Grivennikov IA (2009) Alpha-melanocyte-stimulating hormone increases the expression of vascular endothelial growth factor in rat hippocampal astrocytes in vitro. *Neurochem J* 3: 267–271. <https://doi.org/10.1134/S1819712409040059>
32. Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 514–517. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.514>
33. Pollock GS, Vernon E, Forbes ME, Yan Q, Ma YT, Hsieh T, Robichon R, Frost DO, Johnson JE (2001) Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *J Neurosci* 21: 3923–3931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03923.2001>
34. Manchenko DM, Glazova NY, Levitskaya N, Andreeva LA, Kamenskii AA, Myasoedov NF (2012) The Nootropic and Analgesic Effects of Semax Given via Different Routes. *Neurosci Behav Physiol* 42: 264–270. doi:10.1007/s11055-012-9562-6
35. Pettersen VL, Zapata-Sudo G, Raimundo JM, Trachez MM, Sudo RT (2009) The synergistic interaction between morphine and maprotiline after intrathecal injection in rats. *Anesth Analg* 109: 1312–1327. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181b16ff5>
36. Pereira LO, da Cunha IC, Neto JM, Paschoalini MA, Faria MS (2005) The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res* 159: 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.10.002>

37. *Violle N, Balandras F, Le Roux Y, Desor D, Schroeder H* (2009) Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 203: 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.04.015>
38. *Padovan CM, Guimarães FS* (2000) Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 33: 79–83.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000000100011>
39. *Walker JM, Berntson GG, Sandman CA, Kastin AG, Akil H* (1981) Induction of Analgesia by Central Administration of ORG 2766, An Analog of ACTH 4-9. *Eur J Pharmacol* 69: 71–79.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90603-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90603-8)
40. *Huber R, Tononi G, Cirelli C* (2007) Exploratory behavior, cortical BDNF expression, and sleep homeostasis. *Sleep* 30: 129–139.
<https://doi.org/10.1093/sleep/30.2.129>
41. *Zhu SW, Codita A, Bogdanovic N, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Dickins DW, Mohammed AH* (2009) Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behav Brain Res* 197: 339–346.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.032>
42. *Dayi A, Cetin F, Sisman AR, Aksu I, Tas A, Gönenc S, Uysal N* (2015) The effects of oxytocin on cognitive defect caused by chronic restraint stress applied to adolescent rats and on hippocampal VEGF and BDNF levels. *Med Sci Monit* 21: 69–75.
<https://doi.org/10.12659/MSM.893159>
43. *Nicoletti JN, Lenzer J, Salerni EA, Shah SK, Elkady A, Khalid S, Quinteros D, Rotella F, Betancourth D, Croll SD* (2010) Vascular endothelial growth factor attenuates status epilepticus-induced behavioral impairments in rats. *Epilepsy Behav* 19: 272–277.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.07.011>

The Effect of ACTH/MSH N-Terminal Fragment Analogs on the Anxiety Level, Pain Sensitivity and Levels of Neurotrophic Factors BDNF and VEGF in Primary Neuronal Cultures of Rats

N. Yu. Glazova^{a, b}, D. M. Manchenko^a, E. A. Sebentsova^{a, b}, L. A. Andreeva^b,
I. A. Grivennikov^b, O. V. Dolotov^{a, b}, N. F. Myasoedov^b, and N. G. Levitskaya^{a, b, *}

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

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

ACTH/MSH-like peptides (melanocortins) have a wide range of neurotropic effects, including effects on learning and memory processes, neuroprotection, emotional state and pain sensitivity. Present work is aimed to compare the effects of peptides, the structure of which includes a natural fragment of ACTH and a stabilizing tripeptide PGP. The peptides ACTH₄₋₇PGP (Semax), ACTH₆₋₉PGP и ACTH₇₋₁₀PGP were used in the work. The effects of these peptides on the exploratory behavior, anxiety level and pain sensitivity of white rats, as well as on the protein levels of the neurotrophic factors BDNF (brain derived neurotrophic factor) and VEGF (vascular endothelial growth factor) in primary neuron cultures were studied. A comparative study of the effects of analogs of different ACTH/MSH fragments revealed both similarities and differences in their neurotropic activity. The peptides structure of which includes a sequence of ACTH₄₋₇ or ACTH₆₋₉ have nootropic, anxiolytic and analgesic activity, and also cause an increase in VEGF levels in the culture of hippocampal neurons. The peptide containing the ACTH₇₋₁₀ sequence in the structure exhibits anxiolytic activity, increases exploratory behavior, does not affect pain sensitivity and has a stimulating effect on BDNF and VEGF levels in neuronal cultures. The data obtained indicate that different parts of the N-terminal region of the ACTH molecule are responsible for the manifestation of certain neurotropic effects of melanocortins. The results of the study can be used in the development of therapeutics based on natural melanocortins.

Keywords: melanocortins, ACTH/MSH fragments, synthetic analogs, anxiety, pain sensitivity, neurotrophic factors, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОСОБЕННОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ТКАНИ
ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ САМОК КРЫС В МОДЕЛИ
БИЛИАРНОГО ПАНКРЕАТИТА ПРИ ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ**

© 2024 г. Н. С. Сиротина^{1,*}, Т. М. Илиева¹, Д. В. Руденко¹, Ю. Б. Костенко¹,
А. В. Курынина¹, Т. А. Балакина¹, О. В. Смирнова¹

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

*E-mail: kushnarevans@mail.ru

Поступила в редакцию 11.08.2024 г.

После доработки 06.10.2024 г.

Принята к публикации 14.10.2024 г.

Заболевания печени, сопровождающиеся обструктивным холестазом (ОХ), часто зависят от пола. Уровень гормона пролактина нередко повышен при различных заболеваниях гепатопанкреатобилиарной зоны, что является неблагоприятным прогностическим признаком. Для уточнения роли пролактина в развитии панкреатита в условиях ОХ были исследованы структурные изменения ткани печени и поджелудочной железы (ПЖ) самок крыс на фоне гиперпролактинемии. Крысы были разделены на следующие экспериментальные группы: группа К – контрольные животные; группа ГиперПрл – животные с нормальной работой печени на фоне гиперпролактинемии; группа БП – животные с билиарным панкреатитом в условиях ОХ; группа БПгиперПрл – животные с билиарным панкреатитом в условиях ОХ на фоне гиперпролактинемии. Гиперпролактинемии моделировали трансплантацией гипофиза донора под капсулу почки реципиента. Билиарный панкреатит моделировали перевязкой билиопанкреатического протока за 1 см до впадения его в двенадцатиперстную кишку, вызывая обструкцию протоков ПЖ селезеночного отдела. Через 14 дней после операций проводили забор биоматериала. Биохимические показатели сыворотки крови подтверждали развитие ОХ и панкреатита. Структура паренхимы ПЖ в группах БП и БПгиперПрл была изменена, особенно в селезеночном отделе. В обеих группах были обнаружены тубуло-островковые и тубуло-ацинарные комплексы, воспалительная инфильтрация, явление ацинарно-протоковой метаплазии, что сопровождалось выраженным фиброзом паренхимы ПЖ в группе БПгиперПрл. Важно отметить, что кишечный отдел ПЖ продолжал компенсаторно работать в условиях развития панкреатита в группах БП и БПгиперПрл. В ткани печени были показаны гистологические подтверждения развития ОХ в группах БП и БПгиперПрл, с потерей балочной структуры гепатоцитов и развития перидулолярного фиброза на фоне гиперпролактинемии. Таким образом, мы впервые показали, что у самок крыс с повышенной концентрацией пролактина на фоне ОХ развивается более тяжелая форма панкреатита с явно выраженным фиброзированием ткани ПЖ. Данную модель развития билиарного панкреатита на фоне ОХ возможно использовать не только для изучения роли пролактина в нарушении работы ПЖ, но и его участия в компенсаторных реакциях поддержания работы экзокринной части ПЖ при данной патологии.

Ключевые слова: гиперпролактинемия, обструктивный холестаз, билиарный панкреатит, фиброз, поджелудочная железа, печень

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия во всем мире прослеживается рост числа заболеваний гепатопанкреатобилиарной зоны, таких как холестатические нарушения работы печени, острый панкреатит и другие. Часто неблагоприятный прогноз связан с быстрым прогрессированием болезни, отсутствием специфических симптомов, что приводит к поздней диагностике заболевания. Принадлежность к женскому полу, а также число беременностей – нередко являются факторами риска развития данных патологий. Яркий пример – желчнокаменная болезнь, которая в ряде случаев может сопровождаться развитием билиарного панкреатита с поражением части поджелудочной железы (ПЖ) [1]. Структурно-функциональные изменения, происходящие при этом в ПЖ, развиваются вследствие билиарного рефлюкса, под действием которого происходит поражение протоковой системы и ацинарных клеток (с нарушением работы ферментов ПЖ) [2, 3]. Кроме того, пристальное внимание уделяется исследованию метаболических функций гормона пролактина, уровень которого нередко повышен при заболеваниях гепатопанкреатобилиарной зоны [4–7].

Целью работы стало исследование структурных изменений ткани печени и различных отделов ПЖ самок крыс для выяснения роли пролактина в развитии панкреатита в условиях обструктивного холестаза (ОХ) на фоне гиперпролактинемии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на половозрелых самках крыс Wistar массой тела 180–230 г. Крысы находились в стандартных условиях в виварии со свободным доступом к еде и воде. Животных наркотизировали смесью зоветила и ксилазина дважды: для выполнения хирургических операций и через 14 дней после операции для забора биоматериала (фрагменты печени и поджелудочной железы) и взятия крови из яремной вены. Крысы были разделены на 4 экспериментальные группы по 7 самок в каждой: I группа (К) – контрольные (ложнооперированные) животные; II группа (ГиперПрл) – животные с нормальной работой печени на фоне гиперпролактинемии; III группа (БП) – животные с билиарным панкреатитом в условиях ОХ; IV группа (БПгиперПрл) – животные с билиарным панкреатитом в условиях ОХ на фоне гиперпролактинемии.

В ходе эксперимента проводились следующие хирургические операции: перевязка билиопанкреатического протока (часть общего желчного протока, проходящая через ПЖ) крысы для моделирования панкреатита (группы БП и БПгиперПрл) и пересадка гипофиза крысы-донора под капсулу почки крысе-реципиенту для моделирования гиперпролактинемии (группы ГиперПрл и БПгиперПрл). На крысах контрольной группы (К) проводили ложные операции (вскрывали брюшную полость без перевязки протока и пересадки гипофиза).

Перевязку билиопанкреатического протока проводили за 1 см до его впадения в двенадцатиперстную кишку, вызывая при этом полную обструкцию общего желчного протока и частичную обструкцию протоков ПЖ, при которой происходило нарушение ее селезеночного отдела. Несмотря на отсутствие у крыс желчного пузыря, ОХ часто экспериментально моделируется перевязкой общего желчного протока для создания похожей клинической картины, отражающей последствия развития желчнокаменной болезни у человека [8, 9].

Для повышения концентрации пролактина до уровня, соответствующего состоянию физиологической гиперпролактинемии беременных крыс, осуществляли трансплантацию гипофиза от нелактующей половозрелой самки крысы-донора под почечную капсулу крысы-реципиента [10, 11]. Фундаментальное объяснение данной модели заключается в том, что все тропные гормоны гипофиза находятся под позитивным влия-

янием рилизинг-гормонов гипоталамуса и только один пролактин – под негативным влиянием дофамина гипоталамуса.

Биоптаты тканей печени (фрагмент из центральной доли) и поджелудочной железы (фрагменты из двух отделов – селезеночный и кишечный) фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (Sigma, США). Далее проводили гистологическое исследование образцов с использованием микроскопа Leica DM 1000 и цифровой камеры Leica DFC 295 (Германия) при стандартном окрашивании гематоксилином и эозином парафиновых срезов толщиной 4–5 мкм, полученных на микротоме ESM-150S (ERMA Inc., Япония). Для подтверждения развития фиброза в исследуемых тканях проводилось гистологическое окрашивание по Маллори (БиоВитрум, Россия). Для каждого типа ткани был подобран протокол окрашивания по Маллори с выявлением компонентов соединительной ткани.

Определяли концентрацию общего и прямого билирубина (Ольвекс диагностикум, Россия), активность липазы (набор «Липаза-ново», Вектор-Бест, Россия), щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) (Ольвекс диагностикум, Россия) в сыворотке на спектрофотометре Genesys (Thermo scientific). Концентрацию глюкозы в свежей капиллярной крови анализировали при помощи глюкометра и тест-полосок Accu-Chek Active (Roche Diagnostics GmbH, Германия).

Статистический анализ полученных данных проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США) с использованием непараметрического теста Краскела – Уоллиса с поправкой Данна для множественных сравнений. Данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25 и 75 процентиля). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной группе (К) ложнооперированных самок крыс гистологических особенностей в строении печени и обоих отделов ПЖ не было выявлено (рис. 1a, b, c), биохимические показатели крови также были в пределах нормы (табл. 1). В печеночной дольке трабекулы гепатоцитов были четко выражены, видны небольшие желчные протоки, состоящие из холангиоцитов, а также центральная вена и другие важные сосуды. Экзокринная часть обоих отделов ПЖ была представлена ацинарными клетками и системой выводных протоков, а эндокринная часть состояла из островков Лангерганса разной величины. Сосуды обоих отделов ПЖ, как и печени, не были повреждены.

Как видно из рис. 1d, e, f, структура гепатоцитов и желчных протоков, а также строение экзокринной части обоих отделов ПЖ в группе ГиперПрл не менялась по сравнению с контрольной группой. Однако наблюдалась более высокая прибавка массы тела через 14 дней по сравнению с контролем (табл. 1), остальные метаболические показатели работы печени и ПЖ были в пределах нормы.

В группе БП в печени наблюдали пролиферацию желчных протоков и увеличение размеров холангиоцитов (рис. 1g, рис. 2a), что согласуется с данными литературы по наличию выраженной протоковой реакции в условиях ОХ [12, 13]. Несмотря на характерные очаговые фибротические изменения в портальных зонах в виде отложений коллагеновых волокон вокруг пролиферируемых клеток желчных протоков, было выявлено частичное нарушение балочного строения гепатоцитов по сравнению с контрольной группой. Также наблюдали отдельные очаги некротизированной ткани. Вокруг расширенных кровеносных сосудов можно было отметить образование неполных фиброзных септ.

В нашей экспериментальной модели билиарного панкреатита проявились четкие отличия в структуре ПЖ между селезеночным и кишечным отделом. В селезеночном отделе, характеризующемся обструкцией протокового аппарата в результате операции, структура паренхимы ПЖ была сильно нарушена (рис. 1h, рис. 2b). Наблюдалась

трансформация ацинарных клеток с приобретением морфологических признаков клеток протоков с образованием тубулярных или тубулоацинарных комплексов (явление ацинарно-протоковой метаплазии при развитии панкреатитов различного генеза [14]), интерстициальный отек, инфильтрация клетками воспаления, что свидетельствовало о наличии ранних признаков развития панкреатита. В селезеночном отделе ПЖ наблюдали умеренное увеличение количества внутريدольковых и междольковых протоков с расширением диаметра их просвета с образованием больших площадей соединительной ткани (перидуктальный фиброз). Также встречались умеренно фиброзированные участки вокруг расширенных сосудов. В эндокринной части ПЖ данного отдела отме-

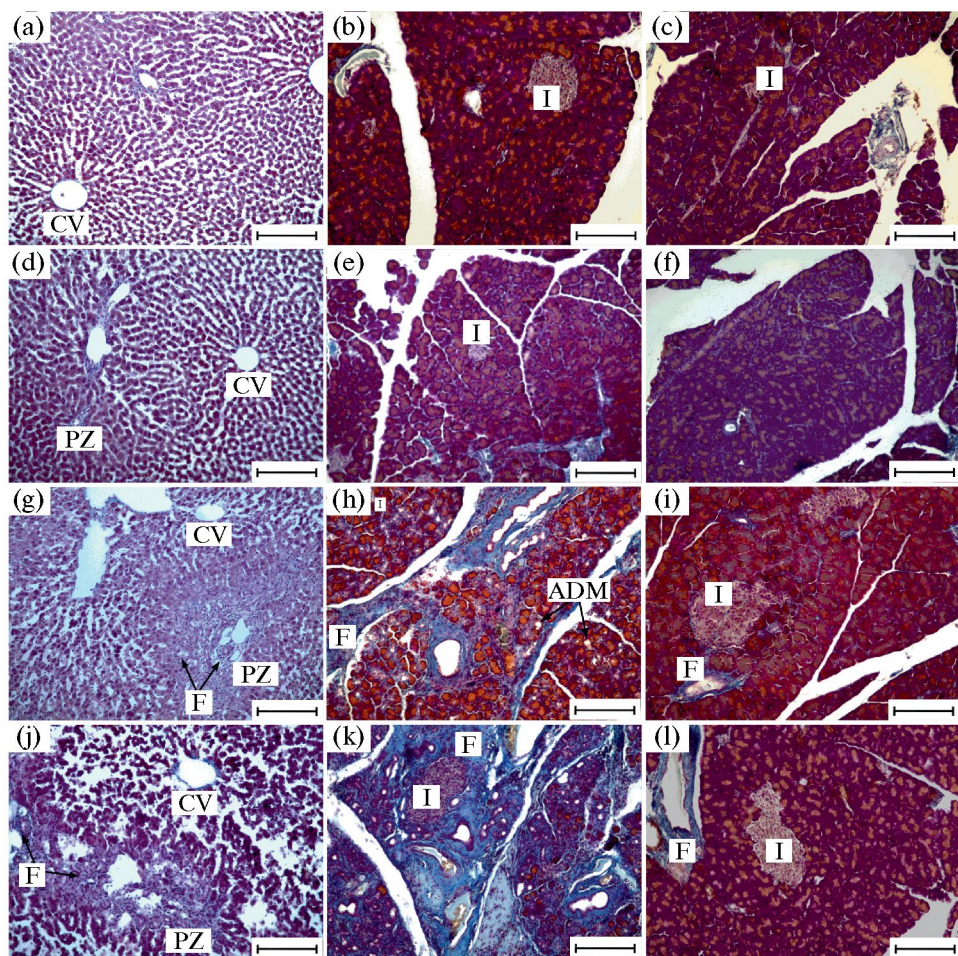


Рис. 1. Гистологическое окрашивание по Маллори ткани печени, селезеночного и кишечного отделов поджелудочной железы самок крыс всех экспериментальных групп, увеличение $\times 10$, шкала – 100 мкм. Группа (К): (a) – печень, (b) – селезеночный отдел ПЖ, (c) – кишечный отдел ПЖ; группа (ГиперПрл): (d) – печень, (e) – селезеночный отдел ПЖ, (f) – кишечный отдел ПЖ; группа (БП): (g) – печень, (h) – селезеночный отдел ПЖ, (i) – кишечный отдел ПЖ; группа (БПгиперПрл): (j) – печень, (k) – селезеночный отдел ПЖ, (l) – кишечный отдел ПЖ. ADM – ацинарно-протоковая метаплазия, CV – центральная вена печеночной долики, F – фиброз, I – островок Лангерганса ПЖ, PZ – портальная зона печеночной долики.

чалось появление тубуло-островковых комплексов. При этом периинсулярные ацинусы, расположенные вокруг островков, более крупные по размеру, оставались неизмененными. Структура ПЖ в кишечном отделе (рис. 1i) была практически не повреждена, наблюдалась лишь незначительная воспалительная инфильтрация и отложение коллагеновых волокон вокруг кровеносных сосудов, характерное для нормальной ткани ПЖ.

Итак, ПЖ повреждалась частично (селезеночный отдел), а остальная часть компенсаторно работала за всю железу. В данной группе БП ожидаемо были повышены концентрация общего и прямого билирубина (все крысы в данной группе были с выраженной желтушностью) и активность ферментов АЛТ, АСТ, ЩФ и липазы по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Масса печени, нормированная на массу тела животного, была выше по сравнению с контрольной группой, что также подтверждало развитие ОХ. Концентрация глюкозы в крови не отличалась от контроля, однако значение медианы было повышенным (6.9 ммоль/л), соответствующим умеренной гипергликемии.

В Группе БПгиперПрл наблюдали более тяжелые изменения структуры печени по сравнению с группой БП: выраженная пролиферация желчных протоков с увеличением их диаметра, деформация трабекул гепатоцитов, расширение синусоидальных про-

Таблица 1. Показатели состояния животных в экспериментальных группах

Параметр	Контрольная группа	Группа ГиперПрл	Группа БП	Группа БПгиперПрл
Набор массы тела за 14 дней, г	16.2 (8.2; 16.3)	24.9 (22.1; 28.1)*	23.1 (16.7; 29.7)	16.3 (10.2; 24.9)
Масса ПЖ/масса тела крысы, х 100%	0.59 (0.56; 0.68)	0.64 (0.61; 0.75)	0.48 (0.40; 0.50)	0.65 (0.54; 0.76)*
Масса печени/масса тела крысы, х 100%	2.5 (2.4; 3.0)	2.6 (2.4; 2.7)	5.2 (4.9; 5.6)*	5.4 (4.5; 6.1)*
Билирубин общий, мкмоль/л	2.6 (2.3; 2.9)	3.3 (3.1; 3.8)	189 (188; 190)*	217 (160; 230)**
Билирубин прямой, мкмоль/л	0.5 (0.3; 0.7)	0.6 (0.5; 0.8)	121 (85; 129)*	149 (82; 170)**
АЛТ Ед/л	30 (21; 33)	26 (16; 39)	128 (118; 207)**	112 (88; 160)*
АСТ Ед/л	113 (102; 134)	146 (107; 206)	872 (699; 1234)**	955 (746; 1124)**
ЩФ Ед/л	39 (22; 43)	26 (20; 42)	208 (191; 216)**	185 (150; 223)*
Липаза Ед/л	70 (52; 79)	115 (93; 176)	329 (260; 525)***	231 (195; 416)*
Уровень глюкозы ммоль/л	4.6 (3.8; 6.1)	5.4 (4.0; 5.9)	6.9 (6.5; 8.2)	7.9 (6.3; 8.9)*

Примечание.* – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$; ** – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.01$; *** – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.001$; * – статистически значимое отличие от группы БП, $p < 0.05$.

странств, появление зон некроза и перипортальной инфильтрации клетками воспаления (рис. 1j, рис. 2с). Также происходила потеря функционирующей паренхимы печени вследствие обширного замещения соединительной тканью. В данной группе можно было отметить диффузное поражение фиброзной тканью расширенных портальных зон и перичеселлюлярный фиброз, характеризующийся отложением соединительнотканых волокон вокруг печеночных долек.

Структура ПЖ в данной группе была также изменена, особенно в селезеночном отделе (рис. 1k, рис. 2d). Отсутствовало четкое строение паренхимы, наблюдалась воспалительная инфильтрация, атрофия ацинарных клеток, отмечалось появление метаплазированных протоков, туболо-островковых и туболо-ацинарных комплексов и отеков. Также отмечалась выраженная деструкция экзокринной паренхимы вследствие значительного фиброза: большие площади плотных фиброзных септ вокруг увеличенных в количестве и расширенных в диаметре внутридольковых и междольковых протоков, отложение рыхлой соединительной ткани внутри долек и плотной соединительной ткани вокруг долек. В кишечном отделе ПЖ наблюдались выраженная очаговая инфильтрация и межацинарные отеки по сравнению с группой БП (рис. 1l). Биохимические показатели крови в этой группе были повышены по сравнению с контрольной, включая концентрацию глюкозы в крови (до 7.9 ммоль/л) (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В группе ГиперПрл на фоне нормальной работы печени при гиперпролактинемии у самок крыс не было выявлено изменений в гистологическом строении органов гепатопанкреатобилиарной зоны. В настоящее время активно ведутся исследования ме-

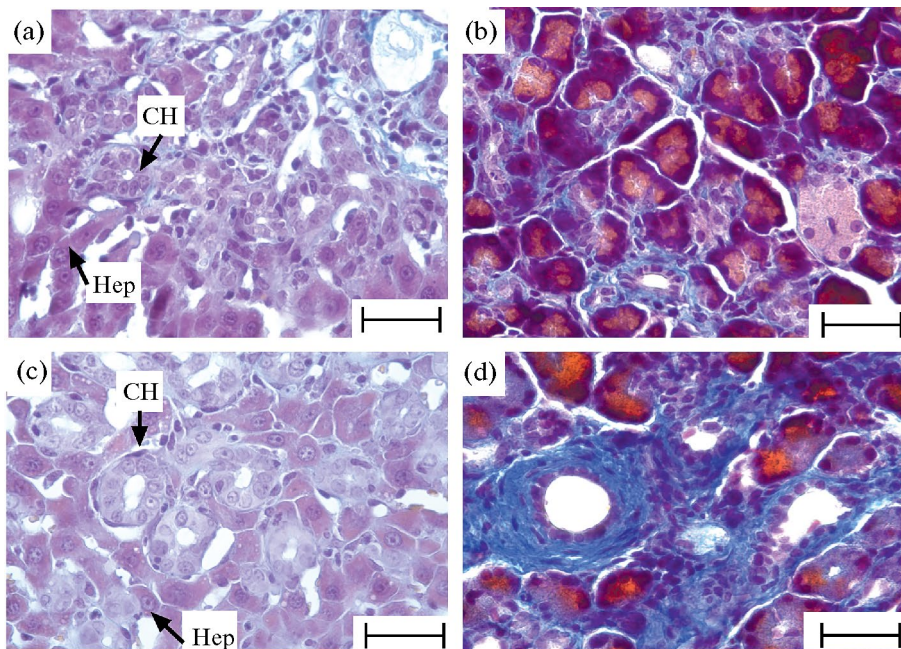


Рис. 2. Гистологическое окрашивание по Маллори ткани печени и селезеночного отдела поджелудочной железы самок крыс опытных групп БП и БПгиперПрл, увеличение $\times 40$, шкала – 100 мкм. Группа (БП): (a) – печень, (b) – селезеночный отдел ПЖ; группа (БПгиперПрл): (c) – печень, (d) – селезеночный отдел ПЖ. СН – холангиоциты, клетки желчных протоков, Нер – гепатоциты.

таболических функций пролактина в регуляции обмена веществ в норме и при патологии. Было показано, что пролактин, модулируя функциональную активность ряда ферментов и транспортеров в адипоцитах жировой ткани и островках Лангерганса ПЖ, потенциально влияет на метаболизм жиров и глюкозы [15], чем можно объяснить полученное достоверное увеличение прибавки массы тела через 14 дней по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Также хотелось бы отметить, что в нашем исследовании мы не изучали изменения амилазы во всех экспериментальных группах, так как среди панкреатических ферментов надежным диагностическим маркером панкреатита является липаза, которая остается повышенной в течение более длительного периода [16], что мы и получили в группах БП и БПгиперПрл по сравнению с контрольной группой.

Согласно литературным данным, пролактин участвует в патогенезе развития фиброза печени [17], а повышение его концентрации в сыворотке является плохим прогностическим признаком при оценке тяжести состояния [18]. В группах БП и БПгиперПрл в ткани печени были показаны гистологические подтверждения развития ОХ, с потерей балочной структуры гепатоцитов и развития перипеллюлярного фиброза на фоне гиперпролактинемии. Повышенный уровень пролактина на фоне ОХ приводит к более значительным изменениям как в ткани печени, так и селезеночного отдела ПЖ, сопровождая воспалительный процесс фиброзом и развитием внешне- и внутрисекреторной недостаточности. В группе БПгиперПрл также важно отметить развитие гипергликемии (табл. 1). В структуре ПЖ система протоков, эндокринные и ацинарные клетки функционально связаны между собой, что особенно важно при развитии панкреатита, который в ряде случаев может предшествовать развитию панкреатогенного диабета [19–21]. По данным литературы, в модели панкреатита, вызванного перевязкой протоков органов гепатопанкреатобилиарной зоны, у крыс не развивается характерный для билиарного панкреатита необратимый фиброз (для этого необходимо дополнительное воздействие, например, с применением химических веществ), поэтому она подходит только для изучения ранних событий в патогенезе данного заболевания [22]. Для половых гормонов ранее было показано как гепатопротекторное, так и гепатотоксическое действие в развитии различных патологий печени [23]. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения панкреопротекторного или панкреотоксического действия пролактина, которое может зависеть от стадии заболевания ПЖ.

Таким образом, мы впервые показали, что у самок крыс с повышенной концентрацией пролактина на фоне ОХ развивается более тяжелая форма билиарного панкреатита с явно выраженным фиброзированием ткани ПЖ. Данную модель развития билиарного панкреатита на фоне ОХ возможно использовать не только для изучения роли пролактина в нарушении работы ПЖ, но и его участия в компенсаторных реакциях поддержания работы экзокринной части ПЖ при данной патологии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова № 121032300075-6. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, протокол № 134-д от 19.08.2021 (заявка № 135-ж, версия № 5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pirouz A, Sadeghian E, Jafari M, Eslamian R, Elyasinia F, Mohammadi-Vajari MA, Ghorbani Abdehghah A, Soroush A (2021) Investigating the Factors Affecting the Development of Biliary Pancreatitis and Their Relationship with the Type and Severity of Complications. *Middle East J Digestive Diseases* 13(1): 43–48.
<https://doi.org/10.34172/mejdd.2021.202>
2. Губергриц НБ, Лукашевич ГМ (2014) Холестаз и панкреатическая недостаточность: с чего начинать лечение? Экспер клин гастроэнтерол 8(108): 84–90. [Gubergrits NB, Lukashevich GM Cholestasis and pancreatic insufficiency: how to start treatment? *Eksper Clin Gastroenterol* 2014(8): 84–90. (In Russ)].
3. Васильев ЮВ, Живаева НС (2008) Желчнокаменная болезнь и билиарный панкреатит: патогенетические и клинические аспекты. Экспер клин гастроэнтерол 7: 9–17. [Vasil'ev YuV, Zhivaeva NS (2008) *Exper Clin Gastroenterol* (7): 9–17. (In Russ)].
4. Lopez-Vicchi F, De Winne C, Brie B, Soriano E, Ladyman SR, Becu-Villalobos D (2020) Metabolic functions of prolactin: Physiological and pathological aspects. *J Neuroendocrinol* 32(11): e12888.
<https://doi.org/10.1111/jne.12888>
5. Balakrishnan C, Rajeev H (2017) Correlation of Serum Prolactin Level to Child Pugh Scoring System in Cirrhosis of Liver. *J Clin Diagnost Res* 11(7): OC30–OC33.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24730.10273>
6. Simon-Holtorf J, Mönig H, Klomp HJ, Reinecke-Lüthge A, Fölsch UR, Kloehn S (2006) Expression and distribution of prolactin receptor in normal, fibrotic, and cirrhotic human liver. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114 (10): 584–589.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-948310>
7. Jha SK, Kannan S (2016) Serum prolactin in patients with liver disease in comparison with healthy adults: A preliminary cross-sectional study. *Int J Appl Basic Med Res* 6(1): 8–10.
<https://doi.org/10.4103/2229-516X.173984>
8. Gijbels E, Pieters A, De Muynck K, Vinken M, Devisscher L (2021) Rodent models of cholestatic liver disease: A practical guide for translational research. *Liver Int Official J Int Associat Study Liver* 41(4): 656–682.
<https://doi.org/10.1111/liv.14800>
9. Смирнова НГ, Чефу СГ, Коваленко АЛ, Власов Т (2010) Влияние инфузионного гепатопротектора ремаксол на функцию печени крыс на модели обтурационной желтухи. Экспер клин фармакол 73(9): 24–27 [Smirnova NG, Chifu SG, Kovalenko AL, Vlasov TD (2010) The effect of the infusion hepatoprotector remaxol on rat liver function in a model of obstructive jaundice. *Eks klin farmakol* 73(9): 24–27. (In Russ)].
10. Charoenphandhu N, Wongdee K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Krishnamra N (2008) Transcriptome responses of duodenal epithelial cells to prolactin in pituitary-grafted rats. *Mol Cell Endocrinol* 296(1–2): 41–52.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.025>
11. Fidchenko YM, Kushnareva NS, Smirnova OV (2014) Effect of prolactin on the water-salt balance in rat females in the model of cholestasis of pregnancy. *Bull Exp Biol Med* 156(6): 803–806.
<https://doi.org/10.1007/s10517-014-2455-7>
12. Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G (2019) Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology (Baltimore)* 69(1): 420–430.
<https://doi.org/10.1002/hep.30150>

13. *Mavila N, Siraganahalli Eshwaraiah M, Kennedy J* (2024) Ductular Reactions in Liver Injury, Regeneration, and Disease Progression-An Overview. *Cells* 13(7): 579.
<https://doi.org/10.3390/cells13070579>
14. *Wei D, Wang L, Yan Y, Jia Z, Gagea M, Li Z, Zuo X, Kong X, Huang S, Xie K* (2016) KLF4 Is Essential for Induction of Cellular Identity Change and Acinar-to-Ductal Reprogramming during Early Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Cell* 29(3): 324–338.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.005>
15. *Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Shah ZA, Gojwari TA, Dar TA* (2016). Profile of leptin, adiponectin, and body fat in patients with hyperprolactinemia: Response to treatment with cabergoline. *Indian J Endocrinol Metabol* 20(2): 177–181.
<https://doi.org/10.4103/2230-8210.176346>
16. *Ismail OZ, Bhayana V* (2017) Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clin Biochem* 50(18): 1275–1280.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.07.003>
17. *Simon-Holtorf J, Mönig H, Klomp HJ, Reinecke-Lüthge A, Fölsch UR, Kloehn S* (2006) Expression and distribution of prolactin receptor in normal, fibrotic, and cirrhotic human liver. *Exper Clin Endocrinol & Diabet* 114(10): 584–589.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-948310>
18. *Jha SK, Kannan S* (2016) Serum prolactin in patients with liver disease in comparison with healthy adults: A preliminary cross-sectional study. *Int J Appl Basic Med Res* 6(1): 8–10.
<https://doi.org/10.4103/2229-516X.173984>
19. *Bertelli E, Bendayan M* (2005) Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and development? *J Histochem Cytochem* 53(9): 1071–1086.
<https://doi.org/10.1369/jhc.5R6640.2005>
20. *Zhao HL, Sui Y, Guan J, Lai FM, Gu XM, He L, Zhu X, Rowlands DK, Xu G, Tong PC, Chan JC* (2008) Topographical associations between islet endocrine cells and duct epithelial cells in the adult human pancreas. *Clin Endocrinol* 69(3): 400–406.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03190.x>
21. *Overton DL, Mastracci TL* (2022) Exocrine-Endocrine Crosstalk: The Influence of Pancreatic Cellular Communications on Organ Growth, Function and Disease. *Front Endocrinol* 13: 904004.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.904004>
22. *Miyauchi M, Suda K, Kuwayama C, Abe H, Kakinuma C* (2007) Role of fibrosis-related genes and pancreatic duct obstruction in rat pancreatitis models: implications for chronic pancreatitis. *Histol and Histopathol* 22(10): 1119–1127.
<https://doi.org/10.14670/HH-22.1119>
23. *Xu L, Yuan Y, Che Z, Tan X, Wu B, Wang C, Xu C, Xiao J* (2022) The Hepatoprotective and Hepatotoxic Roles of Sex and Sex-Related Hormones. *Front Immunol* 13: 939631.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.939631>

Histological features of the hepatic and pancreatic structure of female rats in the model of biliary pancreatitis with hyperprolactinemia

**N. S. Sirotina^a *, T. M. Ilieva^a, D. V. Rudenko^a, I. B. Kostenko^a, A. V. Kurynina^a,
T. A. Balakina^a, and O. V. Smirnova^a**

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

Liver diseases accompanied by obstructive cholestasis (OC) often depend on sex. Prolactin hormone levels are often elevated in a variety of hepatopancreatobiliary zone diseases, which is an adverse prognostic sign. To clarify the role of prolactin in the development of pancreatitis under OC conditions, structural changes in hepatic and pancreatic tissue female rats against the background of hyperprolactinemia were investigated. The rats were divided into the following experimental groups: group K – control animals; group HyperPrl – animals with normal hepatic function against the background of hyperprolactinemia; group BP – animals with biliary pancreatitis under OC; group BHyperPrl – animals with biliary pancreatitis under OC against the background of hyperprolactinemia. Hyperprolactinemia was modeled by transplanting the donor's pituitary gland under the recipient's kidney capsule. Biliary pancreatitis was simulated with a ligation of the biliopancreatic duct 1 cm prior to its discharge into the duodenum, causing obstruction of the ducts of the splenic segment of pancreas. After 14 days of operations, a biomaterial was collected. The biochemical indicators of the blood serum confirmed the development of OC and pancreatitis. The structure of the pancreatic parenchyma in the BP and BHyperPrl groups was changed, especially in the splenic segment. In both groups, tubulo-insula and tubulo-acinar complexes, inflammatory infiltration, acinaro-ductal metaplasia were found, which was accompanied by severe pancreatic parenchyma fibrosis in the group BHyperPrl. It is important to note that the duodenal segment of pancreas continued to compensate for pancreatitis development in the BP and BHyperPrl groups. In the hepatic tissue, histological confirmation of the development of obstructive cholestasis was shown in the BP and BHyperPrl groups, with the loss of the beam structure of hepatocytes and the development of pericellular fibrosis against the background of hyperprolactinemia. Thus, we first showed in our work that female rats with increased prolactin concentration on the background of OC develop a heavier form of pancreatitis with a pronounced pancreatic fibrosis. This model of the development of biliary pancreatitis under OC can be used not only to study the role of prolactin in disruption of the pancreas, but also its participation in compensatory reactions to maintain the work of the exocrine part of the pancreas in this pathology.

Keywords: hyperprolactinemia, obstructive cholestasis, biliary pancreatitis, fibrosis, pancreas, liver

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**БЫСТРАЯ АДАПТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМНОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ ПОДАВЛЕНА ПРИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ
ГИПЕРТЕНЗИИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДИСФУНКЦИИ БАРОРЕФЛЕКТОРНОГО
КОНТРОЛЯ СЕРДЕЧНОГО РИТМА**

© 2024 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. академика
Е. И. Чазова, Москва, Россия

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

*E-mail: ferk_88@list.ru

Поступила в редакцию 25.08.2024 г.

После доработки 28.09.2024 г.

Принята к публикации 01.10.2024 г.

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) сопровождается подъемом давления в малом круге кровообращения; для ЛАГ характерна активация симпатического отдела вегетативной нервной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем (РААС). Изменение барорецепторной регуляции системного кровообращения, тесно переплетенной с СНС и РААС, при ЛАГ не исследовано. В работе изучали барорецепторную реакцию (БРР) в хронической монокроталиновой (МКТ) модели ЛАГ у крыс (Wistar, 290 ± 30 г, 2–4 месяца). Для индукции вазомоторных ответов хронически катетеризованным, бодрствующим контрольным животным и животным с ЛАГ (4 недели после инъекции МКТ) градуально, последовательно вводили агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов (фенилэфрин) и донор NO (нитропруссид натрия). Среднее артериальное давление и ЧСС регистрировали только при действии вазоактивных соединений, при действии вазоактивных соединений на фоне ангиотензина-II (АП II), атропина. Рассчитывали параметры, характеризующие барорецепторное изменение ЧСС: наибольшую и наименьшую достижимую ЧСС ($ЧСС_{max}$, $ЧСС_{min}$), рефлекторную тахикардию ($ТК_{БРР}$) и брадикардию ($БК_{БРР}$), диапазон ($A_{БРР}$) и индекс чувствительности ($ИЧ_{БРР}$) барорецепторной реакции (БРР). У крыс с ЛАГ наблюдали значимое снижение $ЧСС_{max}$, $ТК_{БРР}$, $A_{БРР}$, а также индекса чувствительности БРР, но не $БК_{БРР}$. При введении через 4 недели после начала эксперимента АП II приводит к заметным, но различным изменениям параметров БРР у контрольных крыс и у крыс с ЛАГ. У крыс с ЛАГ АП II вызывает менее значимые изменения $ЧСС_{max}$ и $ТК_{БРР}$, чем у животных контрольной группы. АП II незначительно влияет на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса у крыс с ЛАГ. Таким образом, в условиях МКТ модели у крыс ЛАГ оказывает существенное влияние на барорецепторную регуляцию. Это влияние манифестирует в уменьшении диапазона и чувствительности БРР. ЛАГ не одинаково влияет на симпатический и парасимпатический компоненты барорецепторной регуляции ЧСС. В модели ЛАГ влияние АП II на БРР оказывается снижен. В заключение – ЛАГ приводит к нарушению немедленных, рефлекторных механизмов регуляции ЧСС и кровообращения в большом круге.

Ключевые слова: легочная артериальная гипертензия, ритм сердца, системное кровообращение, барорецепторная реакция, парасимпатическая регуляция ЧСС, ангиотензин II

ВВЕДЕНИЕ

Состояние, сопровождающееся значительно увеличенным средним давлением в легочных артериях, повышенным правожелудочковым систолическим давлением, гипертрофией правого желудочка, обструктивными изменениями сосудов в легких, а также снижением перфузии в малом круге кровообращения, определяется как легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) [1]. Исследованию ЛАГ посвящено значительное количество работ [2], большинство из которых направлено на изучение функциональных и структурных перестроек в малом круге кровообращения. Тем не менее ремоделирование и дисфункция малого круга кровообращения при ЛАГ приводит к изменению системной гемодинамики. При ЛАГ наблюдается ослабление способности сосудов большого круга развивать и поддерживать тонус [3], ЛАГ приводит к нарушению регионального кровотока, микроциркуляции в целом ряде сосудистых бассейнов организма [4–7] за счет перестройки локальных механизмов стабилизации давления [4, 8]. Известно, что ЛАГ сопровождается увеличением активности ренин-альдостерон-ангиотензиновой системы (РААС), повышением тонуса симпатического отдела (СНС) вегетативной нервной системы (ВНС) [9, 10], ростом уровня циркулирующего адреналина, ангиотензина-II (АПГ) [11]. Также при ЛАГ наблюдается повышение уровня вазопрессина, что синергично с альдостероном способствует реабсорбции ионов натрия, увеличению объема циркулирующей жидкости [12] и оказывает влияние на долгосрочную регуляцию системной гемодинамики.

Накапливаются данные, указывающие на перестройку механизмов немедленной регуляции гемодинамики в большом круге при ЛАГ. Барорецепторная реакция (БРР), обусловленная сдвигом баланса активности парасимпатического и симпатического отделов ВНС, является центральным элементом системы, отвечающей за немедленную, рефлекторную координацию сердечного выброса и артериального давления (АД).

Установлено, что у пациентов с ЛАГ наблюдается существенное снижение вариабельности сердечного ритма (ВРС), проявляющееся в уменьшении кумулятивной спектральной мощности (КСМ). Уменьшение ВРС связывают с ослаблением вегетативного контроля ЧСС и рассматривают как один из прогностических признаков ЛАГ [10, 13, 14].

Более того, в клинических исследованиях показано, что степень нарушения вегетативной регуляции ЧСС у пациентов пропорциональна тяжести ЛАГ [10, 13]. Ослабленная связь флуктуаций ЧСС и АД наблюдается у пациентов с ЛАГ при спонтанных и вызванных отклонениях АД. Для пациентов с ЛАГ также характерно увеличение длительности периода восстановления ЧСС покоя после физической нагрузки [15, 16]. Проба Вальсальвы при ЛАГ вызывает обмороки, увеличивает риск внезапной сердечной смерти [17], что также указывает на ослабленную способность к стабилизации ЧСС со стороны ВНС. Подавленный быстрый контроль ЧСС, вероятно, является причиной увеличенной подверженности аритмиям пациентов с ЛАГ [18]. Совокупность имеющихся сведений позволяет предположить, что ЛАГ затрагивает БРР и сопровождается т. н. барорефлекторной дисфункцией [19].

Однако остается неизвестным, в какой степени и какой именно компонент барорецепторной регуляции системной гемодинамики и ЧСС изменен или подавлен, а также каково соотношение активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС при ЛАГ.

В данной работе впервые прямо исследуется функционирование барорецепторного рефлекса, диапазон колебаний ЧСС, возникающих в ответ на вазоконстрикторные либо вазодилататорные стимулы, в экспериментальной *in vivo* модели ЛАГ. Так как активность симпатического отдела ВНС, чувствительность тканей к адренергическим воздействиям подвержены модуляции РААС, в данной работе изучено влияние АПГ на барорецепторный контроль ЧСС в условиях легочной гипертензии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

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

Катетеризация

Для хронической регистрации АД, ЧСС и инфузии вазоактивных соединений крысам контрольной и экспериментальной групп вживляли один внутриартериальный и два внутривенных комбинированных полиуретановых катетера (Instechlabs, США), подключенных к трехканальным устройствам сосудистого доступа (УСД, VABR3B/22, Instechlabs, США). Катетеризацию осуществляли стандартным способом наркотизированным животным (золетил-100, в. б., 0.1 мл на 100 г массы тела) по методике, описанной ранее [3].

Регистрация среднего артериального давления и ЧСС

Среднее артериальное давление (САД) и ЧСС регистрировали в модифицированной установке для работы с бодрствующими животными прямым методом, как описано ранее [3]. В эксперимент животных брали по окончании периода восстановления через 6 суток после вживления катетеров. Для регистрации САД артериальный катетер и УСД подключали к датчику давления (Gould Statham 23PB, США) и мостовому усилителю (Biograph-4, Россия), сигнал от которого поступал на АЦП (National Instruments, США). Запись сигналов осуществляли с помощью ПО (National Instruments, LabView RunTime Engine) с частотой 10 КГц. Для предотвращения тромбообразования в артериальном катетере осуществляли его промывку 10%-ным раствором гепарина (5000 Ед) в физиологическом растворе (1–1.5 мкл/мин).

Индукция и верификация ЛАГ

Для индукции ЛАГ использовали стандартный подход [20], основанный на однократном введении монокроталина (МКТ, Sigma Aldrich, подкожно, 60 мг/кг, 0.3 мл). Индивидуальную навеску МКТ готовили непосредственно перед введением и растворяли в физиологическом растворе с титрованием 0.1 нормальной HCl до полного растворения осадка (рН раствора МКТ доводили до 7 титрованием 0.2 Н NaOH). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор (0.3 мл). ЛАГ индуцировали только у тех животных, которые через 6 суток после вживления катетеров демонстрировали нормальный уровень САД (100 ± 10 мм рт. ст.), ЧСС покоя (360 ± 30 уд/мин), ректальную температуру 37 ± 0.5 °С, а также суточный объем потребляемой жидкости (30 ± 10 мл). Формирование ЛАГ подтверждали, выявляя структурные и функциональные признаки гипертрофии правого желудочка методом эхокардиографии с помощью УЗИ-аппарата Visual Sonics VEVO 1100 с линейным датчиком MS250 (диапазон частот 12–24 МГц), как описано ранее [3].

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), воспроизводя протокол повышения концентраций фенилэфрина (ФЭ) и нитропруссид натрия (НП) из [21] с изменениями, перечисленными ниже.

По окончании постоперационного периода восстановления, а также на 28-й (рис. 1а) день после инъекции МКТ после 30-минутного периода адаптации и контрольной записи САД / ЧСС животным вводили раствор нитропруссид натрия (1 мкг/кг/мкл, в физиологическом растворе, Sigma Aldrich) с линейно нарастающей скоростью инфузии («рамповое» введение) от 7 до 40 мкг/кг/мин за 3.5 мин (суммарный объем – 82.25 мкл, рис. 1б). Затем дожидались возвращения САД и ЧСС (20–25 мин) к контрольному уровню и осуществляли введение агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов ($\alpha 1$ -АР) фенилэфрина (1 мкг/кг/мкл в физиологическом растворе, Sigma Aldrich) с линейно нарастающей скоростью инфузии от 5 до 35 мкг/кг/мин за то же время, что и НП (суммарный объем – 70 мкл, рис. 1б). Через час животным вводили раствор атропина (1 мг/кг, в/в, 0.3 мл) для блокады парасимпатической компоненты барорецепторного рефлекса. Инфузию ФЭ и НП осуществляли повторно, но на фоне атропина (рис. 1с).

В части экспериментов на следующие сутки повторяли эксперимент, но введение вазоактивных соединений и атропина осуществляли на фоне непрерывной инфузии ангиотензина II, который добавляли в промывочную смесь для артериального катетера (АТП, 1.5 нг/кг/мин, в/в, в 1%-ном растворе БСА в физиологическом растворе, 2.5%-ный раствор гепарина 5000 Ед, суммарный объем ~ 400–500 мкл). Инфузию АТП начинали за 60 мин до введения НП (рис. 1). Для инфузии НП / ФЭ использовали два отдельных внутривенных катетера.

Оценка диапазона и чувствительности барорефлекторной реакции

В ходе периода «рампового» введения НП или ФЭ вычисляли пары значений САД и ЧСС для каждого кардиоцикла (рис. 2а). Последовательные пары значений САД и ЧСС использовали для построения регрессионной кривой барорецепторной реакции (кривой «САД-ЧСС», рис. 2б). Для получения регрессионной кривой использовали специализированное ПО («Data Processing», Лукошкова), реализованное в среде Lab-View и основанное на ранее описанных численных методах аппроксимации [22, 23] и алгоритмах Левенберга – Марквардта. Четырехпараметрическая логистическая регрессионная кривая имеет уравнение вида:

$$y(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(x - \tilde{e}))},$$

где $\tilde{e}$ – значение по оси абсцисс для точки перегиба кривой, b – коэффициент крутизны кривой, c – наименьшее асимптотическое значение, интерпретируемое как наименьшее достижимое (минимальное) значение ЧСС ($ЧСС_{\min}$), d – наибольшее асимптотическое значение, интерпретируемое как наибольшее достижимое (максимальное) значение ЧСС ($ЧСС_{\max}$), наблюдаемое при индукции барорецепторной реакции ФЭ и НП [21]. Асимптотические значения регрессионной кривой использовали для минимизации межиндивидуальной вариабельности шириты диапазона отклонений САД и ЧСС при действии вазоактивных соединений.

В качестве индекса чувствительности барорецепторной реакции ($ИЧ_{\text{БРР}}$) использовали максимальное значение производной регрессионной кривой БРР. Используя регрессионную кривую, также рассчитывали диапазон барорефлекторной реакции ($A_{\text{БРР}}$)

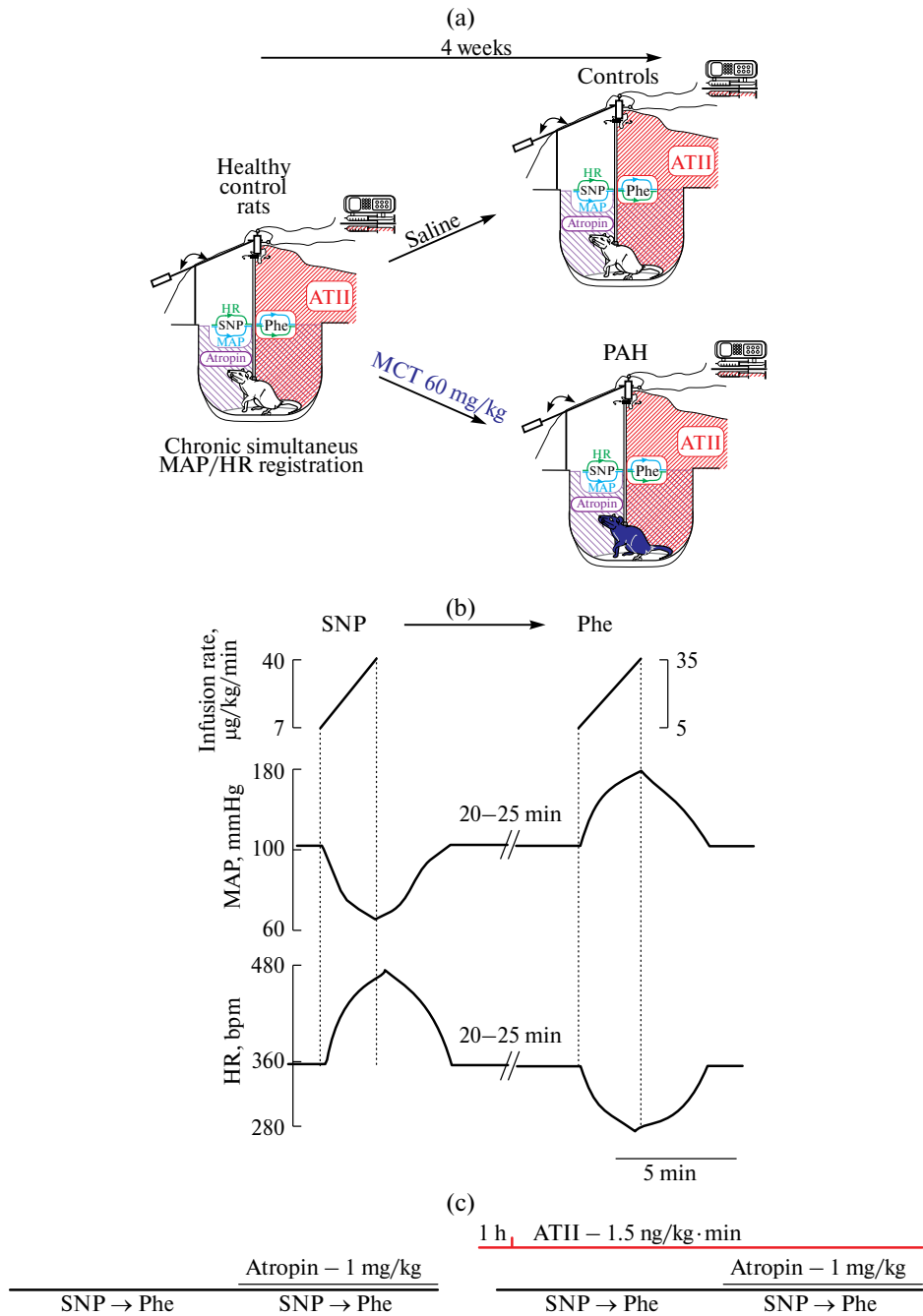


Рис. 1. (a) – схема экспериментальных воздействий в группах при моделировании ЛАГ. Светло-синий – формирующаяся ЛАГ (2 недели), синий – сформированная ЛАГ (4 недели). Красная штриховка – инфузия ангиотензина II. Фиолетовая штриховка – инфузия атропина. МКТ – монокроталин. (b) – схематическое представление вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения при оценке барорецепторной реакции (БРР). (c) – схема, демонстрирующая последовательность применения вазомоторных соединений при оценке БРР. САД – среднее артериальное давление, НП – нитропруссид натрия, ФЭ – фенилэфрин.

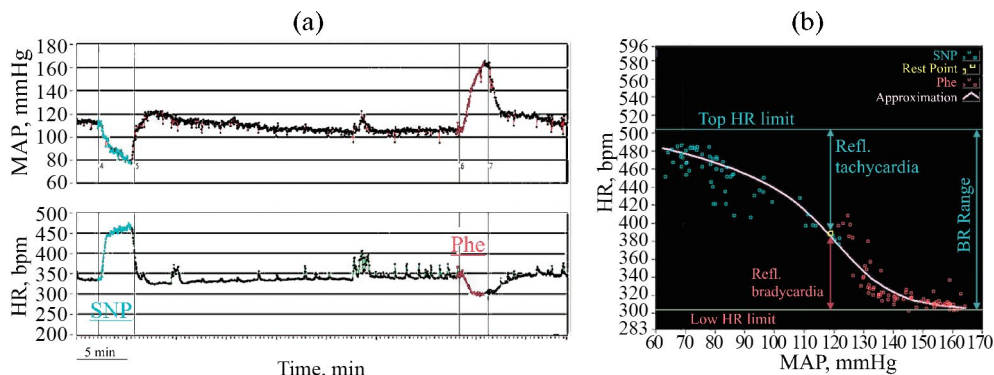


Рис. 2. (a) – репрезентативные записи, получаемые при последовательном анализе кардиоциклов и демонстрирующие синхронные отклонения САД и ЧСС при рамповом внутривенном введении животным нитропруссид (НП, голубой) или фенилэфрина (ФЭ, красный). (b) – репрезентативный пример кривой барорецепторной реакции (БРР), получаемой при логистической аппроксимации рефлекторного изменения ЧСС, вызванного введением нитропруссид и фенилэфрина. Показаны рассчитываемые характеристические параметры БРР. Горизонтальными линиями показаны наибольшее (сверху) и наименьшее (снизу) асимптотические значения, интерпретируемые как максимальное и минимальное значения ЧСС.

как разницу между $ЧСС_{\max}$ и $ЧСС_{\min}$. Определяли ЧСС покоя как среднее значение ЧСС за 1 мин, наблюдаемое за 1 мин до введения вазоактивных соединений. Также рассчитывали величину рефлекторной тахикардии ($ТК_{БРР}$) и брадикардии ($БК_{БРР}$) как разность между $ЧСС_{\max}$ или $ЧСС_{\min}$ и ЧСС покоя.

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали программную среду R [24]. В тех случаях, когда в индивидуальных кривых БРР после аппроксимации параметры ($ЧСС_{\min, \max}$ и др.) принимали аномальные значения, использовали соответствующие значения параметров из нелинейной модели со смешанными эффектами. В данном случае подготовка результатов осуществлялась средствами пакета tidyverse [25]. Построение нелинейной модели логистических кривых со смешанными эффектами [26] производили средствами пакета nlme [27] с использованием уравнения убывающей логистической функции SSd1f из пакета nlraa [28] в 3 этапа: предварительная аппроксимация отдельных кривых (функции nlsLMlist, пакет nlraa), построение на их основе усредненной кривой (функция nlme); построение смешанной модели, включающей в себя кривые для каждой группы, с использованием параметров усредненной кривой [29].

Для статистического анализа характеристических показателей БРР строили линейные модели со смешанными эффектами с помощью пакета lme4 [30], что позволяло оценивать значимость различий в связанных и несвязанных группах. Проверка статистических гипотез для коэффициентов модели выполнялась с применением тестов Вальда и t -тестов, степени свободы для которых рассчитывались по методу Саттеруайта, средствами пакета emmeans [31]. Различия между группами принимали значимыми при $p < 0.05$. Для $ИЧ_{БРР}$ проверка статистических гипотез и расчет доверительных интервалов производили на основе логарифмически трансформированных данных (на рисунках для $ИЧ_{БРР}$ доверительные интервалы показаны без обратной трансформации). Для расчета стандартных ошибок и доверительных интервалов в линейных моделях использовался пакет clubSandwich [32] с поправкой для малых выборок «CR1» [33].

Поправку на множественные сравнения производили по методу Холма средствами пакета multcomp [34].

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего [нпДИ; впДИ], где нпДИ и впДИ – нижний и верхний пределы доверительного интервала. Для графического представления результатов анализа использовали пакеты ggplot2 [35], gghalves [36], ggdist [37] и patchwork [38] среды R.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ЛАГ на рефлекторную тахикардию, брадикардию, диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса

В наших экспериментах введение вазоконстриктора (ФЭ) с постепенно нарастающей скоростью приводило к немедленному, градуальному повышению САД, а также снижению ЧСС за счет индукции барорецепторного рефлекса. В свою очередь, рамповое введение вазодилататора (НП) приводило к немедленному снижению САД и росту ЧСС. Дозозависимое рефлекторное изменение ЧСС, вызванное введением вазоактивных соединений, имело типичный сигмоидальный характер (рис. 3а). Наибольшая достижимая ЧСС у крыс контрольной группы в начале эксперимента составляла 512.17 ± 16.7 [478.9; 545.5], а наименьшая – 289.5 ± 13.7 [262.6; 316.4] уд/мин (рис. 3а, панель «исходно»). Диапазон барорефлекторной реакции у крыс контрольной группы составлял 204.0 ± 16.7 [170.9; 237.1] уд/мин (рис. 3б, табл. 1).

У крыс с ЛАГ (4 недели после введения МКТ) наибольшая достижимая ЧСС значительно меньше ($p = 0.001$) по сравнению с исходным уровнем и составляет 440.1 ± 18.49 [403.9; 476.3] уд/мин; наименьшая достижимая ЧСС значительно не меняется и составляет 258.7 ± 14.9 [229.4; 288.0] уд/мин (рис. 3а, панель «4-я нед»). Таким образом, ЛАГ приводит к значимому уменьшению рефлекторной тахикардии (от 138.0 ± 11.9 [114.5; 161.5] до 90.3 ± 12.0 [66.4; 114.2] уд/мин, $p = 0.0029$, рис. 3с), а также диапазона барорефлекторной реакции (от 211.1 ± 7.4 [196.9; 225.4] до 166.6 ± 14.6 [137.4; 195.8], $p = 0.0031$, рис. 3б), но не влияет на рефлекторную брадикардию (рис. 3д). Также у крыс с ЛАГ значимо ($p = 0.0005$) уменьшается индекс чувствительности барорецепторной реакции (рис. 3е), (3.58 ± 0.38 [2.89; 4.43] и 2.02 ± 0.29 [1.52; 2.68], табл. 1).

У контрольных крыс к 4-й неделе после начала эксперимента, в противоположность животным с ЛАГ, наблюдалось значимое увеличение ЧСС_{max} ($p < 0.001$), большее, чем у животных с ЛАГ, изменение ЧСС_{min} ($p = 0.0052$, рис. 3а), что приводит к увеличению $A_{БРР}$ и $TK_{БРР}$; у контрольных животных $ИЧ_{БРР}$ падает незначительно. Величины ЧСС_{max}, ЧСС_{min}, $A_{БРР}$, $TK_{БРР}$, $ИЧ_{БРР}$ значимо превышают таковые, наблюдаемые у крыс с ЛАГ (рис. 3б, с, д, $p \leq 0.0011$, табл. 1).

Влияние ангиотензина II на диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса при ЛАГ

Ангиотензин II не вызывал немедленного значимого изменения ЧСС покоя, а также не менял наибольшую и наименьшую достижимую ЧСС (рис. 4а, панели «исходно»). Таким образом, в наших экспериментах при действии АПГ не наблюдалось изменения $A_{БРР}$, $BK_{БРР}$, $TK_{БРР}$, а также $ИЧ_{БРР}$ (рис. 4б–д, панель «Исходно») у животных в начале эксперимента.

Тем не менее при повторном введении через 4 недели после начала эксперимента инфузия АПГ приводила к заметным изменениям барорецепторной реакции. Эффекты, индуцируемые АПГ, различаются у крыс с ЛАГ (4 недели после введения МКТ) и животных контрольной группы. В обеих группах при действии АПГ наблюдается снижение максимальной ЧСС и уменьшение рефлекторной тахикардии. Однако у крыс с ЛАГ в результате действия АПГ максимальная ЧСС и $TK_{БРР}$ изменяются менее значимо, чем

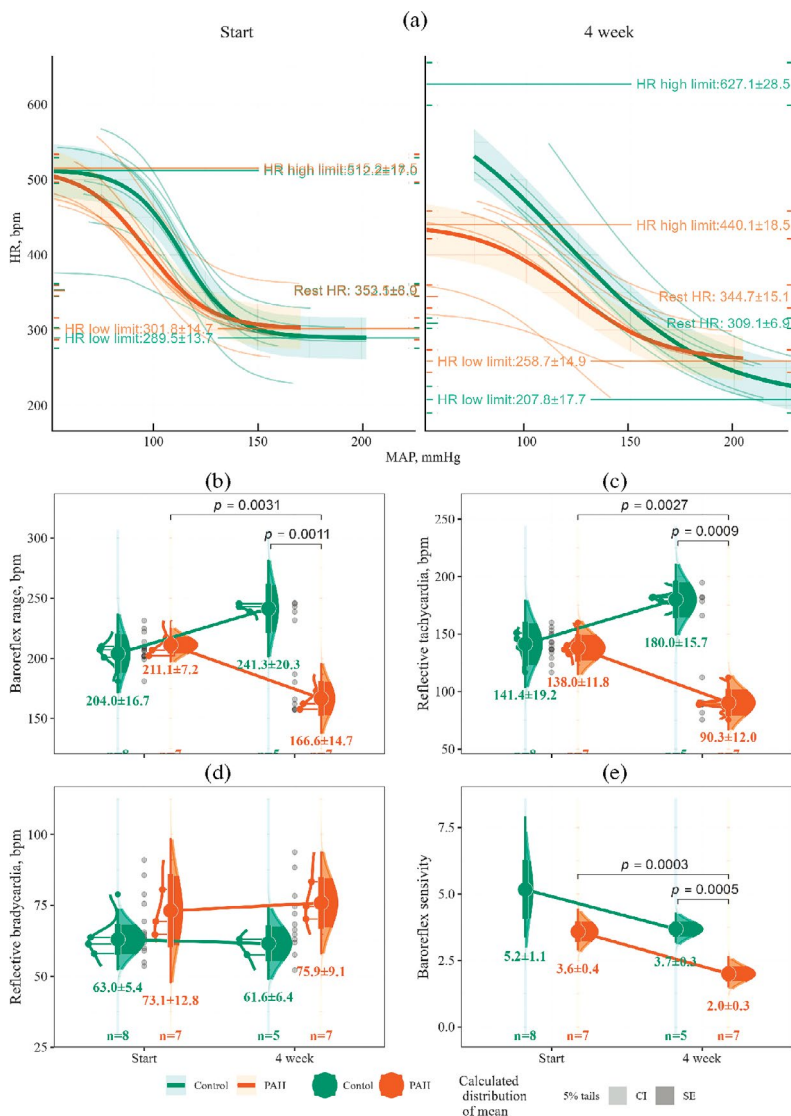


Рис. 3. Влияние ЛАГ на барорефлекторное изменение ЧСС и характеристики барорецепторной реакции. (а) – кривые барорецепторной реакции (БРР), полученные с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами. Зеленым цветом обозначены кривые для контрольной («контроль») группы животных (для момента начала – «исходно»), через 4 недели после начала эксперимента – «4-я нед»), а оранжевым – для группы «ЛАГ», т.е. животных до введения и через 4 недели после введения МКТ. Тонкими линиями показаны аппроксимированные кривые для отдельных экспериментов (животных); полупрозрачными лентами обозначены доверительные интервалы. На графиках указаны аппроксимированные значения ЧСС покоя и максимально достижимые пределы ЧСС. ЧСС покоя, пределы ЧСС, а также стандартная ошибка среднего значения для этих величин отмечены цветными горизонтальными отрезками на оси ординат. Панели представлены в одинаковом масштабе по обеим осям. (б) – диапазон барорецепторной реакции. (с) – рефлекторная тахикардия. (д) – рефлекторная брадикардия. (е) – индекс чувствительности БРР. На панелях (б – е) приведены точные значения p (t -тест); доверительный интервал (CI) и стандартная ошибка среднего (SE) показаны интенсивностью цвета. Кумулятивные плотности распределения для групп показаны слева в виде оранжевых (ЛАГ) и зеленых (контроль) огибающих контуров. Описательные характеристики выборок (верхний и нижний квартиль, медиана) показаны горизонтальными линиями на контуре. Индивидуальные значения показаны серыми точками. На панелях приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего для каждой группы.

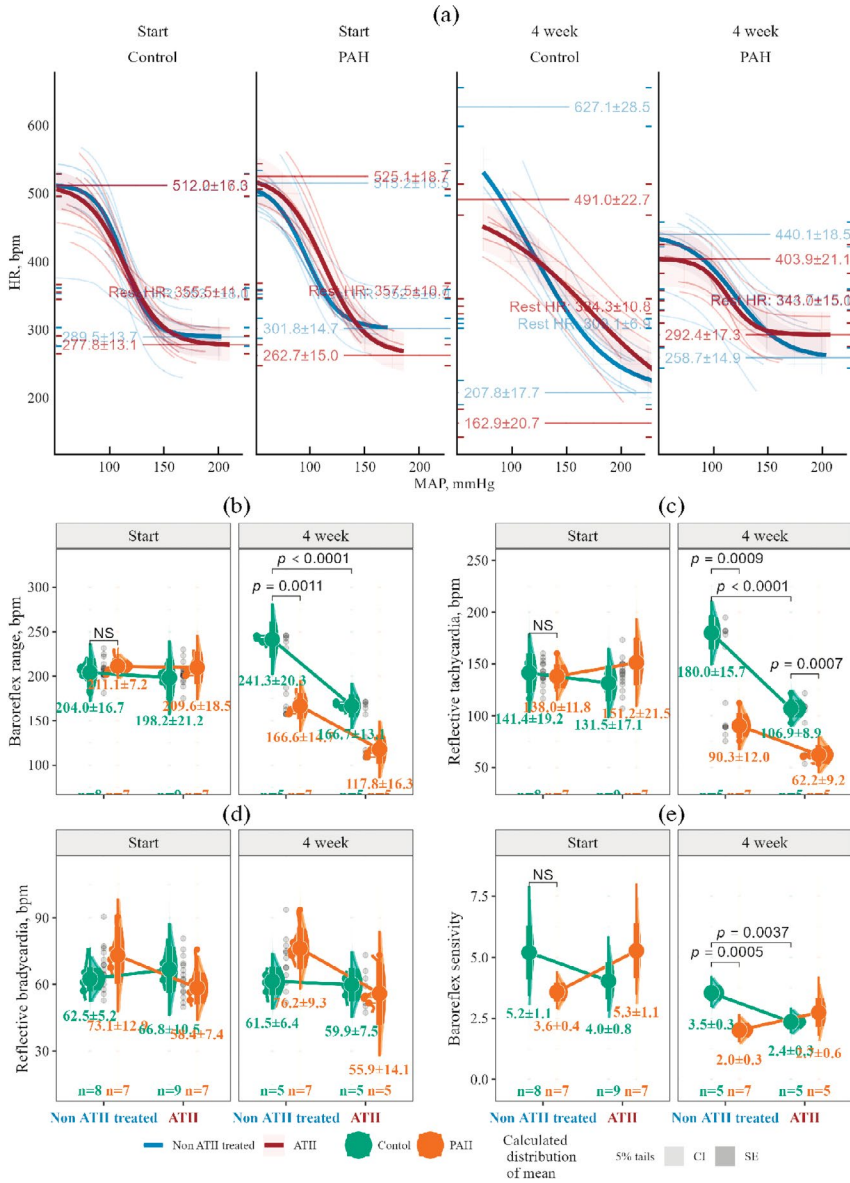


Рис. 4. Влияние ангиотензина II (АТII) на характеристики барорецепторной реакции при ЛАГ. (а) – кривые барорецепторной реакции (БРР), полученные с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами. Кривые БРР показаны для контрольной группы крыс («контроль») на момент начала и через 4 недели после начала эксперимента; для группы животных до введения («исходно/ЛАГ») и через 4 недели после введения МКТ («4-я нед/ЛАГ»). Голубым цветом обозначены кривые БРР до введения, а красным – кривые, полученные на фоне инфузии АТII. Обозначения доверительных интервалов, аппроксимированных кривых для отдельных экспериментов, отметки на оси ординат и масштаб осей, а также приведенные на панелях аппроксимированные значения такие же, как на рис. 3а. На панелях (b – e) представлены отдельные характеристики БРР у контрольных животных (зеленый цвет) и животных с ЛАГ (оранжевый цвет), определяемые до и в ходе инфузии АТII. Характеристики БРР приведены для начала («исходно») и через 4 недели («4-я нед») после начала эксперимента. Панели «Исходно» и «4-я неделя» даны в одинаковом масштабе по оси ординат. (b) – диапазон БРР. (c) – рефлекторная тахикардия. (d) – рефлекторная брадикардия. (e) – индекс чувствительности БРР. Обозначения значений p , доверительных интервалов, ошибок среднего, плотностей распределения и описательных статистик такие же, как на рис. 3. На панелях приведены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего для каждой группы.

Таблица 1. Характеристические значения ЧСС и параметров барорецепторной реакции в группе контрольных животных (контроль), получавших в начале эксперимента физиологический раствор, а также в группе животных, получавших в начале эксперимента раствор МКТ (ЛАГ) и сформировавших к 4-й неделе признаки ЛАГ (правая колонка)

период эксперимента	исходно		4-я неделя	
группа / параметр БРР	контроль (перед введением ф. р-ра)	ЛАГ (перед введением МКТ)	контроль (4 нед после введения ф. р-ра)	ЛАГ (4 нед после введения МКТ)
ЧСС _{max}	512.2 ± 17.0 [478.9; 545.5]	515.2 ± 18.5 [478.9; 551.6]	627.1 ± 28.5 [571.2; 682.9]	440.1 ± 18.5 [403.9; 476.3]
ЧСС _{max} : АТП	512.0 ± 16.3 [480.1; 544.0]	525.1 ± 18.7 [488.5; 561.7]	491.0 ± 22.7 [446.5; 535.5]	403.9 ± 21.1 [362.5; 445.3]
ЧСС покоя	353.1 ± 8.0 [337.2; 369.0]	352.5 ± 6.9 [338.8; 366.2]	309.1 ± 6.9 [295.3; 322.9]	344.7 ± 15.1 [314.6; 374.8]
ЧСС покоя: АТП	355.5 ± 11.1 [333.4; 377.7]	357.5 ± 10.7 [336.1; 378.8]	334.3 ± 10.8 [312.8; 355.9]	343.0 ± 15.0 [313.2; 372.8]
ЧСС _{min}	289.5 ± 13.7 [262.6; 316.4]	301.8 ± 14.7 [273.0; 330.7]	207.8 ± 17.7 [173.1; 242.5]	258.7 ± 14.9 [229.4; 288.0]
ЧСС _{min} : АТП	277.8 ± 13.1 [252.2; 303.4]	262.7 ± 15.0 [233.3; 292.0]	162.9 ± 20.7 [122.3; 203.4]	292.4 ± 17.3 [258.5; 326.3]
A _{БРР}	204.0 ± 16.7 [170.9; 237.1]	211.1 ± 7.2 [196.9; 225.4]	241.3 ± 20.3 [201.0; 281.7]	166.6 ± 14.7 [137.4; 195.8]
A _{БРР} : АТП	198.2 ± 21.2 [156.1; 240.3]	209.6 ± 18.5 [172.9; 246.4]	166.7 ± 13.1 [140.8; 192.7]	117.8 ± 16.3 [85.3; 150.3]
ТК _{БРР}	141.4 ± 19.2 [103.1; 179.6]	138.0 ± 11.8 [114.5; 161.5]	180.0 ± 15.7 [148.7; 211.3]	90.3 ± 12.0 [66.4; 114.2]
ТК _{БРР} : АТП	131.5 ± 17.1 [97.4; 165.6]	151.2 ± 21.5 [108.3; 194.1]	106.9 ± 8.9 [89.2; 124.7]	62.2 ± 9.2 [44.0; 80.4]
БК _{БРР}	62.5 ± 5.2 [52.0; 72.9]	73.1 ± 12.9 [47.4; 98.8]	61.5 ± 6.4 [48.7; 74.2]	76.2 ± 9.3 [57.8; 94.7]
БК _{БРР} : АТП	66.8 ± 10.5 [45.9; 87.7]	58.4 ± 7.4 [43.7; 73.1]	59.9 ± 7.5 [45.0; 74.9]	55.9 ± 14.1 [27.7; 84.0]
ИЧ _{БРР}	5.2 ± 1.1 [3.4; 7.9]	3.6 ± 0.4 [2.9; 4.4]	3.5 ± 0.3 [3.0; 4.2]	2.0 ± 0.3 [1.5; 2.7]
ИЧ _{БРР} : АТП	4.0 ± 0.8 [2.8; 5.9]	5.3 ± 1.1 [3.5; 8.0]	2.4 ± 0.3 [1.9; 2.9]	2.7 ± 0.6 [1.8; 4.2]
n/n _{АТП}	8/9	7/7	5/5	7/5

Примечание. Значения параметров приведены на момент начала эксперимента («исходно», левые колонки) и к моменту окончания 4-й недели эксперимента («4-я неделя», правые колонки). В нижней части каждой графы для каждой группы приведены значения ЧСС и параметры барорецепторной реакции, получаемые на фоне инфузии ангиотензина II (АТП). n_{АТП} – количество животных, получавших АТП.

МКТ – монокроталин; ЧСС_{max} – наибольшее асимптотическое (максимальное достижимое) значение ЧСС; ЧСС покоя – значение ЧСС, наблюдаемое до введения вазоактивных соединений; ЧСС_{min} – наименьшее асимптотическое (минимальное достижимое) значение ЧСС; A_{БРР} – диапазон (амплитуда) барорецепторной реакции; ТК_{БРР} – величина рефлекторной тахикардии; БК_{БРР} – величина рефлекторной брадикардии; ИЧ_{БРР} – индекс чувствительности барорецепторной реакции.

у животных контрольной группы (рис. 4с, панель «4-я нед»). Также $ЧСС_{\min}$ у крыс с ЛАГ на фоне АТП значительно отличается от этого параметра у контрольных животных ($p < 0.001$, рис. 4а, панель «4-я нед/ЛАГ»). Крысы с ЛАГ при действии АТП демонстрируют тенденцию к уменьшению $БК_{\text{БРР}}$ (рис. 4d, «4-я нед»), однако, различия между группами оказываются незначимыми, поскольку у контрольных животных АТП на 4-й неделе эксперимента вызывал значительное повышение $ЧСС$ покоя (табл. 1).

И в контрольной группе животных (на 4-ю неделю), и у животных с ЛАГ введение АТП приводило к значимому снижению $A_{\text{БРР}}$ (рис. 4b, панель «4-я нед»). Однако у контрольных животных этот эффект АТП преимущественно реализуется за счет снижения наибольшей достижимой $ЧСС$ (при повышенной $ЧСС$ покоя) и ослабления рефлекторной тахикардии, а у животных с ЛАГ – как за счет снижения рефлекторной тахикардии, так и брадикардии (рис. 4b–d).

Изменение парасимпатического компонента барорецепторного рефлекса при ЛАГ

Во всех экспериментальных группах атропин вызывает увеличение $ЧСС$ покоя, уменьшение рефлекторной брадикардии; также, наименьшая достижимая $ЧСС$ на фоне атропина во всех группах выше, чем в контрольных условиях. Атропин не вызывает значимого изменения наибольшей достижимой $ЧСС$ как в контрольной группе, так и у животных с ЛАГ (рис. 5а, верхние панели). Атропин уменьшает $A_{\text{БРР}}$ в контрольной группе животных и у животных с ЛАГ за счет изменения $ЧСС_{\min}$ и $БК_{\text{БРР}}$. Атропин также вызывает уменьшение $ИЧ_{\text{БРР}}$ как у животных контрольной группы, так и у животных с ЛАГ (табл. 2).

Наибольшее изменение $ЧСС$ покоя (от 309.1 ± 6.9 [295.3; 322.9] до 394.9 ± 12.0 [371.0; 418.8] уд/мин, 85.7 уд/мин), $ЧСС_{\min}$ (от 207.8 ± 17.7 [173.1; 242.5] до 333.0 ± 17.6 [298.5; 367.4] уд/мин, 125.18 уд/мин), $БК_{\text{БРР}}$ и $A_{\text{БРР}}$, вызванное действием атропина, обнаруживается у контрольных животных через 4 недели после начала эксперимента (рис. 5а, панель «4-я нед/контроль»); у животных с ЛАГ атропин приводит к значимо меньшему изменению $ЧСС_{\min}$, $БК_{\text{БРР}}$ и $A_{\text{БРР}}$ ($p < 0.05$), чем у крыс контрольной группы на 4-ю неделю (рис. 5а, правая верхняя панель, табл. 2, $\Delta A_{\text{БРР}}$).

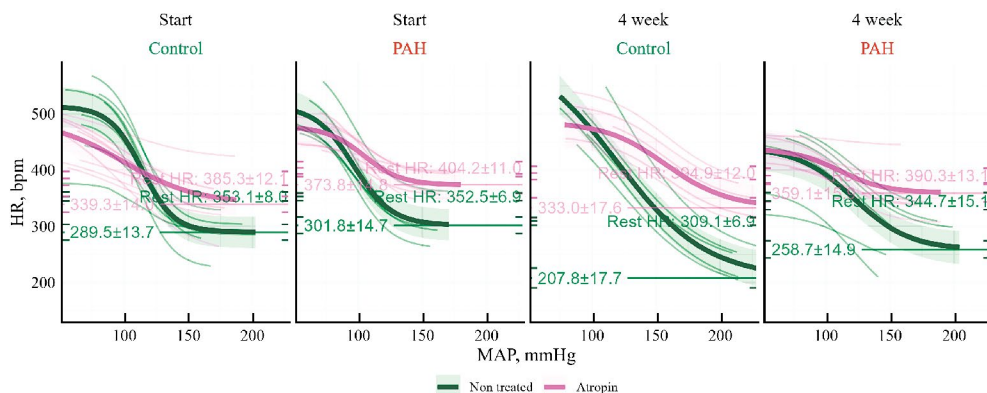


Рис. 5. Влияние ЛАГ на холинергическую составляющую барорецепторного контроля $ЧСС$. Кривые барорецепторной реакции показаны для контрольной группы крыс («контроль») на момент начала и через 4 недели после начала эксперимента; для группы животных до введения («исходно/ЛАГ») и через 4 недели после введения МКТ («4-я нед/ЛАГ»). Для каждой группы и временной точки показаны кривые БРР, полученные в стандартных условиях (зеленый цвет), а также после введения атропина (розовый цвет). На рисунке представлены только минимально достижимая $ЧСС$ и $ЧСС$ покоя. Обозначения групповых средних, доверительных интервалов, индивидуальных предсказаний, а также отметки на краях панелей для параметров, $ЧСС$ покоя и масштаб панелей такие же, как на предыдущих рисунках.

Влияние АТП на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса при ЛАГ

В контрольных условиях АТП оказывает незначительное влияние на изменения параметров барорецепторной реакции, вызываемые атропином (рис. 6а, панели «исходно»). В контрольной группе через 4 недели после начала эксперимента при действии атропина на фоне инфузии АТП наблюдается незначительное изменение ЧСС покоя (от 334.3 ± 10.8 [312.8; 355.9] до 362.0 ± 15.2 [331.8; 392.2] уд/мин, 27 уд/мин) и ЧСС_{min} (от 162.9 ± 20.7 [122.3; 203.4] до 183.9 ± 26.6 [131.7; 236.1] уд/мин, 21 уд/мин), а также лишь небольшое ослабление БК_{БРР} и снижение $A_{\text{БРР}}$ (16.4 ± 28 уд/мин на фоне инфузии АТП и 102.8 ± 21.2 уд/мин без АТП, рис. 6б, панель «контроль»). Таких эффектов не наблюдается у животных с ЛАГ (рис. 6б, панель «ЛАГ») – вызываемое атропином повышение ЧСС_{min}, ослабление БК_{БРР} и $A_{\text{БРР}}$ сохраняются (табл. 2).

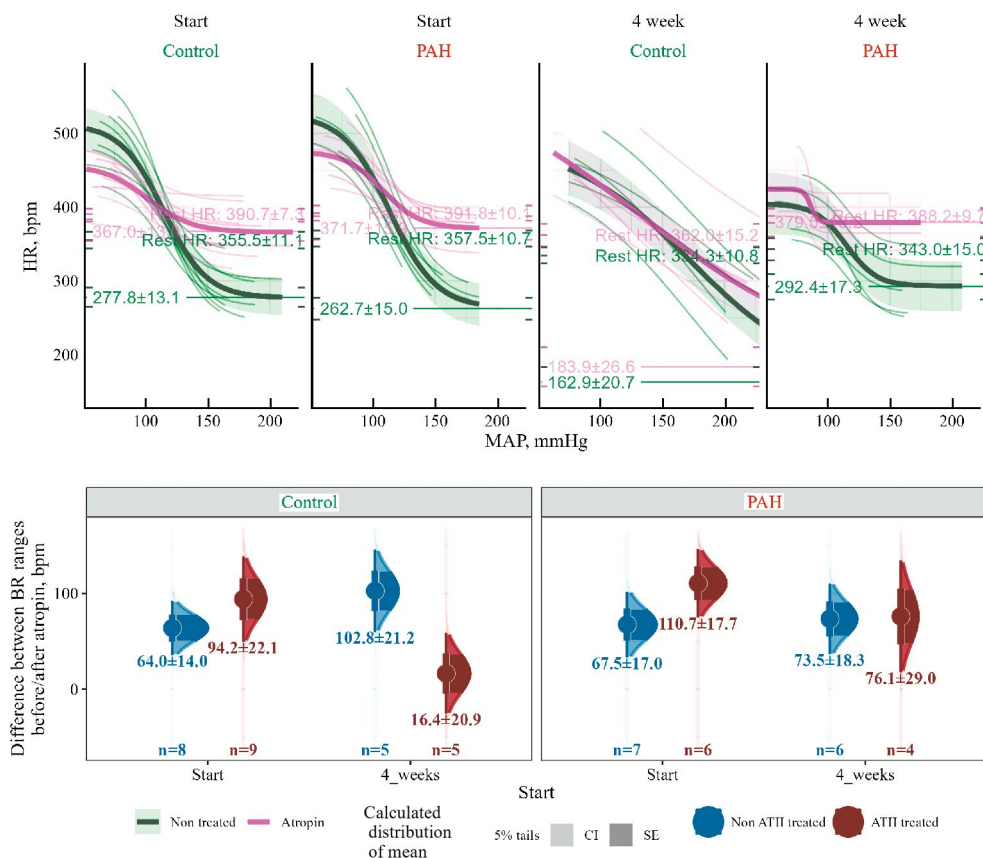


Рис. 6. Влияние АТП на парасимпатический компонент барорецепторного контроля ЧСС при ЛАГ. (а) – кривые барорецепторной реакции показаны для контрольной группы крыс, группы животных до введения («исходно») и через 4 недели после введения монокроталина («ЛАГ»). Розовым цветом показаны кривые БРР, регистрируемые на фоне инфузии АТП. (б) – разница в величине диапазона БРР (ΔАБРР), определяемого до и после введения атропина для контрольных животных (левая панель) и животных, получавших МКТ («ЛАГ», правая панель). Красным цветом показана разница в величине диапазона БРР, регистрируемая на фоне инфузии АТП. Обозначения доверительных интервалов, ошибок среднего, плотностей распределения и описательных статистик такие же, как на рис. 3. На панелях приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего для каждой группы.

Таблица 2. Характеристические значения ЧСС и параметров барорецепторной реакции в группе контрольных животных (контроль), а также в группе животных, сформировавших к 4-й неделе признаки ЛАГ (правая колонка) на фоне атропина

период эксперимента	исходно		4-я неделя	
группа / параметр БРР	контроль (атропин)	ЛАГ (перед введением МКТ) (атропин)	контроль (атропин)	ЛАГ (4-я нед. после введения МКТ) (атропин)
ЧСС покоя	353.1 ± 8.0 [337.2; 369.0] 385.3 ± 12.1 [361.2; 409.4]	352.5 ± 6.9 [338.8; 366.2] 404.2 ± 11.0 [382.4; 426.0]	309.1 ± 6.9 [295.3; 322.9] 394.9 ± 12.0 [371.0; 418.8]	344.7 ± 15.1 [314.6; 374.8] 390.3 ± 13.1 [364.3; 416.3]
ЧСС покоя: АТП	355.5 ± 11.1 [333.4; 377.7] 390.7 ± 7.3 [376.2; 405.3]	357.5 ± 10.7 [336.1; 378.8] 391.8 ± 10.1 [371.8; 411.9]	334.3 ± 10.8 [312.8; 355.9] 362.0 ± 15.2 [331.8; 392.2]	343.0 ± 15.0 [313.2; 372.8] 388.2 ± 9.7 [368.9; 407.5]
ЧСС _{min}	289.5 ± 13.7 [262.6; 316.4] 339.3 ± 14.0 [311.8; 366.8]	301.8 ± 14.7 [273.0; 330.7] 373.8 ± 14.8 [344.7; 402.8]	207.8 ± 17.7 [173.1; 242.5] 333.0 ± 17.6 [298.5; 367.4]	258.7 ± 14.9 [229.4; 288.0] 359.1 ± 15.9 [327.9; 390.2]
ЧСС _{min} : АТП	277.8 ± 13.1 [252.2; 303.4] 367.0 ± 13.0 [341.5; 392.5]	262.7 ± 15.0 [233.3; 292.0] 371.7 ± 15.9 [340.6; 402.7]	162.9 ± 20.7 [122.3; 203.4] 183.9 ± 26.6 [131.7; 236.1]	292.4 ± 17.3 [258.5; 326.3] 379.5 ± 19.2 [342.0; 417.1]
ИЧ _{БРР}	5.2 ± 1.1 [3.4; 7.9] 1.7 ± 0.3 [1.2; 2.4]	3.6 ± 0.4 [2.9; 4.4] 2.4 ± 0.4 [1.7; 3.2]	3.5 ± 0.3 [3.0; 4.2] 1.8 ± 0.1 [1.6; 2.0]	2.0 ± 0.3 [1.5; 2.7] 1.4 ± 0.1 [1.2; 1.7]
ИЧ _{БРР} : АТП	4.0 ± 0.8 [2.8; 5.9] 1.7 ± 0.3 [1.2; 2.5]	5.3 ± 1.1 [3.5; 8.0] 2.3 ± 0.4 [1.7; 3.2]	2.4 ± 0.3 [1.9; 2.9] 1.9 ± 0.1 [1.7; 2.1]	2.7 ± 0.6 [1.8; 4.2] 0.7 ± 0.1 [0.5; 1.0]
ΔА _{БРР}	64.0 ± 14.0 [35.7; 92.3]	67.5 ± 17.0 [33.3; 101.8]	102.8 ± 21.2 [59.9; 145.7]	73.5 ± 18.3 [36.5; 110.4]
ΔА _{БРР} : АТП	94.2 ± 22.1 [49.7; 138.7]	110.7 ± 17.7 [75.0; 146.4]	16.4 ± 20.9 [-25.7; 58.5]	76.1 ± 29.0 [17.6; 134.6]
n(n _{атр})	8(8)	7(7)	5(5)	7(6)
n _{АТП} (n _{АТП+атр})	9(9)	7(6)	5(5)	5(4)

Примечание. Значения параметров приведены на момент начала эксперимента («исходно», левые колонки) и к моменту окончания 4-й недели эксперимента («4-я неделя», правые колонки). В нижней части каждой графы для каждой группы приведены значения ЧСС и параметры барорецепторной реакции, получаемые на фоне атропина и инфузии ангиотензина II (АТП). Обозначения такие же, как и в табл. 1, за исключением ΔА_{БРР} обозначающей разницу между диапазонами БРР до и после атропина.

Для возможности сопоставления в верхней строке каждой ячейки приведены значения параметра, определяемые до введения животным атропина (выделено курсивом). В нижней строке каждой ячейки в круглых скобках жирным шрифтом приведены значения параметра, определяемые на фоне атропина.

n_{атр} – количество животных, получавших атропин.

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего [ниДН; виДН].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дисфункция барорецепторной регуляции ЧСС при ЛАГ

В наших экспериментах впервые прямо продемонстрировано, что ЛАГ оказывает существенное, комплексное влияние на барорецепторную регуляцию ЧСС. В частности, при ЛАГ у крыс наблюдается уменьшение рефлекторной тахикардии, а наибольшая достижимая ЧСС меньше, чем у контрольных животных. Таким образом, ЛАГ ослабляет способность к рефлекторному увеличению ЧСС в ответ на снижение среднего артериального давления, вызванного вазодилатацией системных сосудов за счет NO-зависимых механизмов.

У крыс с ЛАГ практически не уменьшается способность к рефлекторному снижению ЧСС в ответ на вазоконстрикцию, вызванную стимуляцией $\alpha 1$ -адренорецепторов: рефлекторная брадикардия и наименьшая достижимая ЧСС при ЛАГ остается такой же, как и в контрольных условиях (группах). Следует отметить, что при ЛАГ, в условиях монокроталиновой модели заболевания у крыс, не наблюдается существенного изменения амплитуды вазоконстрикторного ответа системных артерий на введение ФЭ и активацию $\alpha 1$ -АР, хотя наблюдается заметное снижение способности артерий большого круга поддерживать тонус [3]. Таким образом, ЛАГ вызывает большее нарушение тех механизмов и компонентов барорецепторной реакции, которые способствуют повышению ЧСС (при снижении САД) и меньшее нарушение тех, которые приводят к снижению ЧСС (при росте САД) – ЛАГ вызывает «несимметричное» изменение кривой БРР, «искажая» в большей степени симпатическую компоненту барорефлекса.

Как результат снижения ЧСС_{max} и ТК_{БРР} у крыс с ЛАГ наблюдается существенное уменьшение диапазона барорецепторной регуляции. ЛАГ приводит к тому, что животные теряют способность к быстрой, рефлекторной стабилизации ЧСС при снижении САД. Следует отметить, что в наших экспериментах ЧСС покоя у «здоровых» животных и животных с ЛАГ оставалась одинаковой. В предыдущих работах показано, что через 4 недели после введения МКТ и манифестации симптомов ЛАГ у крыс САД остается на прежнем уровне [3]. Ранее показано, что NO-зависимая вазодилатация в большом круге в хронической модели ЛАГ остается неизменной, несмотря на повреждение и дисфункцию эндотелия в малом круге кровообращения: снижение САД посредством активации NO-зависимых механизмов у контрольных животных и животных с ЛАГ оказывается одинаковым [3]. Тем не менее диапазон компенсаторной регуляции ЧСС и соответственно гемодинамики в большом круге при ЛАГ оказывается ограниченным. При неизменной величине NO-зависимой вазодилатации уменьшение барорефлекторного роста ЧСС может происходить за счет снижения «тонуса» симпатического отдела ВНС или чувствительности к симпатическим факторам.

Центральные механизмы дисфункции БРР могут быть обусловлены изменениями в росто-вентролатеральных структурах продолговатого мозга (РВЛМ), модулирующих активность симпатических преганглионаров интермедиолатеральных зон спинного мозга, или изменениями возбудимости самих симпатических преганглионарных нейронов. Хорошо известно, что премоторные нейроны РВЛМ вовлечены в пути барорецепторной регуляции [39]. К настоящему времени показано, что вазоактивный пептид аденомедуллин может как усиливать, так и подавлять активность возбуждающих нейронов в РВЛМ и симпатическую афферентацию [40, 41]. Однако установлено, что при действии в РВЛМ аденомедуллин существенно подавлял чувствительность и диапазон БРР, а также уменьшал ЧСС_{max} при индукции барорецепторного ответа нитропруссидом натрия [42]. В то же время показано, что уровень аденомедулина в плазме повышен при ЛАГ, и, более того, уровень аденомедулина коррелирует с тяжестью ЛАГ [43, 44]. Спекулятивно наблюдаемая нами дисфункция БРР у крыс с ЛАГ может быть обусловлена вызванным аденомедуллином нарушением активности СНС.

Как указано выше, ВСР у пациентов с ЛАГ снижена [10, 13, 14]. Снижение КСМ / ВСР связывают с переходом от циклического, залпового характера к тоническому, перманентному режиму активности эфферентных волокон симпатического отдела ВНС [45]. Тип разрядовой активности в симпатическом отделе ВНС может существенно различаться у здоровых животных и у животных с ЛАГ: у последних залповый характер разрядов может отсутствовать [45]. Вызванное ЛАГ ослабление рефлекторной тахикардии может быть связано с утратой паттерна активности симпатическими нервами, что приводит к ослаблению чувствительности пейсмейкерных кардиомиоцитов ритмоводителя сердца (синоатриального узла, САУ) к норадреналину (НА). Так как профиль секреции нейромедиатора влияет на чувствительность ткани к нему, то изменение режима секреции НА с залпового на перманентный приводит к десенситизации адренорецепторов, снижению их экспрессии или представленности в мембране миоцитов ритмоводителя сердца, несмотря на возможное увеличение общего количества секретируемого норадреналина, характерное для ЛАГ [46, 47].

Известно, что ЛАГ сопровождается повышением уровня циркулирующих натрийуретических пептидов (ANP, BNP, CNP) [48], а также повышением экспрессии их рецепторов, являющихся гуанилатциклазами [49]. Симпатическая иннервация, включающая НА и адренорецепторы, а также система натрийуретических пептидов и их рецепторов являются двумя ключевыми и крайне тесно переплетенными элементами нейрогуморальной регуляции функционирования сердца [50]. В настоящее время показано, что повышение уровня циркулирующих ANP и BNP снижает залповую активность симпатических нервов, а также чувствительность барорецепторного рефлекса [51]. Увеличение активности системы натрийуретических пептидов может быть одной из причин наблюдаемого нами уменьшения диапазона БРР при ЛАГ.

Периферические причины дисфункции БРР при ЛАГ могут быть связаны с изменением функционирования барорецепторов каротидного синуса [52]. Известно, что системная артериальная гипертензия может сопровождаться снижением трансмурального давления в каротидном синусе, его фиброзом, что ослабляет чувствительность к изменению САД, способствует повышению активности симпатических нервов и дисфункции БРР [53–55]. ЛАГ может способствовать ремоделированию барорецепторов, ослаблению их чувствительности к колебаниям САД, например, влияя на экспрессию пуриновых рецепторов P2X-типа в сенсорных окончаниях [56]. Недавно показано, что стимуляция каротидного синуса облегчает симптомы ЛАГ у крыс [57].

В наших экспериментах у крыс с ЛАГ наблюдалось не только уменьшение диапазона БРР, но и снижение $ИЧ_{БРР}$. Причиной системной идиопатической гипертензии часто является ослабление чувствительности барорецепторного рефлекса – феномен, иначе называемый «барорецепторной недостаточностью» [58, 59]. Как указано выше, барорецепторная недостаточность при системной гипертензии сопровождается повышенной активностью СНС. В данной работе впервые показано, что ЛАГ, как и системная гипертензия, ассоциирована с нарушением барорецепторной регуляции, которая, однако, обусловлена ослаблением «симпатического» компонента.

Ангиотензин II как фактор барорецепторной дисфункции при ЛАГ

У крыс с ЛАГ при действии ангиотензина II на 4-ю неделю после введения МКТ ЧСС_{max} и ТК_{БРР} изменяются (снижаются) крайне слабо по сравнению с контрольными животными. Хорошо известно, что ЛАГ сопровождается активацией РААС, увеличением уровня циркулирующего АТ и его производных. Слабое изменение ЧСС_{max} и ТК_{БРР} при действии АТII, вероятно, связано с исходно уменьшенным диапазоном БРР, а также с ослаблением чувствительности к АТII на фоне его хронически повышенного уровня у крыс с ЛАГ.

Ранее показано, что АТII при ЛАГ парадоксально уменьшает величину вазоконстрикторного ответа в большом круге кровообращения, обусловленного стимуляцией

$\alpha 1$ -АР [3]. Соответственно АТII должен ослаблять величину рефлекторной брадикардии; приводить к тому, что абсолютное значение $ЧСС_{\min}$ будет выше, чем в экспериментах без инфузии ангиотензина. Такой эффект действительно наблюдается у крыс с ЛАГ, но не у контрольных животных (лишенных парадоксального влияния АТII на констрикторные эффекты $\alpha 1$ -АР). Вышеописанный эффект, вероятно, не связан с подавлением парасимпатической компоненты БРР ангиотензином. Таким образом, АТII при ЛАГ способствует усугублению дисфункции БРР, которое манифестирует в снижении диапазона барорецепторной реакции.

Парасимпатический компонент барорецепторного контроля ЧСС при ЛАГ

Известно, что артерии малого круга кровообращения помимо симпатической имеют также интенсивную парасимпатическую иннервацию [9, 60]. К настоящему времени установлено, что при ЛАГ активность парасимпатических постганглионарных волокон, иннервирующих артерии малого круга кровообращения, снижается [61]. Стимуляция парасимпатических нервов или потенцирование холинергических эффектов за счет применения ингибиторов холинэстеразы рассматривается как способ нормализации циркуляции в малом круге при ЛАГ [62, 63].

В наших экспериментах атропин, блокируя М-холинорецепторы САУ, подавляет снижение ЧСС в ответ на введение ФЭ, активацию $\alpha 1$ -АР и вазоконстрикцию как у контрольных животных, так и у животных с ЛАГ. В наших экспериментах атропин приводил к типичным парасимпатолитическим эффектам, включающим повышение ЧСС покоя, уменьшение $A_{БРР}$ за счет $ЧСС_{\min}$ и $БК_{БРР}$. Эти типичные эффекты наблюдались как у контрольных животных, так и у животных с ЛАГ. Как указано выше, у крыс с ЛАГ наименьшая достижимая ЧСС и рефлекторная брадикардия остаются неизменными, что позволяет предположить интактность холинергической компоненты БРР у крыс с ЛАГ. Величина снижения $A_{БРР}$, $ЧСС_{\min}$ и $БК_{БРР}$ под действием атропина, регистрируемая до и через 4 недели после введения МКТ, оказывается практически одинаковой. Кроме того, АТII практически не изменял влияния атропина на величину $БК_{БРР}$ и $A_{БРР}$ у крыс с ЛАГ. АТII незначительно влияет на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса у крыс с ЛАГ. Эти наблюдения подтверждают предположение о минимальной дисфункции холинергической компоненты БРР при ЛАГ.

Причиной того, что у контрольных животных при регистрации на 4-ю неделю эксперимента атропин приводит к большему изменению $ЧСС_{\min}$, $БК_{БРР}$ и $A_{БРР}$, чем у крыс с ЛАГ, вероятно, является ремоделирующее действие АТII, способствующее отложенному проконстрикторному действию у «здоровых» животных, потенциации ответа на ФЭ и физиологическому усилению рефлекторного снижения ЧСС.

Наши функциональные эксперименты с использованием МКТ модели патологии позволяют предположить, что парасимпатическая иннервация САУ, в отличие от иннервации легочных артерий, при ЛАГ остается не затронутой. Следует отметить, что парасимпатический тонус и холинергический вклад в регуляцию ЧСС у человека гораздо больше, чем у грызунов. Поэтому дерегуляция ЧСС, обусловленная дисфункцией парасимпатического отдела ВНС у человека при ЛАГ, не может быть исключена полностью.

В итоге в представленной работе впервые в экспериментах *in vivo* показано, что легочная артериальная гипертензия, вызванная МКТ, приводит к нарушению барорецепторного контроля ЧСС, что соответственно снижает возможность рефлекторной стабилизации АД и обуславливает дерегуляцию кровообращения в системном круге. Результаты работы позволили подтвердить предположение, что ЛАГ оказывает влияние на отдельные компоненты регуляции кровообращения в большом круге, преимущественно нарушая симпатическую компоненту БРР.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят А. В. Фаворова за доставку полиуретановой трубки необходимого диаметра и УСД от Instechlabs в Москву. Это сделало хронические эксперименты возможными.

ВКЛАДЫ 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., В. С. К.)

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (грант РНФ 22-15-00189). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Министерства здравоохранения РФ, протокол № ЛЭС/01.11.23.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

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. Hassoun PM (2021) Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 385: 2361–2376.
<https://doi.org/10.1056/NEJMr2000348>
3. Абрамов АА, Лакомкин ВЛ, Лукошкова ЕВ, Просвирнин АВ, Капелько ВИ, Кузьмин ВС (2023) ЛЕГОЧНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ ОСЛАБЛЯЕТ ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫЕ РЕАКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ АЛЬФА-1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В БОЛЬШОМ КРУГЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109: 1498–1514. [Abramov AA, Lakomkin VL, Lukoshkova EV, Prosvirnin AV, Kapelko VI, Kuzmin VS (2023) PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION WEAKENS VASOCONSTRICTOR REACTIONS CAUSED BY ACTIVATION OF ALPHA-1-ADRENERGIC RECEPTORS IN THE LARGE CIRCULATORY CIRCLE. *Russ J Physiol* 109: 1498–1514. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923100023>
4. Peled N, Shritit 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>
5. 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>
6. 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>

7. *Nickel NP, Yuan K, Dorfmüller 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>
8. *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>
9. *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>
10. *Wensel R, Jilek C, Dörr M, Francis DP, Stadler H, Lange T, Blumberg F, Opitz C, Pfeifer M, Ewert R* (2009) Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34: 895–901. <https://doi.org/10.1183/09031936.00145708>
11. *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>
12. *Samavat S, Ahmadpoor P, Samadian F* (2011) Aldosterone, hypertension, and beyond. *Iran J Kidney Dis* (2): 71–76.
13. *Dimopoulos S, Anastasiou-Nana M, Katsaros F, Papazachou O, Tzanis G, Gerovasili V, Pozios H, Roussos C, Nanas J, Nanas S* (2009) Impairment of Autonomic Nervous System Activity in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Case Control Study. *J Card Failure* 15: 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.06.001>
14. *Andersen MØ, Diederichsen SZ, Svendsen JH, Carlsen J* (2023) Continuous long-term heart rate variability and risk assessment in pulmonary hypertension. *Open Heart* 10: e002302. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2023-002302>
15. *Ramos RP, Arakaki JSO, Barbosa P, Treptow E, Valois FM, Ferreira EVM, Nery LE, Neder JA* (2012) Heart rate recovery in pulmonary arterial hypertension: relationship with exercise capacity and prognosis. *Am Heart J* 163: 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.01.023>
16. *Minai OA, Gudavalli R, Mummadi S, Liu X, McCarthy K, Dweik RA* (2012) Heart rate recovery predicts clinical worsening in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 400–408. <https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0848OC>
17. *Mar PL, Nwazue V, Black BK, Biaggioni I, Diedrich A, Paranjape SY, Loyd JE, Hemnes AR, Robbins IM, Robertson D, Raj SR, Austin ED* (2016) Valsalva Maneuver in Pulmonary Arterial Hypertension: Susceptibility to Syncope and Autonomic Dysfunction. *CHEST* 149: 1252–1260. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.015>
18. *Yi H-T, Hsieh Y-C, Wu T-J, Huang J-L, Lin W-W, Liang K-W, Su C-S, Tsai W-J, Wang K-Y* (2014) Heart rate variability parameters and ventricular arrhythmia correlate with pulmonary arterial pressure in adult patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Heart Lung* 43: 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2014.05.010>
19. *Paula-Ribeiro M, Ribeiro IC, Aranda LC, Silva TM, Costa CM, Ramos RP, Ota-Arakaki J, Cravo SL, Nery LE, Stickland MK, Silva BM* (2021) Cardiac baroreflex dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension at rest and during orthostatic stress: role of the peripheral chemoreflex. *J Appl Physiol* (1985) 131: 794–807. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00152.2021>
20. *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>
21. *Head GA, McCarty R* (1987) Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 21: 203–213. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(87\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0165-1838(87)90023-3)
22. *An H, Landis JT, Bailey AG, Marron JS, Dittmer DP* (2019) dr4pl: A Stable Convergence Algorithm for the 4 Parameter Logistic Model. *R Journal* 11: 171–190. <https://doi.org/10.32614/RJ-2019-003>

23. 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>
24. R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing.
25. 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>
26. Pinheiro J, Bates D (2000) *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag. New York.
<https://doi.org/10.1007/b98882>
27. Pinheiro J, Bates D, R Core Team (2024) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.nlme>
28. Miguez F, Archontoulis S, Dokoohaki H (2018) Nonlinear Regression Models and Applications. In: Glaz B, Yeater KM (eds) *Applied Statistics in Agricultural, Biological, and Environmental Sciences*. Wiley. 401–447.
<https://doi.org/10.2134/appliedstatistics.2016.0003.c15>
29. Oddi FJ, Miguez FE, Ghemandi L, Bianchi LO, Garibaldi LA (2019) A nonlinear mixed-effects modeling approach for ecological data: Using temporal dynamics of vegetation moisture as an example. *Ecol and Evolut* 9: 10225–10240.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5543>
30. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Software* 67: 1–48.
<https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
31. Lenth RV (2024) Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans>
32. Pustejovsky J (2024) clubSandwich: Cluster-Robust (Sandwich) Variance Estimators with Small-Sample Corrections.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.clubSandwich>
33. Pustejovsky JE, Tipton E (2018) Small-Sample Methods for Cluster-Robust Variance Estimation and Hypothesis Testing in Fixed Effects Models. *J Busin & Econom Statist* 36: 672–683.
<https://doi.org/10.1080/07350015.2016.1247004>
34. Bretz F, Hothorn T, Westfall P (2016) *Multiple Comparisons Using R*. CRC Press.
35. Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer Int Publ.
36. Tiedemann F (2020) gghalves: Compose Half-Half Plots Using Your Favourite Geoms.
37. Kay M (2024) ggdist: Visualizations of Distributions and Uncertainty in the Grammar of Graphics. *IEEE Transact Visual Comput Graphics* 30: 414–424.
<https://doi.org/10.1109/TVCG.2023.3327195>
38. Pedersen TL (2024) patchwork: The Composer of Plots.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.patchwork>
39. Kumagai H, Oshima N, Matsuura T, Iigaya K, Imai M, Onimaru H, Sakata K, Osaka M, Onami T, Takimoto C, Kamayachi T, Itoh H, Saruta T (2012) Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertens Res* 35: 132–141.
<https://doi.org/10.1038/hr.2011.208>
40. Charles CJ, Jardine DL, Nicholls MG, Richards AM (2005) Adrenomedullin increases cardiac sympathetic nerve activity in normal conscious sheep. *J Endocrinol* 187: 275–281
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06337>
41. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T (2005) Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 45: 1165–1172.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000165690.85505.37>
42. Xu Y, Krukoff TL (2006) Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla inhibits baroreflex control of heart rate: a role for protein kinase A. *Br J Pharmacol* 148: 70–77.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706698>
43. Bouzina H, Rådegran G (2020) Plasma adrenomedullin peptides and precursor levels in pulmonary arterial hypertension disease severity and risk stratification. *Pulm Circ* 10: 2045894020931317.
<https://doi.org/10.1177/2045894020931317>

44. *Hartopo AB, Anggrahini DW, Dinarti LK, Schäfer A-K, Bergmann A, Fachiroh J, Somma SD* (2023) Prognostic Value for Mortality of Plasma Bioactive Adrenomedullin in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Sub Analysis of the Biomarker Study in the COHARD-PH Registry. *Medicina* (Kaunas) 59: 748.
<https://doi.org/10.3390/medicina59040748>
45. *Shinoda M, Saku K, Oga Y, Tohyama T, Nishikawa T, Abe K, Yoshida K, Kuwabara Y, Fujii K, Ishikawa T, Kishi T, Sunagawa K, Tsutsui H* (2019) Suppressed baroreflex peripheral arc overwhelms augmented neural arc and incapacitates baroreflex function in rats with pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol* 104: 1164–1178.
<https://doi.org/10.1113/EP087253>
46. *Zaloga GP, Chernow B, Fletcher JR, Hughes P, Rainey TG, Lake CR* (1984) Increased circulating plasma norepinephrine concentrations in noncardiac causes of pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 12: 85–89.
<https://doi.org/10.1097/00003246-198402000-00001>
47. *Mak JC, Haddad EB, Buckley NJ, Barnes PJ* (1993) Visualization of muscarinic m4 mRNA and M4 receptor subtype in rabbit lung. *Life Sci* 53: 1501–1508.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90624-c](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90624-c)
48. *Morice AH, Pepke-Zaba J, Brown MJ, Thomas PS, Higenbottam TW* (1990) Atrial natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 3: 910–913.
49. *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>
50. *Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Tank J, Diedrich A, Schroeder C, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M, Jordan J* (2006) Beta-adrenergic and atrial natriuretic peptide interactions on human cardiovascular and metabolic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 5069–5075.
<https://doi.org/10.1210/jc.2006-1084>
51. *Luchner A, Schunkert H* (2004) Interactions between the sympathetic nervous system and the cardiac natriuretic peptide system. *Cardiovasc Res* 63: 443–449.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.004>
52. *Conde SV, Sacramento JF, Melo BF, Fonseca-Pinto R, Romero-Ortega MI, Guarino MP* (2021) Blood Pressure Regulation by the Carotid Sinus Nerve: Clinical Implications for Carotid Body Neuromodulation. *Front Neurosci* 15: 725751.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.725751>
53. *Wallbach M, Koziolok MJ* (2018) Baroreceptors in the carotid and hypertension-systematic review and meta-analysis of the effects of baroreflex activation therapy on blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 33: 1485–1493.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfx279>
54. *Kougias P, Weakley SM, Yao Q, Lin PH, Chen C* (2010) Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension. *Med Sci Monit* 16: RA1–RA8.
55. *Mancia G, Ferrari A, Gregorini L, Parati G, Ferrari MC, Pomidossi G, Zanchetti A* (1979) Control of blood pressure by carotid sinus baroreceptors in human beings. *Am J Cardiol* 44: 895–902.
[https://doi.org/10.1016/0002-9149\(79\)90220-0](https://doi.org/10.1016/0002-9149(79)90220-0)
56. *Yokoyama T, Settai K, Nakamuta N, Yamamoto Y* (2019) Distribution and morphology of baroreceptors in the rat carotid sinus as revealed by immunohistochemistry for P2X3 purinoceptors. *Histochem Cell Biol* 151: 161–173.
<https://doi.org/10.1007/s00418-018-1734-1>
57. *Wang J, Chen J, Shu L, Zhang R, Dai M, Fang X, Hu Z, Xiao L, Xi Z, Zhang J, Bao M* (2024) Carotid Baroreceptor Stimulation Improves Pulmonary Arterial Remodeling and Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *JACC Basic Transl Sci* 9: 475–492.
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2024.01.012>
58. *Heusser K, Tank J, Luft FC, Jordan J* (2005) Baroreflex failure. *Hypertension* 45: 834–839.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000160355.93303.72>
59. *Biaggioni I, Shibao CA, Diedrich A, Muldowney JAS, Laffer CL, Jordan J* (2019) Blood Pressure Management in Afferent Baroreflex Failure: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* 74: 2939–2947.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.027>

60. *Kummer W* (2011) Pulmonary vascular innervation and its role in responses to hypoxia: size matters! *Proc Am Thorac Soc* 8: 471–476.
<https://doi.org/10.1513/pats.201101-013MW>
61. *Da Silva Gonçalves Bos D, Happé C, Schalij I, Pijacka W, Paton JFR, Guignabert C, Tu L, Thuillet R, Bogaard H-J, van Rossum AC, Vonk-Noordegraaf A, de Man FS, Handoko ML* (2017) Renal Denervation Reduces Pulmonary Vascular Remodeling and Right Ventricular Diastolic Stiffness in Experimental Pulmonary Hypertension. *JACC Basic Transl Sci* 2: 22–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.09.007>
62. *Ntiloudi D, Qanud K, Tomaio J-N, Giannakoulas G, Al-Abed Y, Zanos S* (2019) Pulmonary arterial hypertension: the case for a bioelectronic treatment. *Bioelectron Med* 5.
<https://doi.org/10.1186/s42234-019-0036-9>
63. *Karpov AA, Vachrushev NS, Shilenko LA, Smirnov SS, Bunenkov NS, Butskih MG, Chervaev A-KA, Vaulina DD, Ivkin DY, Moiseeva OM, Galagudza MM* (2023) Sympathetic Denervation and Pharmacological Stimulation of Parasympathetic Nervous System Prevent Pulmonary Vascular Bed Remodeling in Rat Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis* 10: 40.
<https://doi.org/10.3390/jcdd10020040>

Rapid Adaptive Regulation of Systemic Circulation is Suppressed in Pulmonary Arterial Hypertension as a Result of Dysfunction of Baroreflexive Heart Rate Control

A. A. Abramov^{a,*}, V. L. Lakomkin^a, E. V. Lukoshkova^a, A. V. Prosvirnin^a,
V. I. Kapelko^a, and V. S. Kuzmin^{a,b}

^aNational Medical Research Centre of Cardiology named after Academician E. I. Chazov
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: ferk_88@list.ru

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by an increase of a pressure in the pulmonary circulation; PAH is accompanied by activation of the sympathetic (SNS) and the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). However, PAH-associated changes in baroreceptor regulation of systemic circulation, which is tightly interwoven with SNS and RAAS, have not been studied. The baroreceptor response (BRR) was studied in a chronic monocrotaline (MCT) model of PAH in rats (Wistar, 290 ± 30 g, 2–4 months). Phenylephrine as an agonist of $\alpha 1$ -adrenergic receptor and sodium nitroprusside as NO donor were gradually administered to chronically catheterized, non-anesthetized control animals and animals with PAH (4 weeks after MCT administration) to induce vasomotor responses. Mean arterial pressure and heart rate (HR) were recorded under the action of vasoactive compounds alone or under the action of vasoactive compounds in presence of angiotensin-II (ATII), atropine. The parameters characterizing baroreceptor change in HR including maximal and minimal heart rate (HR_{max} , HR_{min}), reflex tachycardia (T_{BRR}) and bradycardia (B_{BRR}), range (A_{BRR}) and the baroreceptor response sensitivity index (SI_{BRR}) were calculated. A significant decrease in HR_{max} , T_{BRR} , A_{BRR} (but not B_{BRR}), as well as the sensitivity index of BRR was observed in rats with PAH. ATII induces significant and different changes in the BRR parameters in control rats and in rats with PAH if administered 4 weeks after the start of the experiment. In rats with PAH, ATII causes less pronounced changes in HR_{max} , T_{BRR} , and B_{BRR} than in control animals. ATII insignificantly affects parasympathetic component of the baroreceptor reflex in rats with PAH. Thus, at least in the MCT-mediated model in rats, PAH significantly deteriorates the baroreceptor regulation of HR. This effect manifests in a decrease in the range and sensitivity of the baroreceptor response. Also, PAH unequally affects the sympathetic and parasympathetic control of the baroreceptor regulation of HR. On the other hand, ATII exhibits weak ability to alter BRR in rats with HAP. In conclusion, PAH leads to a disfunction of immediate, reflex mechanisms HR and systemic circulation control.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, heart rhythm, systemic circulation, baroreceptor reflex, baroreceptor regulation, parasympathetic control, heart rhythm, angiotensin II