

ISSN (print) 0869-8139

ISSN (online) 2658-655X



РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY



Том 111 № 7

июль

2025



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные статьи

Современные представления о фибробластах эндоневрия

Е. С. Петрова, Е. А. Колос

995

Старение клеток скелетных мышц: возраст, саркопения, терапия

Н. Г. Плехова, П. А. Новикова, А. Н. Воронова, Д. В. Королев, В. Б. Шуматов

1018

Экспериментальные статьи

Поведенческий профиль и состав кишечной микробиоты у крыс с различной возбудимостью нервной системы

*И. Г. Шалагинова, Д. С. Кацеров, К. О. Эни, Е. А. Буденкова, А. К. Прибышина,
Н. А. Дюжикова*

1042

Восстановление пик-волновых разрядов после их подавления этосуксимидом у крыс линии WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией

А. В. Габова, Е. А. Федосова, А. Б. Шацкова, К. Ю. Саркисова

1066

Влияние четырехнедельной терапии семаглутидом и его комбинацией с интраназальным инсулином на гормональный статус тиреоидной и гонадной систем у самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа

К. В. Деркач, И. И. Зорина, И. В. Федорчук, А. О. Шпаков

1084

Влияние умеренно гипоксических условий культивирования мезенхимальных стромальных клеток на иммунологические показатели при заживлении матки крыс

*Н. Б. Тихонова, А. А. Темнов, В. В. Алексанкина, А. П. Алексанкин, Т. В. Фокина,
А. Н. Склифас, Е. В. Кузнецова, А. П. Милованов, Л. М. Михалева*

1101

Биохимические показатели сыворотки крови самцов американских норок (*Neogale vison*) при отборе на ручное и агрессивное поведение

Э. В. Панова, С. Н. Калинина, О. В. Трапезов, В. А. Илюха

1117

Транскрипционная активность генов, кодирующих белки – регуляторы нейроглиогенеза и апоптоза, при обучении в водном лабиринте Морриса: влияние факторов стресса и формирования пространственной памяти у крыс Вистар

А. М. Ратмиров, М. А. Грудень, З. И. Сторожева

1134

Особенности афферентного обеспечения мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей при скоростных локомоторных движениях

А. А. Челноков, М. Г. Барканов, Д. А. Гладченко, Р. М. Городничев

1153

Пол и возраст влияют на пищевые предпочтения и адаптацию к кратковременному потреблению высококалорийной “вкусной” пищи у мышей

Е. Н. Макарова, П. Е. Орлов, А. Ю. Казанцева, Т. В. Яковлева, Н. М. Бажан

1168

Особенности миграционных процессов нейтрофилов в проточной системе

С. Н. Плескова, Н. А. Безруков, Е. Н. Горшкова, Д. В. Новиков, Е. В. Отставнова

1185

Влияние хронического стресса на поведение мышей, нокаутированных по рецептору TAAR1, в тестах, оценивающих депрессивноподобное состояние

*Е. П. Виноградова, А. Ю. Александров, Д. В. Беляков, Е. С. Дмитриева,
Л. Н. Станкевич, А. А. Александров*

1198

Дефицит витамина D приводит к ухудшению постинфарктного ремоделирования левого желудочка у крыс

*Ж. И. Ионова, А. А. Карпов, О. А. Беркович, С. Г. Чефу, Л. А. Шиленко,
М. Г. Буцких, А.-Х. А. Черваев, Д. С. Четурная, Д. Ю. Ивкин,
Т. Д. Власов*

1211

Метаболические нарушения при росте перевиваемой гепатомы 22а: роль церулоплазмينا

*Е. А. Зеленский, К. В. Рутто, А. С. Трулев, Н. П. Горбунов, А. В. Соколов,
Е. П. Киселева*

1225

CONTENTS

Reviews

Modern Concepts of Endoneurial Fibroblasts

E. S. Petrova, and E. A. Kolos 995

Cellular Senescence in Skeletal Muscle: Age, Sarcopenia, Therapy

N. G. Plekhova, P. A. Novikova, A. N. Voronova, D. V. Korolev, and V. B. Shumatov 1018

Experimental articles

Behavioral Profile and Gut Microbiota Composition in Rats with Different Nervous System Excitability

I. G. Shalaginova, D. S. Katserov, K. O. Ensh, E. A. Budenkova, A. K. Pribyshina, and N. A. Dyuzhikova 1042

Restoration of Spike-Wave Discharges after Their Suppression with Ethosuximide in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy

A. V. Gabova, E. A. Fedosova, A. B. Shackova, and K. Yu. Sarkisova 1066

Effect of Four-Week Semaglutide Therapy and its Combination with Intranasal Insulin on Thyroid and Gonadal Status in Male Rats with Type 2 Diabetes

K. V. Derkach, I. I. Zorina, I. V. Fedorchuk, and A. O. Shpakov 1084

Immunological Effect of Moderately Hypoxic Mesenchymal Stromal Cell Culture Conditions on Uterine Healing in Rats

N. B. Tikhonova, A. A. Temnov, V. V. Aleksankina, T. V. Fokina, A. P. Aleksankin, A. N. Sklifas, E. V. Kuznetsova, A. P. Milovanov, and L. M. Mikhaleva 1101

Biochemical Indicators of Blood Serum of Male American Minks (*Neogale Vison*) Involved in Selection for Tame and Aggressive Behavior

E. V. Panova, S. N. Kalinina, O. V. Trapezov, and V. A. Ilyukha 1117

Transcriptional Activity of Genes Regulating Neurogliogenesis and Apoptosis in Rats Trained in Morris Water Maze: the Influence of Stress and Spatial Memory Formation

A. M. Ratmirov, M. A. Gruden, and Z. I. Storozheva 1134

Peculiarities of Afferent Innervation of Antagonist Muscles of the Bilateral Lower Legs During High-Speed Locomotor Movements

A. A. Chelnokov, M. G. Barkanov, D. A. Gladchenko, and R. M. Gorodnichev 1153

Sex and age affect food choice and metabolic adaptation to short-term high-calorie palatable food eating in mice

E. N. Makarova, P. E. Orlov, A. Yu. Kazantseva, T. W. Jakovleva, and N. M. Bazhan 1168

The Peculiarities of Neutrophils Migration Processes in the Flow System

S. N. Pleskova, N. A. Bezrukov, E. N. Gorshkova, D. V. Novikov, and E. V. Otstavnova 1185

The Effect of Chronic Stress and TAAR1 Knockout on Behavior Characteristics of Mice in Tests Assessing Depressive-Like Behavior

E. P. Vinogradova, A. Y. Aleksandrov, D. V. Belyakov, E. S. Dmitrieva, L. N. Stankevich, and A. A. Aleksandrov 1198

Vitamin D Deficiency Leads to Deterioration of Post-Infarction Remodeling of the Left Ventricle
in Rats

*Zh. I. Ionova, A. A. Karpov, O. A. Berkovich, S. G. Cefu, L. A. Shilenko, M. G. Butskikh,
A.-Kh. A. Chervaeu, D. S. Chepurnaya, D. Yu. Ivkin, T. D. Vlasov* 1211

Metabolic Alterations in Mice Bearing Hepatoma 22a: Focus on Ceruloplasmin

E. A. Zelenskiy, K. V. Rutto, A. S. Trulioff, N. P. Gorbunov, A. V. Sokolov, E. P. Kiseleva 1225

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФИБРОБЛАСТАХ ЭНДОНЕВРИЯ

© 2025 г. Е. С. Петрова¹ *, Е. А. Колос¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iempes@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2025 г.

После доработки 02.05.2025 г.

Принята к публикации 03.05.2025 г.

Целью настоящего обзора явилось обобщение современных представлений о фибробластах эндонеурия периферических нервных проводников и их роли в репаративной регенерации нерва. Наряду со шванновскими клетками и макрофагами фибробласты являются основными по функциональной значимости клетками эндонеурия. В литературе имеется мало сведений об особенностях фибробластов и их роли в регенерации поврежденных нервных проводников. В обзоре представлены данные последних лет о морфофункциональных особенностях фибробластов эндонеурия, их происхождении в онтогенезе и их функциях. Дана характеристика иммуногистохимических маркеров, используемых для их идентификации. Подчеркивается необходимость исследования взаимодействий фибробластов с другими клетками нерва для выяснения их роли в регенерации нервных проводников после повреждения.

Ключевые слова: нерв, эндоневрий, фибробласты, регенерация, иммуногистохимия

DOI: 10.7868/S2658655X25070017, **EDN:** MVGLDI

ВВЕДЕНИЕ

Механическое повреждение периферических нервных проводников вследствие травм, ушибов и переломов встречается достаточно часто [1–3], хроническая компрессия нервных стволов может наступать также при развитии новообразований. Известно, что по сравнению с нервными проводниками ЦНС периферические нервы обладают более высокими восстановительными потенциями благодаря наличию в них особых глиоцитов периферической нервной системы – шванновских клеток (нейролеммоцитов) (Schwann cells, SCs) [4–8]. На эффективность восстановления поврежденных нервных волокон оказывают влияние взаимодействия SCs с различными структурными элементами нерва: клетками периневральной и эпиневральной оболочек, структурами эндонеурия, белками внеклеточного матрикса. Для выяснения роли различных клеток в восстановлении периферических нервных проводников необходимо проведение углубленных исследований как внутриклеточных механизмов, так и межклеточных коммуникаций, лежащих в основе дегенеративных и репаративных процессов, развивающихся после повреждения [9].

К клеточным элементам эндонеурия интактного нерва наряду с SCs относятся резидентные макрофаги, клетки стенок кровеносных микрососудов (эндотелиоциты, перидциты, гладкомышечные клетки), тучные клетки, фибробласты и др. Шванновские

клетки, впервые описанные немецким исследователем Шванном (1810–1882) в конце XIX века, активно изучаются в течение последних двух десятилетий, о чем свидетельствуют данные многочисленных обзоров [10–16]. Особое внимание исследователи-нейробиологи уделяют изучению периневрия [17–19] и такой важной популяции клеток эндоневрия, как резидентные макрофаги [20–22]. Наименее изученными клетками нерва являются эндоневральные фибробласты. Несмотря на то что они были описаны почти сто лет назад, их происхождение, биологическая роль, участие в развитии патологических процессов по-прежнему неясны [23]. Целью настоящего обзора явилось обобщение имеющихся в современной литературе представлений о фибробластах эндоневрия периферических нервных проводников, их взаимодействиях со шванновскими клетками и их роли в репаративной регенерации нерва.

Фибробласты в нерве

При описании нервного ствола выделяют три отдела: эпиневрий, периневрий и эндоневрий [1, 24, 25] (рис. 1). В отечественной литературе их часто называют оболочками. Фибробласты в периферических нервных проводниках составляют значительную долю всех клеточных элементов, располагаясь во всех оболочках [26, 27]. Показано, что доля фибробластов в разных типах нервов различна и зависит от размеров и плотности распределения нервных пучков [26].

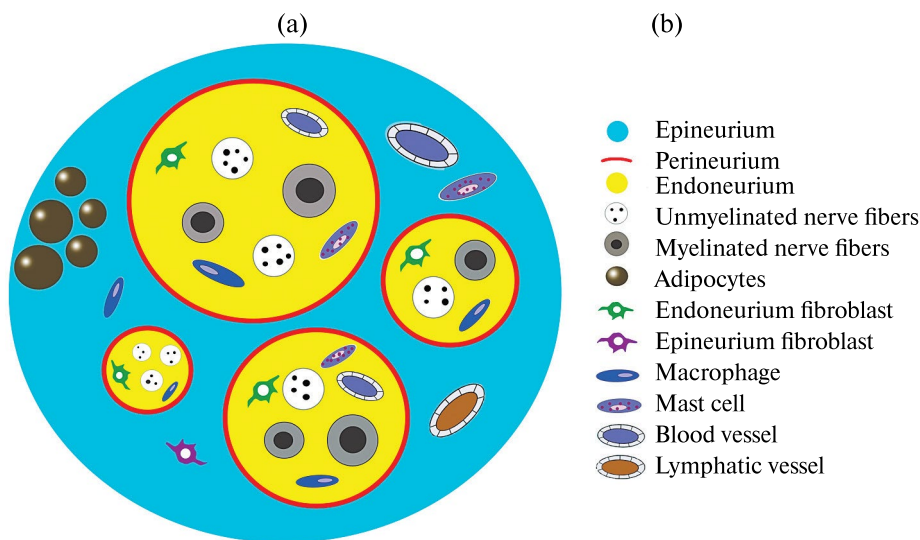


Рис. 1. Схема поперечного среза седалищного нерва крысы.

Для каждого нервного ствола (НС) характерны периневральная и эпиневральная оболочки. НС могут содержать в своем составе несколько нервных пучков. Каждый нервный пучок покрыт периневрием. Эпиневрий представляет собой соединительную ткань, которая окружает нерв снаружи. Если нерв состоит из нескольких НС, различают внутренний и внешний (покрывающий комплекс всех НС) эпиневрий. В состав эпиневральной оболочки входят кровеносные и лимфатические сосуды, коллагеновые и эластические волокна, макрофаги, фибробласты, тучные клетки, адипоциты [1, 19, 24]. Известно, что фибробласты являются его основным клеточным компонентом. Они продуцируют коллагеновые волокна, образующие основу эпиневрия.

Следует отметить, что фибробласты эпинеуральной оболочки являются соединительнотканными клетками, сходными с фибробластами других тканей и органов.

Периневрйй окружает пучки нервных волокон и состоит из специализированных клеток. Именно эти клетки участвуют в формировании гемато-неврального барьера [19, 20]. Перинеуральные клетки соединяются между собой плотными и щелевыми контактами. Слои перинеуральных клеток разделены коллагеновыми фибриллами (коллаген IV типа) [1, 17]. В составе перинеурйя также имеются фибробласты, структурно отличающиеся от перинеуральных клеток отсутствием базальной мембраны. Обеспечивая синтез коллагеновых волокон, фибробласты пери- и эпинеурйя определяют защитную и механическую функции этих оболочек.

В современных исследованиях в интактных нервах описывают несколько популяций фибробластов. Некоторые авторы выделяют две разновидности фибробластов, располагающихся в эпинеурйи (экспрессируют транскрипционные факторы: *Dpt*, *Pcolce2*, *Lybc1*), и две разновидности – в эндонеурйи (*Osr2*, *Sox9*, *Ccl9*) [28]. Другие ученые с помощью секвенирования мРНК обнаружили четыре популяции фибробластов, которые были разделены на эпинеуральные (*PDGFRA* и *PCOLCE2*), перинеуральные (*Itgb4*, *Slc2a1*) и эндонеуральные (*Ccbe1*, *Adams3*) [27]. Считается, что после травмы могут появляться новые подтипы фибробластов [29].

Chen с соавт., используя метод секвенирования РНК отдельных клеток, показал, что как в неповрежденных, так и в поврежденных нервах все клеточные элементы можно функционально классифицировать на четыре категории: SCs, EFs, иммунные клетки (выявлены скопления макрофагов, тучных клеток, естественных клеток-киллеров, Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов) и клетки, связанные с кровеносными сосудами (эндотелиоциты, гладкомышечные клетки сосудов и перициты) [29]. Также в работе подчеркивается, что фибробласты нерва можно подразделить на эпинеуральные, перинеуральные и эндонеуральные. Генетический анализ показал, что EFs наряду с SCs являются двумя наиболее важными типами клеток, способствующими регенерации нервов. Определив ряд маркерных генов для EFs (*Sox9*, *Osr2*, *Pdgfra*, *Cd34*, *Abca9*, *Cdkn2a*, *Cdkn2b* и *Plxdc1*), авторы указали на возможность их использования в будущем для определения типов клеток в неповрежденных и поврежденных периферических нервах.

Настоящий обзор касается главным образом фибробластов эндонеурйя, функция которого состоит в обеспечении благоприятного микроокружения для нервных волокон и их регенерации.

В современных работах эндонеуральные фибробласты (endoneurial fibroblasts (EFs)) [30] нередко называют эндонеуральными фибробластоподобными клетками (endoneurial fibroblast-like cells (EFLCs)) из-за их недостаточной изученности [23, 31]. О том, что в состав периферических нервных проводников входят фибробласты, известно из классических работ исследователей прошлого века [32, 33]. Однако до сих пор вопросы о биологической роли этих клеток и о выполняемых ими функциях носят дискуссионный характер. Это касается и вопроса о происхождении EFs в онтогенезе.

Происхождение фибробластов эндонеурйя в онтогенезе

Известно, что фибробласты – наиболее распространенные клетки соединительной ткани разных органов млекопитающих и человека, основная функция которых заключается в синтезе белков внеклеточного матрикса и коллагена [34]. Что касается эндонеурйя периферических нервных проводников, то в пионерских работах, выполненных в начале прошлого века, его структурные компоненты рассматривались как соединительнотканые производные [33, 35]. По данным Joseph с соавт. [36], фибробласты эндонеурйя представляют собой особую популяцию клеток, источник их происхождения – клетки нервного гребня (neural crest stem cells, NCSCs). Нервный гребень

является эмбриональным зачатком, мультипотентные клетки которого дают начало многим типам клеточных элементов [37–39].

Ранее выполненные электронно-микроскопические исследования срезов седалищного нерва с применением Bluо-Gal (галагенированный индолил-β-галактозид) [36] показали, что эндоневральные фибробласты имеют следующие отличительные особенности: у них нет связи с аксонами и с миелином, отсутствует базальная мембрана и имеются длинные угловатые отростки. Отсутствие базальной пластинки вокруг эндоневральных фибробластов отличает эти клетки от SCs, периневральных клеток и перицитов. При использовании современных методов отслеживания клеточных поколений показано, что, несмотря на описанные структурные отличия, и SCs, и EFs происходят из одного источника – NCSCs [36], а предшественники шванновских клеток (Dhh+CSP) в нерве в онтогенезе способны дифференцироваться и в SCs, и в фибробласты [26, 36]. В последующих исследованиях было сделано предположение, что направление дифференцировки мигрирующих из нервного гребня в нерв предшественников определяется близостью их расположения к аксону. Близкорасположенные – дифференцируются в SCs, другие – в фибробласты [26, 40]. Доля EFs при патологических условиях (нейропатиях) может увеличиваться [31].

Таким образом, в настоящее время показано, что EFs являются производными клеток нервного гребня, у SCs и фибробластов эндоневрия имеется общий предшественник [15, 41]. Сигналы, которые определяют его дифференцировку в фибробласты или незрелые SCs, до конца не ясны. Предположительно они могут включать в себя локальные факторы окружающей среды (включая аксональные), а также коактивацию и/или репрессию транскрипционных программ [15, 41, 42]. Следует отметить, что в эндоневрии периферических нервных проводников может присутствовать несколько субпопуляций фибробластов и фибробластоподобных клеток [43, 44], и их онтогенетическое происхождение может быть различным.

Структурные особенности фибробластов эндоневрия

EFs составляют значительную часть эндоневральных клеток. Они локализируются под периневрием, располагаясь вдоль периневральных клеток, диффузно рассеяны между нервными волокнами и часто встречаются вблизи капилляров [23, 31]. Предположительно они образуют в эндоневрии своеобразную сеть.

Fs имеют звездчатую или веретеновидную форму с небольшим объемом цитоплазмы, с ядром овальной формы, содержащим главным образом эухроматин и небольшое количество гетерохроматина [1]. Веретеновидные клетки на поперечных срезах имеют треугольную или четырехугольную форму. Электронно-микроскопические исследования [23] показали, что EFs обладают длинными цитоплазматическими отростками, которые простираются вдоль нервного ствола. В цитоплазме фибробластов описаны митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, тонкие внутриклеточные филаменты, клеточная мембрана с инвагинациями, лизосом в EFs интактного нерва мало. Как отмечалось ранее, отсутствие сплошной базальной мембраны вокруг EFs отличает их от SCs, клеток периневрия и перицитов. У некоторых клеток есть реснички, в ряде клеток определяются окаймленные ямки [1].

В настоящее время в литературе высказываются предположения о том, что эндоневральные фибробласты могут являться телоцитами [44]. Действительно, телоциты в нерве порой называют эндоневральными стромальными клетками, эндоневральными фибробластоподобными клетками, эндоневральными дендритными клетками, CD34⁺ эндоневриальными клетками, эндоневриальными мезенхимными клетками и др. [45]. Название “телоциты” применяется с 2010 г. [46–49]. Исследования, выполненные с применением методов культивирования *in vitro*, световой и флуоресцентной микроскопии, просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, позволили

идентифицировать характерную структурную особенность телоцитов: наличие длинных тонких отростков-телопод, образующих своеобразную сеть в строме органа. Ранее эти клетки называли подобными интерстициальным клеткам Кахаля, поскольку они казались похожими на интерстициальные клетки Кахаля (ICC) желудочно-кишечного тракта. Есть мнение, что телоциты являются мультипотентными предшественниками.

Для настоящего обзора важно подчеркнуть разницу между телоцитами и фибробластами. Телоциты, в отличие от EFs, являются соединительнотканными клетками. Их функции недостаточно изучены. Предположительно они выполняют механическую функцию, участвуют в межклеточной передаче сигналов, в миграции предшественников во время органогенеза, в регенерации тканей и органов [44].

В отличие от EFs, ядро телоцитов, как правило, гетерохроматично. Они имеют небольшой объем цитоплазмы, разнообразную форму, которая зависит от количества телоподий. Количество телоподий может достигать пяти, их длина может доходить до сотен мкм, диаметр – от 0.1 до 0.24 мкм, им свойственны ветвление и образование трехмерных сетей с гетеро- и гомоклеточными соединениями [44, 45]. Учитывая тот факт, что EFs нерва являются предположительно гетерогенной популяцией, некоторые авторы предлагают называть фибробласты с наличием длинных отростков телоцитоподобными клетками [44].

Цитохимическая характеристика фибробластов эндоневрия

Для большинства клеток эндоневрия селективные ИГХ-маркеры хорошо известны. Так, для визуализации SCs применяют антитела к белку S100 β [8], для периневральных клеток – антитела к белку плотных контактов клаудину-1 и к белку-переносчику глюкозы GLUT1 [17], для макрофагов – белок CD68 или кальций-связывающий белок Iba-1 [50, 51]. Все эти маркеры не экспрессируются в фибробластах, что было подтверждено электронно-микроскопически с использованием иммуногистохимии [23].

Считается, что одним из маркеров фибробластов является белок CD105 (эндоглин) [52, 53]. Эндоглин – трансмембранный белок, составная часть рецептора к трансформирующему ростовому фактору бета (transforming growth factor beta, TGF-beta), являющемуся стимулятором ангиогенеза. Авторы отмечают, что CD105 не селективен для фибробластов: он характерен также и для гладкомышечных клеток, и для мезенхимных стволовых клеток (МСК) [52]. Аналогичные данные продемонстрированы в работе Lupatov с соавт. [53], в которой был проведен сравнительный анализ экспрессии поверхностных маркеров на фибробластах и фибробластоподобных клетках, выделенных из различных тканей человека.

Для идентификации фибробластов эндоневрия применялись иммуногистохимические реакции на такие белки, как CD34 и NG2 [31]. Следует отметить, что только при электронно-микроскопическом исследовании эти данные оказываются убедительными. Иммуноэлектронная микроскопия показала присутствие положительной реакции на CD34 на уровне плазматической мембраны EFs интактного нерва человека. Однако в дополнение к фибробластам CD34-положительными являются тучные клетки и эндотелиоциты. Белок NG2 также не является селективным маркером для EFs. Наряду с ними NG2 экспрессируют клетки периневрия. Показано, что половина EFs в интактных нервах экспрессирует рецепторы тромбоцитарного фактора роста (platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR- β)). Некоторые фибробласты эндоневрия могут экспрессировать белок промежуточных филаментов нестин (однако уровень экспрессии ниже, чем у SCs). При патологии нерва у крыс наблюдается увеличение нестин-положительных EFs [31]. При нарушениях гомеостаза нервного проводника EFs экспрессируют также белок тенасцин-С [31, 54, 55] и секретируют ряд цитокинов и нейротрофических факторов [56].

При иммуногистохимическом исследовании белка щелевых контактов коннексина 43 (Cx43) в структурах периферической нервной системы, в частности в седалищном нерве крысы, выяснилось, что в ранние сроки после травмы в эндоневрии выявляется множество клеток, экспрессирующих Cx43 [57]. По своим структурным особенностям (форме ядер, наличию цитоплазматических отростков) и локализации (располагаются в толще эндоневрия, образуя своеобразную сеть) они могут быть фибробластами или их предшественниками.

Имеющиеся в литературе сведения о маркерах, используемых исследователями для идентификации фибробластов, обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Маркеры, используемые для идентификации фибробластов

№ п/п	Название	Характеристика	Специфичность	Источник
1	CD105 (эндоглин)	Трансмембранный белок, составная часть рецептора к трансформирующему ростовому фактору бета, являющемуся стимулятором ангиогенеза	Фибробласты, гладкомышечные клетки, мезенхимные стволовые клетки	[52, 53]
2	CD34	Трансмембранный фосфогликопротеиновый белок, кодируемый геном <i>CD34</i> , гликопротеин клеточной поверхности, молекула межклеточной адгезии, играющая роль на ранних этапах кроветворения	Фибробласты эндоневрия интактного нерва, тучные клетки, телоциты, эндотелиальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки	[31, 58, 59]
3	CD90	Гликозилфосфатидилинозит-заякоренный белок суперсемейства иммуноглобулинов, продукт гена <i>THY1</i> , стромальный маркер	Фибробласты в культуре клеток нерва, стволовые клетки	[60]
4	Нейронный/глиальный антиген 2 (Neural/glial antigen 2, или NG2)	Протеогликан интегральной мембраны клеток, участвует в клеточной адгезии, в межклеточной коммуникации и межклеточно-ЕСМ-коммуникации, в миграции и метастазировании, пролиферации и росте аксонов	Фибробласты эндоневрия нерва человека, клетки периневрия, клетки-предшественники олигодендроцитов, хондробласты, миобласты, кардиомиоциты, предшественники перичитов, клетки глиобластомы, меланомы и др. новообразования	[31, 61, 62]

Таблица 1. Продолжение

№№ п/п	Название	Характеристика	Специфичность	Источник
5	Тенасцин-С	Гликопротеин, у человека кодируется геном <i>TNC</i>	Фибробласты эндоневирия при патологии, радиальная глия ЦНС, развивающиеся астроциты и олигодендоциты, клетки нервного гребня, развивающиеся сухожилия, кости и хрящи	[54, 55, 63]
6	Нестин (neuroepithelial stem cell protein)	Белок промежуточных нейрофиламентов VI типа. Кодируется геном <i>NES</i>	Отдельные фибробласты эндоневирия, шванновские клетки при патологии, нейральные стволовые/прогениторные клетки	[31]
7	P4Hb	Бета-субъединица пролил-4-гидроксилазы, фермент, который у человека кодируется геном <i>P4Hb</i>	Фибробласты эндоневирия в культуре, клетки глиом	[31, 64]
8	HSP47	Белок теплового шока (HSP) 47 – гликопротеин, связывающий коллаген массой 47 кДа, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме. Маркер коллаген-продуцирующих клеток	Фибробласты эндоневирия в области рубцовой ткани	[65]
9	FAP, белок активации фибробластов α	Интегральный мембранный белок типа II, принадлежащий к семейству мембраносвязанных сериновых протеаз, высокая представленность FAP характерна для процессов регенерации в тканях, фиброза и деградации внеклеточного матрикса фибробластами	Фибробласты опухолей, мезенхимные стволовые клетки	[66, 67]

Таблица 1. Окончание

№№ п/п	Название	Характеристика	Специфичность	Источник
10	Виментин	Виментин – белок промежуточных филаментов соединительных тканей и других тканей мезодермального происхождения	Микроглия, эндотелий, астроциты, фибробласты	[68, 69]
11	Пропил-1,4 гидроксилаза	Основной фермент фибробластов, участвующий в синтезе коллагена	Фибробласты, эндотелий, остеобласты и др.	[48, 70]
12	PDGFR	Рецептор для фактора роста тромбоцитов (PDGF), относится к рецепторам с тирозинкиназной активностью, известны два типа PDGFR: α -тип и β -тип, которые кодируются разными генами, являются белками, регулирующими пролиферацию, дифференцировку, рост клеток и развитие онкологических заболеваний	Фибробласты эндоневрия, нейральные стволовые/прогениторные клетки, нейроны, перicytes	[31, 45, 71]
13	Фибронектин	Гликопротеин внеклеточного матрикса	Фибробласты нерва, эндотелиоциты, миофибробласты, клетки карциномы	[72–75]

Анализ литературы показал, что проблема идентификации фибробластов на основе иммуногистохимического исследования возникла еще в 90-х годах прошлого века. Первые попытки выявлять фибробласты с помощью антител были в значительной степени безуспешными [76]. Это связывали со слабой антигенностью фибробластов и неспецифической природой используемых антигенов [76]. Из данных, представленных в табл. 1, очевидно, что иммуногистохимические маркеры, используемые для идентификации фибробластов в последние годы, также не являются четко селективными и подбираются авторами экспериментальным путем, в основе которого лежат структурные особенности SCs. Как правило, используются такие маркеры, которые нехарактерны другим клеткам эндоневрия (SCs, макрофагам, эндотелиоцитам и др.). Некоторые маркеры первоначально удалось обнаружить благодаря исследованиям, выполненным на культурах фибробластов эндоневрия.

Исследования эндоневральных фибробластов in vitro

Культивирование *in vitro* является удобной моделью для изучения клеток и тканей [77]. Наряду с исследованием репаративной регенерации тканей в эксперименте и/или выяснением их морфофункциональных изменений при патологии, культивирование позволяет изучать гистобластические потенции различных клеток [78]. Используя культуру клеток, полученных после диссоциации трипсином фрагментов седалищного

нерва новорожденных крыс, было показано, что значительную часть клеток нерва составляют фибробластоподобные клетки [79]. Позднее Joseph с соавт. [36] культивировали клетки, полученные из седалищных нервов эмбрионов крысы. Используя антитела к белку S100 β (ИГХ-маркеру SCs) и к β -gal (β -D-galactoside galactohydrolase – фермент, характерный для клеток нервного гребня), авторы предположили, что клетки в культуре, которые оказались S100 β / β -gal⁺, являются фибробластами. Доказательством послужило выяснение ультраструктурных особенностей этих клеток, которые соответствовали характеристикам фибробластов, описанным в настоящем обзоре ранее.

Используя модель культивирования клеток *in vitro*, было установлено, что маркером эндоневральных фибробластов может служить транскрипционный фактор Gli1 [80]. Факторы Gli являются эффекторами передачи сигналов Hh и участвуют в определении судьбы клеток в эмбриогенезе. Данные, полученные *in vitro*, были подтверждены на модели поврежденного лицевого нерва [80]. Установлено, что после повреждения лицевого нерва количество Gli1⁺ клеток увеличивается. Показано, что при транссекции транскрипты Gli1 локализуются совместно с фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor (VEGF-A)) [80]. VEGF-A – сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования васкулогенеза и ангиогенеза.

Следует отметить, что особенностью культур, полученных из тканей нерва, является присутствие в них и SCs, и EFs [31]. Фибробласты в условиях *in vitro* представляют собой уплощенные клетки многоугольной формы с цитоплазматическими отростками и большими круглыми ядрами. SCs в культуре – овальные и веретеновидные клетки с тенденцией к линейности и взаимосвязи друг с другом. Применяв иммуногистохимическую реакцию на белок S100 для идентификации SCs и анти-пролил-4-гидролазы-бета (P4Hb) для фибробластов, авторы установили, что 98% культивируемых клеток представляли собой EFs, а 2% – SCs. Затем клетки этих культур были помечены антителами против NG2, CD34, P4Hb, нестина, Thy1 и PDGFR- β . Было установлено, что все EFs оказались иммуноположительными для CD34 и NG2.

Учитывая, что культура SCs нередко содержит и EFs, она является удобной моделью для фундаментальных и трансляционных исследований взаимодействия этих клеток [64]. Было проведено специальное исследование по иммунологической и функциональной характеристике взрослых SCs и фибробластов человека, чтобы выявить их свойства и оптимизировать протокол сортировки магнитно-активируемых клеток. Анализ с использованием методов визуализации с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и секвенирования РНК следующего поколения (RNA-seq) подтвердил, что молекулярный фенотип SCs и фибробластов подобен прогениторным и стволовым клеткам, а также позволил установить гетерогенность популяций фибробластов. Кроме того, были выявлены двунаправленные сети сигнализации от фибробластов к SCs, это подчеркивает независимый от SCs вклад фибробластов в регенерацию нервов.

Участие фибробластов в регенерации нервных проводников

Для осуществления регенерации периферического нервного проводника после механического повреждения необходимо, чтобы в его дистальном сегменте прошли процессы валлеровской дегенерации (WD). WD включает в себя деструкцию аксонов, отторжение SCs миелина, рекрутирование гематогенных макрофагов, которые участвуют в клиренсе миелина наряду со SCs и резидентными макрофагами, и другие молекулярные и клеточные процессы [24, 81–83]. После фрагментации аксона и распада миелиновой оболочки наступает активация SCs. Они проходят этап дедифференцировки, превращаясь в SCs репаративного типа, начинают пролиферировать и формировать пути для направленной регенерации регенерирующих аксонов, растущих на периферию из проксимального сегмента [81].

Главными участниками WD считаются SCs, роль фибробластов в этих процессах мало изучена. На модели перерезки нерва показано, что они (как и SCs, и макрофаги) участвуют в процессе клиренса миелина [9]. Удаление продуктов распада миелина имеет решающее значение для дальнейшего восстановления нервного волокна, поскольку миелин содержит молекулы, ингибирующие регенерацию аксонов (в частности миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG)). Показано, что у мышей с медленно протекающей WD (линия WLDS-мыши) функциональное восстановление нерва после повреждения значительно задерживается по сравнению с мышами дикого типа [56].

Установлено, что EFs вырабатывают ряд молекул внеклеточного матрикса, необходимых для осуществления регенерации поврежденных аксонов, в частности белок тенасцин-С (TNC) [84], который способствует дедифференцировке SCs, а также модулирует рост и направленность нервных волокон. Показано, что в ответ на повреждение нерва экспрессия фибробластами TNC увеличивается в проксимальном сегменте нерва, что способствует миграции SCs. Влияние TNC на SCs достигается посредством прямого связывания TNC с экспрессируемым SCs $\beta 1$ интегрином [84].

Также было показано, что фибробласты экспрессируют и секретируют ряд цитокинов и трофических факторов, регулируя васкуляризацию регенерирующей ткани и способствуя миграции клеток в область моста, формирующегося между проксимальным и дистальным сегментами нерва после перерезки [34, 80, 85].

Общая схема событий, развивающихся в регенерирующем нерве с участием фибробластов, приведена в работе Qu с соавт. [9] и представлена на рис. 2 настоящего обзора.

Взаимодействия различных структурных элементов эндоневрия исследуют на экспериментальных моделях повреждения нервов, в том числе с использованием кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты нервного ствола. Такие работы позволили выяснить последовательность взаимодействий SCs и нервных волокон в ранние сроки WD. Было установлено, что в этих взаимодействиях SCs выполняют ведущую роль для аксонов, а не наоборот [86]. Фактор роста нейрегулин-1 (NRG1), экспрессируемый на поверхности аксонов, передает сигналы через рецепторы ErbB2 и ErbB3, локализующиеся на поверхности миелинообразующей глии [87]. Однако выработка нейрегулинов предшествует секреции SCs нейротрофических факторов роста [86]. В более поздних исследованиях отмечается, что для формирования мостов между проксимальным и дистальным сегментами поврежденного нерва важное значение имеют фибробласты эндоневрия [88]. Оказалось, что они первыми заселяют кондуит, регулируют миграцию SCs, стимулируют васкуляризацию формирующейся ткани и экспрессируют изоформу sNRG1 [88]. Считается, что, высвобождая sNRG1, фибробласты могут способствовать дедифференцировке SCs и образованию репаративного фенотипа SCs, способствуя тем самым регенерации периферических нервов.

Молекулярные механизмы взаимодействия EFs и SCs осуществляются через секрецию различных соединений в межклеточное пространство и их связывание с рецепторами близлежащих клеток или с рецепторами той же клетки. Это взаимодействие может проходить по аутокринному механизму, когда регулирующее действие сигнального белка осуществляется на клетки, в которых он непосредственно синтезируется, или по паракринному механизму, при котором сигнальные молекулы, синтезирующиеся в других клетках, путем диффузии оказывают воздействие на соседние клетки [64].

Исследуя сигнальные пути, задействованные во взаимоотношениях четырех главных структурных компонентов эндоневрия (аксонов, SCs, макрофагов и фибробластов), Dun, Parkinson [85] отводят основные роли в организации нейрального мостика следующим сигнализациям: Netrin1/DCC, EphrinB2/EphB2 и Slit3/Robo1 (рис. 3).

Скорость восстановления поврежденного нервного проводника связана со временем окончания процессов WD [24, 56]. Время завершения WD зависит не только от макрофагов, но и от взаимодействия всех клеток нерва. Повреждение нервного проводника стимулирует выработку и секрецию различных регуляторных факторов, цитокинов

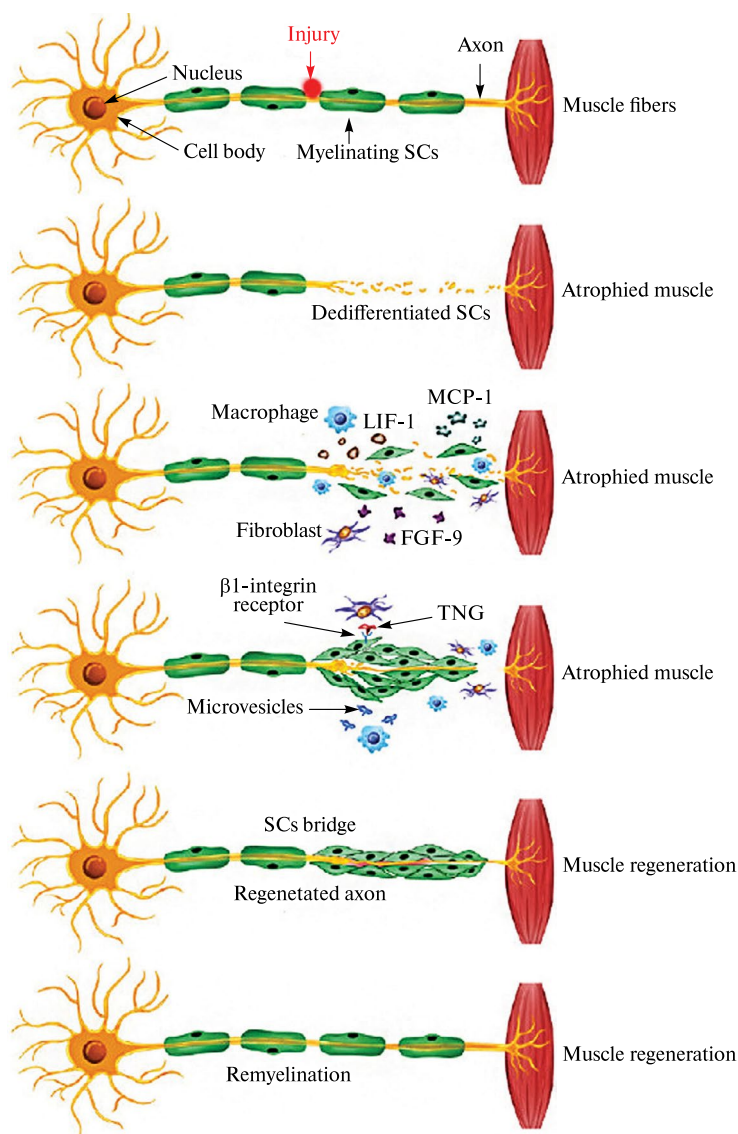


Рис. 2. Схема, показывающая общую последовательность событий восстановления нерва после повреждения с участием фибробластов, макрофагов и SCs.

(а) – Пример повреждения двигательного нерва, тело нервной клетки располагается в спинном мозге, аксон, окруженный миелинизирующими SCs, достигает мышцы, где он образует синапсы и инициирует свое действие. (б) – Повреждение нерва нарушает целостность аксона и вызывает валлеровскую дегенерацию. (с) – В ответ на травму очистка от детрита и восстановление инициируются активированными SCs, макрофагами и фибробластами. Паракринная сигнализация с участием MCP-1, LIF-1 и FGF-9, которые секретируются этими клетками, обеспечивает ответ на повреждение нерва. (d) – Влияние фибробластов на SCs частично опосредовано прямым связыванием TNC с экспрессируемым SCs $\beta 1$ -интегрином. Аналогичным образом микровезикулы, высвобождаемые активированными макрофагами, влияют на функцию SCs в процессе восстановления и зависят от воспалительного статуса макрофагов, привлеченных в место повреждения. (е) – Эти клеточные взаимодействия способствуют созданию SCs моста через место повреждения для поддержки регенерации аксонов и последующей миелинизации. (f) – Восстановленный периферический нерв. FGF-9 – фактор роста фибробластов 9; LIF-1 – фактор ингибирования лейкемии-1; MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; PNI – повреждение периферического нерва; SCs – шванновская клетка; TNC – тенасцин-С. Из статьи Qu с соавт. [9].

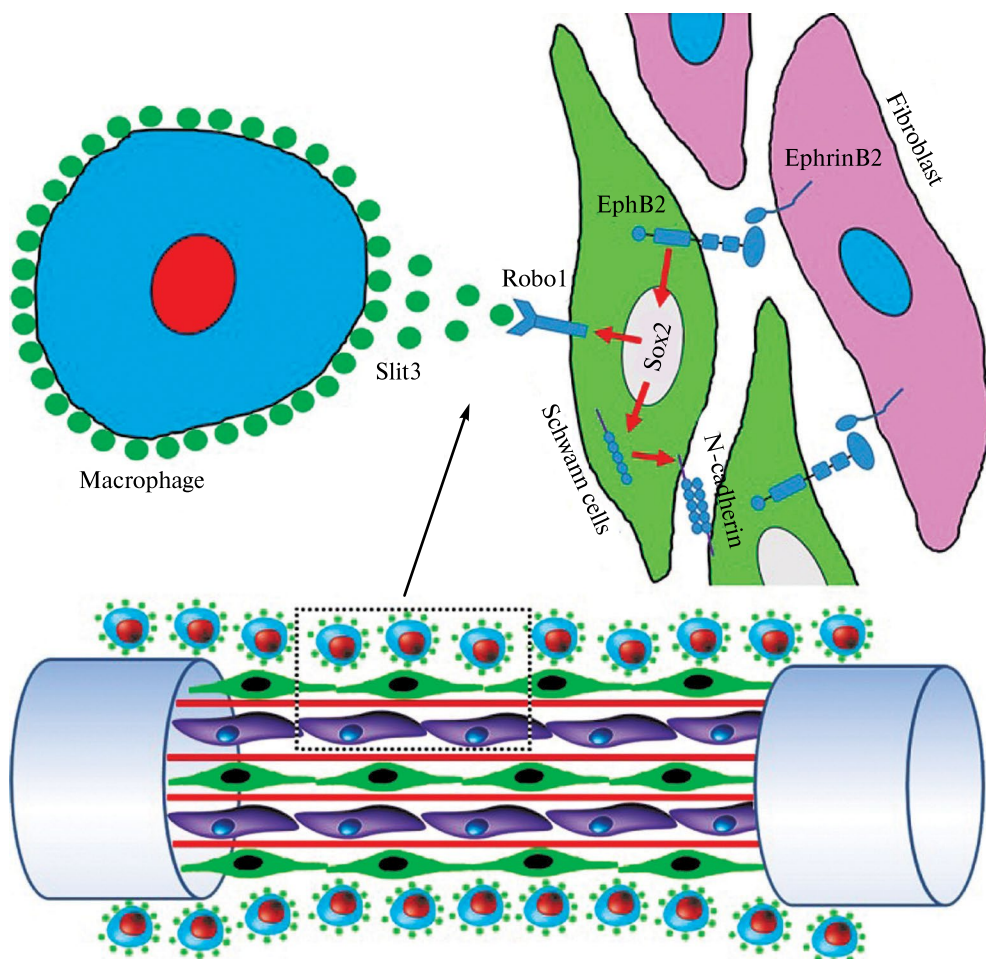


Рис. 3. Сигналы EphrinB2/EphB2, Slit3/Robo1 и Netrin1/DCC контролируют правильное формирование ткани нервного мостика и регенерацию аксона. После перерезки седалищного нерва нервный мостик формируется между проксимальным концом нерва (слева) и дистальным концом нерва (справа). Сигналы EphrinB2/EphB2 между мигрирующими шванновскими клетками (зеленые) и фибробластами (фиолетовые) контролируют SCs и формирование ими тяжей. Сигналы EphrinB2/EphB2 увеличивают экспрессию Sox2 в SCs, а Sox2 способствует транслокации N-кадгерина в мембрану SCs. Sox2 также регулирует экспрессию Robo1 в SCs. Макрофаги (синие) во внешнем слое нервного мостика секретируют Slit3, необходимый для взаимодействия с Robo1 на SCs и поддержания миграции шванновских клеток внутри нервного мостика. Шванновские клетки секретируют Netrin1, взаимодействующий с DCC на регенерирующих аксонах (красного цвета) с целью регуляции направления регенерирующих аксонов через нервный мостик. Dun, Parkinson [85].

и хемокинов всеми клетками эндоневрия. Так, SCs начинают экспрессировать мРНК воспалительных цитокинов TNF α и IL-1 α , а также сами белки TNF α и IL-1 α . Эти цитокины в течение нескольких часов после травмы индуцируют соседние фибробласты к выработке IL-6, GM-CSF и LIF. После этого TNF α , IL-1 α , IL-1 β и IL-6 индуцируют выработку шванновскими клетками, фибробластами и эндотелиоцитами хемокинов MCP-1/CCL2 и MIP1- α /CCL3, которые способствуют миграции в эндоневрий моноцитов из кровеносных сосудов. Последние побуждают близлежащие фибробласты экспрессировать IL-6 и GM-CSF, секреция которых обнаруживается уже через 2–5 ч после травмы.

Кроме того, показано, что в первые двое суток после повреждения фибробласты секретируют противовоспалительные цитокины, в частности аполипопротеин-Е [89], участвующий в поляризации макрофагов в сторону фенотипа M2. Известно, что макрофаги обладают большой пластичностью и при участии в воспалительных и репаративных процессах способны как подавлять, так и стимулировать воспалительные реакции [90]. Несмотря на то что в настоящее время разделение макрофагов на два функциональных типа – M1 (провоспалительный) и M2 (противовоспалительный) – считается несколько условным (так как обнаружены и описаны их промежуточные формы) [90], для объяснения механизмов регуляции сложных дегенеративных и репаративных процессов в поврежденных нервах эта классификация широко используется [82, 91].

Важно отметить, что фибробласты эндоневирия, наряду со SCs, способны синтезировать нейротрофические факторы, способствующие выживанию нейронов после повреждения, росту аксонов, образованию синапсов [56, 92].

Функции фибробластов эндоневирия

Фибробласты в биологии тканей занимают важное место и выполняют множество функций [34, 93]. Они производят структурные (например, коллагены и фибронектин) и неструктурные (например, тромбоспондины и остеоопонтин) молекулы экстрацеллюлярного матрикса, поддерживают и модифицируют соединительнотканную строму посредством производства протеиназ; взаимодействуют с клетками кровеносных сосудов; экспрессируют множество рецепторов клеточной поверхности, которые позволяют им реагировать на биологически активные факторы, высвобождаемые другими клетками; секретируют смесь факторов роста, цитокинов и хемокинов, обеспечивая клеточные коммуникации в органах и тканях [34, 93]. Известна роль фибробластов в развитии фиброза [34, 76], однако для EFs эта роль незначительна [1].

Функции EFs более разнообразны, чем фибробластов в других органах, но остаются менее изученными. Долгое время считалось, что EFs являются лишь поддерживающими клетками периферического нерва [23], в последние годы их значимость и предположительная роль в регенерации нервных проводников активно изучается. Большой функциональный потенциал фибробластов эндоневирия можно объяснить их особым происхождением. Кроме того, предполагается, что эндоневральные фибробласты являются гетерогенной популяцией, и функции субпопуляций не изучены. В табл. 2 представлен ряд функций EFs.

Малоизученной функцией EFs является их участие в возникновении фиброза. Фиброз нервных проводников в разной степени развивается после их повреждения. Известно, что до 33% всех повреждений периферических нервных проводников демонстрируют неполное восстановление нерва, частичную потерю двигательной и/или сенсорной функции, хроническую боль, атрофию мышц и могут приводить к инвалидности [3]. Имеется множество причин, препятствующих полному восстановлению нервного проводника. К ним относят как частичную гибель нервных клеток спинного мозга и чувствительного ганглия [96–98], так и формирование в месте повреждения нервного ствола невромы [24] или образование рубцовой ткани [3, 97]. Развитие фиброза описано при различных патологиях нервов: проказе [99], радиационно-индуцированной нейропатии [100], опухолях [101]. Распространенной проблемой является также обширное образование рубцовой ткани после механического повреждения или хирургического вмешательства [3]. При травматических воздействиях развитие фиброза и формирование рубца зависят от степени повреждения нерва, которая определяется по классификации, предложенной Seddon в середине прошлого века [102]. Она основана на степени повреждения структуры нерва: (1) нейропраксия, или повреждение нерва вследствие сжатия, без структурного повреждения нерва, (2) аксонотмезис, или

Таблица 2. Функции эндоневральных фибробластов

№№ п/п	Функция	Механизм осуществления функции	Авторы
1	Поддержка гомеостаза	Синтез белков внеклеточного матрикса, в частности коллагена I типа и ламинина (изоформы B1, B2, M и S)	[26]
2	Клиренс миелина после повреждения нервного проводника	Фагоцитоз продуктов распада миелина в месте повреждения и дистальном сегменте нерва	[9]
3	Участие в регенерации. Воздействие на другие клетки	Направляют миграцию SCs и макрофагов после повреждения	[15]
4	Содействие миелинизации аксонов	Секретируют коллаген I типа для содействия миелинизации SCs	[94]
5	Участие в морфогенезе	Предположительно из фибробластов могут формироваться периневральные клетки	[31, 96]
6	Участие в регенерации, влияние на васкулогенез	Экспрессия VEGF-A увеличивается в эндоневральных фибробластах после стимуляции пути Hh	[80]
7	Участие в регенерации аксонов, влияние на дедифференцировку и миграцию SCs	Выработка регуляторных факторов (sNRG1 и др.)	[88]
8	Участие в валлеровской дегенерации, рекрутирование гематогенных макрофагов	Секреция цитокинов (IL-6 и GM-CSF) и хемокинов	[56]
9	Участие в процессе миелинизации	Синтез аполипопротеина-E (ApoE) – белка, участвующего в метаболизме липидов в организме. ApoE осуществляет доставку холестерина к месту миелинизации, необходим для поддержания миелиновой и нейрональной мембран в периферической нервной системе. Способствует поляризации макрофагов	[89]
10	Стимуляция регенерации аксонов	Выработка теназинов	[9]
11	Осуществление нейропротективного влияния на нейроны	Путем выработки NGF оказывает воздействие на нейроны по ретроградному механизму	[56]

потеря непрерывности нервных аксонов, и (3) нейротомезис, или полная перерезка или разрыв всего нерва. Эта классификация позднее была уточнена Sunderland в 1951 г., который ввел пять типов повреждения, основанных на возрастающей тяжести повреждения структуры нерва [103]. Уровень внутреннего и внешнего рубцевания нервов (интра- и экстраневральный фиброз) зависит от степени повреждения. Молекулярные механизмы их формирования изучены недостаточно [3].

В настоящее время в экспериментальных работах активно разрабатываются способы ингибирования формирования рубцов [96, 97]. В таких исследованиях степень формирования рубца оценивают по следующим показателям: по толщине эпинеурia, по площади, занимаемой коллагеном, по количеству фибробластов, по экспрессии коллагена и по соотношению коллагена типа I / типа III. В большинстве исследований речь идет о фибробластах эпинеурia [97] или перинеурia [104]. Есть мнение, что важную роль в процессах рубцевания, связанных с образованием богатых коллагеном отложений, играют фибробласты проксимального сегмента поврежденного нерва [65]. При этом EFs не выделяют из общей популяции фибробластов, их роль остается неясной. Это может быть связано с тем, что причиной образования рубцовой ткани после травмы нерва считается пролиферация фибробластов главным образом эпиневральной оболочки. Второй причиной может быть тот факт, что после миграции фибробластов эпинеурia в эндоневрий вследствие травмы отличить различные популяции фибробластов в силу отсутствия специфических маркеров затруднительно. Есть мнение, что роль EFs в развитии фиброза незначительна [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре представлены современные сведения о морфофункциональных особенностях, цитохарактеристике и функциях малоизученных клеток – фибробластов эндоневрия. Актуальность исследования этих клеток не вызывает сомнений и обусловлена недостатком знаний о молекулярных и клеточных механизмах дегенерации и регенерации периферических нервных проводников после повреждений (механической травмы и при нейропатиях). Обобщение данных современной литературы позволяет подчеркнуть, что важную роль в восстановлении нервов играют межклеточные взаимодействия между фибробластами и другими клетками эндоневрия: шванновскими клетками, макрофагами, тучными клетками, клетками микрососудов и другими структурами. Важно отметить, что именно фибробласты первыми заселяют кондуит, соединяющий проксимальный и дистальный сегменты поврежденного нерва, участвуют в формировании новой ткани (нейрального мостика) и способствуют ее васкуляризации и миграции в нее других клеток. На моделях *in vitro* и *in vivo* доказано, что между EFs и SCs после повреждения нерва устанавливаются тесные взаимодействия. Для выяснения молекулярных механизмов этих взаимодействий, конкретизации задействованных сигнальных путей и молекул необходимы дальнейшие исследования. Для осуществления таких исследований, а также для определения роли EFs в регенерации нервных проводников необходимо совершенствовать методы визуализации этих клеток. Помимо этого, необходима разработка новых экспериментальных моделей с использованием различных видов позвоночных животных, которые могут помочь в установлении последовательности событий в нерве после повреждения. Дальнейшие исследования EFs при патологии периферической нервной системы (при воспалительных, аутоиммунных и генетических заболеваниях нервов) также могут способствовать выяснению их потенций и определению их роли в регенерации нервных проводников. Выяснение молекулярных механизмов взаимодействия всех клеточных типов эндоневрия имеет решающее значение не только для понимания основных принципов регенерации тканей, но и для разработки новых способов эффективного восстановления

нервов. Представленные в настоящем обзоре данные демонстрируют, что не только SCs и/или макрофаги, но и фибробласты и вырабатываемые ими факторы могут стать основной мишенью для таргетной терапии поврежденного нерва.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Е. С. П. и Е. А. К. – идея работы, анализ литературы, написание текста.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”. Шифр темы: GFWG-2025-0003. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья носит обзорный характер и не содержит исследований с использованием животных и людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zochodne DW* (2008) *Neurobiology of peripheral nerve regeneration*. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo: Cambridge Univer Press.
2. *Одинак ММ, Живолупов СА* (2009) Заболевания и травмы периферической нервной системы (обобщение клинического и экспериментального опыта): руководство для врачей. СПб. СпецЛит. [*Odinak MM, Zhivolupov SA* (2009) *Diseases and injuries of the peripheral nervous system (summary of clinical and experimental experience): a guide for doctors*. St. Petersburg: SpetsLit. (In Russ)].
3. *Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK* (2019) Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connective Tissue Res* 60(1): 3–9.
<https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>
4. *Madduri S, Gander B* (2010) Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 15(2): 93–103.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00257.x>
5. *Raginov IS, Chelyshev YA* (2001) Sensory neurons and Schwann cells during pharmacological stimulation of a regenerating nerve. *Neurosci Behav Physiol* 31(6): 629–633.
<https://doi.org/10.1023/a:1012329429655>
6. *Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarizaga-Lejarreta M, Palomo-Irigoyen M, Varela-Rey M, Griffith M, Hantke J, Macias-Camara N, Azkargorta M, Aurrekoetxea I, De Juan VG, Jeffries HB, Aspichueta P, Elortza F, Aransay AM, Martínez-Chantar ML, Baas F, Mato JM, Mirsky R, Woodhoo A, Jessen KR* (2015) Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol* 210(1): 153–168.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201503019>
7. *Carr MJ, Johnston AP* (2017) Schwann cells as drivers of tissue repair and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 47: 52–57.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.003.gomes>
8. *Petrova ES* (2019) Current views on Schwann cells: development, plasticity, functions. *J Evol Biochem Phys* 55: 433–447.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019060012>

9. *Qu WR, Zhu Z, Liu J, Song DB, Tian H, Chen BP, Li R, Deng LX* (2021) Interaction between Schwann cells and other cells during repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* 16(1): 93–98.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.286956>
10. *Чельшиев ЮА, Сайткулов КИ* (2000) Развитие, фенотипическая характеристика и коммуникации шванновских клеток. *Успехи физиол наук* 31(3): 54–69. [*Chelyshev YuA, Saitkulov KI* (2000) Development, phenotypic characteristics and communication of Schwann cells. *Uspekhi fiziol nauk* 31(3): 54–69. (In Russ)].
11. *Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D* (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 96(1-2): 17–24.
[https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(01\)00076-6](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(01)00076-6)
12. *Bhatheja K, Field J* (2006) Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1995–1999.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.007>
13. *Griffin JW, Thompson WJ* (2008) Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56(14): 1518–1531.
<https://doi.org/10.1002/glia.20778>
14. *Kastriti ME, Adameyko I* (2017) Specification, plasticity and evolutionary origin of peripheral glial cells. *Curr Opin Neurobiol* 47: 196–202.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.004>
15. *Bosch-Queralt M, Fledrich R, Stassart RM* (2023) Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair. *Neurobiol Dis* 176: 105952.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105952>
16. *Stassart RM, Gomez-Sanchez JA, Lloyd AC* (2014) Schwann cells as orchestrators of nerve repair: implications for tissue regeneration and pathologies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 16(6): a041363.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041363>
17. *Pinã-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C* (2008) The normal and neoplastic perineurium. A review. *Adv Anat Pathol* 15: 147–164.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31816f8519>
18. *Piña AR, Martínez MM, de Almeida OP* (2015) Glut-1, best immunohistochemical marker for perineurial cells. *Head Neck Pathol* 9(1): 104–106.
<https://doi.org/10.1007/s12105-014-0544-6>
19. *Petrova ES, Kolos EA* (2022) Current views on perineurial cells: unique origin, structure, functions. *J Evol Biochem Physiol* 58(1): 1–23.
<https://doi.org/10.1134/S002209302201001X>
20. *Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R* (2001) Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol* 159(6): 2187–2197.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63070-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63070-2)
21. *Griffin JW, George R, Ho T* (1993) Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 52(6): 553–560.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199311000-00001>
22. *Петрова ЕС, Колос ЕА* (2024) Изучение резидентных макрофагов эндоневирия седалищного нерва крысы. Матер VI Нац конгр регенерат мед СПб. Эко-Вектор. 764–765. [*Petrova ES, Kolos EA* (2024) Study of resident macrophages in the endoneurium of the rat sciatic nerve. Матер VI Нац Конгр Регенерат Мед СПб. Эко-Вектор. 764–765. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>
23. *Richard L, Topilko P, Magy L, Decouvelaere AV, Charnay P, Funalot B, Vallat JM* (2012) Endoneurial fibroblast-like cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 938–947.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318270a941>
24. *Ноздрачев АД, Чумасов ЕИ* (1999) Периферическая нервная система. СПб. Наука. [*Nozdrachev AD, Chumasov EI* (1999) Peripheral nervous system. SPb. Nauka. (In Russ)].
25. *Kucenas S* (2015) Perineurial glia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(6): a020511.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020511>
26. *Ren Z, Tan Y, Zhao L* (2024) Cell heterogeneity and variability in peripheral nerve after injury. *Int J Mol Sci* 25: 3511.
<https://doi.org/10.3390/ijms25063511>

27. Yim AKY, Wang PL, Bermingham JR Jr, Hackett A, Strickland A, Miller TM, Ly C, Mitra RD, Milbrandt J (2022) Disentangling glial diversity in peripheral nerves at single-nuclei resolution. *Nat Neurosci* 25: 238–251.
<https://doi.org/10.1038/s41593-021-01005-1>
28. Carr MJ, Toma JS, Johnston APW, Steadman PE, Yuzwa SA, Mahmud N, Frankland PW, Kaplan DR, Miller FD (2019) Mesenchymal precursor cells in adult nerves contribute to mammalian tissue repair and regeneration. *Cell Stem Cell* 24: 240–256.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.024>
29. Chen B, Banton MC, Singh L, Parkinson DB, Dun XP (2021) Single cell transcriptome data analysis defines the heterogeneity of peripheral nerve cells in homeostasis and regeneration. *Front Cell Neurosci* 15: 624826.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.624826>
30. Zotter B, Dagan O, Brady J, Baloui H, Samanta J, Salzer JL (2022) Gli1 regulates the postnatal acquisition of peripheral nerve architecture. *J Neurosci* 42(2): 183–201.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3096-20.2021>
31. Richard L, Védrenne N, Vallat JM, Funalot B (2014) Characterization of endoneurial fibroblast-like cells from human and rat peripheral nerves. *J Histochem Cytochem* 62(6): 424–435.
<https://doi.org/10.1369/0022155414530994>
32. Ramon y Cahal S (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. V 1–2. L. Oxf. H. Milford.
33. Nageotte J, Guyon L (1930) Reticulin. *Am J Pathol* 6(6): 631–654.5.
34. Sorrell JM, Caplan AI (2009) Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* 276: 161–214.
[https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)76004-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)76004-6)
35. Laidlaw GF (1930) Silver Staining of the Endoneurial Fibers of the Cerebrospinal Nerves. *Am J Pathol* 6(4): 435–444.3.
36. Joseph NM, Mukoyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ (2004) Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131: 5599–5612.
<https://doi.org/10.1242/dev.01429>
37. Le Lièvre CS, Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34(1): 125–154.
38. Le Douarin NM, Dupin E (2018) The "beginnings" of the neural crest. *Dev Biol* 444(1): 3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.019>
39. Пахомова НЮ, Строчкова ЕЛ, Корыткин АА, Кожевников ВВ, Гусев АФ, Зайдман АМ (2023) История изучения нервного гребня (обзор). *Сибирск научн мед журн* 43(1): 13–29. [Pakhomova NY, Strokova EL, Korytkin AA, Kozhevnikov VV, Gusev AF, Zaidman AM (2023) The History of the Study of the Neural Crest (Overview). *Sibirsk nauchn med zhurn* 43(1): 13–29. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18699/SSMJ20230102>
40. Woodhoo A, Sommer L (2008) Development of the Schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 56: 1481–1490.
<https://doi.org/10.1002/glia.20723>
41. Furlan A, Adameyko I (2018) Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? *Dev Biol* 444(1): 25–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.008>
42. Kastriti ME, Faure L, von Ahsen D, Boudierlique TG, Bostrom J, Solovieva T, Jackson C, Bronner M, Meijer D, Hadjab S, Lallemand F, Erickson A, Kaucka M, Dyachuk V, Perlmann T, Lahti L, Krivanek J, Brunet J, Fried K, Adameyko I (2022) Schwann cell precursors represent a neural crest-like state with biased multipotency. *EMBO J* 41(17): e108780.
<https://doi.org/10.15252/embj.2021108780>
43. Mirancea N (2016) Telocyte – a particular cell phenotype. Infrastructure, relationships and putative functions. *Rom J Morphol Embryol* 57(1): 7–21.
44. Mirancea N, Mirancea GV, Moroşanu AM (2022) Telocytes inside of the peripheral nervous system – a 3D endoneurial network and putative role in cell communication. *Rom J Morphol Embryol* 63(2): 335–347.
<https://doi.org/10.47162/RJME.63.2.05>

45. *Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Gayoso S, Gutiérrez E, Díaz-Flores L Jr, Carrasco JL* (2020) Telocytes in the Normal and Pathological Peripheral Nervous System. *Int J Mol Sci* 21(12): 4320.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124320>
46. *Popescu LM, Faussone-Pellegrini MS* (2010) Telocytes – a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to telocytes. *J Cell Mol Med* 14(4): 729–740.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x>
47. *Faussone Pellegrini MS, Popescu LM* (2011) Telocytes. *Biomol Concepts* 2(6): 481–489.
<https://doi.org/10.1515/BMC.2011.039>
48. *Низяева НВ, Марей МВ, Сухих ГТ, Щёголев АИ* (2014) Интерстициальные пейсмейкерные клетки. *Вестн Рос акад мед наук* 69(7-8): 17–24. [*Nizyaeva NV, Marej MV, Sukhikh GT, Shchyogolev AI* (2014) Interstitial pacemaker cells. *Vestn Ross akad med nauk* 69(7-8): 17–24. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1105>
49. *Одинцова ИА, Слуцкая ДР, Березовская ТИ* (2022) Телоциты: локализация, структура, функции и значение в патологии. *Гены и Клетки* 17(1): 6–12. [*Odincova IA, Sluckaya DR, Berезovskaya TI* (2022) Telocytes: localization, structure, functions and significance in pathology. *Geny i Kletki* 17(1): 6–12. (In Russ)].
<https://doi.org/10.23868/202205001>
50. *Chen T, Li Y, Ni W, Wei Y, Li J, Yu J, Zhang L, Gao J, Zhou J, Zhang W, Xu H, Hu J* (2020) Neural stem cell-conditioned medium inhibits inflammation in macrophages via Sirt-1 signaling pathway in vitro and promotes sciatic nerve injury recovery. *Stem Cells and Develop*
<https://doi.org/10.1089/scd.2020.0020>
51. *Petrova ES, Kolos EA* (2023) Immunohistochemical Study of Macrophages of Sciatic Rat Nerve after Damage and Subperineural Injection of Mesenchymal Stem Cells. *Russ Physiol J* 109(4): 466–476 (In Russ).
<https://doi.org/10.31857/S0869813923040076>
52. *Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ* (2018) Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение* 18(1): 16–24. [*Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Mel'nikova EV, Olefir YuV* (2018) Application of flow cytometry for quality assessment of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* 18(1): 16–24. (In Russ)].
<https://doi.org/10.30895/2221-996KH-2018-18-1-16-24>
53. *Lupatov AY, Vdovin AS, Vakhrushev IV, Poltavtseva RA, Yarygin KN* (2015) Comparative analysis of the expression of surface markers on fibroblasts and fibroblast-like cells isolated from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 158(4): 537–543.
<https://doi.org/10.1007/s10517-015-2803-2>
54. *Hill R* (2009). Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *J Anat* 214: 219–225.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01026.x>
55. *Yamamoto M, Okui N, Tatebe M, Shinohara T, Hirata H* (2011) Regeneration of the perineurium after microsurgical resection examined with immunolabeling for tenascin-C and alpha smooth muscle actin. *J Anat* 218: 413–425.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01341.x>
56. *Rotshenker S* (2011) Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflamm* 8: 109.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-109>
57. *Колос ЕА* (2023) Коннексин-43 в клетках регенерирующего седалищного нерва крысы. *Морфология* 161(3): 71–78. [*Kolos EA* (2023) Connexin-43 in regenerating rat sciatic nerve cells. *Morfologiya* 161(3): 71–78. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/morph.629037>
58. *Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED* (1996) Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88(11): 4102–4109.
<https://doi.org/10.1182/blood.V88.11.4102.4102>

59. Smeland EB, Funderud S, Kvalheim G, Gaudernack G, Rasmussen AM, Rusten L, Wang MW, Tindle RW, Blomhoff HK, Egeland T (1992) Isolation and characterization of human hematopoietic progenitor cells: an effective method for positive selection of CD34+ cells. *Leukemia* 6(8): 845–852.
60. He Q, Yu F, Li Y, Sun J, Ding F (2020) Purification of fibroblasts and schwann cells from sensory and motor nerves in vitro. *J Vis Exp* 159: e60952.
<https://doi.org/10.3791/60952>
61. Levine JM, Nishiyama A (1996) The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* 3(4): 245–259.
62. Levine JM (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 14(8): 4716–4730.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04716.1994>
63. Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36(6): 986–990.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.002>
64. Peng K, Sant D, Andersen N, Silvera R, Camarena V, Piñero G, Graham R, Khan A, Xu XM, Wang G, Monje PV (2020) Magnetic separation of peripheral nerve-resident cells underscores key molecular features of human Schwann cells and fibroblasts: an immunochemical and transcriptomics approach. *Sci Rep* 10(1): 18433.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74128-3>
65. Fertala J, Rivlin M, Wang ML, Beredjiklian PK, Steplewski A, Fertala A (2020) Collagen-rich deposit formation in the sciatic nerve after injury and surgical repair: A study of collagen-producing cells in a rabbit model. *Brain Behav* 10(10): e01802.
<https://doi.org/10.1002/brb3.1802>
66. Du H, Chen D, Zhou Y, Han Z, Che G (2014) Fibroblast phenotypes in different lung diseases. *J Cardiothorac Surg* 9: 147.
<https://doi.org/10.1186/s13019-014-0147-z>
67. Лунина НА, Сафина ДР, Кострова СВ (2023) Ассоциированные с опухолью фибробласты: гетерогенность и бимодальность в онкогенезе. *Мол биол* 57(5): 739–770. [Lunina NA, Safina DR, Kostrov SV (2023) Cancer-Associated Fibroblasts: Heterogeneity and Bimodality in Oncogenesis. *Mol Biol* 57(5): 739–770. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0026898423050105>
68. Kolarcik CL, Catt K, Rost E, Albrecht IN, Bourbeau D, Du Z, Kozai TD, Luo X, Weber DJ, Cui XT (2015) Evaluation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotube neural electrode coatings for stimulation in the dorsal root ganglion. *J Neural Eng* 12(1): 016008.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/12/1/016008>
69. Kolarcik CL, Castro CA, Lesniak A, Demetris AJ, Fisher LE, Gaunt RA, Weber DJ, Cui XT (2020) Host tissue response to floating microelectrode arrays chronically implanted in the feline spinal nerve. *J Neural Eng* 17(4): 046012.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab94d7>
70. Nissi R, Autio-Harmainen H, Marttila P, Sormunen R, Kivirikko KI (2001) Prolyl 4-hydroxylase isoenzymes I and II have different expression patterns in several human tissues. *J Histochem Cytochem* 49(9): 1143–1153.
<https://doi.org/10.1177/002215540104900908>
71. Sato H, Ishii Y, Yamamoto S, Azuma E, Takahashi Y, Hamashima T, Umezawa A, Mori H, Kuroda S, Endo S, Sasahara M (2016) PDGFR- β plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts in cerebral stroke. *Stem Cells* 34(3): 685–698.
<https://doi.org/10.1002/stem.2212>
72. Zhou C, Liu B, Huang Y, Zeng X, You H, Li J, Zhang Y (2017) The effect of four types of artificial nerve graft structures on the repair of 10-mm rat sciatic nerve gap. *J Biomed Mater Res A* 105(11): 3077–3085.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36172>
73. Hamidi H, Ivaska J (2017) Vascular morphogenesis: an integrin and fibronectin highway. *Curr Biol* 27(4): R158–R161.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.12.036>
74. Zent J, Guo LW (2018) Signaling mechanisms of myofibroblastic activation: outside-in and inside-out. *Cell Physiol Biochem* 49(3): 848–868.
<https://doi.org/10.1159/000493217>

75. *Mohammadizadeh F, Heydari S* (2020) Intracellular fibronectin expression in invasive breast carcinoma: is it related to significant clinicopathological prognostic factors? *Iran Red Crescent Med J* 22(4): e98676.
<https://doi.org/10.5812/ircmj.98676>
76. *Darby IA, Hewitson TD* (2007) Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257: 143–179.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57004-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57004-X)
77. *Хлопин НГ* (1946) Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. М. Изд-во Акад наук СССР. [*Hlopin NG* (1946) General biological and experimental principles of histology. M. Izd-vo Akad nauk SSSR. (In Russ)].
78. *Михайлов ВП* (1972) Классификация тканей и явления метоплазии в свете принципа тканевой детерминации. *Архив анатом гистол эмбриол* 63(6): 12–33. [*Mihajlov VP* (1972) Classification of tissues and phenomena of metaplasia in terms of the principle of tissue determination. *Arhiv anatom gistol embriol* 63(6): 12–33. (In Russ)].
79. *Raff MC, Fields KL, Hakomori SI, Mirsky R, Pruss RM, Winter J* (1979) Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res* 174(2): 283–308.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90851-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90851-5)
80. *Faniku C, Kong W, He L, Zhang M, Lilly G, Pepper JP* (2021) Hedgehog signaling promotes endoneurial fibroblast migration and Vegf-A expression following facial nerve injury. *Brain Res* 1751: 147204.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147204>
81. *Tricaud N, Park HT* (2017) Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cell Mol Life Sci* 74 (22): 4049–4057.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2565-2>
82. *Zigmond RE, Echevarria FD* (2019) Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol* 173: 102–121.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.001>
83. *Kolter J, Kierdorf K, Henneke P* (2020) Origin and Differentiation of Nerve-Associated Macrophages. *J Immunol* 204(2): 271–279.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901077>
84. *Zhang Z, Yu B, Gu Y, Zhou S, Qian T, Wang Y, Ding G, Ding F, Gu X* (2016) Fibroblast-derived tenascin-C promotes Schwann cell migration through beta1-integrin dependent pathway during peripheral nerve regeneration. *Glia* 64(3): 374–385.
<https://doi.org/10.1002/glia.22934>
85. *Dun XP, Parkinson DB* (2020) Classic axon guidance molecules control correct nerve bridge tissue formation and precise axon regeneration. *Neural Regen Res* 15(1): 6–9.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.264441>
86. *McDonald D, Cheng C, Chen Y, Zochodne D* (2006) Early events of peripheral nerve regeneration. *Neuron Glia Biol* 2: 139–147.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X05000347>
87. *Lemke G* (2006) Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 325: pe11.
<https://doi.org/10.1126/stke.3252006pe11>
88. *Fornasari BE, El Soury M, Nato G, Fucini A, Carta G, Ronchi G, Crosio A, Perroteau I, Geuna S, Raimondo S, Gambarotta G* (2020) Fibroblasts colonizing nerve conduits express high levels of soluble neuregulin1, a factor promoting Schwann cell dedifferentiation. *Cells* 9(6): 1366.
<https://doi.org/10.3390/cells9061366>
89. *Saada A, Dunaevsky-Hutt A, Aamar A, Reichert F, Rotshenker S* (1995) Fibroblasts that reside in mouse and frog injured peripheral nerves produce apolipoproteins. *J Neurochem* 64: 1996–2003.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64051996.x>
90. *Ельчанинов АВ, Фатхудинов ТХ* (2023) Макрофаги. Москва. ГЭОТАР-Медиа. [*El'chaninov AV, Fatxudinov TX* (2023) Macrophages. Moskva. GE'OTAR-Media. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33029/9704-7780-9-EAM-2023-1-208>
91. *Chen P, Piao X, Bonaldo P* (2015) Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* 130(5): 605–618.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>

92. *Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H* (1987) Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104: 1623–1631. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.6.1623>
93. *Зорина АИ, Бозо ИЯ, Зорин ВЛ, Черкасов ВР, Деев РВ* (2011) Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения. *Клеточн трансплантол тканев инженер* 6(2): 15–26. [*Zorina AI, Bozo IYa, Zorin VL, Cherkasov VR, Deev RV* (2011) Dermal fibroblasts: features of cytogenesis, cytophysiology and possibilities of clinical application. *Kletochn transplantol tkanev inzhener* 6(2): 15–26. (In Russ)].
94. *Zhao Y, Liang Y, Xu Z, Liu J, Liu X, Ma J, Sun C, Yang Y* (2022) Exosomal miR-673-5p from fibroblasts promotes Schwann cell-mediated peripheral neuron myelination by targeting the TSC2/mTORC1/SREBP2 axis. *J Biol Chem* 298(3): 101718. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101718>
95. *Bunge MB, Wood PM, Tynan LB, Bates ML, Sanes JR* (1989) Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker. *Science* 243(4888): 229–231. <https://doi.org/10.1126/science.2492115>
96. *Hou H, Zhang L, Ye Z, Li J, Lian Z, Chen C, He R, Peng B, Xu Q, Zhang G, Gan W, Tang P* (2016) Chitooligosaccharide inhibits scar formation and enhances functional recovery in a mouse model of sciatic nerve injury. *Mol Neurobiol* 53(4): 2249–2257. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9196-0>
97. *Ngeow WC* (2010) Scar less: a review of methods of scar reduction at sites of peripheral nerve repair. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109(3): 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.06.030>
98. *Порсева ВВ, Преображенский НД, Маслоков ПМ* (2023) Экспрессия парвальбумина в ГАД67-иммунореактивных нейронах промежуточной зоны грудного спинного мозга у мышей C57BL/6 в условиях сенсорной денервации. *Рос журн боли* 21(1): 13–18. [*Porseva VV, Preobrazhensky ND, Maslyukov PM* (2023) Expression of parvalbumin in GAD67-immunoreactive neurons of the intermediate zone of the thoracic spinal cord in C57BL/6 mice under conditions of sensory denervation. *Ross zhurn boli* 21(1): 13–18. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/pain20232101113>
99. *Antunes SLG, Jardim MR, Vital RT, Pascarelli BMO, Nery JADC, Amadeu TP, Sales AM, da Costa EAF, Sarno EN* (2019) Fibrosis: a distinguishing feature in the pathology of neural leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 114: e190056. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190056>
100. *Pradat PF, Delanian S* (2013) Late radiation injury to peripheral nerves. *Handb Clin Neurol* 115: 743–758. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00043-6>
101. *Bisceglia M, Vigilante E, Ben-Dor D* (2007) Neural lipofibromatous hamartoma: a report of two cases and review of the literature. *Adv Anat Pathol* 14(1): 46–52. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31802f04b7>
102. *Seddon HJ* (1942) Classification of Nerve Injuries. *Br Med J* 2(4260): 237–239. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4260.237>
103. *Sunderland S* (1951) A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*. 74(4): 491–516. <https://doi.org/10.1093/brain/74.4.491>
104. *Aman M, Mayrhofer-Schmid M, Schwarz D, Bendszus M, Daeschler SC, Klemm T, Kneser U, Harhaus L, Boecker AH* (2023) Avoiding scar tissue formation of peripheral nerves with the help of an acellular collagen matrix. *PLoS One* 18(8): e0289677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289677>

Modern Concepts of Endoneurial Fibroblasts

E. S. Petrova^{a,*}, E. A. Kolos^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

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

The purpose of this review was to summarize modern concepts of endoneurial fibroblasts of peripheral nerves and their role in reparative nerve regeneration. Along with Schwann cells and macrophages, fibroblasts are the main functionally significant cells of the endoneurium. There is little information in the literature on the characteristics of fibroblasts and their role in the regeneration of damaged nerves. Recent data on the morphofunctional features of endoneurial fibroblasts, their origin in ontogenesis and their functions are presented in the review. The characteristics of immunohistochemical markers used for their identification are presented. The necessity of studying the interactions of fibroblasts with other nerve cells is emphasized to clarify their role in nerve regeneration after injury.

Keywords: nerve, endoneurium, fibroblasts, regeneration, immunohistochemistry

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

**СТАРЕНИЕ КЛЕТОК СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ: ВОЗРАСТ, САРКОПЕНИЯ,
ТЕРАПИЯ**

© 2025 г. Н. Г. Плехова^{1, *}, П. А. Новикова¹, А. Н. Воронова¹, Д. В. Королев¹,
В. Б. Шуматов¹

¹*Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток,
Россия*

**E-mail: pl_nat@hotmail.com*

Поступила в редакцию 10.03.2025 г.

После доработки 21.05.2025 г.

Принята к публикации 09.06.2025 г.

Прогрессирующее возрастное снижение массы, силы и функции скелетных мышц приводит к потере и атрофии мышечных волокон и сопутствующему замещению их жировой и фиброзной тканью, саркопении. Мышцы подвержены множественным формам молекулярных и клеточных повреждений, включая нарушение регенеративной способности, оборота белков, митохондриальную дисфункцию и клеточное старение, которое проявляется остановкой клеточного цикла. С возрастом такие клетки накапливаются и приобретают отличительные свойства, характеризующиеся изменениями хроматина и появлением специфического секреторного, связанного со старением фенотипа (SAS-фенотип), который оказывает локальное и/или системное негативное влияние на ткани организма. Цель настоящего обзора – представить ландшафт признаков старения клеток скелетных мышц, основанный на данных доказательства их роли в возрастном изменении массы, силы, функции мышц и клинических последствий данного явления, а также продемонстрировать ключевые направления в разработке новых методов сенесцентной терапии саркопении. Критерии включения: рандомизированные или нерандомизированные контролируемые исследования, изучающие роль старения клеток в возрастзависимом изменении и патофизиологии скелетных мышц. Поиск данных осуществляли в электронных научных базах Google Scholar, Medline, PubMed, Scopus, Web of Science и Cochrane Library по ключевым словам и их сочетаниям, используя программу AMSTAR 2. Отбор публикаций (из 430 включено 82) производили случайным образом, после чего независимо авторами давалась оценка их методологического качества. Доказана решающая роль клеточного старения при формировании SAS-фенотипа в возрастной патофизиологии скелетных мышц. Эти явления изменяют гомеостаз мышечной ткани и способствуют возникновению и прогрессированию саркопении. Воздействие на стареющие клетки и их секреторные профили может способствовать разработке комплексных стратегий, включая использование сенолитиков и сеноморфов, для улучшения качества жизни стареющей популяции населения. С другой стороны, на настоящий момент недостаточно данных об уязвимости к старению терминально-дифференцированных волокон скелетных мышц и резидентных мононуклеарных клеток интерстициального микроокружения. Приводятся различные мнения о вкладе этого явления в начало и прогрессирование возрастной потери массы и дисфункции скелетных мышц, а также инициации саркопении. Научные достижения в данной области позволят определить новые терапевтические подходы для оптимизации здоровья мышц в пожилом возрасте.

Ключевые слова: старение клеток, скелетные мышцы, миоциты, возрастзависимые заболевания, саркопения, терапия

DOI: 10.7868/S2658655X25070028, **EDN:** MVJTDV

ВВЕДЕНИЕ

Активная часть опорно-двигательного аппарата, соматическая мускулатура, в основном состоит из скелетной (поперечнополосатой) мышечной ткани. Структурная единица (мышечное волокно) при толщине в 50–100 мкм достигает длины в несколько сантиметров и содержит миосимпласты и миосателлитоциты, покрытые общей базальной мембраной. Прогрессирующее возрастное снижение мышечной массы и силы отрицательно влияет на множество физиологических параметров организма, включая движение, дыхание, зрение, терморегуляцию и метаболический гомеостаз [1]. С возрастом мышцы постепенно теряют регенеративную способность, которая зависит от степени деградации и синтеза белков и является результатом нарушения регуляции метаболизма мышечных клеток и реакции на внешние стимулы [2, 3]. Возрастная адаптация мышечной ткани основана на эффективности всех задействованных этапов, от формирования соответствующего мембранного потенциала до обмена ионами кальция и сдвига соотношения актин-миозин, что в конечном итоге реализует генерацию новых миофибрилл (миогенез) из сателлитных клеток [4]. Поскольку генерация мышечной силы критически зависит от активности миоцитов, проявление их старения при значительном снижении метаболизма заметно на протяжении всей жизни. Показана связующая роль старения клеток между хронологическим изменением организма и нарушением структуры и функций органов различных систем, включая сосудистую, дыхательную, нервную и костную [5–7]. Тем не менее исследования в отношении восприимчивости к старению популяций постмитотических и митотически компетентных клеток и его влияния на возрастные изменения массы, силы и функции скелетных мышц, а также возникновение саркопении на настоящий момент находятся на начальном этапе [3].

Старение (сенесценция) клеток характеризуется стабильной остановкой клеточного цикла, при котором они остаются метаболически активными, в них инициируется синтез белка p16^{Ink4a}, модифицируется секретом, уменьшается длина теломер и конденсируется прицентромерная сателлитная ДНК [8]. На фоне снижения способности к пролиферации и дифференцировке такие клетки увеличиваются, в них возрастает синтез белков регуляторов клеточного цикла p16, p21, p53 и фермента β -галактозидазы (SA- β -gal), в результате чего формируется специфический секреторный фенотип, ассоциированный с сенесценцией (senescence-associated secretory phenotype, SAS фенотип) [9]. Продукция провоспалительных цитокинов (интерлейкины 1 бета (IL1 β), 6 (IL6), 8 (IL8), фактор некроза опухоли альфа, TNF α), лигандов хемокинов мотива C-C 2, 3, 5, 8 и других клетками SAS-фенотипа создает микросреду, непригодную для пролиферации, роста и выживания окружающих клеток, что приводит к их повреждению и смерти [9, 10]. Клеточное старение по своей сути является защитной, подавляющей опухоли программой и может возникнуть в результате инициации репаративных процессов в тканях, воздействия окислительного стресса, а именно: влияния активных форм кислорода (АФК) и недостатка питательных веществ. Однако с возрастом стареющие клетки накапливаются, предположительно, из-за их устойчивости к апоптозу и неэффективного удаления иммунной системой [5, 11]. Цель настоящего обзора – представить ландшафт признаков старения клеток скелетных мышц, основанный на данных доказательства их роли в возрастном изменении массы, силы, функции мышц и клинических последствий данного явления, а также продемонстрировать основные направления в разработке новых методов сенесцентной терапии саркопении. С этих позиций ключевыми направлениями исследований, рассмотренных в обзоре, являются оценка роли сенесценции различных популяций клеток мышечной и соединительной тканей, иммуностарения, эпигенетических факторов и микробиома в возрастзависимых изменениях и миопатиях, а также представление методов коррекции патологического состояния опорно-двигательного аппарата.

СТРУКТУРА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Центральную часть в совокупности слившихся клеток – миосимпласте – занимают миофибриллы, по периферии в большом количестве располагаются ядра, саркоплазматический ретикулум, митохондрии и другие органеллы. В интерстициальном микроокружении скелетных мышц существует несколько популяций митотически активных моноклеарных клеток, которые необходимы для гомеостаза и адаптации миосимпласта. К ним относятся миобласты (сателлитные или стволовые клетки), фиброадипогенные клетки-предшественники (ФАП), эндотелиальные клетки, перициты, макрофаги, нейроны, теноциты и нейтрофилы [3]. Структурная единица миофибриллы, саркомер, состоит из актина и миозина, взаимодействие которых обеспечивает изменение длины мышечного волокна. В состав саркомера также входят многие вспомогательные белки, а именно титин, тропонин, тропомиозин и др. [12]. Моторную функциональную единицу мышц составляют волокна и иннервирующие их мотонейроны. В зависимости от максимальной скорости укорочения скелетные мышцы подразделяются на быстрые и медленные волокна, содержащие изоферменты миозина для расщепления АТФ [12]. Высокая АТФазная активность миозина свойственна быстрым, а низкая – медленным волокнам. Несмотря на превышающую у быстрых волокон примерно в четыре раза скорость рабочего цикла медленных, поперечные мостики миозина обоих типов генерируют одинаковую силу. Другой подход к классификации волокон скелетных мышц основан на различиях ферментативных механизмов синтеза АТФ. В окислительных волокнах при большом количестве митохондрий обеспечивается высокий уровень окислительного фосфорилирования, которое зависит от кровоснабжения мышц. В этих волокнах также присутствует миоглобин, увеличивающий скорость диффузии кислорода и выполняющий роль кратковременного кислородного депо. В гликолитических волокнах митохондрий небольшое количество, но большие запасы гликогена и ферментов гликолиза. Они окружены небольшим числом капилляров, и миоглобина в их ткани немного, что соответствует ограниченному использованию кислорода. Таким образом, на основании вышесказанного выделяется три типа волокон скелетных мышц: тип I – медленные окислительные волокна (низкая активность АТФазы и высокая окислительная способность); тип IIa – быстрые окислительные волокна (высокая активность АТФазы и окислительной способности); тип IIb – быстрые гликолитические волокна (высокая активность АТФазы и гликолитической способности) [12]. В ответ на применение анаболических средств и прогрессивных тренировок с отягощениями сократительные и другие белки и органеллы накапливаются в цитозоле, возрастают метаболические и синтетические процессы, что приводит к увеличению площади поперечного сечения и гипертрофии волокон [3]. В контексте патофизиологии при потере мышечной массы, силы и физической функции с возрастом или вследствие кахексии, бездействия (постельный режим или иммобилизация конечностей) и дегенерации (травма, миопатия) отмечается резкое снижение количества клеточных белков и органелл с уменьшением размера и атрофии волокон [2, 4, 11].

ВОЗРАСТЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Пик формирования мышечной ткани у людей обоих полов приходится в среднем на 25 лет, а затем наступает его прогрессирующее снижение до 50% к девяноста годам [11, 14]. Основным фактором потери физической устойчивости и возрастных функциональных ограничений является снижение массы (саркопения), которая включает уменьшение площади поперечного сечения скелетных мышц и количества волокон, а также накопление жира и соединительной ткани (рис. 1) [15]. У пожилых лиц с низкой мышечной массой по сравнению с молодыми лицами отмечаются более высокие показатели хирургических осложнений, инфекций и замедленной регенерации тканей [13].

В патофизиологии состарившейся мышцы участвуют популяции стареющих резидентных сателлитных, фибroadипогенных, эндотелиальных и иммунных клеток. Подмножество терминально дифференцированных миофибрилл приобретает возрастзависимое увеличение синтеза белка p21 и заметное обогащение путей, связанных со старением, в то время как пролиферирующие мышечные клетки демонстрируют значительное увеличение белка p16 и других основных свойств SAS-фенотипа [5]. В течение жизни в ответ на травму и возрастные повреждения клетки мышц под влиянием окислительного стресса накапливают повреждение ДНК, что запускает начало клеточного старения (рис. 1) [16]. Такие клетки приобретают устойчивость к апоптозу, что способствует их долговременной персистенции. Хотя стареющие клетки привлекают и активируют иммунные, являясь объектами для клиренса, с возрастом ослабленная защита, вероятно, теряет способность к их элиминации, тем самым способствуя их накоплению [17]. Существуют данные, указывающие на влияние старения клеток, в том числе и на саркопению. Указывается, что у пожилых людей клеточное старение является одним из факторов, ответственных за снижение регенеративной функции мышечных, костных и жировых тканей бедра, так как в них отмечается отрицательная корреляция между количеством клеток, экспрессирующих $p16^{Ink4a}$, и показателями мышечной производительности

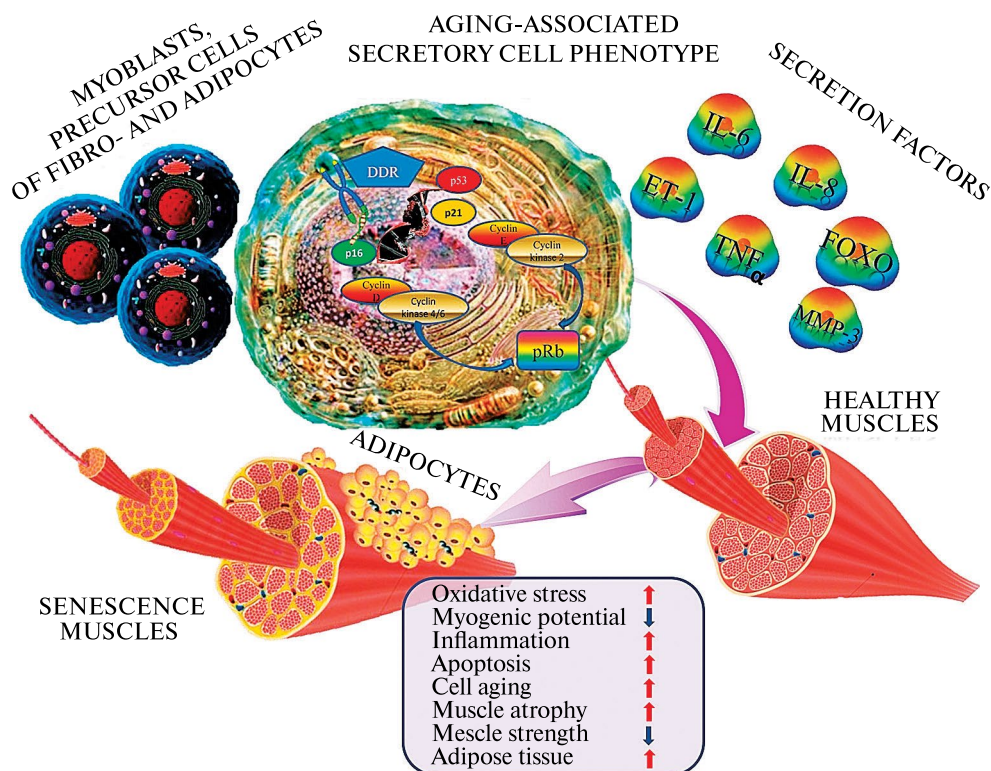


Рис. 1. Старение стволовых, фибро- и адипогенных клеток способствует возрастному изменению мышечной ткани, при котором маркеры старения p16, p21 и p53 блокируют клеточный цикл, подавляют рост и пролиферацию клеток-сателлитов. Стареющие клетки-сателлиты преобразуются в секреторный фенотип, связанный со старением (SAS-фенотип), продуцирующий эндотелин-1 (ЭТ-1), интерлейкин-6, -8 (IL-6, IL-8), фактор некроза опухоли α (TNF α), матриксную металлопротеиназу-3 (MMP-3) и активатор транскрипции FoxO1. В мышечной ткани клетки SAS-фенотипа усиливают (стрелка вверх) окислительный стресс, воспаление и апоптоз и снижают (стрелка вниз) миогенный потенциал и мышечную силу.

и физической функции [18]. В скелетной мышечной ткани пожилых женщин (65–71 год) уровень синтеза циклинзависимой киназы 1A (p21, ингибитор пролиферации при клеточном ответе на повреждение ДНК) был выше, чем у молодых (20–29 лет) [19]. С другой стороны, анализ скелетных мышц молодых (21–30 лет) и пожилых людей (70–86 лет) не выявил различий между количеством гистона γ H2AX системы репарации ДНК, фосфорилирование которого происходит при участии p38 при старении клеток [20]. Интересно, что молодые тучные люди (21–24 года, ИМТ 34–46) имели более высокую экспрессию γ H2AX в миоцитах, чем худые (21–24 года, ИМТ 20–25) [20]. Такие данные указывают на то, что старение и ожирение, связанные с ухудшением регенерации мышц и наращиванием их объема, сопряжены с увеличением числа стареющих клеток, однако это требует дальнейших исследований. Действительно, стареющие клетки продуцируют белки-регуляторы, такие как p16, p21 и p27, оказывающие влияние на митотическое деление, что вызывает резкое снижение пролиферации и дифференцировки, и это явление в контексте регенерации мышц обнаруживается повышенным фиброзом и накоплением жира. С другой стороны, экспериментально не показано долгосрочных эффектов стареющих клеток или их удаления на саркопению, фиброз, жировую инфильтрацию и мышечную силу. Отчасти это практическая проблема, поскольку саркопению по сравнению с прогрессирующей природой у людей является относительно поздним явлением у мышей. Тем не менее трансплантация сенесцентных клеток (сингенных преадипоцитов или аутологичных фибробластов уха) молодым мышам снизила показатели силы захвата и физической функции, включая скорость ходьбы и выносливость при подвешивании [18]. Таким образом, восприимчивость клеток мышечной ниши к приобретению SAS-фенотипа увеличивается с возрастом, что приводит к снижению регенеративной способности тканей опорно-двигательного аппарата и способствует хроническим расстройствам и патологиям.

СЕНЕСЦЕНЦИЯ САТЕЛЛИТНЫХ КЛЕТОК СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Молекулярные маркеры старения могут быть приобретены как постмитотическими, так и митотическими популяциями клеток, но ингибирование пролиферации сателлитных клеток особенно актуально для функций мышц [5]. Резидентные стволовые клетки мышц находятся в состоянии покоя, а в ответ на различные стимулы начинают делиться. Часть из них дифференцируется в миоциты, которые дополняют растущее мышечное волокно или восстанавливают его при повреждении, а другая восполняет собственный пул [21]. С возрастом регенеративный потенциал мышечной ткани снижается, и частично это связано с уменьшением количества сателлитных клеток, но в первую очередь это обусловлено нарушением активации и пролиферации в ответ на стимулы (рис. 1) [21]. Показано, что сателлитные клетки старых мышей демонстрируют высокую активность β -галактозидазы и экспрессию мРНК p16^{Ink4a}, циклинзависимых киназ (Cdkn2a, Cdkn2b) и инсулиноподобного фактора роста 5 (Igfbp5a), а их трансплантация молодым животным с травмой снижает регенерацию скелетных мышц [22, 23]. При целенаправленном подавлении синтеза белка p16^{Ink4a} на модели *in vitro* восстанавливается активность сателлитных клеток и увеличивается способность к самообновлению *in vivo* [24]. В стареющих миоцитах отмечается низкая экспрессия миогенных регуляторных факторов, способствующих росту мышц, на фоне высокого количества белка p53, фактора транскрипции Forkhead box O1 (FoxO1) и IL-6 [25]. Эти результаты показывают, что старение сателлитных клеток, вызванное истощением и постоянной активностью фосфатазы митоген-активируемых протеинкиназ MAP-8 с ингибированием киназы p38, в целом ухудшает регенерацию и индуцирует преждевременное изменение мышц (рис. 1) [24, 26, 27]. С возрастом в стволовых клетках мышц при травме отмечается снижение количества белка Slug (член суперсемейства факторов

транскрипции цинкового пальца Zincfinger, Slug/Snail), что способствует экспрессии p16^{Ink4a} и приводит к нарушению регенерации [27, 28].

Повреждение мышц с возрастом вызывает хроническое воспаление, сопряженное с окислительным стрессом, которое часто наблюдается у пожилых людей. Это состояние индуцирует старение клеток, в том числе и стволовых. Недавние исследования показали появление пула стареющих сателлитных клеток в скелетных мышцах у пожилых людей. Для таких клеток с высокой активностью лизосомальной β -галактозидазы (SA- β Gal), связанной со старением, продемонстрирован фенотип, продуцирующий антипролиферативные молекулы (p16INK4a, ARF и p21) [20]. Эти данные подтверждают результаты исследования скелетных мышц старых мышей, где в сателлитных клетках обнаружена остановка клеточного цикла, что привело к уменьшению их количества и снижению регенеративного потенциала тканей [29]. Показано, что с накоплением стареющих стволовых клеток также связаны ожирение и дистрофия мышц [20, 29, 30]. Хотя механизм индукции старения, специфичный для конкретного заболевания, остается неизвестным, старение сателлитных клеток может быть результатом снижения митохондриальной, а также опосредованной TGF- β активации сигнального трансдукторного белка-супрессора пролиферации клеток Smad3 и чрезмерной стимуляции белков трансмембранного семейства Notch [25]. Последние регулируют взаимодействие между соседними клетками. На настоящий момент остается под вопросом: действие стареющих сателлитных клеток на физическую функцию мышц положительно или отрицательно, а также оказывают ли такие клетки прямое влияние на параметры их старения (например, клеточный состав и атрофию). Показано, что системное удаление клеток, экспрессирующих p16^{Ink4a} у трансгенных молодых мышей, вызывает состояние, подобное саркопении, а у старых животных, к сожалению, незначительно улучшает показатели физической функции [18].

Старению мышц может способствовать эндотелиальная дисфункция, связанная с увеличением синтеза эндотелина-1 (ET-1), который оказывает влияние на пролиферативную активность стволовых клеток (рис. 1). На модели *in vitro* продемонстрировано, что под влиянием ET-1 стареющие миообласты синтезируют фибронектин, который взаимодействует с интегриновым рецептором и способствует выработке АФК и активации сигнального пути фосфоинозитид-3-киназа/тирозинкиназа В/киназы гликогенсинтазы-3 β (PI3K/AKT/GSK-3 β) [18]. Высокий уровень циркулирующего ET-1 при фиброзе у старых мышей коррелировал с экспрессией p16 в мышцах и потерей мышечной силы [31]. Интересно, что дефицит активной формы витамина D – 1,25(OH)₂D – способствует клеточному старению и появлению SAS-фенотипа с экспрессией мРНК белков p16, p21 и цитокинов TNF- α , IL-6, а также металлопротеиназы MMP-3 в сочетании с мышечной атрофией и снижением метаболической активности митохондрий [32]. Таким образом, снижение миогенного потенциала и индукция апоптотических, провоспалительных и атрофических факторов могут указывать на старение клеток миогенной линии [33].

СТАРЕНИЕ ФИБРО/АДИПОГЕННЫХ КЛЕТОК – ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ МЫШЦ

В скелетных мышцах ключевые компоненты перехода в SAS-фенотип вырабатываются фиброадипогенными предшественниками (ФАП), эндотелиальными и резидентными иммунными клетками, включая моноциты, которые дифференцируются в макрофаги [15]. При физиологических условиях ФАП-клетки способствуют регенерации мышц, а при патологических – формированию эктопической ткани [27, 34, 35]. Эти клетки в качестве медиаторов функций сателлитных клеток хорошо охарактеризованы при регенерации скелетных мышц, так как обладают как фиброгенным, так

и адипогенным потенциалом [36]. Идентифицировано несколько субпопуляций ФАП, которые играют различную роль в скелетных мышцах и имеют решающее значение для роста и опосредованного макрофагами воспалительного ответа на повреждение [37]. В условиях острого воспаления после травмы количество ФАП-клеток временно повышается со 2-го по 5-й день, а затем возвращается к исходным показателям через 14–21 день при полной регенерации мышц, тогда как при хроническом воспалении длительная пролиферация этих клеток и недостаточная элиминация приводят к их накоплению и фиброзу [38–40]. Эти динамические изменения пролиферации и клиренса ФАП-клеток важны для регуляции регенерации и дегенерации мышц, но лежащие в их основе механизмы до конца не изучены. Показано, что в состоянии покоя эти клетки поддерживают синтез гиперметилированного белка-супрессора опухолей 1 (Hic1), тогда как снижение экспрессии его гена сразу после травмы инициирует пролиферацию клеток [34]. Другое исследование продемонстрировало, что опосредованная цитокином IL-4 активация сигнального белка активатора транскрипции 6 (STAT6), путь IL4/STAT6, или воздействие IL-15 способствуют пролиферации ФАП-клеток [41]. Важную роль в клиренсе апоптотических телец ФАП-клеток играют макрофаги, обогащенные комплексом лимфоцитарного антигена 6 (Ly6C) и синтезирующие фактор некроза опухоли TNF- α [42]. В острый период повреждения мышц старение ФАП-клеток способствует переходу в SAS-фенотип и привлечению фагоцитарных клеток для их клиренса (рис. 1) [24, 27]. С другой стороны, клиренс может нарушаться при воздействии антиапоптотических факторов SAS-фенотипа, и, например, чрезмерный синтез макрофагами Ly6C типа фактора TGF- β , напротив, активирует сигнализацию для выживания стареющих клеток (рис. 1) [27]. В совокупности эти исследования указывают, что для достижения полной регенерации мышц должны быть сбалансированы про- и противовоспалительные, а также про- и антиапоптотические сигналы. Эта концепция подтверждается исследованием, демонстрирующим, что фармакологическое ингибирование янус-киназы JAK, которые регулируют переход стареющих ФАП-клеток в SAS-фенотип, подавляет показатели биосинтетических процессов системного воспаления и преобразования сателлитных мышечных клеток в адипоциты, что улучшает параметры мышечной силы, выносливости и координации у старых мышей [18].

Исследования с использованием экспериментальной модели хронической воспалительной миопатии показали, что стареющие ФАП-клетки стимулируют привлечение макрофагов, NK-клеток и активируют сателлитные клетки, что приводит к регенерации мышц в следующей последовательности: старение – очищение – регенерация [24]. В острый период повреждения мышц стареющие ФАП-клетки продуцируют цитокины, при этом высокий уровень синтеза IL-33 коррелирует с экспрессией белков супрессоров пролиферации, а именно ингибитором циклинзависимой киназы (CDKN2A, p16) и p53 [27]. IL-33 является мощным индуктором провоспалительных цитокинов и хемокинов, стимулирует выработку TNF- α макрофагами и оказывает влияние на деятельность регуляторных Т-клеток (Tregs), которые способствуют регенерации мышц [43]. На фоне замедленной регенерации травмированных мышц у старых мышей показано повышение синтеза p16^{Ink4a} в ФАП-клетках, а нокаутирование экспрессии генов белков супрессоров пролиферации p53 и p21 ухудшало способность к восстановлению тканей [44]. Стареющие ФАП-клетки в ответ на травму мышц могут вызывать перепрограммирование стволовых клеток. Показано, что клетки с индуцированной экспрессией четырех генов репрограммирования факторов Яманаки (*OSKM*, *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* и *c-Myc*) при повреждении мышц часто находились рядом со стареющими ФАП-клетками, расположенными в интерстициальном пространстве [45]. Кроме того, когда стареющие клетки были истощены или продукция IL-6 SAS-фенотипом была подавлена, эффективность репрограммирования стволовых клеток снижалась, это указывает на то, что они становятся более многочисленными в ответ на травму и могут способствовать регенерации мышц [45].

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ СТАРЕНИЯ МЫШЦ

Возрастзависимые изменения процессов метилирования ДНК, которые происходят во всех тканях организма, включая скелетные мышцы, могут способствовать структурному и функциональному ухудшению органов [46, 47]. Эпигенетические изменения в скелетных мышцах проявляются в основном через повышенные уровни метилирования. Предиктором хронологического возраста мышц является статус метилирования 200 сайтов области CpG ДНК, более 200 п. н. с G+C содержанием более 0.5 (ожидаемое/наблюдаемое присутствие CpG > 0.6). В геномах млекопитающих наиболее распространенной модификацией ДНК является метилирование пятого углерода цитозина (5-метилцитозин, или 5mC), при этом метилирование происходит от 70 до 80% CpG. Другие заметные модификации ДНК включают 5-гидроксиметилцитозин (5hmC), 5-карбоксиметилцитозин (5caC) и 5-формилцитозин (5fC) [46]. У пожилых пациентов с саркопенией уровни метилирования участков генов *CTSB* *_15*, *CXCL12* *_22* и *FGF2* *_30* в крови снижается, тогда как у *CTSB* *_17* и *FGF19* *_28*, напротив, повышается. Примечательно, что метилирование *FGF2* *_30* положительно коррелировало с силой хвата и скоростью движения пациентов [47]. В целом сумма уровней метилирования CpG-сайтов значительно повышается у пациентов с саркопенией и отрицательно коррелирует с анатомической площадью поперечного сечения латеральной широкой мышцы бедра, максимальным изометрическим сгибанием локтя и разгибанием колена [46]. Анализ энциклопедии генов и геномов показал, что гены, связанные с различиями метилирования при саркопении, были в основном связаны с путями, включающими регуляцию актинового цитоскелета, мышечную функцию и энергетический метаболизм [48].

Показано, что физические тренировки изменяют метилирование мышечной ДНК [46], но приводит ли это к тому, что этот процесс у пожилых лиц становится похожим на подобный у молодых, – остается под вопросом. Проведен эксперимент по исследованию влияния бега в колесе с весом мышей с 22–24-месячного возраста на эпигенетическое старение скелетных мышц [49]. На основании метода бисульфитного секвенирования был проведен целевой анализ высокого разрешения с высоким охватом > 500 тканеспецифичных мышечных CpG-локусов (анализ DNAgeTM), который перекрывался с часами эпигенетического старения тканей по Хорвату [50]. Примененный алгоритм DNAgeTM от Zymo Research, расширяющий часы Хорвата, построенный с использованием эластичной сетевой регрессии, оказался более точным для сравнения хронологического возраста мышц старых тренированных животных с возрастом молодых. Так, эпигенетический возраст мышцы тренированных возрастных мышей был на 10% ниже (~ на 8 недель моложе), чем у малоподвижных. Демонстрируется, что старение обычно приводит к большей молекулярной изменчивости, или “беспорядку”. Энтропия Шеннона метилирования ядерной и рДНК была выше при старении (FDR < 0.05) и не влияла на состояние мышц, но мтДНК была схожей между молодыми малоподвижными и старыми тренированными животными [49]. Более высокие уровни мРНК *Foxo3* и сниженное метилирование его гена по сравнению с молодыми наблюдались в скелетных мышцах 7-летних свиней, в то время как ген *FGFR1*, ингибирующий атрофию мышц, показал пониженную экспрессию и гиперметилирование [47]. В камбаловидной мышце мышей через неделю после тренировки значительно возрос уровень метилирования гена *nNOS* и убиквитиназы *E3* [49].

Помимо этого, на различных моделях мышечной атрофии продемонстрированы изменения процессов ацетилирования гистонов и их регуляторных факторов. Так, для функции скелетных мышц решающее значение имеют ацетилазы и деацетилазы гистонов, которые модулируют экспрессию многочисленных путей и генов. Длительные упражнения значительно увеличивают ацетилирование гистона H3, а убиквитинирование уменьшается в скелетных мышцах крыс в модели атрофии, вызванной иммобилизацией гипса [51]. У стареющих 24-месячных мышей соотношение массы икроножной

мышцы к массе тела и уровень ацетилирования гистонов H3, H3K9 и H3K27 значительно снижается по сравнению с молодыми, в то время как уровни мРНК атрогина-1 увеличиваются [51]. В первичных клетках – предшественниках мышечных клеток человека, выделенных из латеральной части бедра, при старении увеличивается экспрессия гистона γ -H2AX, которая положительно коррелирует с маркерами мышечной атрофии (*murf-1* и *atrogen-1*) [51].

Известно более 170 типов химических модификаций после транскрипции некодирующей и информационной РНК, которые играют ключевую роль в их стабильности, эффективности трансляции и внутриклеточной локализации. Как ключевой компонент эпигенетики, модификации РНК регулируют экспрессию генов и образуют сложную сеть, необходимую для поддержания клеточных физиологических функций и способствующую возникновению и прогрессированию различных заболеваний [51]. Преобладающей химической модификацией мРНК является метилирование N6-аденозина (m6A), которое включает добавление метильной группы в положение N6 на остатке аденозина молекул мРНК, катализируемое специфическими ферментами. Модификация m6A регулирует сплайсинг предшественников и ядерный экспорт мРНК, а также влияет на трансляцию и стабильность, показано ее наличие в скелетных мышцах и потенциальное влияние на дифференцировку миобластов.

Некодирующие молекулы РНК длиной около 22 нуклеотидов (miRNA) регулируют экспрессию генов, дополняя 3'-нетранслируемую область (3'UTR) целевой мРНК, и играют ключевую роль в различных биологических процессах, включая пролиферацию клеток, дифференцировку, апоптоз и развитие. Атрофические миоциты и макрофаги, вызванные старением, высвобождают экзосомы, обогащенные miR-690, которые подавляют дифференцировку сателлитных клеток, регулируя экспрессию *Mef2a*, *Mef2c* и *Mef2d*, сверхэкспрессия miR-181a усиливает функцию митохондрий у старых мышей, а miR-181a подавляет экспрессию сиртуина 1 [52]. У старых мышей сверхэкспрессия miR-434-3p в миоцитах сопровождается снижением активности каспаз 3, 8 и 9 [51]. MiR-29 ингибирует трансляцию медиаторов пролиферации миобластов, связываясь с 3'UTR IGF-1, p85a и B-myb, способствуя появлению связанных со старением индикаторов и приводя к атрофии скелетных мышц [52]. Тип молекулы РНК длиной более 200 нуклеотидов (lncRNA) регулирует экспрессию генов, ремоделирование хроматина, процессинг РНК и взаимодействие белков и участвует в дифференцировке и развитии клеток, опосредуя импринтинг генов при заболеваниях. В скелетных мышцах lnc-MYN модулирует пролиферацию миобластов в составе комплекса ремоделирования хроматина INO80 [52]. lncRNA, экспрессируемая во время дифференцировки этих клеток, оказывает влияние на метилирование ДНК и уплотнение хроматина в перичентромерных/центромерных областях [52]. Конкурирующая эндогенная РНК (ceRNA) miR-520d-5p подавляет регуляцию факторов регуляции мышц и апоптоз клеток, и ее экспрессия в мышцах пожилых людей повышена [52]. Ингибирование Chronos приводит к гипертрофии мышц через регуляцию *Bmp7* [51]. Таким образом, метилирование ДНК, модификация гистонов, РНК и некодирующая РНК имеют решающее значение в прогрессировании старения скелетных мышц, однако изучение эпигенетических процессов, сопровождающих это явление, находится на начальном этапе.

РОЛЬ ИММУННЫХ КЛЕТОК В СТАРЕНИИ МЫШЦ

С возрастом инициируется процесс иммунной дисфункции, иммуностарение, которое способствует развитию хронических возрастзависимых болезней [53, 54]. Регенерация скелетных мышц регулируется не только сателлитными и ФАП-клетками, но и иммунными, следовательно, иммуностарение должно оказывать влияние на регенерацию мышц, хотя доказательства связи между этими двумя явлениями остаются

ограниченными. Показано, что возрастное изменение количественной динамики и функций иммунных клеток и хроническое воспаление способствуют прогрессированию саркопении. Подобное сложное взаимодействие между иммунной системой, осью “кишечник – мышца” и аутофагией подчеркивает важную роль этих систем в патогенезе этого заболевания. Новые технологии биофизической стимуляции мышц с позиций иммуномодуляции и регуляции макрофагов и Т-клеток и снижения хронического воспаления демонстрируют доказательства такого взаимодействия. При индукции старения иммунных клеток у мышей повышается количество инфильтрирующих макрофагов преимущественно противовоспалительного фенотипа M2, снижается мышечная сила и ухудшается регенерация мышц после травмы [55]. Эти клетки могут способствовать иммунологическому надзору за старением путем высвобождения висфатина, аналога никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT), а также адипомиокина, который стимулирует пролиферацию стволовых клеток и миобластов [42]. Висфатин/NAMPT регулирует синтез НАД-зависимого белка сиртуина SIRT1, который деацетирует факторы транскрипции, в результате чего подавляется старение в эндотелиальных клетках-предшественниках [56]. Таким образом, в качестве критических факторов возрастных изменений мышц в клинических и доклинических исследованиях была показана роль воспалительной инфильтрации и изменений иммунных клеток, особенно макрофагов и Т-клеток. С другой стороны, проспективное популяционное исследование Newcastle 85+ лиц престарелого возраста, живущих в регионах Ньюкасл и Тайнсайд, Великобритания, продемонстрировало, что профиль иммуностарения не связан с мышечной функцией и риском саркопении [57]. Тем не менее источники возрастного инфламмейджинга, а именно высокая секреция провоспалительных цитокинов, накопление молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP), изменения жировой ткани и микробиома могут быть вызваны старением иммунных клеток. Эти явления оказывают влияние на развитие саркопении прямыми или косвенными путями, а она может усугублять этот процесс, создавая порочный круг. Более того, не только про-, но и противовоспалительные цитокины могут влиять на мышцы и участвовать в прогрессировании саркопении. Существующие данные об изменениях в иммунных клетках на протяжении прогрессирования заболевания остаются неоднозначными, а иногда даже спорными. С помощью комплексных аналитических методов, охватывающих пространственную транскриптомику и высокорежимную массовую цитометрию, будущие исследовательские усилия должны прояснить всеобъемлющие и подробные изменения в иммунных клетках, включая появление новых популяций, связанных с саркопенией. Хотя вопрос о том, влияет ли иммуностарение на воспаление и регенерацию мышц, остается спорным, более глубокое понимание механизмов регуляции этих процессов может способствовать прогрессу терапии при старении и заболеваниях мышц.

РОЛЬ МИКРОБИОМА В СТАРЕНИИ МЫШЦ

Сложная экосистема микробиоты имеет жизненно важное значение в иммунных и эндокринных функциях кишечника, энергетическом гомеостазе, питании и в целом – в поддержании здоровья [57]. Эта система выполняет промежуточную роль, расщепляя углеводы, белки и липиды для обеспечения организма энергией, а ее продукты, преодолевая кишечный барьер, метаболизируются в тканях и попадают в кровеносную систему. Так, микронутриенты и метаболиты микробиоты кишечника достигают мышц и оказывают на них воздействие [57, 58]. С возрастом возникает дисбактериоз микробиома кишечника с изменением видового спектра и соотношения между микроорганизмами, которое сопровождается снижением содержания полезных метаболитов [57]. Для изучения взаимосвязи между микробиотой и мышцами была выдвинута

концепция оси “кишечник – мышца”, данные исследований которой дополняют сведения о причинах возникновения возрастной атрофии мышц и дисфункции, приводящей к саркопении [59]. В частности, показано, что изменение микробиома путем использования биологических добавок, содержащих *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, увеличивают мышечную массу, силу и выносливость у старых мышей [58]. Особенно интересным и актуальным является изучение взаимодействия между старением мышечных клеток и изменениями в микробиоме кишечника, состояние которого вносит ощутимый вклад в системное воспаление, физиологический спад и предрасположенность к возрастным заболеваниям.

Сложность, гетерогенность стареющих клеток и возникновение SAS-фенотипа усугубляют процесс старения через провоспалительные пути и влияют на микросреду и иммунную систему. Одновременно с этим связанные со старением изменения в разнообразии и составе микробиома кишечника способствуют дисбактериозу, еще больше усугубляя системное воспаление. Показано, что накопление стареющих стволовых клеток SAS-фенотипа на фоне повышения содержания активных метаболитов кислорода и повреждения ДНК создает воспалительную среду, нарушая функцию кишечника и гомеостаз [57]. Кроме того, старение способствует снижению пролиферации, самообновления и подвижности этих клеток, усугубляя локальное воспаление и проблемы гомеостаза кишечника [57]. Бокаловидные клетки производят слизистый слой, в то время как клетки Панета секретируют антимикробные пептиды, такие как α -дефензины и лизоцим, для защиты от бактериальной инвазии. Исследования показывают, что старение обоих типов клеток нарушает барьерные функции кишечника, что проявляется снижением продукции муцина в бокаловидных клетках, снижением секреции лизоцима и активацией Notum, ингибитора WNT, в клетках Панета у старых мышей [57]. Эти нарушения целостности барьера кишечника, вызванные старением обоих типов клеток, способствуют бактериальной пермеабилитации и хроническому воспалению. Недавние исследования показали, что иммунные клетки подвздошной кишки подвергаются клеточному старению в зависимости от вида бактерий по мере старения людей [57]. Это подчеркивает, что возрастная дисфункция кишечного барьера в сочетании с увеличением грамотрицательных бактерий усиливает проницаемость микробиоты в тканях подвздошной кишки, что приводит к длительной стимуляции иммунных клеток. Однако конкретные механизмы, посредством которых старение клеток кишечника напрямую влияет на изменение состава микробиома, остаются неясными. Это нарушение может привести к повышенной проницаемости кишечника, способствуя дисбактериозу кишечника, ухудшению гомеостаза кишечника и развитию воспалительных заболеваний. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения взаимосвязи между клеточным старением других клеток, находящихся в кишечнике, повышенной проницаемостью кишечника из-за старения и последующими изменениями в микробиоме кишечника.

Возрастзависимые изменения микробиома кишечника в контексте системного воспаления предполагают двунаправленное взаимодействие, при котором дисбактериоз может усугублять старение и, наоборот, стареющие клетки могут влиять на состав и функцию микрофлоры [57]. Такое взаимодействие имеет значительные последствия для развития заболеваний опорно-двигательного аппарата, связанных со старением, предлагая потенциальную цель для терапевтического вмешательства. Накопление различных SAS-фенотипа стареющих клеток, таких как эпителиальные или иммунные клетки в кишечнике, может вызвать изменения в микробном разнообразии и метаболитах кишечной среды. И наоборот, метаболиты, вырабатываемые микробиотой кишечника, могут потенциально влиять на клеточное старение в кишечных клетках напрямую [58]. Теория оси “кишечник – кость” подчеркивает важность поддержания гомеостаза микробиома кишечника для метаболизма и функции скелетных мышц. Продемонстрировано снижение массы и функции скелетных мышц у мышей

без микробов и животных, получавших антибиотики, причем введение этим мышам суспензии бактерий микробиоты кишечника здоровых особей снижало показатели атрофии мышц [59]. Частично восстановило нарушения скелетных мышц лечение короткоцепочечными жирными кислотами. У пожилых людей установлена корреляция между наличием определенных родов микроорганизмов, высокой мышечной массой и лучшей физической работоспособностью [59]. Например, количество бактерий, известных противовоспалительной функцией и продукцией бутирата (*Fusicatenibacter*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Eubacterium* и *Lachnoclostridium*), снижалось, в то время как *Lactobacillus* чаще обнаруживались в фекалиях при состояниях предсаркопении и саркопении [59]. Исследование норвежской популяции населения (включая оба пола, $n = 5196$) обнаружило увеличение диагностического показателя саркопении аппендикулярной безжировой массы и снижение минеральной плотности костей, которые сопровождалось наличием трех анаэробных видов бактерий – *Dorea longicatena*, *Coprococcus comes* и *Eubacterium ventriosum* [60]. В значительной степени ассоциирован с ростом мышц метаболизм, связанный с желчными кислотами, полученными из микробиома кишечника [59]. Вырабатываемые в печени первичные желчные кислоты мигрируют в подвздошную кишку, где гидролаза желчных солей деконъюгирует их, превращая во вторичные, которые действуют как лиганды для фарнезоидного X-рецептора. Связываясь с рецепторами, этот лиганд способствует секреции фактора роста фибробластов с активацией сигнального пути ERK1/2, что оказывает влияние на повышение мышечной массы [59]. В настоящее время в Ирландии проводятся клинические испытания для оценки влияния пробиотических добавок (*Bacillus coagulans*) на синтез мышечного белка в ответ на растительную диету [60].

СТАРЕНИЕ КЛЕТОК И САРКОПЕНИЯ

Тип стойкой мышечной атрофии, саркопении, характеризуется постепенной потерей массы и функции скелетных мышц с риском развития негативных последствий, таких как физическая инвалидность, плохое качество жизни и смерть. Это заболевание диагностируется примерно у 20% пожилых лиц, преимущественно с наличием сердечно-сосудистых заболеваний, деменции, сахарного диабета и респираторных заболеваний [2]. Существуют различные методы диагностики саркопении, такие как биоимпедансный анализ компонентного состава тела, радиологическая оценка с помощью методов визуализации состава тела, а именно двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия, компьютерная и магниторезонансная томография. С возрастом отмечается снижение мышечной массы и силы, которое отчасти зависит от накопления стареющих клеток и появления SAS-фенотипа. Возникает эффект паракринного старения с изменением активности стволовых клеток, внеклеточного матрикса и функций мышечной ткани [20, 61]. Накопление стареющих клеток выступает в качестве детерминанты снижения мышечной массы и силы при возникновении саркопении, сопряженной с демонстрацией маркеров SAS-фенотипа (рис. 1). Показано, что после воздействия цитостатика и индуктора старения доксорубицина миобласты и фибробласты, извлеченные из биопсий мышц здоровых молодых людей, преобразуются в различные SAS-фенотипы. В миоблестах наблюдается значительное повышение уровня экспрессии мРНК фермента MMP-3 и цитокина IL-8, тогда как в фибробластах отмечается синтез белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 3 (IGFBP3), плазминогена-1 (PAI-1) и хемокина 5 (CXCL-5) на фоне низкого уровня TNF- α и IL-6 [38]. Также дефицит активной формы витамина D 1,25(OH) $_2$ D, способствуя старению клеток скелетных мышц, оказывает влияние на развитие возрастной саркопении, вызывая окислительный стресс и препятствуя регенерации мышц [32]. Эти данные указывают на динамический процесс старения с характерными чертами сложной меж- и внутриклеточной

изменчивости и появлением признаков саркопении. У пожилых людей обнаруживаются достоверные ассоциации между наличием клеток SAS-фенотипа и показателями физической силы. Наиболее сильная связь отмечена между отрицательным регулятором мышечной массы активином A и силой, что подтверждает ключевую роль старения клеток в возрастзависимом снижении физической работоспособности [62].

Провоспалительное и межклеточное воздействие продуктов синтеза стареющих клеток SAS-фенотипа в мышцах и окружающих тканях считается ключевым фактором, способствующим саркопении [63]. Экспериментальное исследование эффекта имплантации стареющих человеческих фибробластов в скелетные мышцы и кожу мышцей обнаружило распространение SAS-фенотипа в соседних клетках на фоне истончения мышечных волокон и характерных признаков саркопении [64]. Наблюдалось старение сателлитных клеток с наличием митохондриальной дисфункции и секреции SAS-фенотипа, связанное с возрастной потерей мышечной массы, силы и проявлением признаков саркопении [64]. На основании вышеуказанных доказательств участия различных молекул в процессе старения сателлитных клеток, а именно наличия сигнализации по пути $p38\alpha/\beta$ MAPK, сниженной экспрессии репрессора гена $p16^{\text{INK4a}}$ фактора транскрипции Slug и синтеза Wnt-3, можно предположить вероятность участия этих молекул в возрастной мышечной дегенерации при саркопении. В частности, биологически активные вещества, высвобождаемые из воспалительного инфильтрата и из ФАП, оказывают патологическое влияние на пролиферацию и дифференцировку сателлитных клеток, что индуцирует восстановление мышц, характерное для хронического состояния, то есть формирование фиброзной и жировой дегенерации и атрофию миофибрилл [37, 65]. Согласно исследованиям на модели линии миобластов мышечей C2C12, было предложено несколько потенциальных механизмов потери мышечной массы (саркопении), опосредованной старением мышечных клеток [31, 33]. Под влиянием высокой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и/или экспрессии рецептора к эндотелину-1 стареющие клетки начинают синтезировать апоптотические, атрофические и воспалительные факторы [31, 33, 66]. Указывается, что в ответ на метаболический стресс остановка клеточного цикла в значительной степени является результатом двух сигнальных путей повреждения ДНК. Первый осуществляется через фосфорилирование транскрипционного фактора p53 продуктом экспрессии гена мутанта атаксии-телеангиэктазии (ATM), что приводит к повышению уровня ингибитора циклинзависимой киназы $p21^{\text{CIP1}}$ с активацией тумор-супрессорного пути с фосфорилированием белка ретинобластомы (Rb) [67]. Второй путь опосредован ингибитором циклинзависимой киназы $p16^{\text{INK4a}}$, участием белка Rb, что приводит к блокированию перехода клеток из G1 фазы в S период ($p16^{\text{INK4a}}$ /Rb) [68]. Окислительный стресс вызывает старение сателлитных клеток, которые в большей степени начинают дифференцироваться в адипоциты, что в конечном итоге способствует замещению мышечной ткани на жировую. Показано, что при культивировании стареющих клеток с миобластами останавливается образование миоцитов и возникает саркопения [69, 70]. В развитии такого типа метаболической саркопении принимает участие антиоксидантный фермент, пероксиредоксин 6, который предотвращает расщепление сиртуина SIRT1, а также экспрессию гена *FoxO1* [71]. Его высокая активность усиливает протеолиз, старение клеток и ускоряет мышечную дегенерацию, вызванную возрастом и ожирением [71]. Также изучалась роль накопления перимышечной жировой ткани в развитии саркопении: ее трансплантация увеличивала активацию и ядерную транслокацию факторов транскрипции FoxO [71]. Еще один общий регулятор метаболизма – митохондриальный белок атрофии зрительного нерва 1 (OPA1) – регулирует активность и старение мышечных стволовых клеток. При его отсутствии возникают стресс эндоплазматического ретикулума и индукция факторов транскрипции FoxO в стареющих клетках, что приводит к потере мышечной массы [72]. Индукция D-галактозой старения миобластов (модель старения *in vitro*) вызывает в них синтез сарколипина, который участвует в развитии фиброза

скелетных мышц [73]. Действительно, показано, что возникающий с возрастом фиброз, индуцированный изменением функций стареющих клеток, ускоряет развитие саркопении [74]. В недавних исследованиях иммуногенных изменений, связанных с развитием саркопении, показано, что макрофаги могут предотвращать/ингибировать клеточное старение и соответствующий SAS-фенотип и, следовательно, положительно регулировать регенерацию мышц [42]. В целом приведенные данные демонстрируют, что старение клеток играет ключевую роль в развитии саркопении, а более глубокое понимание ее индукции, возникновения SAS-фенотипа при прогрессировании заболевания позволит разработать подходы к терапии потери мышечной массы.

СЕНЕСЦЕНТНАЯ ТЕРАПИЯ САРКОПЕНИИ

Стареющие клетки SAS-фенотипа, продуцирующие провоспалительные факторы и биологически активные вещества, негативные по воздействию на ткани, могут использоваться как терапевтическая мишень для предотвращения возрастных дегенеративных патологий. Сеноморфная и сеностатическая терапия – стратегия воздействия на стареющие клетки – основана на применении биологически активных субстанций, снижающих их преобразование в SAS-фенотип [18]. В качестве сенолитических препаратов (сенолитиков), которые избирательно убивают стареющие клетки, используются белки, блокирующие апоптоз, а также ингибиторы протеинов, способствующих выживанию стареющих клеток, например тирозинкиназа [3, 28]. Сеноморфики нацелены на подавление функций клеток, связанных с провоспалительной паракринной сигнализацией и повреждением тканей. Эксперименты по исследованию системного воздействия сенолитиков и сеноморфиков продемонстрировали благоприятное воздействие на показатели здоровья и функции скелетных мышц (рис. 2) [3].

Большинство сенолитиков, идентифицированных на сегодняшний день, способствуют апоптозу стареющих клеток, воздействуя на критические белки, участвующие в механизмах выживания и антиапоптоза [75]. Многие из идентифицированных сенолитиков проявляют специфичность к определенным типам или субпопуляциям стареющих клеток. Несмотря на эту гетерогенность, сенолитики продемонстрировали способность облегчать многие хронические заболевания, такие как атеросклероз и другие сердечно-сосудистые дисфункции, фиброз печени, функцию стволовых клеток и другие, наряду с сопутствующим увеличением продолжительности здоровой жизни [75]. Первым поколением сенолитиков являются ингибиторы протеинов семейства Bcl-2, которые вызывают апоптоз стареющих клеток, но некоторые из них обладают побочными эффектами на тромбоциты и нейтрофилы, что может ограничивать их использование в клинике. Семейство шаперонных белков теплового шока 90 (HSP90) играет ключевую роль в стабилизации и деградации протеинов, многие из которых участвуют в пролиферации клеток, ангиогенезе и онкогенезе [75]. Некоторые из ингибиторов HSP90, включая 17-DMAG (альверинимин), гелданамицин и 17-AAG (танесипимин), проявляют сенолитическую активность в вызванных окислительным стрессом стареющих фибробластах и эндотелиоцитах. Сенолитический пептид FOXO4-D-ретро-инверсо (FOXO4-DRI), который нарушает взаимодействие транскрипционного фактора белка O4 (FOXO4) с ядерным белком p53 при его перемещении в цитозоль, вызывает апоптоз клеток. Показано, что мишенью дазатиниба является тирозинкиназа (BCR-ABL, SRC, c-KIT) рецепторов эфрина A и тромбоцитарного фактора роста- β 94, тогда как растительный флавонол кверцетин относится к деактиваторам киназы PI3K и серпинов [71]. При действии этих препаратов подавляется активность молекул – регуляторов старения клеток. Показано, что однократная доза дазатиниба и кверцетина снизила экспрессию маркера старения p16 в четырехглавой мышце мышей и улучшила физическую активность на беговой дорожке через 5 дней и 7 месяцев после введения [28]. В контексте

хронологического старения мыши в возрасте от 20 до 24 месяцев, получавшие этот сенолитический коктейль, по сравнению с животными, принимавшими плацебо, показали лучшие результаты по показателям мышечной выносливости (тест на подвешивание), работоспособности на беговой дорожке и силы захвата [18]. Аналогичным образом оценивались 20-месячные мыши, получавшие в течение 8 недель специфичное для старения соединение 1 (SSK1), мишенью которого является лизосомальный фермент SA- β gal. Эти животные демонстрировали более высокие работоспособность, координацию, равновесие и мышечную силу по сравнению с мышами, принимавшими плацебо [76]. Лечение предшественником фермента NAD⁺ никотинамидрибозидом старых мышей предотвращало старение миоцитов и снижало выработку провоспалительных цитокинов SAS-фенотипом [5]. Однако в перечисленных исследованиях не анализировалась масса скелетных мышц и особенности молекулярного и морфологического фенотипа старения или их резидентных клеток. Доказательства влияния сенолитиков на молекулярный фенотип скелетных мышц приведены в эксперименте на старых мышцах (возраст 21–22 месяца), получавших сенолитический препарат ABT263 в течение четырех недель [77]. Под действием препарата повышался процент положительных p16 сателлитных клеток и, напротив, снижалось количество двухпочечных разрывов ДНК в них. Интересен низкомолекулярный пептид сенолитик FoxO4-DRI, который блокирует взаимодействие фактора транскрипции FoxO4 с p53 и преимущественно воздействует на стареющие клетки, что указывает на возможность оценки его эффективности при саркопенической потере мышечной массы [78]. Увеличение экспрессии фактора транскрипции Slug или гена белка p16 рассматривается как потенциальное лечение саркопении, тем не менее при реализации таких стратегий ингибирование функций супрессора опухолей p16 требует осторожности [26].

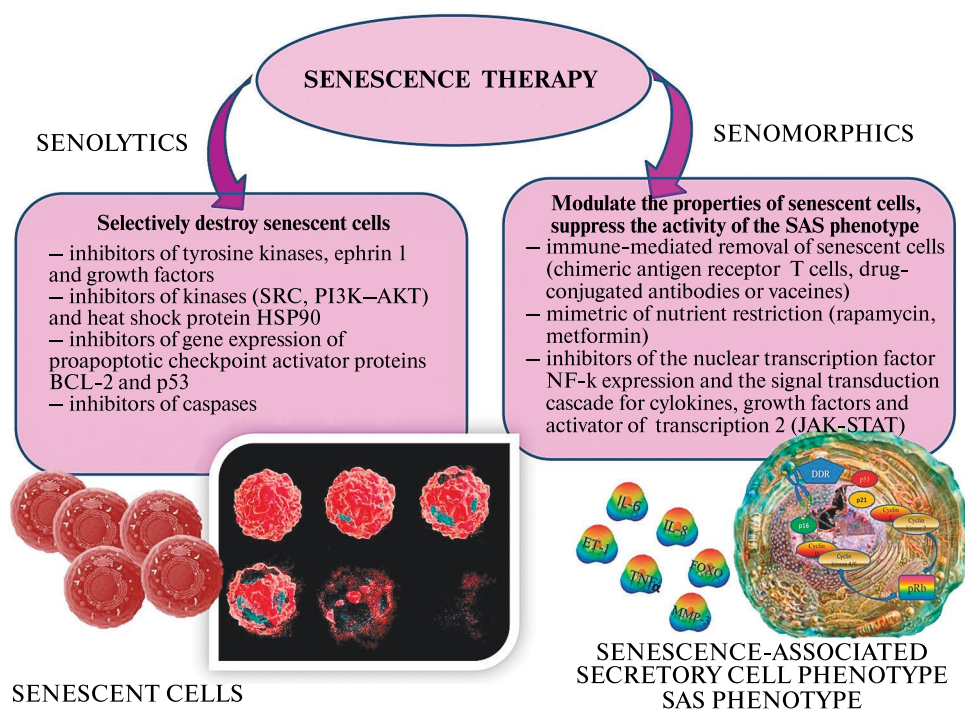


Рис. 2. Механизмы действия препаратов сеноцентной терапии на функциональное состояние скелетных мышц.

Подгруппа препаратов-сеноморфиков подавляет формирование фенотипов старения клеток, включая SAS (рис. 2). Например, ингибитор тирозинкиназы JAK 1/2 (руксолитиниб, INCB18424), которая необходима для синтеза цитокинов I и II типа, блокирует внутриклеточную сигнальную систему JAK/STAT и подавляет воспаление, связанное со стареющими клетками [18]. Показано, что этот препарат влияет на параметры физической функции, выносливости в подвешивании и силы захвата старых мышечных (24-месячных) [18]. У этих животных отмечается снижение концентрации циркулирующих провоспалительных цитокинов и хемокинов. Введение сеноморфного средства MAVp1 предотвращает прогрессирование саркопении путем нейтрализации цитокина IL-1 α , лечение нейтрализующим антителом против IL-6 показало снижение индуцированной старением экспрессии IL-17a [79]. С возрастом на стадии инициации саркопении повышается уровень указанных цитокинов, и воздействие указанными препаратами может снизить риск развития воспаления и заболевания. При системном введении мышам навитоклакса (ингибитор проапоптотических белков Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-w) при потере объема мышц через 4 недели снижалось количество стареющих клеток SAS-фенотипа (особенно связанных с IL-17) и предотвращалось дальнейшее повреждение тканей [79]. Это исследование подчеркнуло эффективность комбинированной терапии сенолитиками и сеноморфами (навитоклакс + нейтрализующие антитела против IL17a/f), иллюстрируя, что сочетание этих методов терапии, нацеленных на стареющие клетки, уменьшает повреждение тканей [65, 79]. Такие данные свидетельствуют, что сенолечение улучшает параметры мышечной производительности и физической функции. Остается неясным, опосредованы ли эти эффекты системным снижением количества стареющих клеток и концентраций циркулирующих продуктов SAS-фенотипов и/или локальным воздействием в скелетных мышцах [65].

Существуют и другие методы лечения, направленные на факторы, вызывающие старение. Так, необходима разработка целевых вмешательств, мишенью которых является улучшение митохондриальной функции, что необходимо для предотвращения саркопении и сохранения здоровья мышц у стареющей популяции населения [65]. Показано, что лечение пациентов фракцией, богатой жирорастворимыми витаминами группы E, токотриенолом, останавливает старение и преобразование в SAS-фенотип миоцитов, обеспечивая мышечные клетки регенеративной способностью и содействуя восстановлению мышечной массы [80, 81]. Появились исследования, где рассматриваются микроРНК, которые связаны с ключевыми факторами, вызывающими старение сателлитных клеток, такими как связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 5 (Igfbp5), молекулы пути сигнализации Wnt-3 α и нарушения регуляции AMPK/SIRT1 [82]. Хотя эти методы лечения, нацеленные на микроРНК, в доклинических испытаниях показали многообещающие результаты, необходимы дальнейшие исследования оценки их эффективности в предотвращении патологического старения, снижения потери мышечной массы при саркопении и содействии регенерации мышц. Нельзя не упомянуть методы клеточных технологий – так, трансплантация функциональных стареющих мезенхимальных стромальных клеток (МСК), обработанных экстрактом плаценты, способствовала регенерации мышц у мышечной модели хронической воспалительной миопатии [24, 27]. Трансплантация таких МСК, обладающих способностью формировать FAP-фенотип с повышенными свойствами привлекать фагоциты и пролиферацией, оказывает влияние на окружающие ткани с повышением их регенерации [24]. В совокупности результаты этих исследований свидетельствуют о том, что сенолечение представляет новую стратегию регулирования мышечного воспаления и регенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологический прогресс биомедицинских исследований позволил представить подробный анализ склонных к старению различных популяций клеток мышечной ткани и определить роль этого явления при возрастных изменениях, возникновении и развитии воспаления и миопатий. Современные методы секвенирования мРНК отдельных клеток, ядер и цитометрия с иммуоцитохимической визуализацией идентифицировали основные свойства стареющих клеток, включая маркеры повреждения ДНК, ингибиторы циклинзависимой киназы, SAS-фенотип и антиапоптотические пути. Исходя из вышеизложенного, можно выделить несколько ключевых позиций. Во-первых, снижение мышечной массы и функции, связанное с возрастом (саркопения), происходит на фоне нарушения регенеративного потенциала, которое обусловлено прогрессирующей заменой мышечной ткани фиброзной и жировой. Во-вторых, старение клеток и возникновение SAS-фенотипа является основным фактором патофизиологии указанных возрастных изменений скелетных мышц. На это указывают сведения многих исследований, где приведены данные о влиянии накопления таких клеток и SAS-фенотипа на здоровье мышц, ускоряя их старение и усугубляя дегенеративные состояния. Так, на фоне уменьшения общего количества появляются миосателлитные клетки секреторного SAS-фенотипа с митохондриальной дисфункцией, которые оказывают патологическое влияние на пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток, что индуцирует дефектное восстановление мышц с формированием фиброзной и жировой ткани и атрофией миофибрилл. В-третьих, процесс старения скелетных мышц сложен и многогранен, и на него оказывают влияние иммуностарение, эпигенетические факторы и микробиом. В зависимости от характера воздействия в процессе старения клетки, по-видимому, принимают специфические фенотипические и функциональные свойства, указывающие на высокогетерогенную клеточную популяцию. Гетерогенность таких клеток и динамический переход от физиологической к компенсаторной или патологической субпопуляции представляются актуальным направлением для изучения в будущих исследованиях. В-четвертых, несомненно, новые терапевтические стратегии, направленные на удаление стареющих клеток или модуляцию их сигнальных путей, представляют собой многообещающий подход к лечению саркопии. Однако понимание основных механизмов остается неполным, что затрудняет разработку точных и целенаправленных вмешательств. Так, существуют определенные ограничения, включая изменчивость экспериментальных моделей и сложность переноса результатов таких исследований на человеческий организм, кроме того, на надежность биомаркеров старения могут влиять неспецифические факторы. В настоящее время клинические исследования на людях ограничены по причине сложности получения биопсий мышц, что указывает на необходимость разработки неинвазивных или минимально инвазивных методов, например флюксомики (определение маркеров скорости синтеза мышечного белка в слюне). Также существенное дополнение для выявления ранних прогностических биомаркеров риска саркопии внесли бы данные продольных мониторинговых исследований, охватывающих возраст, пол и расу обследуемых лиц. Требуется более строгая характеристика маркеров старения мышечных волокон, резидентных популяций клеток, особенно постмитотических. Так, остается неисследованной причинно-следственная связь между повышением количества стареющих клеток и патологией мышц. Подобные исследования позволят дополнить понимание потенциально негативного и полезного воздействия стареющих клеток на физиологию скелетных мышц, раскрыть сигнальные пути межклеточных взаимодействий и выявить дополнительные мишени для антинесенесцентной терапии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идеология, анализ, редактирование рукописи, общее руководство (Н. Г. П., В. Б. Ш.), методология, перевод статей (П. А. Н., А. Н. В., Д. В. К.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания “Структурные и клеточно-молекулярные механизмы возрастного ремоделирования соединительной ткани при заболеваниях опорно-двигательного аппарата” № 056-00055-24-00 от 14.01.2024 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arosio B, Calvani R, Ferri E, Coelho-Junior HJ, Carandina A, Campanelli F, Ghiglieri V, Marzetti E, Picca A (2023) Sarcopenia and cognitive decline in older adults: targeting the muscle-brain axis. *Nutrients* 15(8): 1853. <https://doi.org/10.3390/nu15081853>
2. Dao T, Green AE, Kim YA, Bae SJ, Ha KT, Gariani K, Lee MR, Menzies KJ, Ryu D (2020) Sarcopenia and muscle aging: a brief overview. *Endocrinol Metab (Seoul)* 35(4): 716–732. <https://doi.org/10.3803/EnM.2020.405>
3. Englund DA, Zhang X, Aversa Z, LeBrasseur NK (2021) Skeletal muscle aging, cellular senescence, and senotherapeutics: Current knowledge and future directions. *Mech Ageing Dev* 200: 111595. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111595>
4. Marzetti E, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Landi F, Picca A (2024) Mitochondrial quantity and quality in age-related sarcopenia. *Int J Mol Sci* 25(4): 2052. <https://doi.org/10.3390/ijms25042052>
5. Zhang L, Pitcher LE, Yousefzadeh MJ, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Zhu Y (2022) Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *J Clin Invest* 132(15): e158450. <https://doi.org/10.1172/JCI158450>
6. Rex N, Melk A, Schmitt R (2023) Cellular senescence and kidney aging. *Clin Sci (Lond)* 137(24): 1805–1821. <https://doi.org/10.1042/CS20230140>
7. Melo Dos Santos LS, Trombetta-Lima M, Eggen B, Demaria M (2024) Cellular senescence in brain aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 93: 102141. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102141>
8. De Magalhães JP (2024) Cellular senescence in normal physiology. *Science* 384(6702): 1300–1301. <https://doi.org/10.1126/science.adj7050>
9. Aversa Z, Zhang X, Fielding RA, Lanza I, LeBrasseur NK (2019) The clinical impact and biological mechanisms of skeletal muscle aging. *Bone* 127: 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.05.021>
10. Игрункова АВ, Валиева ЯМ, Калининченко АМ, Курков АВ, Попова КЮ, Шестаков ДЮ, Заборова ВА (2022) Клеточное старение: молекулярный и морфологический аспекты. *Мол мед* 20(4): 16–21. [Igrunkova AV, Valieva YaM, Kalinichenko AM, Kurkov AV, Popova KYu, Shestakov DYU, Zaborova VA (2022) Cellular senescence: molecular and morphological aspects. *Mol Med* 20(4): 16–21. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29296/24999490-2022-04-03>

11. *Pabla P, Jones EJ, Piasecki M, Phillips BE* (2024) Skeletal muscle dysfunction with advancing age. *Clin Sci (Lond)* 138(14): 863–882.
<https://doi.org/10.1042/CS20231197>
12. *Brooks SV, Guzman SD, Ruiz LP* (2023) Skeletal muscle structure, physiology, and function. *Handb Clin Neurol* 195: 3–16.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98818-6.00013-3>
13. *Granic A, Martin-Ruiz C, Dodds RM, Robinson L, Spyridopoulos I, Kirkwood TB, von Zglinicki T, Sayer AA* (2020) Immuno profiles are not associated with muscle strength, physical performance and sarcopenia risk in very old adults: the Newcastle 85+ study. *Mech Ageing Dev* 190: 111321.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111321>
14. *Park J, Shin DW* (2022) Senotherapeutics and their molecular mechanism for improving aging. *Biomol Ther (Seoul)* 30(6): 490–500.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.114>
15. *Falvino A, Gasperini B, Cariati I, Bonanni R, Chiavoghilefu A, Gasbarra E, Botta A, Tancredi V, Tarantino U* (2024) Cellular senescence: the driving force of musculoskeletal diseases. *Biomedicines* 12(9): 1948.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12091948>
16. *Moiseeva V, Cisneros A, Sica V, Deryagin O, Lai Y, Jung S, Andres E, An J, Segales J, Ortet L, Lukesova V, Volpe G, Benguria A, Dopazo A, Benitah SA, Urano Y, Del Sol A, Esteban MA, Ohkawa Y, Serrano AL, Perdiguero E, Munoz-Canoves P* (2023) Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration. *Nature* 613: 169–178.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05535-x>
17. *Burton DGA, Stolzing A* (2018) Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Res Rev* 43: 17–25.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.02.001>
18. *Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer A, Weivoda MM, Inman CL, Ogrodnik M, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, Langhi LGP, Weigl M, Giorgadze N, LeBrasseur NK, Miller JD, Jurk D, Singh RJ, Allison DB, Ejima K, Hubbard GB, Saito Y, Chikenji TS* (2021) Diverse Roles of Cellular Senescence in skeletal muscle inflammation, regeneration, and therapeutics. *Front Pharmacol* 12: 739510.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.739510>
19. *Cai Y, Han Z, Cheng H, Li H, Wang K, Chen J, Liu ZX, Xie Y, Lin Y, Zhou S, Wang S, Zhou X, Jin S* (2024) The impact of ageing mechanisms on musculoskeletal system diseases in the elderly. *Front Immunol* 15: 1405621.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1405621>
20. *Dungan CM, Peck BD, Walton RG, Huang Z, Bamman MM, Kern PA, Peterson CA* (2020) In vivo analysis of γ H2AX⁺ cells in skeletal muscle from aged and obese humans. *Faseb J* 34: 7018–7035.
<https://doi.org/10.1096/fj.202000111rr>
21. *Larijani B, Foroughi-Heravani N, Alaei S, Rezaei-Tavirani M, Alavi-Moghadam S, Payab M, Goodarzi P, Tayanloo-Beik A, Aghayan HR, Arjmand B* (2021) Opportunities and challenges in stem cell aging. *Adv Exp Med Biol* 1341: 143–175.
https://doi.org/10.1007/5584_2021_624
22. *Sousa-Victor P, Gutarra S, Garcia-Prat L, Rodriguez-Ubreva J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jordi M, Ballestar E, Gonzalez S, Serrano AL, Perdiguero E, Munoz-Canoves P* (2014) Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506: 316–321.
<https://doi.org/10.1038/nature13013>
23. *Sousa-Victor P, Garcia-Prat L, Munoz-Canoves P* (2022) Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 204–226.
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00421-2>
24. *Chikenji TS, Saito Y, Konari N, Nakano M, Mizue Y, Otani M, Fujimiya M* (2019) p16INK4A-expressing mesenchymal stromal cells restore the senescence-clearance-regeneration sequence that is impaired in chronic muscle inflammation. *Ebiomedicine* 44: 86–97.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.012>
25. *Mu X, Tang Y, Lu A, Takayama K, Usas A, Wang B, Weiss K, Huard J* (2015) The role of notch signaling in muscle progenitor cell depletion and the rapid onset of histopathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 24: 2923–2937.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv055>

26. Sousa-Victor P, Perdiguero E, Munoz-Canoves P (2014) Geroconversion of aged muscle stem cells under regenerative pressure. *Cell Cycle* 13: 3183–3190.
<https://doi.org/10.4161/15384101.2014.965072>
27. Saito Y, Chikenji TS (2021) Diverse Roles of Cellular Senescence in Skeletal Muscle Inflammation, Regeneration, and Therapeutics. *Front Pharmacol* 12: 739510.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.739510>
28. Zhu P, Zhang C, Gao Y, Wu F, Zhou Y, Wu WS (2019) The transcription factor Slug represses p16Ink4a and regulates murine muscle stem cell aging. *Nat Commun* 10: 2568.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10479-4>
29. Kudryashova E, Kramerova I, Spencer MJ (2012) Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J Clin Invest* 122: 1764–1776.
<https://doi.org/10.1172/jci59581>
30. Sugihara H, Teramoto N, Nakamura K, Shiga T, Shirakawa T, Matsuo M, Ogasawara M, Nishino I, Matsuwaki T, Nishihara M, Yamanouchi K (2020) Cellular senescence-mediated exacerbation of duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* 10: 16385.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73315-6>
31. Alcalde-Estévez E, Asenjo-Bueno A, Sosa P, Olmos G, Plaza P, Caballero-Mora MA, Rodríguez-Puyol D, Ruiz-Torres MP, López-Ongil S (2020) Endothelin-1 induces cellular senescence and fibrosis in cultured myoblasts. A potential mechanism of aging-related sarcopenia. *Aging* 12: 11200–11223.
<https://doi.org/10.18632/aging.103450>
32. Yu S, Ren B, Chen H, Goltzman D, Yan J, Miao D (2021) 1,25-Dihydroxyvitamin D deficiency induces sarcopenia by inducing skeletal muscle cell senescence. *Am J Transl Res* 13: 12638–12649.
<https://doi.org/10.18632/aging.103450>
33. Moustogiannis A, Philippou A, Taso O, Zevolis E, Pappa M, Chatzigeorgiou A, Koutsilieris M (2021) The effects of muscle cell aging on myogenesis. *Int J Mol Sci* 22: 3721.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073721>
34. Scott RW, Arostegui M, Schweitzer R, Rossi FMV, Underhill TM (2019) Hic1 Defines Quiescent Mesenchymal Progenitor Subpopulations with Distinct Functions and Fates in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell* 25(6): 797–813e9.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.004>
35. Theret M, Rossi FMV, Contreras O (2021) Evolving roles of muscle-resident fibro-adipogenic progenitors in health, regeneration, neuromuscular disorders, and aging. *Front Physiol* 12: 673404.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.673404>
36. Giuliani G, Rosina M, Reggio A (2022) Signaling pathways regulating the fate of fibro/adipogenic progenitors (FAPs) in skeletal muscle regeneration and disease. *FEBS J* 289(21): 6484–6517.
<https://doi.org/10.1111/febs.16080>
37. Farup J, Madaro L, Puri PL, Mikkelsen UR (2015) Interactions between muscle stem cells, mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease. *Cell Death Dis* 6(7): e1830.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2015.198>
38. Francis TG, Jaka O, Harridge SDR, Ellison-hughes GM, Lazarus NR (2022) Human primary skeletal muscle-derived myoblasts and fibroblasts reveal different senescent phenotypes. *JCSM Rapid Commun* 5: 226–238.
<https://doi.org/10.1002/rco2.67>
39. Molina T, Fabre P, Dumont NA (2021) Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol* 11(12): 210110.
<https://doi.org/10.1098/rsob.210110>
40. Vumbaca S, Giuliani G, Fiorentini V, Tortolici F, Cerquone Perpetuini A, Riccio F, Sennato S, Gargioli C, Fuoco C, Castagnoli L, Cesareni G (2021) Characterization of the skeletal muscle secretome reveals a role for extracellular vesicles and IL1 α /IL1 β in restricting fibro/adipogenic progenitor adipogenesis. *Biomolecules* 11(8): 1171.
<https://doi.org/10.3390/biom11081171>
41. Riparini G, Simone JM, Sartorelli V (2022) FACS-isolation and culture of fibro-adipogenic progenitors and muscle stem cells from unperturbed and injured mouse skeletal muscle. *J Vis Exp* 184: 10.3791/63983.
<https://doi.org/10.3791/63983>

42. Rathnayake D, Nguyen PD, Rossello FJ, Wimmer VC, Tan JL, Galvis LA, Julier Z, Wood AJ, Boudier T, Isiaku AI, Berger S, Oorschot V, Sonntag C, Rogers KL, Marcelle C, Lieschke GJ, Martino MM, Bakkers J, Currie PD (2021) Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature* 591: 281–287.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03199-7>
43. Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D (2016) Poor repair of skeletal muscle in aging mice reflects a defect in local, interleukin-33-dependent accumulation of regulatory T cells. *Immunity* 44: 355–367.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.009>
44. Baker DJ, Weaver RL, van Deursen JM (2013) p21 both attenuates and drives senescence and aging in BubR1 progeroid mice. *Cell Rep* 3: 1164–1174.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.028>
45. Chiche A, Le Roux I, von Joest M, Sakai H, Aguin SB, Cazin C, Salam R, Fiette L, Alegria O, Flamant P, Tajbakhsh S, Li H (2017) Injury-induced senescence enables in vivo reprogramming in skeletal muscle. *Cell Stem Cell* 20: 407–414e4.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.020>
46. Murach KA, Dimet-Wiley AL, Wen Y, Brightwell CR, Latham CM, Dungan CM, Fry CS, Watowich SJ (2022) Late-life exercise mitigates skeletal muscle epigenetic aging. *Aging Cell* 21(1): e13527.
<https://doi.org/10.1111/acel.13527>
47. Liang W, Xu F, Li L, Peng C, Sun H, Qiu J, Sun J (2024) Epigenetic control of skeletal muscle atrophy. *Cell Mol Biol Lett* 29(1): 99.
<https://doi.org/10.1186/s11658-024-00618-1>
48. Liu JC, Dong SS, Shen H, Yang DY, Chen BB, Ma XY, Peng YR, Xiao HM, Deng HW (2022) Multi-omics research in sarcopenia: Current progress and future prospects. *Ageing Res Rev* 76: 101576.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101576>
49. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 49(2): 359–367.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
50. Horvath S (2015) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14(10): R115.
<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
51. Moresi V, Marroncelli N, Coletti D, Adamo S (2015) Regulation of skeletal muscle development and homeostasis by gene imprinting, histone acetylation and microRNA. *Biochim Biophys Acta* 1849(3): 309–316.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.01.002>
52. Buonaiuto G, Desideri F, Taliani V, Ballarino M (2021) Muscle Regeneration and RNA: New Perspectives for Ancient Molecules. *Cells* 10(10): 2512.
<https://doi.org/10.3390/cells10102512>
53. Liu Z, Liang Q, Ren Y, Guo C, Ge X, Wang L, Cheng Q, Luo P, Zhang Y, Han X (2023) Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 8(1): 200.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01451-2>
54. Barbé-Tuana F, Funchal G, Schmitz CRR, Maurmann RM, Bauer ME (2020) The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Semin Immunopathol* 42(5): 545–557.
<https://doi.org/10.1007/s00281-020-00806-z>
55. Yousefzadeh MJ, Flores RR, Zhu Y, Schmiechen ZC, Brooks RW, Trussoni CE, Cui Y, Angelini L, Lee KA, McGowan SJ, Burrack AL, Wang D, Dong Q, Lu A, Sano T, O'Kelly RD, McGuckian CA, Kato JI, Bank MP, Wade EA, Pillai SPS, Klug J, Ladiges WC, Burd CE, Lewis SE, LaRusso NF, Vo NV, Wang Y, Kelley EE, Huard J, Stromnes IM, Robbins PD, Niedernhofer LJ (2021) An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature* 594: 100–105.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>
56. Ming GF, Wu K, Hu K, Chen Y, Xiao J (2016) NAMPT regulates senescence, proliferation, and migration of endothelial progenitor cells through the SIRT1 AS lncRNA/miR-22/SIRT1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 478: 1382–1388.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.133>
57. Strasser B, Wolters M, Weyh C, Krüger K, Ticinesi A (2021) The effects of lifestyle and diet on gut microbiota composition, inflammation and muscle performance in our aging society. *Nutrients* 13(6): 2045.
<https://doi.org/10.3390/nu13062045>

58. *Ticinesi A, Nouvenne A, Cerundolo N, Catania P, Prati B, Tana C, Meschi T* (2019) Gut microbiota, muscle mass and function in aging: a focus on physical frailty and sarcopenia. *Nutrients* 11(7): 1633.
<https://doi.org/10.3390/nu11071633>
59. *Liu C, Cheung WH, Li J, Chow SK, Yu J, Wong SH, Ip M, Sung JJY, Wong RMY* (2021) Understanding the gut microbiota and sarcopenia: a systematic review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 12(6): 1393–1407.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12784>
60. *Grahnmemo L, Nethander M, Coward E, Gabrielsen ME, Sree S, Billod JM, Sjögren K, Engstrand L, Dekkers KF, Fall T, Langhammer A, Hveem K, Ohlsson C* (2023) Identification of three bacterial species associated with increased appendicular lean mass: the HUNT study. *Nat Commun* 14(1): 2250.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37978-9>
61. *Granic A, Sayer AA, Jurk D, Lanza IR, Khosla S, Fielding RA, Nair KS, Schafer MJ, Passos JF, LeBrasseur NK* (2022) Characterization of cellular senescence in aging skeletal muscle. *Nat Aging* 2: 601–615.
<https://doi.org/10.1038/s43587-022-00250-8>
62. *Fielding RA, Atkinson EJ, Aversa Z, White TA, Heeren AA, Achenbach SJ, Mielke MM, Cummings SR, Pahor M, Leeuwenburgh C, LeBrasseur NK* (2022) Associations between biomarkers of cellular senescence and physical function in humans: Observations from the lifestyle interventions for elders (LIFE) study. *Geroscience* 44: 2757–2770.
<https://doi.org/10.1007/s11357-022-00685-2>
63. *Gerosa L, Malvandi AM, Malavolta M, Provinciali M, Lombardi G* (2023) Exploring cellular senescence in the musculoskeletal system: Any insights for biomarkers discovery? *Ageing Res Rev* 88: 101943.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101943>
64. *Da Silva PFL, Ogrodnik M, Kucheryavenko O, Glibert J, Miwa S, Cameron K, Ishaq A, Saretzki G, Nagaraja-Grellscheid S, Nelson G, von Zglinicki T* (2019) The bystander effect contributes to the accumulation of senescent cells in vivo. *Aging Cell* 18: e12848.
<https://doi.org/10.1111/acel.12848>
65. *Wan M, Gray-Gaillard EF, Elisseeff JH* (2021) Cellular senescence in musculoskeletal homeostasis, diseases, and regeneration. *Bone Res* 9(1): 41.
<https://doi.org/10.1038/s41413-021-00164-y>
66. *Mijares A, Allen PD, Lopez JR* (2021) Senescence is associated with elevated intracellular resting $[Ca^{2+}]$ in mice skeletal muscle fibers. An in vivo study. *Front Physiol* 11: 601189.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.601189>
67. *Kumari R, Jat P* (2021) Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol* 29(9): 645593.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
68. *Hall BM, Balan V, Gleiberman AS* (2016) Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and beta-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY)* 8(7): 1294–1315.
<https://doi.org/10.18632/aging.100991>
69. *Alsharidah M, Lazarus NR, George TE, Agley CC, Velloso CP, Harridge SD* (2013) Primary human muscle precursor cells obtained from young and old donors produce similar proliferative, differentiation and senescent profiles in culture. *Aging Cell* 12: 333–344.
<https://doi.org/10.1111/acel.12051>
70. *Sugihara H, Teramoto N, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M* (2018) Oxidative stress-mediated senescence in mesenchymal progenitor cells causes the loss of their fibro/adipogenic potential and abrogates myoblast fusion. *Aging* 10: 747–763.
<https://doi.org/10.18632/aging.101425>
71. *Zhu S, Tian Z, Torigoe D, Zhao J, Xie P, Sugizaki T, Sato M, Horiguchi H, Terada K, Kadomatsu T, Miyata K, Oike Y* (2019) Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy. *PLoS One* 14(8): e0221366.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221366>
72. *Tezze C, Romanello V, Desbats MA, Fadini GP, Albiero M, Favaro G, Ciciliot S, Soriano ME, Morbidoni V, Cerqua C, Loefer S, Kern H, Franceschi C, Salvioli S, Conte M, Blaauw B, Zampieri S, Salviati L, Scorrano L, Sandri M* (2017) Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab* 5(6): 1374–1389.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.021>

73. *Chen XK, Yi ZN, Wong GTC, Hasan KMM, Kwan JSK, Ma ACH, Chang RC* (2021) Is exercise a senolytic medicine? A Systematic Review. *Aging Cell* 20: e13294.
<https://doi.org/10.1111/accel.13294>
74. *Tieland M, Trouwborst I, Clark BC* (2018) Skeletal muscle performance and ageing. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9(1): 3–19.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12238>
75. *Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD* (2023) Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J* 290(5): 1362–1383.
<https://doi.org/10.1111/febs.16350>
76. *Cai Y, Zhou H, Zhu Y, Sun Q, Ji Y, Xue A, Wang Y, Chen W, Yu X, Wang L, Chen H, Li C, Luo T, Deng H* (2020) Elimination of senescent cells by beta-galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res* 30: 574–589.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0314-9>
77. *Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, Krager K, Ponnappan U, Hauer-Jensen M, Meng A, Zhou D* (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22: 78–83.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0314-9>
78. *Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, van IJcken WF, Houtsmuller AB, Pothof J, de Bruin RWF, Madl T, Hoeijmakers JHJ, Campisi J, de Keizer PLJ* (2017) Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 169(1): 132–147.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.02.031>
79. *Chung L, Maestas DR Jr, Lebid A, Mageau A, Rosson GD, Wu X, Wolf MT, Tam AJ, Vanderzee I, Wang X, Andorko JI, Zhang H, Narain R, Sadtler K, Fan H, Čiháková D, Le Saux CJ, Housseau F, Pardoll DM, Elisseeff JH* (2020) Interleukin 17 and senescent cells regulate the foreign body response to synthetic material implants in mice and humans. *Sci Transl Med* 2(539): eaax3799.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax3799>
80. *Khor SC, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA, Abdul Karim N, Makpol S* (2017) Tocotrienol-rich fraction ameliorates antioxidant defense mechanisms and improves replicative senescence-associated oxidative stress in human myoblasts. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 3868305.
<https://doi.org/10.1155/2017/3868305>
81. *Lim JJ, Wan Zurinah WN, Mouly V, Norwahidah AK* (2019) Tocotrienol-rich fraction (TRF) treatment promotes proliferation capacity of stress-induced premature senescence myoblasts and modulates the renewal of satellite cells: microarray analysis. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 9141343.
<https://doi.org/10.1155/2019/9141343>
82. *Yanai K, Kaneko S, Ishii H, Aomatsu A, Ito K, Hirai K, Ookawara S, Ishibashi K, Morishita Y* (2020) MicroRNAs in sarcopenia: a systematic review. *Front Med (Lausanne)* 7: 180.

Cellular Senescence in Skeletal Muscle:**Age, Sarcopenia, Therapy**

**N. G. Plekhova^{a,*}, P. A. Novikova^a, A. N. Voronova^a, D. V. Korolev^a,
and V. B. Shumatov^a**

^aPacific State Medical University, Vladivostok, Russia

**e-mail: pl_nat@hotmail.com*

Progressive age-related decline in skeletal muscle mass, strength, and function results in muscle fiber loss and atrophy, with associated replacement by adipose and fibrous tissue, or sarcopenia. Muscles are subject to multiple forms of molecular and cellular damage, including impaired regenerative capacity, protein turnover, mitochondrial dysfunction, and cellular senescence, which manifests as cell cycle arrest. With age, these cells accumulate and acquire distinctive properties characterized by chromatin changes and the emergence of a specific secretory senescence-associated phenotype (SAS phenotype), which exerts local and/or systemic negative effects on organism tissues. The aim of this review is to present the cellular senescence landscape in the skeletal muscle based on the evidence for their role in age-related changes in muscle mass, strength, function, and clinical consequences of this phenomenon, denoting key directions for the development of new senescence-based therapies for sarcopenia. Methods: Inclusion criteria: randomized or non-randomized controlled trials investigating the role of cellular senescence in age-related changes and pathophysiology of skeletal muscles. Data were searched in the electronic scientific databases Google Scholar, Medline, PubMed, Scopus, Web of Science and Cochrane Library by keywords and their combinations using the AMSTAR 2 program. The selection of publications (82 included out of 430) was randomly performed, after which their methodological quality was independently assessed by the authors. The crucial role of cellular senescence with the formation of the secretory phenotype associated with aging (SAS phenotype) in the age-related pathophysiology of skeletal muscles has been proven. These phenomena alter muscle tissue homeostasis and contribute to the occurrence and progression of sarcopenia. The impact on senescent cells and their secretory profiles can contribute to the development of complex strategies, including the use of senolytics and senomorphs to improve the quality of life of older adults. On the other hand, currently, there is a lack of data on the vulnerability to aging of terminally differentiated skeletal muscle fibers and resident mononuclear cells of the interstitial microenvironment. There are different opinions on the contribution of this event to the onset and progression of age-related skeletal muscle mass loss and dysfunction, as well as the initiation of sarcopenia. Scientific advances in the study of cellular senescence will allow us to identify new therapeutic approaches to optimize muscle health in old age.

Keywords: cellular aging, skeletal muscles, myocytes, age-related diseases, sarcopenia, therapy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2025 г. И. Г. Шалагинова^{1,2,*}, Д. С. Кацеров¹, К. О. Энш¹, Е. А. Буденкова¹,

А. К. Прибышина², Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

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

*E-mail: shalaginova_i@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2025 г.

После доработки 29.04.2025 г.

Принята к публикации 04.05.2025 г.

Предыдущие исследования показали, что две линии крыс, селектированные по порогу возбудимости нервной системы в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессирование, проявляют различия как на поведенческом, так и на нейробиологическом и молекулярно-генетическом уровнях, а также специфические изменения выявляются и в составе кишечного микробиома. Это указывает на потенциальную связь между генетическими факторами, микробиотой и нарушениями поведения. Целью данного исследования являлся анализ кишечной микробиоты и поведенческих профилей интактных крыс линий с высоким (ВП) и низким (НП) порогами возбудимости нервной системы для выявления ключевых различий, обусловленных их генетическими особенностями.

Поведение интактных крыс двух линий было проанализировано в тестах “Открытое поле” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”, анализ микробиоты в образцах стула проведен с использованием ампликонного секвенирования гена 16S рРНК. Поведенческий анализ показал, что высоковозбудимые крысы (линия НП) демонстрировали более высокую активность и менее выраженное замирание в приподнятом крестообразном лабиринте по сравнению с низковозбудимыми крысами (линия ВП). Показатели альфа-разнообразия микробиоты кишечника не различались между линиями, но анализ бета-разнообразия показал значимые различия в микробных профилях между линиями ВП и НП. Крысы линии НП имеют значимо более высокую по сравнению с линией ВП представленность родов *Lactobacillus* и *Faecalibacterium*, в то время как у крыс линии ВП выше относительная представленность родов *Romboutsia*, *Eubacterium* и *Turicibacter*. Интеграция данных о поведении и микробиоте выявляет потенциальную взаимосвязь между генетическими факторами, профилями кишечного микробиома и уникальными физиологическими и поведенческими характеристиками линий крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы.

Ключевые слова: микробиота кишечника, микробиом, ось “микробиота – кишечник – мозг”, возбудимость нервной системы, крысы, стресс

DOI: 10.7868/S2658655X25070037, **EDN:** MVMWNE

ВВЕДЕНИЕ

Изучение фундаментальных механизмов индивидуальной устойчивости/уязвимости к стрессорным воздействиям, лежащих в основе формирования постстрессорных психонейропатологий, является актуальной задачей современной нейробиологии и имеет важное клиническое значение. Моделями на животных для такого рода исследований являются линии крыс, селектированные по порогу возбудимости нервной системы, демонстрирующие значимые различия в поведенческих, биохимических, физиологических и микробиологических параметрах в ответ на стресс [1–4].

Высоковозбудимые (низкий порог, линия НП) крысы проявляют более выраженную и сложную динамику поведенческих реакций в ответ на хронический стресс по сравнению с низковозбудимыми (высокий порог, линия ВП) [1, 3]. Показано, что хронический стресс у крыс линий ВП и НП вызывает различную динамику изменений плотности нейронов в области СА3 гиппокампа – ключевой зоне, ответственной за процессы обучения и памяти [2]. Мы также продемонстрировали, что крысы с контрастной возбудимостью имеют различия в степени выраженности и динамике постстрессорного воспаления как в крови, так и в мозге [3, 5]. Оценка геномной нестабильности методом кометного фореза выявила межлинейные различия в реакциях на стресс в различных областях мозга [6]. Предварительные исследования микробиома показали, что постстрессорная динамика состава кишечной микробиоты также имеет линейную специфику: после длительного эмоционально-болевого стрессирования у крыс линии ВП наблюдалось увеличение относительной представленности бактерий родов *Faecalibacterium* и *Prevotella*, в то время как у крыс линии НП таких изменений не отмечалось [4]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что генетические особенности линий с контрастной возбудимостью могут влиять не только на нейрональные и поведенческие реакции, но и на формирование микробной композиции в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), что открывает новые перспективы для исследования оси “микробиота – кишечник – мозг”. Различия в регуляции экспрессии генов, связанных с иммунной функцией, способны опосредованно воздействовать на состав микробиоты [7]. Генетический фон может определять особенности моторики кишечника, секреции слизи и других физиологических параметров, создавая специфические ниши для определенных микробов [8]. Генетические различия могут влиять на метаболизм хозяина, что изменяет доступность субстратов для микробов и соответственно их состав. Есть данные, что генетические особенности хозяина могут объяснять до 10% вариативности бета-разнообразия микробиоты у здоровых людей [9].

Использование данных линий в качестве модельных объектов позволяет глубже понять механизмы взаимодействия генетических факторов, микробиоты, нейровоспаления и поведенческих нарушений в ответ на стресс.

Исследования на стерильных (germ-free, GF) мышах показали, что отсутствие микробной колонизации приводит к изменению нейрохимического профиля и поведения [10], а использование пробиотиков обладает потенциалом для модификации поведения и улучшения состояния при нейropsychических расстройствах [11], а также для коррекции поведенческих нарушений в моделях на животных [12].

Хотя в современных исследованиях оси “микробиота – кишечник – мозг” большое внимание уделяется анализу изменений микробиоты после экспериментальных воздействий, базовые характеристики микробиоты у контрольных или интактных животных зачастую остаются недостаточно детализированными [13]. Это усложняет интерпретацию данных при исследовании эффекта экспериментальных воздействий на микробную композицию, поскольку сравнение с “контролем” чаще всего основано на общих оценках, а не детализированных профилях. Без четко охарактеризованного “базового” состояния микробиоты и диапазона ее изменения критически важные

факторы, влияющие на экспериментальные результаты, такие как исходные различия между группами, могут быть упущены.

Целью настоящего исследования являлся анализ поведенческого профиля и состава кишечной микробиоты у интактных крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости нервной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В исследовании использовались 5-месячные самцы крыс двух линий, различающихся по уровню возбудимости периферической и центральной нервной системы [1]. Средняя масса тела животных в группах находилась в диапазоне 370–400 г и не различалась между линиями. В течение 80 поколений крыс селектировали по высокому (линия ВП) или низкому (линия НП) порогу возбудимости большеберцового нерва (*n. tibialis*) в ответ на электрическую стимуляцию. Для определения порога возбудимости большеберцового нерва у животных оценивали моторный ответ задней конечности, вводя активный электрод в икроножную мышцу и подавая одиночные прямоугольные импульсы длительностью 2 мс. Линии входят в состав биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ GZ 0134-2018-0003) и защищены патентами на селекционные достижения № 10769 и № 10768, выданными Государственной комиссией Российской Федерации, регистрация в Государственном реестре охраняемых селекционных достижений от 15 января 2020 г.

Все животные содержались в одном виварии в стандартных условиях и получали гранулированный корм промышленного производства, удовлетворяющий их пищевые потребности. Корм содержал 18–24% белков, 40–70% углеводов и 4–9% жиров, а также необходимые витамины и минералы. Водопроводная отфильтрованная вода предоставлялась без ограничений. Животные содержались при стандартном световом режиме (12 : 12, свет : темнота) с началом светового периода в 8:00.

Поскольку тесты “Открытое поле” (ОП), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), а также манипуляции при сборе фекалий могут вызывать стрессовую реакцию, для исключения перекрестного влияния между поведенческими тестами и анализом микробиоты были сформированы две независимые группы животных: одна – для поведенческого анализа ($n = 22$), другая – для исследования состава кишечной микробиоты ($n = 40$). Все процедуры проводились в рамках одного периода времени при идентичных условиях содержания, что обеспечивает сопоставимость групп по экспериментальным параметрам при сохранении независимости исследуемых показателей от проводимых процедур.

Поведенческие тесты

Все поведенческие тесты проводились в период с 12:00 до 16:00. В качестве дезинфицирующего средства в поведенческих установках использовали 70%-ный этанол. В тесте ПКЛ оценивали следующие параметры: время, проведенное в открытых и закрытых рукавах лабиринта, количество заходов в центр, время, проведенное в центре, и время замирания.

Локомоторная активность измерялась в тесте ОП (диаметр 1.5 м, высота 40 см). Анализировали следующие параметры: длительность неподвижности, время, проведенное в центре и на периферии, а также общее время двигательной активности.

В обоих тестах животных помещали в установки и позволяли свободно передвигаться в течение 5 мин, осуществляли видеорегистрацию поведения. Общее количество животных, использованных в поведенческих тестах, составило $n = 22$ (по 11 крыс каждой линии). Анализ поведенческих данных проводил один и тот же оператор

с помощью подсчета поведенческих параметров по предварительно зашифрованным видеозаписям, исключавшим определение принадлежности животных к экспериментальным группам (линиям).

Выделение ДНК из образцов и секвенирование ампликонов 16S рРНК

В каждую группу для исследования микробиоты входило по 20 intactных крыс линий ВП и НП (всего $n = 40$). Для исследования изменений в составе кишечной микробиоты образцы фекалий собирали в стерильные пробирки и хранили при -80°C без консервантов.

Тотальную экстракцию ДНК проводили в соответствии с протоколом “QINRA” Международного консорциума по стандартизации микробиома человека с незначительными изменениями. После медленного размораживания при температуре 4°C от 150 до 200 мг фекалий из каждого образца распределяли по пробиркам объемом 2 мл, предварительно заполненным 300 мг стеклянных шариков диаметром 0.1 мм (#G8772) (Merck KGaA, Германия), которые затем подвергали измельчению в гомогенизаторе Minilys personal (#P000673-MLYS0-A.0, Bertin technologies, Франция) в течение 180 с при 3000 об/мин после добавления буфера для лизиса ASL (#19082, QIAGEN, Хильден, Германия). Такие этапы протокола, как частичное удаление непереваренных белков с помощью раствора ацетата аммония, осаждение нуклеиновых кислот изопропанолом, обработка РНКазой и очистка ДНК-экстракта на кварцевой колонке с помощью мини-набора QIAamp DNA Stool (№ 51504, QIAGEN Hilden, Германия), были выполнены без каких-либо изменений. Целостность ДНК оценивали методом электрофореза экстракта в 1%-ном агарозном геле. Все измерения концентрации нуклеиновых кислот проводились с использованием флуорометра Qubit 2.0 (#Q32866, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с фирменным набором для анализа HS-днк Qubit (#Q32851, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Библиотека ампликонов была подготовлена с использованием двухэтапного протокола, где первую ПЦР проводили с праймерами вырожденной гипервариабельной области гена 16S рРНК V4 F515 (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') и 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), модифицированными для включения “гетерогенного спейсера” длиной 0–5 п. н. с последовательностью линкера штрих-кода, и где вторая ПЦР включала последовательности штрих-кода и адаптера, совместимые с Illumina [14]. Амплификацию проводили с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (Evrogen, Россия) на системе ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, Калифорния, США) в соответствии с протоколом [15].

Качество и размер продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Ампликоны очищали с помощью набора для экстракции QIAquick (№ 28704, QIAGEN, Хильден, Германия) и измеряли их концентрацию перед объединением в пул с эквимоллярной концентрацией. Окончательный набор образцов был очищен и концентрирован с помощью магнитных шариков AMPureXP (#A63881, Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Секвенирование проводили на платформе Illumina Miseq, с использованием набора реагентов MiSeq PE kit V2 на 500 циклов с Nano flow cell (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ поведенческих данных

Для оценки влияния фактора “линия” (ВП и НП) на поведенческие параметры был проведен многомерный дисперсионный анализ (MANOVA). Нормальность распределения данных для каждой переменной проверялась с помощью теста Шапиро – Уилка. Для переменных, существенно отклоняющихся от нормальности, применяли логарифмическое преобразование или извлечение квадратного корня.

Парные корреляции между всеми переменными рассчитывали с использованием коэффициента корреляции Пирсона. Высококоррелированные переменные ($|r| > 0.8$) исключались для уменьшения избыточности данных и устранения мультиколлинеарности. После этого шага набор данных был сокращен до шести поведенческих параметров для MANOVA: время, проведенное в центральной части ПКЛ (*EPM_center_time*), время, проведенное в закрытом рукаве ПКЛ (*EPM_closed_time*), время замирания в ПКЛ (*EPM_freezing*), время, проведенное на периферии ОП (*OF_periphery_time*), время замирания в ОП (*OF_freezing*) и активность в ОП (*OF_activity_time*).

Многомерный дисперсионный анализ (MANOVA) проводили с использованием теста Pillai's Trace. Принадлежность к линии рассматривалась как независимая переменная, а шесть отобранных поведенческих параметров – как зависимые переменные.

Все статистические анализы выполнялись в среде программирования *R* (версия 4.4.1, 2024-06-14) с использованием программы RStudio (2024.04.2 Build 764). Для MANOVA использовался программный пакет *car* (*companion of applied regression*) [16], а для проверки нормальности и преобразования данных – пакет *stats*.

Для изучения поведенческих профилей двух линий был проведен анализ главных координат (Principal Coordinates Analysis (PCoA)). Для расчета матрицы расстояний между особями применялась метрика Манхэттена, основанная на шести поведенческих переменных. PCoA выполнялся с использованием пакета *vegan* в среде *R* [17]. Для визуализации использовались первые две главные координаты (PCo1 и PCo2), так как они объясняли основную часть дисперсии в данных.

Индивидуальные данные отображались на графике вдоль первых двух осей (PCo1 и PCo2), где каждая точка представляла отдельную крысу. Для каждой группы были добавлены эллипсы, отражающие 95%-ные доверительные интервалы, с использованием функции *stat_ellipse* из пакета *ggplot2* [18].

Для выявления переменных, вносящих наибольший вклад в разделение по оси PCo1, были рассчитаны коэффициенты корреляции между значениями каждой переменной и координатами животных по оси PCo1. Эти значения были использованы в качестве индикаторов вклада переменных и визуализированы на графике (Importance in PCo1). Вклад отдельных переменных в PCo1 был представлен в виде столбчатой диаграммы, где положительные значения указывают на связь с линией ВП, а отрицательные – с линией НП.

Анализ данных секвенирования 16S рРНК

Качество ридов проверялось с использованием FastQC, после чего данные демультиплексировались с помощью *deML* [19]. Анализ демультиплексированных ридов проводился с использованием программного конвейера *Qiime2-2020.14* [20].

Анализ выполняли в среде программирования *R* (версия 4.4.1, 2024-06-14) с использованием программы RStudio (2024.04.2 Build 764). Различия в микробных сообществах между группами ВП и НП оценивали с помощью пермутационного многомерного дисперсионного анализа – Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), реализованного в функции *adonis2* из пакета *vegan*.

Были использованы две метрики расстояния: *Bray-Curtis* и *LEfSe* (Linear Discriminant Analysis Effect Size). Частота встречаемости таксонов (prevalence) рассчитывалась как отношение числа образцов, содержащих данный таксон, к общему числу образцов в группе. Таксоны основного микробиома (core microbiome) определялись на основании порога по показателю prevalence > 50% и минимального уровня относительной представленности 1%. Определение таксонов, значимо различающихся между группами ВП и НП, проводили с использованием пакета *Deseq2* в среде MicrobiomeAnalyst 2.0, перед анализом была проведена фильтрация таксонов с низкой частотой встречаемости [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты поведенческих тестов

MANOVA выявил значимый эффект фактора “линия” (ВП vs НП) на поведенческие параметры (Pillai’s Trace = 0.671, $F(5,17) = 6.92$, $p = 0.001$), что свидетельствует о выраженных различиях в поведенческих профилях между линиями (рис. 1а). Анализ по отдельным параметрам с помощью t -теста показал значимые различия только по двум показателям: времени двигательной активности в ПКЛ (EPM_activity_time, $p < 0.01$) и времени замирания (EPM_freeseing, $p < 0.01$), что отражено на рис. 1с.

Рис. 1а показывает, что крысы линий ВП и НП формируют отдельные кластеры вдоль оси PCo1, это подчеркивает различие в их поведенческих профилях. Первые две оси PCo объясняют значительную часть дисперсии данных: PCo1 – 47.26%, а PCo2 – 34.62%. Вместе они объясняют 81.88% дисперсии, что указывает на надежность визуализации различий между группами на графике PCoA. Крысы линии ВП образуют кластер, смещенный вправо по оси PCo1, при этом переменные, такие как замирание, локомоторная активность и время, проведенное в закрытых и открытых рукавах ПКЛ, вносят наибольший вклад в PCo1 (рис. 1б).

Анализ микробиоты

Рис. 2а показывает доминирование типов *Firmicutes* и *Bacteroidota* в обеих линиях крыс с некоторыми вариациями.

У крыс линии НП наблюдается более высокая относительная представленность *Proteobacteria* по сравнению с крысами линии ВП, в то время как у крыс линии ВП более распространены *Actinobacteriota*. На уровне семейства *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* более представлены у крыс линии НП (рис. 2б) по сравнению с линией ВП.

На уровне рода у крыс линии ВП наблюдается более высокая относительная представленность *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Allobaculum*, в то время как у крыс линии НП отмечается повышенная относительная представленность *Lactobacillus*, включая как идентифицированные на уровне рода, так и смешанную группу неклассифицированных представителей *Lactobacillaceae* (рис. 2с).

На рис. 3а–б показаны индексы альфа-разнообразия кишечной микробиоты у крыс линий ВП и НП. Статистически значимых различий индексов Chao1 (богатство таксонов) и Симпсона (однородность сообщества) выявлено не было.

На рис. 3с показаны различия в составе кишечной микробиоты между линиями крыс ВП и НП, визуализированные с помощью анализа главных координат (PCoA) на основе индекса несходства Брея – Кёртиса. Анализ PERMANOVA выявил значимые различия между группами ($F = 3.8575$, $p = 0.001$, $R^2 = 0.090$), это указывает на то, что примерно 9% вариативности встречающихся таксонов объясняется принадлежностью к линии.

В то время как обе группы имеют схожие доминирующие классы (рис. 4а), такие как *Bacilli*, *Clostridia* и *Coriobacteriia*, очевидны различия в менее распространенных классах. Крысы линии ВП демонстрируют более высокую представленность *Actinobacteria*, но не имеют *Negativicutes* в основном микробиоме.

У высоковозбудимых крыс линии НП представленность *Eubacterium* в основном микробиоме ниже, а несколько родов, присутствующих у низковозбудимых крыс ВП, отсутствуют (*Streptococcus*, некультивируемые *Erysipelotrichaceae*, *Romboutsia*, *Intestinimonas* и *Ruminococcus*) (рис. 4б). Несколько родов, входящих в основной микробиом крыс НП, полностью отсутствуют в основном микробиоме крыс ВП: *Blautia*, *Catenibacterium*, *Dubosiella*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Quinella*, *unclassified_Eggerthellaceae*.

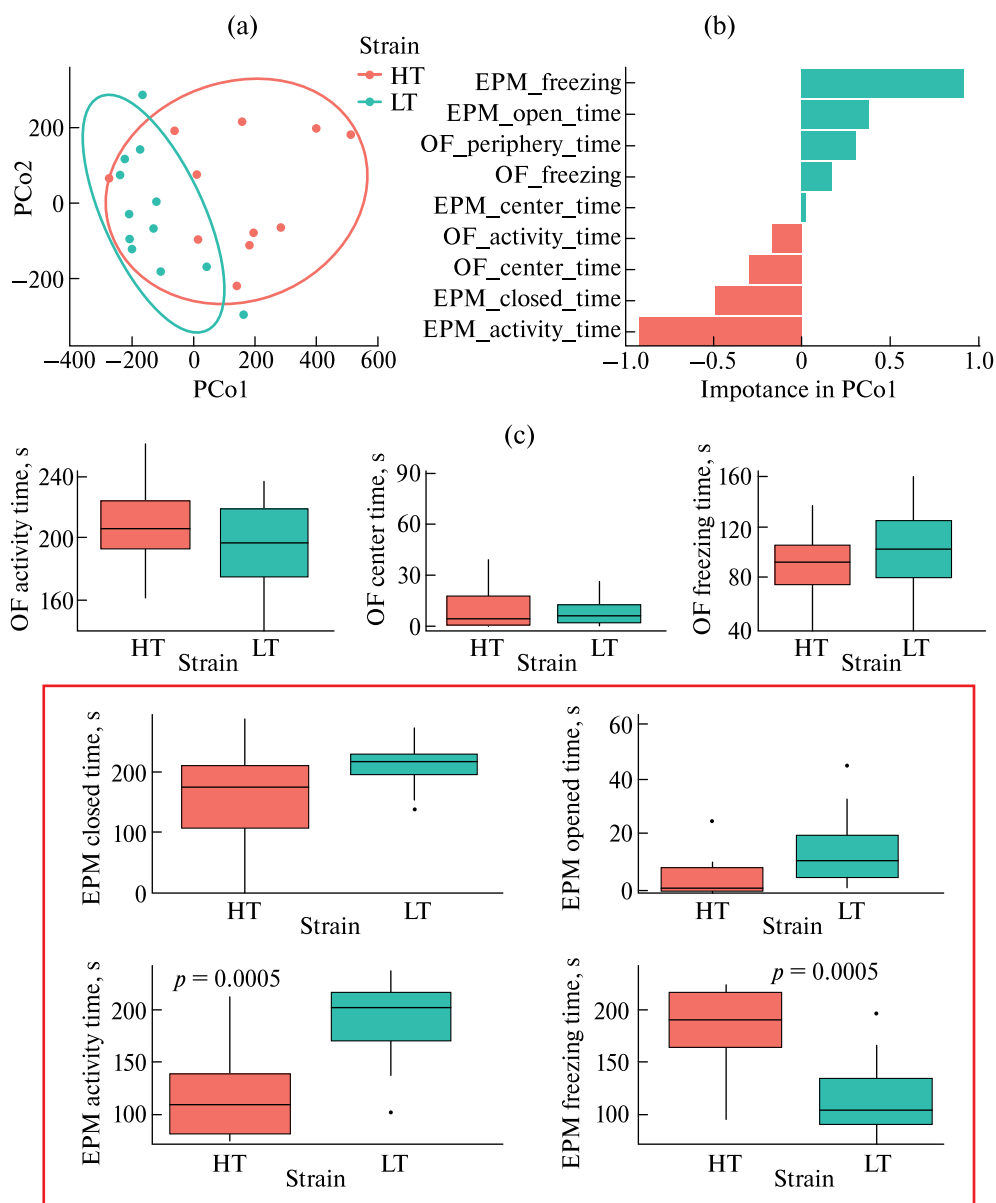


Рис. 1. Поведенческие профили линий крыс ВП и НП. (а) – Распределение линий ВП (НТ) и НП (ЛТ) в пространстве РСОА. Каждая точка представляет отдельное животное, овалы обозначают 95%-ные доверительные интервалы для каждой группы. (б) – Относительный вклад поведенческих переменных в первую главную ось координат (РСО1). Положительные значения (красные столбики) указывают на переменные, которые более тесно связаны с линией ВП, отрицательные значения (синие столбики) более тесно связаны с линией НП. (с) – Диаграммы размаха представляют распределение ключевых поведенческих переменных для линий с НП и ВП. Центральная линия – медиана, края прямоугольника представляют межквартильный размах. В красной рамке указаны параметры с наибольшим относительным вкладом в РСО1; p – уровень значимости различий (t -test).

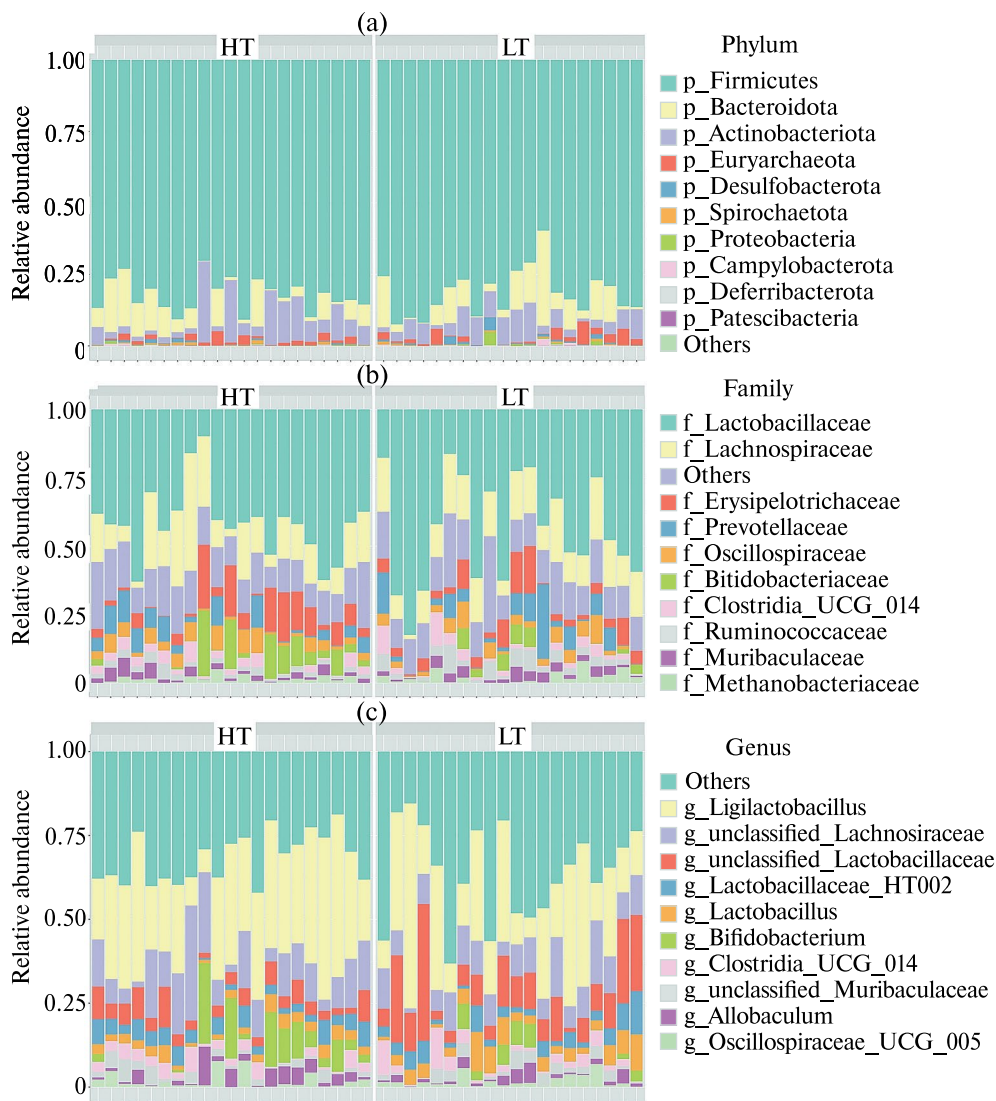


Рис. 2. Относительная представленность кишечного микробиома у крыс линий ВП и НП на различных таксономических уровнях. (а) – Уровень типа. (б) – Уровень семейства. (с) – Уровень рода.

Рис. 5 представляет результаты дискриминантного анализа (LDA), выявляющие различия в микробных таксонах между линиями ВП и НП. Для группы ВП наиболее характерна высокая представленность таких таксонов, как *Eubacterium coprostanoligenes_group*, *Streptococcus* и *Romboutsia*. Микробиом группы НП обогащен таксонами *unclassified_Lactobacillaceae*, *Collinsella* и *Faecalibacterium*.

Помимо выполнения LDA-анализа, мы применили *DESeq2* для получения более надежных данных, способствующих пониманию микробных различий между линиями. В то время как *LDA* выделяет таксоны с дискриминативной способностью и визуализирует специфические паттерны, *DESeq2* представляет данные о статистической значимости различающихся по представленности таксонов со строгим контролем

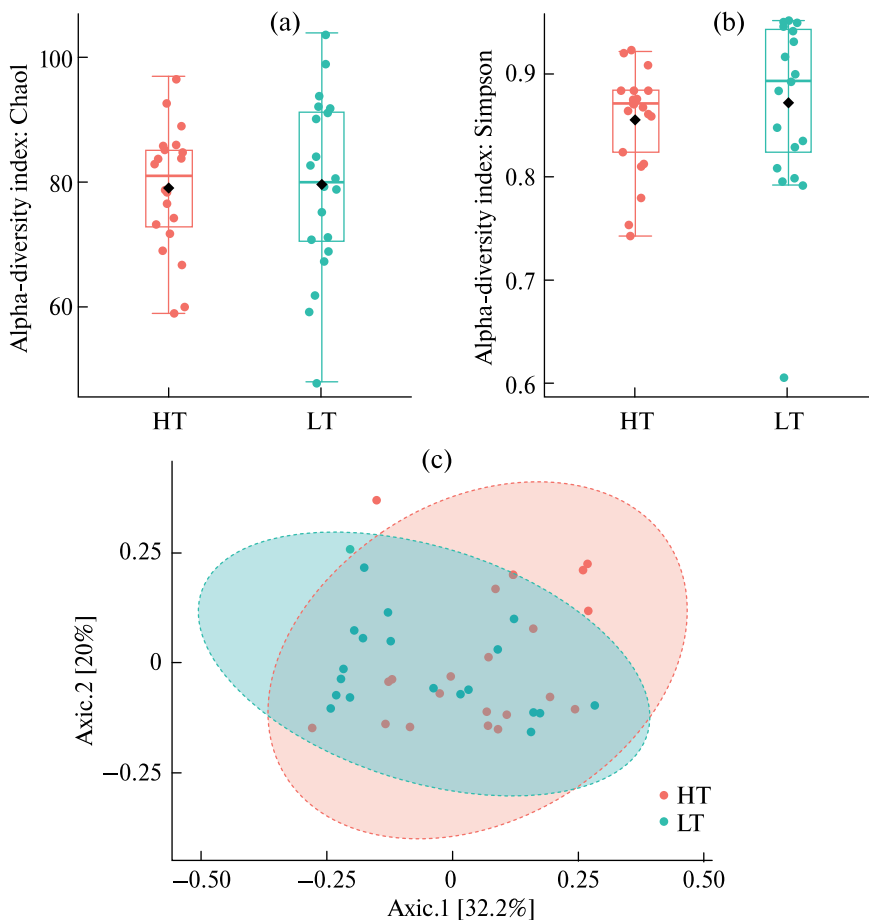


Рис. 3. Показатели разнообразия микробиоты в группах крыс линий ВП и НП. (а–б) – Альфа-разнообразие ($p > 0.05$, критерий Манна – Уитни). (с) – Бета-разнообразие (PCoA состава кишечной микробиоты на основе индекса Брея – Кёртиса).

множественности сравнений (FDR). Такое сочетание методов обеспечивает как биологическую (LDA), так и статистическую значимость ($DESeq2$), создавая целостное представление о различиях в микробном сообществе.

На рис. 6 показано, что, согласно результатам анализа дифференциальной представленности с использованием пакета *DESeq2*, 9 родов были значимо более представлены (*upregulated*) в стуле линии ВП, а 11 родов – у линии НП. На рис. 7 показаны только те роды, различия в представленности которых были выявлены обоими методами – LDA и $DESeq2$.

Как показано на рис. 7, пять таксонов значимо менее представлены у линии НП по сравнению с ВП: *Turicibacter*, *Family_XIII_AD3011_group*, *Adlercreutzia*, *Streptococcus*, *Eubacterium_coprostanoligenes_group*. Семь таксонов более представлены у высоко-возбудимых крыс линии НП по сравнению с низково-возбудимыми ВП: *Oribacterium*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Catenisphaera*, *unclassified_Lactobacillaceae*, *Monoglobus*.

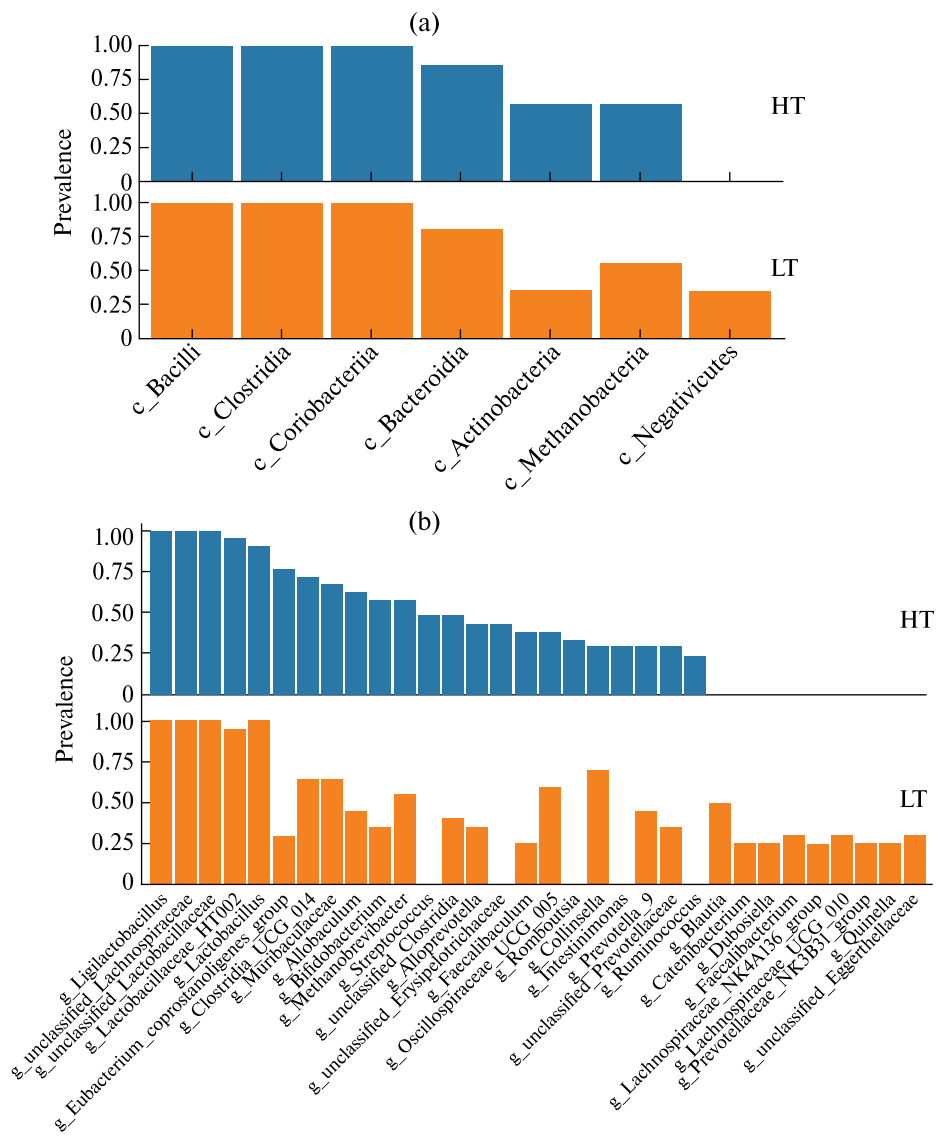


Рис. 4. Состав основного микробиома кишечника на уровне класса (а) и рода (б) у крыс линий ВП (НТ) и НП (LT). По вертикали – частота встречаемости таксонов (prevalence), по горизонтали – таксоны основного микробиома.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поведенческий профиль линий НП и ВП

Как показал анализ, линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы различаются по поведению в тесте ПКЛ в большей степени, чем по поведенческим паттернам в ОП. Анализ отдельных переменных показывает, что интактные высоко-возбудимые крысы линии НП проявляют повышенную активность в ПКЛ, что выражается в увеличенном времени, проведенном как в открытых, так и в закрытых рукавах

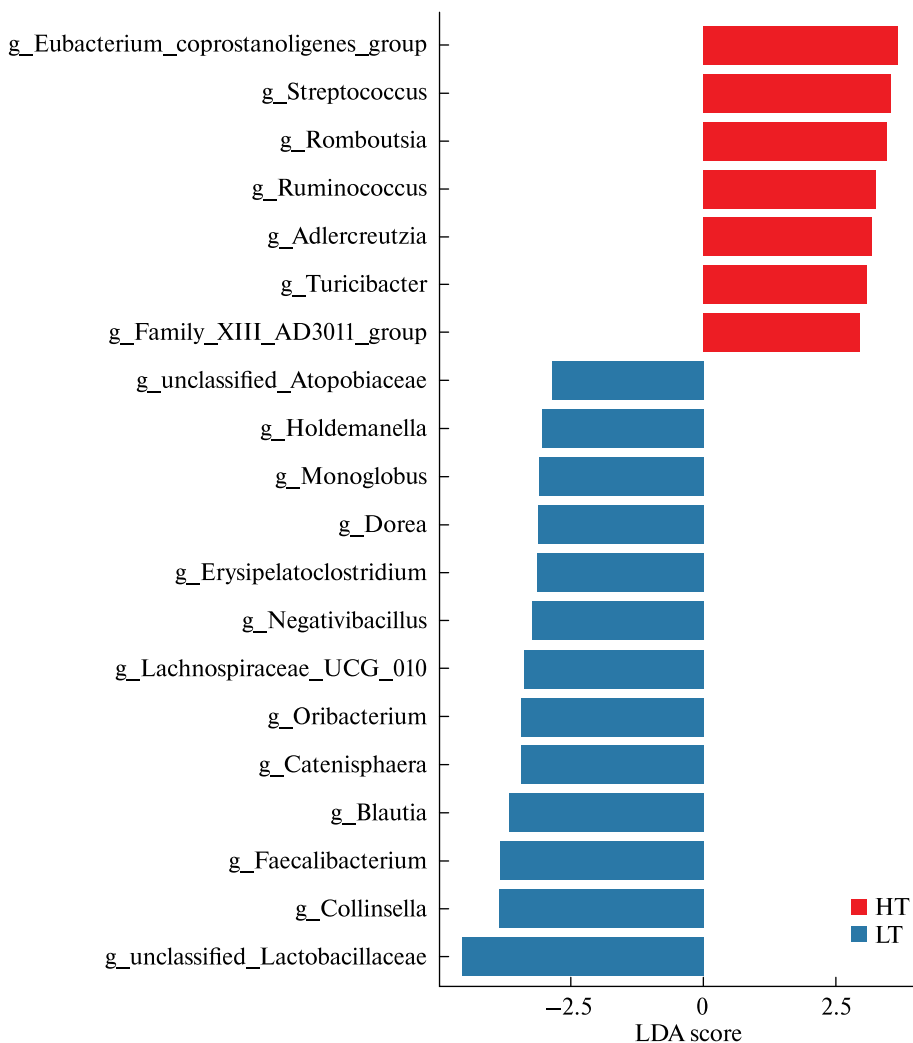


Рис. 5. Результаты дискриминантного анализа (LEfSe/LDA) микробных таксонов у крыс линий ВП и НП. LDA-score количественно определяет вклад каждого таксона в разделение двух групп. Положительные значения указывают на обогащение в группе ВП, а отрицательные – в группе НП. Чем больше абсолютное значение, тем выше дискриминативная значимость таксона.

лабиринта по сравнению с крысами линии ВП. При этом выраженность замирания в тесте ПКЛ ниже, чем у низковозбудимой линии ВП. Ранее было показано, что у крыс линии НП наблюдается повышенная активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), что сопровождается повышенным базальным уровнем кортикостерона [1]. Известно, что активация ГГАС может оказывать значительное влияние на поведение, особенно в контексте стресс-ассоциированных реакций. Высокий уровень кортикостерона может способствовать увеличению моторной подвижности и снижению выраженности реакций избегания в поведенческих тестах, что может объяснять наблюдаемую у интактных крыс линии НП повышенную активность в ПКЛ и сниженное замирание.

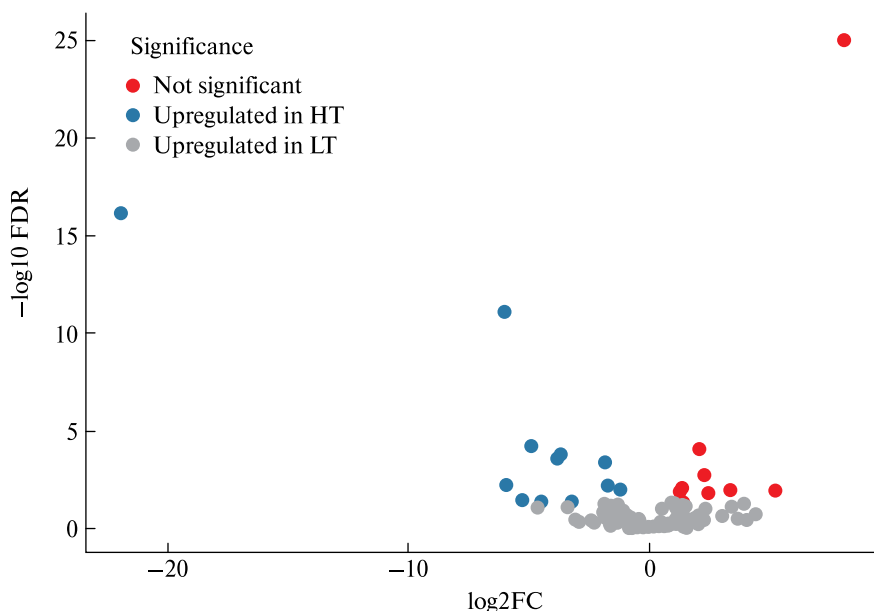


Рис. 6. Дифференциально представленные микробные таксоны на уровне рода между линиями крыс ВП и НП. Ось X ($\log_2FC$): показывает логарифм от изменения относительной представленности микробных таксонов между группами ВП и НП. Положительные (красные) значения указывают на таксоны, более представленные (*upregulated*) в группе ВП (НТ), отрицательные (синие) – на таксоны, более представленные в группе НП (ЛТ). Ось Y ($-\log_{10}FDR$) отражает статистическую значимость различий (скорректированное p -значение).

Однако, как показало наше предыдущее исследование [3], линия НП демонстрирует более выраженные поведенческие изменения в обоих тестах (ПКЛ, ОП) на ранних сроках после стрессового воздействия. Возможно, повышенная активность и сниженное избегание в физиологических условиях не являются маркером устойчивости, а, напротив, могут отражать сниженную способность к адаптации, обусловленную особенностями регуляции ГАС. С другой стороны, низкая активность и избегающее поведение интактных крыс линии ВП отражают их чрезмерную осторожность и избегание новизны. Эти крысы демонстрируют минимальные изменения в поведении при воздействии стресса в срок до 1 месяца [3], что можно интерпретировать как отсутствие эффекта. С другой стороны, важно учитывать, что постстрессорные паттерны поведения могли быть недостаточно полно охарактеризованы с помощью тестов ПКЛ и ОП либо проявляться в более поздние сроки.

Микробная композиция кишечника

Анализ состава и структуры кишечного микробиома у линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы показал, что в стуле обеих линий преобладают типы *Firmicutes* и *Bacteroidota*, что соответствует типичному составу кишечного микробиома грызунов [22].

Хотя анализ состава микробиоты на уровне типов является традиционным этапом в исследованиях оси “микробиота – кишечник – мозг”, он остается довольно обобщенным методом, не дающим полной картины и не позволяющим делать однозначные выводы. Каждый тип объединяет огромное разнообразие бактериальных видов и родов,

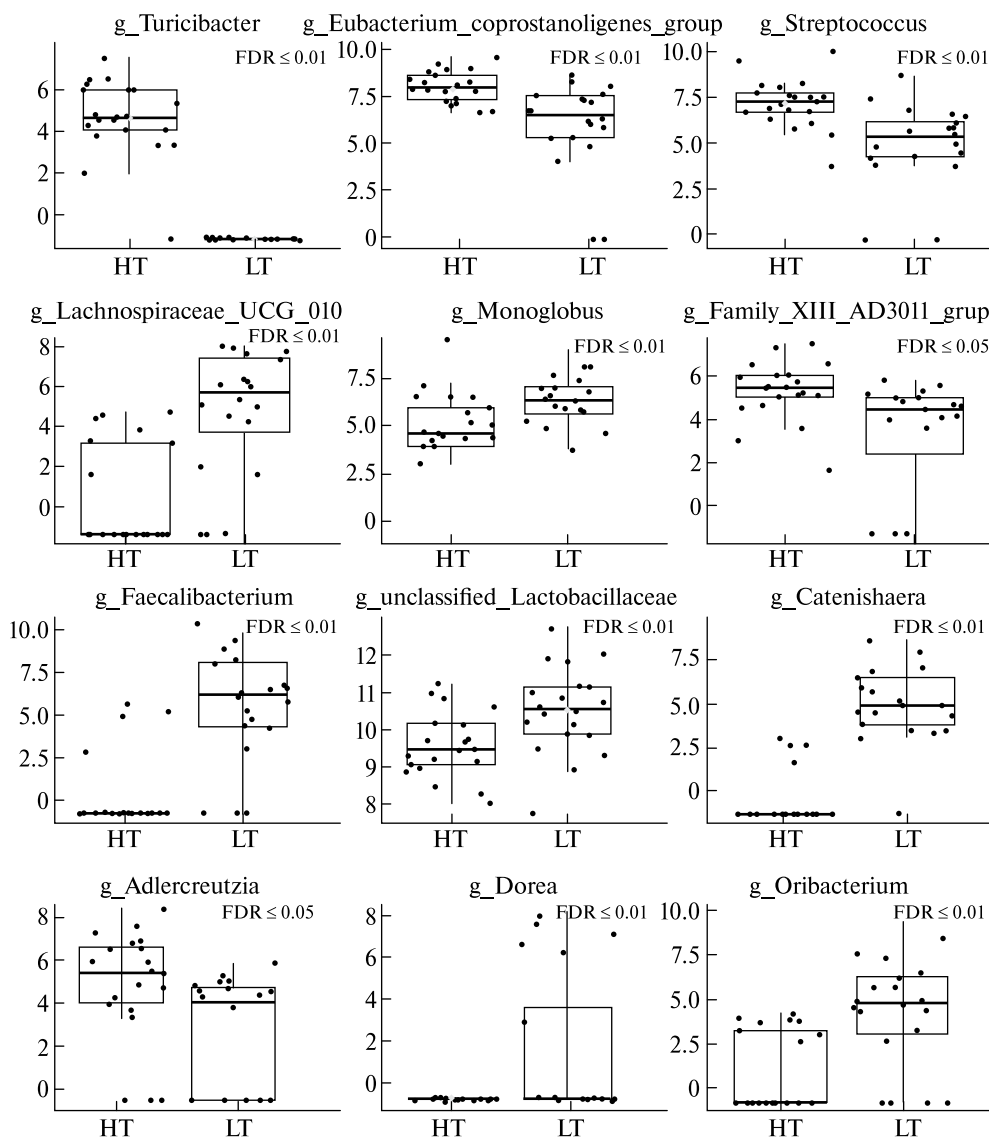


Рис. 7. Дифференциально представленные таксоны на уровне рода в стуле крыс линий ВП и НП. Обозначения: ВП (HT) и НП (LT) – экспериментальные группы; Log-transformed Counts – логарифмически преобразованные нормализованные количества представителей микробных родов; статистическая значимость различий оценивалась методом *DESeq2* с контролем FDR.

которые могут значительно различаться по своим функциональным свойствам и влиянию на организм хозяина.

Так, например, *Firmicutes* – доминирующий тип у грызунов – включает как виды, ассоциированные с положительным влиянием на здоровье (например, некоторые представители *Lactobacillus*), так и виды, связанные с развитием патологий (например, *Clostridium difficile*). Соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* используется для оценки состава кишечного микробиома и выявления потенциальных изменений, связанных с различными заболеваниями, включая ожирение [23], воспалительные заболевания

кишечника [24], метаболический синдром [25] и постстрессорные расстройства [26]. Многие исследования сосредоточены на изучении того, какие сдвиги в этом соотношении характерны для определенных патологий и воздействий, предполагая, что его изменение может служить биомаркером нарушений. Однако такой подход оказался малоэффективным, так как соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* варьирует даже среди здоровых индивидов в пределах одной популяции [27]. На состав микробиоты у человека и модельных животных существенно влияют многочисленные факторы, включая диету, уровень физической активности, потребление антибиотиков, а также различные аспекты образа жизни и окружающей среды.

Предлагается вместо поиска универсальных таксономических сдвигов в качестве маркеров заболеваний направить исследования на идентификацию маркеров для стратификации пациентов на подгруппы с целью персонализации терапевтических вмешательств [27].

На уровне семейств *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* были более распространены у крыс НП, также для них характерна повышенная относительная представленность *Lactobacillus* по сравнению с ВП.

В фекалиях низковоzbудимой линии ВП доминируют роды *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Allobaculum*. Эти роды могут способствовать поддержанию гомеостаза за счет их способности продуцировать короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs) [28, 29] и модулировать иммунные процессы.

У линии НП выявлена повышенная относительная представленность рода *Lactobacillus* и неклассифицированных таксонов семейства *Lactobacillaceae*. Согласно данным [30], увеличение доли *Lactobacillus* в микробиоте прямо коррелирует с выраженностью дезадаптивных ответов в экспериментальных моделях выученной беспомощности (*inescapable shock*). У крыс с дефицитом избегающего поведения в ответ на повторяющийся неизбежаемый футшок рост численности *Lactobacillus* сопровождался повышением уровня молочной кислоты, что указывает на связь метаболической активности данного рода с индивидуальными особенностями адаптации. Эти наблюдения подчеркивают амбивалентную роль *Lactobacillus* в модуляции оси “микробиота – кишечник – мозг”: несмотря на общепризнанные пробиотические свойства [31], их избыточная представленность может ассоциироваться с изменением регуляторных механизмов, опосредующих взаимодействие микрофлоры и организма.

Интересно также, что в исследовании [30] было показано снижение уровней уксусной и пропионовой кислот у стресс-чувствительных крыс, что может указывать на нарушение баланса короткоцепочечных жирных кислот (SCFAs), играющих ключевую роль в поддержании кишечного баланса и иммунной регуляции. Таким образом, сдвиг микробного профиля в сторону *Lactobacillus* может привести к дисбалансу метаболитов.

Значимых различий между линиями по индексам альфа-разнообразия выявлено не было. Это указывает на схожее богатство (*Chao1*) и равномерность распределения таксонов (*Simpson*) в микробиоте кишечника обеих групп. Примечательно, что линия НП демонстрирует большую вариабельность значений индексов по сравнению с ВП, это может свидетельствовать о более высоком уровне индивидуальных различий в составе микробиоты у высоковоzbудимых крыс.

В наших предыдущих экспериментах [4], направленных на изучение изменений микробиоты после стрессового воздействия у крыс данных линий, было показано, что в физиологических условиях крысы линии НП имели значимо более низкие индексы *Chao1* и *Shannon* по сравнению с ВП. Однако в настоящем исследовании, проведенном в том же виварии и при идентичных диетических и средовых условиях, такие различия не были обнаружены.

Литературные данные подтверждают спонтанную динамику альфа-разнообразия. Например, в исследовании [32] были продемонстрированы значительные изменения

во времени состава микробиоты у здоровых взрослых людей, несмотря на стабильные условия окружающей среды. Аналогично было показано, что сезонные изменения и небольшие вариации в диете могут существенно влиять на разнообразие микробиоты [33]. Также имеются данные об изменениях индексов альфа-разнообразия у интактных взрослых грызунов, содержащихся в стандартных условиях, если биоматериал отбирался еженедельно [34]. Это подчеркивает динамическую природу микробиоты, которая может изменяться под влиянием различных факторов, не все из которых можно контролировать даже в рамках стандартизированных протоколов.

Анализ *PERMANOVA* и расстояние *Bray – Curtis* указывают на значимые различия в микробном составе между линиями ВП и НП, которые могут быть обусловлены генетическим фоном, поскольку это интактные животные двух линий, селективированных по порогу возбудимости нервной системы и содержащихся в одинаковых условиях. Анализ *PERMANOVA* подтвердил статистическую значимость различий, при этом примерно 9% вариабельности объясняется принадлежностью к линии, что указывает на ее влияние, хотя и в ограниченной степени.

Далее мы исследовали, какие конкретные таксоны составляют основной микробиом двух линий крыс. Термин “основной микробиом” (*core microbiome*) означает набор микробных таксонов, который характерен и стабильно присутствует у определенного типа хозяина или в определенной среде, независимо от индивидуальных вариаций [35]. В основном микробиоме высоковозбудимых крыс (НП) были выявлены следующие отличия от линии ВП: снижение численности рода *Eubacterium* и отсутствие родов, присутствующих в “core microbiome” низковолюбимых крыс (ВП), включая *Streptococcus*, *Romboutsia*, *Intestinimonas* и *Ruminococcus*.

Род *Eubacterium*, который также является частью основного микробиома кишечника человека, производит бутират – ключевую молекулу, важную для поддержания энергетического баланса, моторики кишечника, иммуномодуляции и подавления воспаления в кишечнике. Кроме того, бутират участвует в трансформации желчных кислот и холестерина, способствуя их гомеостазу [36]. Дисбиоз и изменение представленности *Eubacterium* в кишечнике связывают с различными заболеваниями человека, такими как диабет 2-го типа и ожирение [37].

Некоторые виды *Streptococcus* участвуют в ферментации углеводов, производя молочную кислоту [38], что помогает поддерживать баланс pH и подавлять рост патогенных микроорганизмов. Однако роль этих бактерий в кишечнике сложна, так как некоторые виды могут быть патогенными, что затрудняет оценку функциональных последствий их полного отсутствия в основном микробиоме НП и присутствия у ВП.

Род *Romboutsia*, который также отсутствует в основном микробиоме НП, но присутствует у ВП, включает грамположительные анаэробные бактерии, обитающие в кишечнике человека и животных. Эти бактерии известны своими положительными эффектами на физиологию хозяина. Например, *Romboutsia ilealis* может ферментировать различные углеводы, производя короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), которые поддерживают целостность кишечного барьера. Некоторые виды *Romboutsia* регулируют иммунные реакции, способствуя иммунному гомеостазу и предотвращая воспаление кишечника [39].

Род *Intestinimonas* состоит из анаэробных бактерий, которые играют роль в метаболизме аминокислот – в превращении лизина в бутират, поддерживающий энергетический баланс в кишечнике [40]. Особенно интересен *Intestinimonas butyriciproducens*, который может превращать компоненты пищи, такие как фруктозиллин, в SCFAs, включая бутират и ацетат. Бутират служит основным источником энергии для колоноцитов, поддерживает целостность кишечного барьера и обладает противовоспалительными свойствами. Исследования показали, что *I. butyriciproducens* улучшает метаболическое здоровье хозяина, снижая массу тела, гипергликемию и воспаление в жировой ткани у мышей с ожирением, индуцированным диетой [41].

Род *Ruminococcus* также отсутствует в основном микробиоме НП, в то время как известно, что его представители являются ключевыми видами для разрушения крахмала в кишечнике. Однако некоторые штаммы связаны с воспалительными заболеваниями кишечника, такими как болезнь Крона [42].

Таким образом, в основном микробиоме высоковозбудимых крыс НП отсутствуют несколько таксонов, производящих метаболиты, потенциально важные для физиологии хозяина.

Следующая цель работы заключалась в определении таксонов, которые различаются между двумя линиями крыс, с применением комбинации подходов, минимизирующих ложноположительные результаты и обеспечивающих как статистическую, так и биологическую значимость. Анализ LEfSe хорошо подходит для определения таксонов, которые различаются между двумя группами, при этом эти различия могут быть биологически значимыми. В то же время *DESeq2* обеспечивает более строгую статистическую проверку, контролируя ложные открытия (FDR), что делает его особенно надежным для количественного анализа дифференциальной представленности большого числа таксонов [43].

По результатам обоих анализов следующие таксоны являются наиболее надежными для характеристики различий в микробиоме кишечника крыс с различной возбудимостью нервной системы: *Eubacterium coprostanoligenes_group*, *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Family XIII AD3011_group* и *Adlercreutzia*. Эти таксоны менее представлены в стуле крыс линии НП по сравнению с ВП. Некоторые из этих таксонов частично совпадают с данными об основном микробиоме (*Eubacterium*, *Streptococcus*).

Turicibacter – род грамположительных бактерий, принадлежащих к типу *Firmicutes*. Они встречаются в кишечнике различных млекопитающих, включая человека. Исследования показывают, что *Turicibacter* может играть определенную роль в регуляции иммунной системы и метаболизме хозяина. Кроме того, штаммы *Turicibacter* могут модифицировать желчные кислоты, влияя на метаболизм липидов и энергетический баланс [44]. У мышей отсутствие *Turicibacter sanguinis* повышает восприимчивость к тяжелым кишечным инфекциям, тогда как его присутствие снижает риск таких заболеваний [45]. Таким образом, *Turicibacter* играет важную роль в поддержании здоровья кишечника и общего метаболического баланса у различных видов, включая крыс и человека. Его значимо более низкая относительная представленность в фекалиях линии НП по сравнению с линией ВП может иметь биологическое значение.

Что касается группы *Family XIII AD3011*, то исследования на животных моделях показали, что увеличение их численности связано с нарушениями гемопоэза и повышением уровня IL-5 в модели токсичности бензола, а также с экспрессией ACOD1, маркера воспаления, в моделях колита [46]. Клинические исследования у человека связывают высокую численность этой группы с хроническим воспалением и шизофренией [47].

Adlercreutzia – род грамположительных, облигатно анаэробных бактерий из семейства *Eggerthellaceae*. Они известны своей способностью метаболизировать изофлавоны, такие как даидзеин, превращая их в эквол – соединение с эстрогенной активностью. Снижение численности *Adlercreutzia* наблюдается у мышей, получающих высококалорийную диету, что может свидетельствовать о потенциальной связи с метаболическими расстройствами. Кроме того, было отмечено снижение численности *Adlercreutzia equolifaciens* у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), при этом ее уровень снижается по мере прогрессирования заболевания. Это предполагает, что *Adlercreutzia* может обладать противовоспалительными свойствами [48].

Более представлены в стуле линии НП крыс по сравнению с линией ВП были таксоны: *Oribacterium*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Catenisphaera*, *unclassified_Lactobacillaceae* и *Monoglobus*.

Oribacterium – род грамположительных, облигатно анаэробных бактерий, обычно встречающийся в ротовой и кишечной микробиоте млекопитающих. Он связан

с ферментацией углеводов и производством SCFAs. Однако чрезмерное количество *Oribacterium* обнаружено у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [49]. *Lachnospiraceae* *UCG_010* является частью основного микробиома кишечника человека, при этом его видовое разнообразие и относительная представленность увеличиваются с возрастом хозяина. Различные таксоны *Lachnospiraceae*, помимо производства SCFAs, также связаны с различными воспалительными заболеваниями как в кишечнике, так и вне его [50, 51].

Dorea – еще один род из семейства *Lachnospiraceae*, также связанный с производством бутирата. Хотя эти бактерии обычно являются полезными, их избыток может быть ассоциирован с воспалительными заболеваниями, такими как синдром раздраженного кишечника и метаболические расстройства. Кроме того, показано, что высокая представленность *Dorea* положительно коррелирует с депрессивным поведением [52].

Faecalibacterium считается ключевым индикатором здоровья кишечника благодаря своим выраженным противовоспалительным эффектам через производство бутирата и модуляцию иммунного ответа. Было показано, что увеличение его представленности повышает уровни SCFAs и IL-10, при этом снижая уровни кортикостерона и IL-6 [53]. Кроме того, *F. prausnitzii* может улучшать кишечный барьер, регулируя белки плотных контактов, тем самым снижая проницаемость и воспаление [54].

Интересно, что текущее наблюдение, согласно которому относительная представленность *Faecalibacterium* в стуле крыс линии НП выше, чем у линии ВП, контрастирует с нашими предыдущими данными, согласно которым увеличение представленности *Faecalibacterium* было отмечено, напротив, у линии ВП, однако только после стресса и временно (присутствует через 7 дней, но отсутствует через 24 дня после стресса по сравнению с контролем той же линии) [4]. Возможно, у линии ВП это временное увеличение может быть функциональным, способствуя их адаптации. Линия НП демонстрирует более высокую представленность этих бактерий даже в физиологических условиях, что может свидетельствовать о предрасположенности к воспалению даже в отсутствие внешних стрессоров.

Обнаруженные различия в микробиоте между линиями крыс позволяют предположить, что генетические факторы, определяющие уровень возбудимости нервной системы, могут также участвовать в формировании микробного сообщества кишечника, вероятно, через опосредованные механизмы, такие как нейровоспаление, уровень кортикостероидов или влияние на моторику и секрецию в ЖКТ.

Возможные механизмы связи между поведенческими особенностями и микробиотой у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы

Полученные данные показывают, что линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы отличаются как по поведению, так и по структуре кишечной микробиоты. Хотя прямая взаимосвязь между этими признаками в данной работе не устанавливалась, полученные результаты согласуются с концепцией влияния генетических факторов на формирование оси “кишечник – мозг”. Линия НП, характеризующаяся повышенной локомоторной активностью и более выраженным исследовательским поведением, имеет увеличенную по сравнению с линией ВП относительную представленность бактерий родов *Lactobacillus* и *Faecalibacterium*. Эти таксоны широко известны как потенциальные “психобиотики”, положительно влияющие на стрессоустойчивость и эмоциональное состояние животных [53, 55].

В противоположность этому, у крыс линии ВП – более пассивных и склонных к тревожному поведению – отмечена более высокая доля родов *Romboutsia*, *Eubacterium* и *Turicibacter*. Хотя эти микробы менее изучены в контексте поведения, известно, что представители *Turicibacter* взаимодействуют с серотониновой системой хозяина: они способны стимулировать выработку серотонина в кишечнике, предположительно

через продукцию короткоцепочечных жирных кислот (Short chain fatty acid, SCFAs), и одновременно сами реагируют на повышение уровня кишечного серотонина [56].

Таким образом, наблюдаемые различия в микробиоте между линиями могут потенциально объяснять расхождения в поведенческих реакциях, особенно связанных со стресс-реактивностью.

Кишечная микробиота может модулировать работу мозга и поведение хозяина через ряд взаимодополняющих механизмов. Один из ключевых путей – метаболиты микробного происхождения, прежде всего SCFAs, такие как ацетат, пропионат и бутират. Продуцируемые анаэробными бактериями (*Faecalibacterium*, *Eubacterium* и др.), они служат важными сигнальными молекулами: усиливают барьерную функцию кишечника, регулируют системное воспаление и способны влиять на нейрональную активность. Показано, что введение *F. prausnitzii* повышает уровень SCFA в кишечнике и концентрацию противовоспалительного цитокина IL-10 в крови, сопутствуя снижению уровней кортикостерона и провоспалительных цитокинов (например, IL-6) при стрессовом воздействии. Эти изменения ассоциируются с ослаблением тревожно-депрессивного поведения [53]. Короткоцепочечные жирные кислоты могут напрямую действовать на центральную нервную систему, проникая через гематоэнцефалический барьер [57] или активируя афферентные волокна блуждающего нерва [58]. Кроме того, SCFAs способны модулировать активность микроглии и астроцитов в головном мозге, тем самым влияя на нейровоспаление и нейропластичность [59].

Другой важный механизм – воздействие микробиоты на нейромедиаторные системы. Около 90% серотонина синтезируется в желудочно-кишечном тракте, и состав микробиоты во многом определяет этот процесс [60]. Так, лактобациллы стимулируют экспрессию ферментов синтеза серотонина (триптофан-гидроксилазы) в энтерохромаффинных клетках кишечника и могут тем самым повышать пул периферического 5-НТ, оральное введение некоторых штаммов *Lactobacillus* снижает уровень кортикостерона и выраженность тревожноподобных симптомов у мышей, подвергнутых социальному стрессу [55]. Микробиота также влияет на метаболизм триптофана по кинурениновому пути, что может менять соотношение нейроактивных метаболитов, связанных с депрессивным поведением [61].

Помимо серотонина, бактерии кишечника производят и другие нейроактивные вещества – γ -аминомасляную кислоту, дофамин, норадреналин – или индуцируют их синтез косвенно [62, 63].

Предполагают, что иммунный путь взаимодействия “кишечник – мозг” заключается в том, что микробиота модулирует созревание и развитие иммунной системы хозяина, способна вызывать иммунные ответы: так, липополисахарид грамотрицательных бактерий может активировать врожденный иммунитет, вызывая секрецию цитокинов, которые воздействуют на мозг и изменяют поведение. Баланс про- и противовоспалительных сигналов, формируемый под влиянием микрофлоры, существенно сказывается на реакции организма на стресс [64]. В совокупности короткоцепочечные жирные кислоты, нейромедиаторные молекулы и иммунные посредники составляют сложную сеть механизмов, посредством которых особенности кишечного микробиоценоза способны усиливать или ослаблять поведенческие реакции на стрессовые нагрузки.

Важно подчеркнуть, что обнаруженные различия в микробиоте между линиями ВП и НП проявляются несмотря на идентичные условия содержания животных. Это свидетельствует о возможной роли генетических особенностей хозяина в формировании состава кишечной экосистемы. Генетический профиль организма может напрямую влиять на микробиом, определяя характер иммунных и метаболических взаимодействий с симбиотическими микробами [65].

Показано, что разные линии мышей сохраняют различия в составе микробиоты даже при совместном содержании: в одном из исследований две инбредные мыши двух линий, содержащиеся в одной клетке в условиях однородной микробной контаминации,

демонстрировали устойчивое расхождение профилей микробиоты в пользу наследуемых (генотип-зависимых) таксонов [66]. Эти данные указывают, что генотип хозяина способен создавать специфические ниши для микробиоты – через различия в секреции слизистых субстратов, иммуноглобулинов, моторику кишечника, уровень гормонов стресса и другие наследуемые физиологические параметры. Продолжительная (более 80 поколений) селекция линий ВП и НП по возбудимости нервной системы могла сопровождаться сопряженным отбором аллелей, влияющих на кишечную среду обитания микроорганизмов. Помимо генетической предрасположенности, нельзя исключить и влияние вертикальной передачи микробиоты: у каждой линии сложился свой материнский микробиом, передаваемый потомству при рождении и выкармливании, что закрепило различия на уровне сообщества. Таким образом, генетическая дивергенция линий ВП и НП может иметь своим следствием дивергенцию и их кишечных микробиомов даже при устранении внешних различий среды обитания.

Изучение линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы позволяет глубже понять механизмы функционирования оси “микробиота – кишечник – мозг”, роль генетических факторов в ее функционировании, а также закладывает основу для дальнейших исследований причинно-следственных связей между микробным составом и постстрессорными нарушениями поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ поведения показал, что у высоковозбудимых крыс линии НП более выражена локомоторная активность и менее выражено замирание в тесте ПКЛ по сравнению с низковозбудимыми крысами линии ВП. Эти различия отражают поведенческие профили, связанные с их генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости.

Не было обнаружено значимых различий в индексах альфа-разнообразия между линиями ВП и НП, что указывает на схожее общее разнообразие и равномерность распределения таксонов в микробиоте стула обеих линий крыс, несмотря на их генетические различия и контрастирующие уровни возбудимости нервной системы.

Анализ бета-разнообразия подчеркивает наличие микробиомных профилей, специфичных для каждой линии, что поддерживается дополнительными статистическими методами.

Различия в поведенческих и микробиомных профилях предполагает возможную связь между генетическими факторами, композицией микробиоты кишечника и различными физиологическими характеристиками у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. Для более глубокого понимания этой связи необходимо исследовать функциональное значение этих различий. Для этого необходим метагеномный подход (shotgun-секвенирование), поскольку важны не только различия в таксономическом составе, но и различия в функциональных возможностях микробиоты.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (И. Г. Ш., Н. А. Д.), сбор данных (К. О. Э., Д. С. К., Е. А. Б., А. К. П.), обработка данных (И. Г. Ш., Д. С. К.), написание и редактирование манускрипта (И. Г. Ш., Н. А. Д.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано Федеральной программой академического лидерства “Приоритет-2030” в Балтийском федеральном университете им. И. Канта и средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629-7-3.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова, протокол № 09/16 от 16.09.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vaido AI, Shiryayeva NV, Pavlova MB, Levina AS, Khlebaeva DA, Lyubashina OA, Dyuzhikova NA* (2018) Selected rat strains Ht, Lt as a model for the study of dysadaptation states dependent on the level of excitability of the nervous system. *Lab Animals for Sci* 3. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-03-02>
2. *Shiryayeva NV, Vshivtseva VV, Mal'tsev NA, Sukhorukov VN, Vaido AI* (2008) Neuron density in the hippocampus in rat strains with contrasting nervous system excitability after prolonged emotional-pain stress. *Neurosci Behav Physiol* 38: 355–357. <https://doi.org/10.1007/S11055-008-0049-4>
3. *Shalaginova IG, Tuchina OP, Sidorova MV, Levina AS, Khlebaeva DA, Vaido AI, Dyuzhikova NA* (2021) Effects of psychogenic stress on some peripheral and central inflammatory markers in rats with the different level of excitability of the nervous system. *PLoS One* 16: e0255380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255380>
4. *Shevchenko A, Shalaginova I, Katserov D, Matskova L, Shiryayeva N, Dyuzhikova N* (2023) Post-stress changes in the gut microbiome composition in rats with different levels of nervous system excitability. *PLoS One* 18: e0295709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295709>
5. *Shalaginova IG, Tuchina OP, Turkin AV, Vylegzhanina AE, Nagumanova AN, Zachepilo TG, Dyuzhikova NA* (2023) The effect of long-term emotional and painful stress on the expression of proinflammatory cytokine genes in rats with high and low excitability of the nervous system. *Russ J Physiol* 109(4): 545–558 (In Russ). <https://doi.org/10.31857/S0869813923040088>
6. *Shcherbinina V, Pavlova M, Daev E, Dyuzhikova N* (2024) Rats selected for different nervous excitability: long-term emotional-painful stress affects the dynamics of DNA damage in cells of several brain areas. *Int J Mol Sci* 25: 994. <https://doi.org/10.3390/ijms25020994>
7. *Van averbeke V, Berkell M, Mysara M, Rodriguez-Ruiz JP, Xavier BB, De Winter FHR, Jongers B, Jairam RK, Hotterbeekx A, Goossens H, Cohen ES, Malhotra-Kumar S and Kumar-Singh S* (2022) Host Immunity Influences the Composition of Murine Gut Microbiota. *Front Immunol* 13: 828016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828016>
8. *Paone P, Cani PD* (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69: 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
9. *Dzierzynski L, Queen J, Sears CL* (2023) Subtle, persistent shaping of the gut microbiome by host genes: A critical determinant of host biology. *Cell Host Microb* 31(10): 1569–1573. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.09.007>
10. *Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF* (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18: 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>

11. *Sorboni SG, Moghaddam HS, Jafarzadeh-Esfehani R, Soleimanpour S* (2022) A comprehensive review on the role of the gut microbiome in human neurological disorders. *Clin Microbiol Rev* 35: e00338-20.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00338-20>
12. *Lof J, Smits K, Melotte V, Kuil LE* (2022) The health effect of probiotics on high-fat diet-induced cognitive impairment, depression and anxiety: a cross-species systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 136: 104634.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104634>
13. *Laukens D, Brinkman BM, Raes J, De Vos M, Vandenabeele P* (2016) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol Rev* 40: 117–132.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv036>
14. *Toshchakov SV, Izotova AO, Vinogradova EN, Kachmazov GS, Tuaeva AY, Abaev VT* (2021) Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus. *Biology* 10: 1352.
<https://doi.org/10.3390/biology10121352>
15. *Gohl DM, Vangay P, Garbe J, MacLean A, Hauge A, Becker A* (2016) Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat Biotechnol* 34: 942–949.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3656>
16. *Fox J, Weisberg S, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Ellison S, Heiberger R* (2012) Package ‘car’. Vienna: R Found Stat Comput 16: 332–333.
17. *Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O’Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests MASS* (2007) The vegan package. *Commun ecol package* 10: 631–637.
18. *Wickham H* (2016) Programming with ggplot2. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis* 241–253.
19. *Renaud G, Stenzel U, Maricic T, Wiebe V, Kelso J* (2015) deML: robust demultiplexing of Illumina sequences using a likelihood-based approach. *Bioinformatics* 31: 770–772.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu719>
20. *Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR* (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37: 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
21. *Lu Y, Zhou G, Ewald J, Pang Z, Shiri T, Xia J* (2023) MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 51.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad407>
22. *De Marco P, Henriques AC, Azevedo R, Sá SI, Cardoso A, Fonseca B, Barbosa J, Leal S* (2021) Gut microbiome composition and metabolic status are differently affected by early exposure to unhealthy diets in a rat model. *Nutrients* 13: 3236.
<https://doi.org/10.3390/nu13093236>
23. *Grigor’eva IN* (2020) Gallstone disease, obesity and the firmicutes/bacteroidetes ratio as a possible biomarker of gut dysbiosis. *J Pers Med* 11: 13.
<https://doi.org/10.3390/jpm11010013>
24. *Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B* (2020) The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 8: 1715.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
25. *Xu Z* (2022) Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders – A systematic review. *Genes Nutr* 17: 2.
<https://doi.org/10.1007/s12263-021-00693-y>
26. *Hantsoo L, Zemel BS* (2021) Stress gets into the belly: early life stress and the gut microbiome. *Behav Brain Res* 414: 113474.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113474>
27. *Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, Balamurugan R* (2020) The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 12: 1474.
<https://doi.org/10.3390/nu12051474>
28. *Dong Y, Han M, Fei T* (2024) Utilization of diverse oligosaccharides for growth by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species and their in vitro co-cultivation characteristics. *Int Microbiol* 27: 941–952.
<https://doi.org/10.1007/s10123-023-00446-x>

29. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M (2023) Short-chain fatty-acid-producing bacteria: key components of the human gut microbiota. *Nutrients* 15: 2211.
<https://doi.org/10.3390/nu1509221>
30. Zhang K (2019) Abnormal composition of gut microbiota is associated with resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Transl Psychiatry* 9: 231.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0571-x>
31. Mindus C (2021) Lactobacillus-based probiotics reduce the adverse effects of stress in rodents: a meta-analysis. *Front Behav Neurosci* 15: 642757.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.642757>
32. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK (2011) Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 12: R50.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
33. Claesson M, Jeffery I, Conde S (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488: 178–184.
<https://doi.org/10.1038/nature11319>
34. Meng C, Feng S, Hao Z, Dong C, Liu H (2020) Changes in gut microbiota composition with age and correlations with gut inflammation in rats. *PLoS One* 17: e0265430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265430>
35. Neu AT, Allen EE, Roy K (2021) Defining and quantifying the core microbiome: challenges and prospects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2104429118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
36. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD (2020) Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes* 12: 1802866.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1802866>
37. Yassour M, Lim MY, Yun HS (2016) Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med* 8: 17.
<https://doi.org/10.1186/s13073-016-0271-6>
38. Liu G, Qiao Y, Zhang Y, Leng C, Chen H, Sun J, Fan X, Li A, Feng Z (2020) Metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentation. *Front Microbiol* 11: 1131.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01131>
39. Gerritsen J, Hornung B, Renckens B, van Hijum SAFT, Martins dos Santos V, Rijkers GT, Schaap PJ, de Vos WM, Smidt H (2017) Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIBT reveals adaptation to the small intestine. *Peer J* 5: e3698.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3698>
40. Rampanelli E, Romp N, Troise AD, Ananthasabesan J, Wu H, Gül IS, Bui TPN (2025) Gut bacterium *Intestinimonas butyriciproducens* improves host metabolic health: Evidence from cohort and animal intervention studies. *Microbiome* 13: 15.
41. Seegers J, Bui T, de Vos WM (2021) Remarkable metabolic versatility of the commensal bacteria *Eubacterium hallii* and *Intestinimonas butyriciproducens*: potential next-generation therapeutic microbes. In: Mojgani N, Dadar M (eds) *Probiotic bacteria and postbiotic metabolites: role in animal and human health*. *Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-0223-8_5
42. La Reau AJ, Suen G (2018) The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *J Microbiol* 56: 199–208.
<https://doi.org/10.1007/s12275-018-8024-4>
43. Cao Q, Sun X, Rajesh K, Chalasani N, Gelow K, Katz B, Shah VH, Sanyal AJ, Smirnova E (2021) Effects of rare microbiome taxa filtering on statistical analysis. *Front Microbiol* 11: 607325.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607325>
44. Lynch JB, Gonzalez EL, Choy K (2023) Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids. *Nat Commun* 14: 3669.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39403-7>
45. Hoek KL, McClanahan KG, Latour YL, Shealy N, Piazuolo MB, Vallance BA, Byndloss MX, Wilson KT, Olivares-Villagómez D (2023) *Turicibacterales* protect mice from severe *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 91: e00322-23.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00322-23>

46. Zhang L, Jing J, Han L, Wang J, Zhang W, Liu Z (2021) Characterization of gut microbiota, metabolism and cytokines in benzene-induced hematopoietic damage. *Ecotoxicol Environ Saf* 228: 112956.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112956>
47. Misiak B, Pawlak E, Rembacz K, Kotas M, Żebrowska-Róžańska P, Kujawa D (2024) Associations of gut microbiota alterations with clinical, metabolic, and immune-inflammatory characteristics of chronic schizophrenia. *J Psychiatr Res* 171: 152–160.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2024.01.036>
48. Oñate FP, Chamignon C, Burz SD (2023) *Adlercreutzia equolifaciens* is an anti-inflammatory commensal bacterium with decreased abundance in gut microbiota of patients with metabolic liver disease. *Int J Mol Sci* 24: 12232.
<https://doi.org/10.3390/ijms241512232>
49. Wu X, Chen J, Xu M, Zhu D, Wang X, Chen Y, Yu L (2017) 16S rDNA analysis of periodontal plaque in chronic obstructive pulmonary disease and periodontitis patients. *J Oral Microbiol* 9: 1324725.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1324725>
50. Vacca M, Celano G, Calabrese FM (2020) The controversial role of human gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8: 573.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
51. Hexun Z, Miyake T, Maekawa T (2023) High abundance of Lachnospiraceae in the human gut microbiome is related to high immunoscores in advanced colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 72: 315–326.
<https://doi.org/10.1007/s00262-022-03256-8>
52. McGaughey KD (2019) Relative abundance of *Akkermansia* spp. and other bacterial phylotypes correlates with anxiety- and depressive-like behavior following social defeat in mice. *Sci Rep* 9: 3281.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40140-5>
53. Hao Z (2019) *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology* 104: 132–142.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.025>
54. Martín R, Miquel S, Chain F (2015) *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 15: 67.
<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0400-1>
55. Li LF, Zou HW, Song BL, Wang Y, Jiang Y, Li ZL, Niu QH, Liu YJ (2023) Increased *Lactobacillus* Abundance Contributes to Stress Resilience in Mice Exposed to Chronic Social Defeat Stress. *Neuroendocrinology* 113(5): 563–576.
<https://doi.org/10.1159/000528876>
56. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161: 264–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
57. Mansuy-Aubert V, Ravussin Y (2023) Short chain fatty acids: the messengers from down below. *Front Neurosci* 17: 1197759.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1197759>
58. Bonaz B, Bazin T and Pellissier S (2018) The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci* 12: 49.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>
59. Colombo AV, Sadler RK, Llovera G, Singh V, Roth S, Heindl S, Sebastian Monasor L, Verhoeven A, Peters F, Parhizkar S, Kamp F, Gomez de Agüero M, MacPherson AJ, Winkler E, Herms J, Benakis C, Dichgans M, Steiner H, Giera M, Haass C, Tahirovic S, Liesz A (2021) Microbiota-derived short chain fatty acids modulate microglia and promote A β plaque deposition. *Elife* 10: e59826.
<https://doi.org/10.7554/eLife.59826>
60. Terry N, Margolis KG (2017) Serotonergic Mechanisms Regulating the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handb Exp Pharmacol* 239: 319–342.
https://doi.org/10.1007/164_2016_103
61. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan J (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18: 666–673.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>

62. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, McDonald D, Dietrich D, Ramadhar T, Lekbua A, Mroue N, Liston C, Stewart EG, Dubin MJ, Zengler K, Knight R, Gilbert JA, Clardy J, Lewis K (2019) GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature Microbiol* 4(3): 396–403.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>
63. Wang Y, Tong Q, Ma SR, Zhao ZX, Pan LB, Cong L, Han P, Peng R, Yu H, Lin Y, Gao T, Shou Y, Li X, Zhang X, Zhang Z, Fu J, Wen B, Yu J, Cao X, Jiang JD (2021) Oral berberine improves brain dopa/dopamine levels to ameliorate Parkinson's disease by regulating gut microbiota. *Signal Transduct Targ Therapy* 6(1): 77.
64. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020) Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30: 492–506.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
65. Dąbrowska K, Witkiewicz W (2016) Correlations of Host Genetics and Gut Microbiome Composition. *Front Microbiol* 7: 1357.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01357>
66. Korach-Rechtman H, Freilich S, Gerassy-Vainberg S, Buhnik-Rosenblau K, Danin-Poleg Y, Bar H, Kashi Y (2019) Murine Genetic Background Has a Stronger Impact on the Composition of the Gut Microbiota than Maternal Inoculation or Exposure to Unlike Exogenous Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 85(18): e00826-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00826-19>

Behavioral Profile and Gut Microbiota Composition in Rats with Different Nervous System Excitability

I. G. Shalaginova^{a, b, *}, D. S. Katserov^a, K. O. Ensh^a, E. A. Budenkova^a,
A. K. Pribyshina^b, and N. A. Dyuzhikova^b

^aEducational and Scientific Cluster “Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO)”,
Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

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

*e-mail: shalaginova_i@mail.ru

Previous studies have shown that two rat strains selected by the excitability threshold of the nervous system exhibit differences in response to prolonged emotional-pain stress at behavioral, neurobiological, and molecular-genetic levels, as well as specific changes in gut microbiota composition. This suggests a potential link between genetic factors, microbiota, and behavioral disturbances. The aim of this study is to analyze the gut microbiota and behavioral profiles of intact rats with high (HT) and low (LT) excitability thresholds to identify key differences driven by their genetic characteristics.

The behavior of intact rats from two strains was analyzed in the Open Field and Elevated Plus Maze, and microbiota analysis in stool samples was conducted using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Behavioral analysis revealed that high-excitability (LT) rats exhibited higher activity and less freezing in the Elevated Plus Maze compared to low-excitability (HT) rats. Alpha-diversity indices showed no significant differences between the strains, but beta-diversity analysis revealed significant differences in microbial profiles between HT and LT rats. LT rats had significantly higher abundances of *Lactobacillus* and *Faecalibacterium* genera, whereas HT rats showed a higher relative abundance of *Romboutsia*, *Eubacterium*, and *Turicibacter* genera. The integration of behavioral and microbiota data highlights a potential relationship between genetic factors, gut microbiota profiles, and the unique physiological and behavioral traits of rat strains selected based on the excitability threshold of the nervous system.

Keywords: gut microbiota, core microbiome, gut-brain axis, nervous system excitability, rats, stress

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ ПОСЛЕ ИХ
ПОДАВЛЕНИЯ ЭТОСУКСИМИДОМ У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij
С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ**

© 2025 г. А. В. Габова^{1,*}, Е. А. Федосова¹, А. Б. Шацкова¹, К. Ю. Саркисова¹

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

**E-mail: agabova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 04.04.2025 г.

После доработки 14.05.2025 г.

Принята к публикации 15.05.2025 г.

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью абсансной эпилепсии, при которой на ЭЭГ регистрируются генерализованные пик-волновые разряды (ПВР). ПВР генерируются в гиперактивной соматосенсорной коре мозга. Противоабсансный препарат этосуксимид (ЕТХ) уменьшает возбудимость коры и, как следствие, подавляет ПВР. Цель работы – выяснить особенности восстановления разрядов после их полного подавления ЕТХ. Для этого мы сравнивали динамику восстановления ПВР после отмены 14-дневного введения ЕТХ 7–8-месячным крысам линии WAG/Rij и возрастзависимое созревание ПВР. Ранее нами было показано, что возрастзависимое созревание разрядов проходит 3 стадии: 1-я – незрелые разряды, напоминающие веретенообразные осцилляции, 2-я – незрелые разряды, в которых осцилляции перемежаются с фрагментами пик-волновых комплексов, 3-я – зрелые ПВР. При возрастзависимом созревании ПВР зрелые разряды постепенно вытесняют незрелые, и одновременно пик-волновые комплексы заменяют осцилляции. В 1-й день после отмены ЕТХ на ЭЭГ регистрировались преимущественно незрелые разряды, состоящие из осцилляций, что соответствует 1-й стадии возрастзависимого развития разрядов. На 3-й день после отмены препарата на ЭЭГ преобладали незрелые разряды, в которых перемежались осцилляции и фрагменты с пик-волновыми комплексами, что соответствует 2-й стадии. На 7-й день большинство разрядов были зрелые ПВР, что соответствует 3-й стадии. Таким образом, 3 стадии восстановления разрядов после отмены введения ЕТХ аналогичны стадиям возрастзависимой эволюции ПВР. В процессе восстановления разрядов сначала появлялись осцилляции, а затем волны. Зрелые разряды замещали незрелые, пик-волновые комплексы замещали осцилляции. Предполагается, что восстановление разрядов является результатом повышения возбудимости соматосенсорной коры мозга после отмены ЕТХ. Обсуждаются различные точки зрения относительно общности или независимости механизмов происхождения волны и пика как непереносимых атрибутов зрелого ПВР. Результаты могут быть использованы для определения ранних стадий развития пик-волновых разрядов при диагностике и лечении пациентов с абсансной эпилепсией.

Ключевые слова: крысы линии WAG/Rij, пик-волновой разряд, стадии развития разрядов, этосуксимид, усредненная спектральная мощность разрядов, морфология пик-волнового комплекса

DOI: 10.7868/S2658655X25070048, **EDN:** MVOVHY

ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij являются моделью абсансной (неконвульсивной) эпилепсии человека. На ЭЭГ человека и крыс линии WAG/Rij она проявляется в виде генерализованных пик-волновых разрядов, во время которых происходит изменение или полное отключение сознания. Пик-волновые разряды (ПВР), имеющиеся на ЭЭГ при абсансной эпилепсии, подавляются этосуксимидом (ЕТХ), препаратом первого выбора [1–3]. Показано, что ЕТХ подавляет ПВР у крыс линий WAG/Rij и GAERS при введении в кору мозга [4], внутрибрюшинном [5–8] или пероральном [9–12] введениях разной длительности – как при однократном, так и хроническом, длительностью 4.5 месяца. Однако подавление ПВР является временным, длительность периода подавления разрядов после отмены препарата зависит от продолжительности введения ЕТХ. Полное восстановление разрядов после однократного введения ЕТХ крысам линии GAERS (доза 200 мг/кг) наступало через 48 ч [5]. Через 10 дней после отмены хронического введения ЕТХ крысам линии GAERS в возрасте 5–25 дней (доза 200 мг/кг) число разрядов становилось равным числу ПВР у крысят, которым вводили физраствор [5]. Крысам линии GAERS вводили ЕТХ в возрасте от 3 до 22 недель (доза 300 мг/кг). Был показан временный эффект подавления ПВР: в течение 12 недель после отмены введения ЕТХ число разрядов увеличивалось [11]. После отмены хронического (с 21-дневного до 5-месячного возраста) введения ЕТХ крысам линии WAG/Rij в дозе 300 мг/кг/день число разрядов частично восстанавливалось к 8-месячному возрасту [8, 9, 12]. Однако изменение морфологических характеристик разрядов после отмены введения ЕТХ ранее не изучалось. В предыдущих работах нами было показано, что воздействие внешних факторов на крыс линии WAG/Rij может приводить к изменению морфологии разрядов. Так, воспитание приемной матерью Wistar с высоким уровнем материнской заботы вызывает замедление процесса развития абсансной эпилепсии. У 30% взрослых, 7–8-месячных крыс линии WAG/Rij зрелые ПВР полностью отсутствовали. Они замещались незрелыми разрядами разной степени созревания [13, 14], аналогичными незрелым разрядам, характерным для более ранней стадии развития патологии у крыс линии WAG/Rij, воспитанных собственными матерями. У крыс линии WAG/Rij абсансные разряды появляются не сразу после рождения. Ранее нами было показано, что у крыс линии WAG/Rij созревание разрядов является возрастзависимым процессом, в котором можно выделить 3 стадии: 1-я стадия – на ЭЭГ преобладают незрелые разряды, напоминающие веретенообразные осцилляции (возраст крыс – 2–3 месяца); 2-я стадия – преобладают незрелые разряды с перемежающимися фрагментами осцилляций и пик-волновых комплексов (возраст крыс – 3–4 месяца); 3-я стадия – преобладают зрелые ПВР, состоящие из пик-волновых комплексов и имеющие полностью развитую морфологическую структуру (возраст крыс – 5–6 месяцев). Увеличение амплитуды и длительности ПВР продолжается до 8–9 месяцев [15]. У крыс линии GAERS, другой модели абсансной эпилепсии, появление и созревание разрядов происходит значительно быстрее (от 15–20-дневного до 40–50-дневного возраста), созревание разрядов проходит три стадии аналогично разрядам крыс линии WAG/Rij. Разряды у мышей линии C3H/HeJ также созревают постепенно и зависят от возраста. [16]. В настоящей работе мы сопоставили восстановление разрядов после их полного подавления введением ЕТХ в течение 14 дней с процессом возрастзависимого развития ПВР у крыс линии WAG/Rij.

Цель данной работы – выяснить особенности процесса восстановления ПВР у взрослых крыс линии WAG/Rij после отмены 14-дневного введения ЕТХ. Для достижения этой цели у крыс линии WAG/Rij до введения (фон), в 1-й, а также на 3-й и 7-й дни после отмены введения ЕТХ регистрировали число, длительность, индекс и амплитуду разрядов, вычисляли индекс асимметрии разрядов, долю числа зрелых разрядов (%) и долю осцилляций в разряде (%). Анализировали морфологические особенности,

частотно-временную динамику, спектры мощности отдельных разрядов и усредненную спектральную плотность мощности разрядов. Анализ возрастзависимого изменения характеристик разрядов проводился аналогично.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование восстановления разрядов после 14-дневного введения ЕТХ проводилось на 20 крысах-самцах линии WAG/Rij в возрасте 7–8 месяцев. Для анализа возрастзависимого изменения характеристик разрядов использовали записи ЭЭГ одних и тех же крыс-самцов линии WAG/Rij ($n = 4$) в возрасте от 2 до 8 месяцев. Крысы содержались в стандартных условиях вивария с 12 : 12-часовым циклом “свет – темнота” (свет в 8:00) и свободным доступом к воде и пище. Электроды вживляли во фронтальные (АР: +2 мм, L: 2.5 мм) и затылочные (АР: –6 мм, L: 4 мм) отделы коры. Вживление электродов (миниатюрные винтики из нержавеющей стали) проводили под хлоралгидратной анестезией (400 мг/кг, в/б). Через 8 дней после операции по вживлению электродов крыс произвольно делили на 2 группы по 10 крыс в каждой и проводили фоновую запись ЭЭГ. Затем начинали внутрибрюшинное введение препаратов, которое длилось 14 дней. Крысам одной группы вводили ЕТХ в дозе 300 мг/кг/день, растворителем являлся физраствор (0.9%-ный раствор NaCl), крысам другой группы вводили только физраствор. Через сутки, а также на 3-й и 7-й дни после отмены введения препаратов проводили регистрацию ЭЭГ. Все записи ЭЭГ проводили в течение 3 ч, с 16:00 до 19:00. У свободно передвигающихся животных запись ЭЭГ осуществляли с помощью восьмиканального беспроводного усилителя биопотенциалов BR8V1 (Texas Instruments, США) в соответствии с ранее описанной методикой [13, 14]. Регистрацию проводили монополярно, референтный электрод размещали над мозжечком. ПВР и незрелые разряды брались для анализа во время спокойного бодрствования. Пик-волновые разряды на ЭЭГ определялись как повторяющиеся последовательности острых асимметричных пиков и медленных волн (пик-волновые комплексы) продолжительностью ≥ 2 с. Их амплитуда, по крайней мере, в 2 раза превышала амплитуду фоновой ЭЭГ, величина которой составляла около 60–70 мкВ, средняя частота ПВР равнялась 7–8 Гц [17]. Незрелые разряды отличались от зрелых разрядов веретенообразными осцилляциями на 1-й стадии и нерегулярным появлением комплекса пик-волна, перемежающегося с осцилляциями, на 2-й стадии созревания разрядов. Анализировали разряды, зарегистрированные во фронтальной коре мозга, в которой они имеют наибольшую амплитуду и более отчетливо выраженную морфологическую структуру по сравнению с разрядами, регистрируемыми в задних отделах коры мозга. Разряды брали через 15 мин от начала записи ЭЭГ, убедившись, что крысы находятся в спокойном состоянии. Во всех случаях анализировали ПВР по методике, описанной нами ранее [14]. Вычисляли число зрелых разрядов, их среднюю длительность (суммарная длительность разрядов/число разрядов). Также вычисляли индекс разрядов, характеризующий степень эпилептической активности (доля общей длительности разрядов по отношению к длительности регистрации ЭЭГ в %). Определяли среднюю амплитуду разрядов (мкВ) и индекс асимметрии (%) $[(\text{негативная часть амплитуды} / \text{сумма негативного и позитивного значения амплитуды}) \times 100\%]$. Для вычисления этих характеристик брали 40 разрядов у 10 крыс на каждом сроке эксперимента. Также вычисляли число незрелых разрядов и отношение числа зрелых разрядов к сумме всех разрядов (%) в 3-часовой записи ЭЭГ. Для вычисления доли осцилляций и доли пик-волновых комплексов в разрядах при возрастзависимом изменении брали 25–30 разрядов у 4 крыс в возрасте 2–3, 3–4, 5–6 и 7–8 месяцев.

Частотно-временную динамику разрядов исследовали с помощью комплексного вейвлета Морле на основе ранее разработанной методики [18]. Спектры мощности

частот разрядов вычисляли методом Уэлча, используя быстрое преобразование Фурье (окно Хеннинга шириной 2 с, перекрытие окна равно 7/8). Усредненные спектры мощности разрядов строили из 80–90 разрядов на каждом сроке исследования. Кроме того, анализировали морфологические особенности разрядов. Определяли наличие четырех составляющих пик-волнового комплекса: ранний позитивный переходный процесс (ранний ППП), пик 2 (П2), поздний позитивный переходный процесс (поздний ППП), волна [19]. Доля осцилляций и доля пик-волновых комплексов в разряде представлены в виде средней и ошибки средней ($M \pm m$), %.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ «STATISTICA Release 7». Использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (2-way ANOVA with repeated measures), с последующим определением различий между средними значениями показателей по критерию Ньюмена – Кеулса (Newman – Keuls test). Различия в усредненных спектрах мощности разрядов определяли с помощью U-теста Манна – Уитни с поправкой Бонферрони на число значений в спектре и число парных сравнений. Для построения рисунков использовали программы GraphPad Prism 10, CorrelDraw 2017, Matlab 2021a.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал значимое влияние стадии исследования на число ПБР [$F(3,51) = 8.43, p < 0.001$] и их среднюю длительность [$F(3,51) = 9.46, p < 0.001$]. Произведение факторов «группа» и «стадия исследования» были также значимыми как для числа [$F(3,51) = 8.97, p < 0.001$], так и для средней длительности ПБР [$F(3,51) = 14.62, p < 0.001$]. Фактор «группа» (введение физраствора или ЕТХ) был значимым для средней длительности ПБР [$F(3,51) = 6.46, p < 0.05$] и на уровне тенденции для числа разрядов [$F(3,51) = 3.09, p = 0.09$]. Введение ЕТХ в течение 14 дней крысам линии WAG/Rij практически полностью подавило зрелые разряды. На ЭЭГ в 1-й день после отмены введения ЕТХ имелось большое число незрелых разрядов (рис. 1).

На 3-й день после отмены введения препарата число и длительность ПБР были значимо больше по сравнению со значениями этих показателей в 1-й день после отмены препарата, но меньше, чем в фоне. На 7-й день после отмены введения препарата число и длительность ПБР были значимо больше по сравнению со значениями этих показателей на 1-й день после отмены введения ЕТХ. На 7-й день после отмены ЕТХ наблюдали тенденцию к увеличению числа и значимое увеличение длительности ПБР по сравнению с 3-м днем после отмены ЕТХ (рис. 2а, б).

Введение физраствора не влияло на число и длительность разрядов на всех сроках эксперимента (рис. 2с, д).

Индекс зрелых разрядов, регистрируемых на ЭЭГ (доля суммарной длительности разрядов по отношению к длительности записи, в %), на 1-й и 3-й день после отмены введения ЕТХ был значимо меньше, чем до введения. На 7-й день после отмены введения ЕТХ индекс зрелых разрядов становился значимо больше, чем на 1-й и 3-й день после отмены. На 7-й день после отмены ЕТХ индекс зрелых разрядов не отличался от индекса до введения ЕТХ (рис. 3а). Индексы зрелых разрядов при введении физраствора не имели значимого различия на всех сроках эксперимента (рис. 3б).

Между числом зрелых и незрелых разрядов имела отрицательная корреляционная связь. При введении ЕТХ она равнялась $r = -0.49, p < 0.05$, при введении физраствора $r = -0.27, p < 0.05$, корреляция Пирсона (рис. 4а, б).

Доля зрелых разрядов, регистрируемых на ЭЭГ (отношение числа зрелых разрядов к общему числу разрядов, в %), на 1-й и 3-й день после отмены введения ЕТХ была

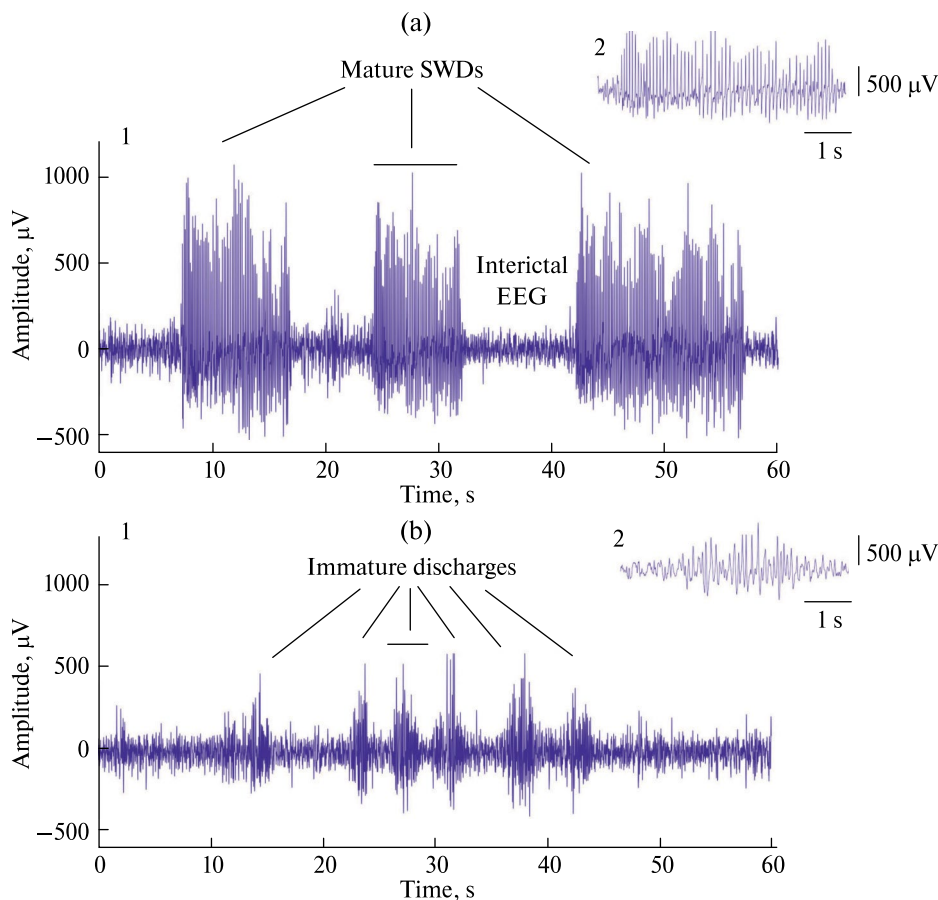


Рис. 1. Примеры фрагментов фоновой записи ЭЭГ (а) и записи ЭЭГ с серией незрелых разрядов на 1-й день после отмены введения ЕТХ (б) у крысы линии WAG/Rij в пассивном бодрствовании. (а) 1 – фоновая запись ЭЭГ с серией ПВР; 2 – ПВР представлен на увеличенной по времени шкале. (б) 1 – ЭЭГ с серией незрелых разрядов на 1-й день после отмены введения ЕТХ; 2 – незрелый разряд представлен на увеличенной по времени шкале. Разряды на увеличенной по времени шкале выделены горизонтальными линиями над ЭЭГ. Amplitude, μV – амплитуда, мкВ; Time, s – время, с; Mature SWDs – зрелые ПВР; Immature discharges – незрелые разряды.

значимо меньше, чем до введения. На 7-й день после отмены введения ЕТХ доля зрелых разрядов становилась значимо больше, чем на 1-й и 3-й день после отмены. На 7-й день после отмены ЕТХ доля зрелых разрядов не отличалась от доли зрелых разрядов до введения ЕТХ (рис. 5а). Доли зрелых разрядов при введении физраствора не имели значимого различия на всех сроках эксперимента (рис. 5б).

Хроническое введение ЕТХ оказывало значимое влияние на амплитуду и индекс асимметрии разрядов. Так, двухфакторный ANOVA с повторными измерениями показал значимый эффект фактора «группа» [$F(1,174) \geq 14.30, p < 0.001$], фактора «стадия исследования» [$F(3,174) \geq 22.81, p < 0.001$] и взаимодействия этих факторов [$F(3,174) \geq 36.23, p < 0.001$] на амплитуду и индекс асимметрии ПВР. В 1-й день после отмены введения ЕТХ, когда на ЭЭГ имелись только незрелые разряды, их амплитуда и индекс асимметрии были значимо меньше, чем до введения (фон), а также на 3-й и 7-й дни после отмены ЕТХ. На 3-й день после отмены введения ЕТХ амплитуда и индекс асимметрии

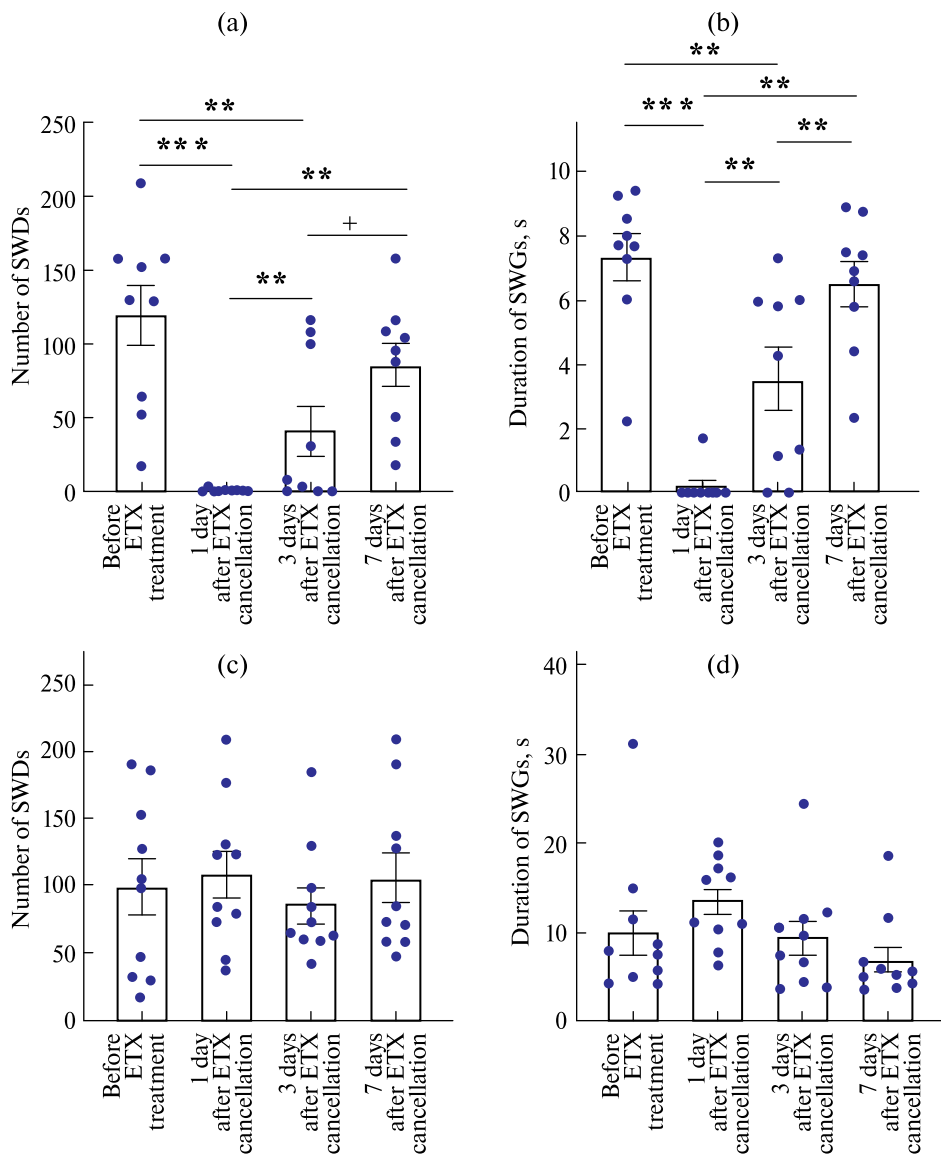


Рис. 2. Число (а, с) и длительность (b, d) зрелых ПВР (ЕТХ – верхний ряд рисунков, физраствор – нижний ряд) до введения, на 1-й, 3-й и 7-й дни после отмены введения ЕТХ/физраствора. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, + $0.05 < p < 0.1$ (тенденция). Горизонтальные линии обозначают сравниваемые группы. Number of SWDs – число ПВР; Duration of SWGs, s – длительность ПВР, с; Before ETX/vehicle treatment – до введения ЕТХ/физраствора; 1, 3, 7 days after ETX/vehicle cancellation – 1-й, 3-й, 7-й дни после отмены введения ЕТХ/физраствора.

разрядов были значимо меньше, чем в фоне, и больше, чем в 1-й день после отмены введения. На 7-й день после отмены препарата значения амплитуды и индекса асимметрии не отличались от фоновых и были больше, чем на 3-й день после отмены. Хроническое введение физраствора не влияло на амплитуду и индекс асимметрии разрядов. Значения амплитуды и индекса асимметрии разрядов в 1-й и на 3-й дни после отмены введения ЕТХ были значимо меньше, чем их значения после введения физраствора (табл. 1).

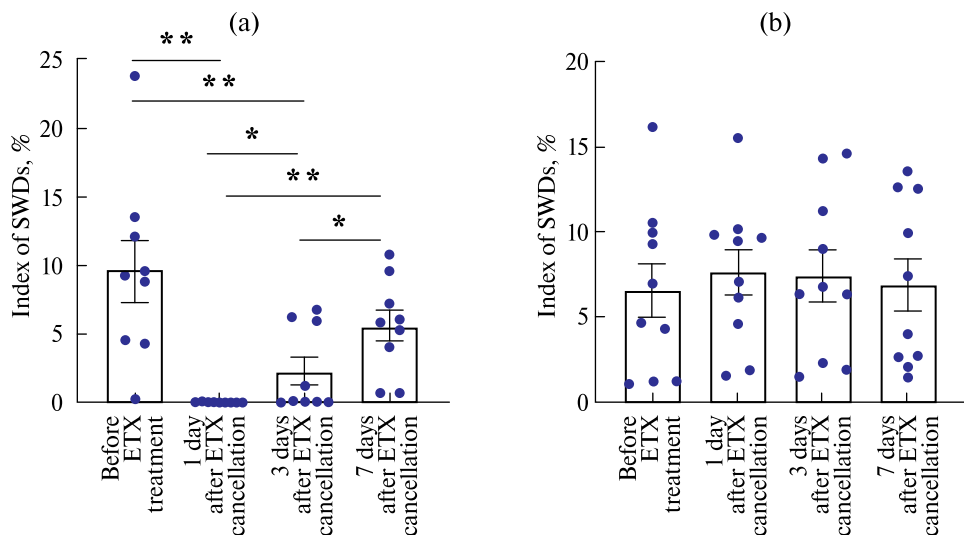


Рис. 3. Индекс ПВР до введения, на 1-й, 3-й и 7-й дни после отмены введения ETX/физраствора. (а) – Введение ETX. (б) – Введение физраствора. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Горизонтальные линии обозначают сравниваемые группы. Index of SWDs – индекс ПВР. По оси абсцисс обозначения те же, что на рис. 2.

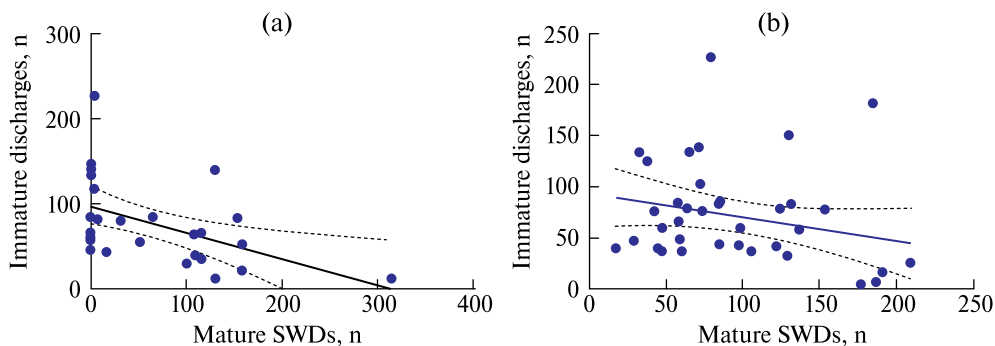


Рис. 4. Связь между числом зрелых и незрелых разрядов. Корреляция Пирсона. (а) – Введение ETX. (б) – Введение физраствора. Mature SWDs, n – зрелые разряды, число; Immature discharges, n – незрелые разряды, число.

В ЭЭГ фоновой записи перед введением ETX и в 1-й день отмены введения физраствора большинство разрядов были типичными ПВР (рис. 6а, б).

ПВР имеют обычную для зрелого разряда длительность и амплитуду (рис. 6а, 1 и рис. 6б, 1, табл. 1). Вейвлет-спектрограммы имеют типичную для ПВР частотно-временную динамику: в начале разряда частота составляет 11–12 Гц, в течение 0.5 Гц она снижается и далее поддерживается на частоте 7–8 Гц (рис. 6а, 2 и рис. 6б, 2). Спектры мощности ПВР соответствуют зрелым разрядам: они имеют максимальную мощность на фундаментальной частоте 7.5–8 Гц и меньшую мощность на 2-й и 3-й гармониках (рис. 6а, б, 3). На фрагментах разрядов на увеличенной по времени шкале показаны морфологические характеристики типичного зрелого ПВР, состоящего из 4 компонентов: ранний позитивный переходный процесс (ППП), пик П2, поздний ППП и волна (рис. 6а, б, 4).

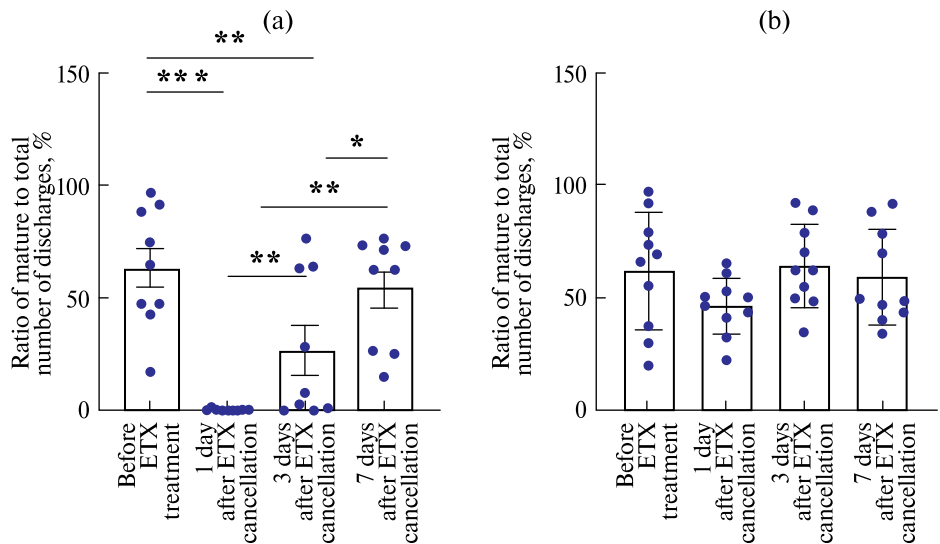


Рис. 5. Отношение числа зрелых разрядов к общему числу разрядов (%) до введения, на 1-й, 3-й и 7-й дни после отмены введения ЕТХ/физраствора. (а) – Введение ЕТХ. (б) – Введение физраствора. ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$. Горизонтальные линии обозначают сравниваемые группы. Ratio of mature to total number of discharges – отношение числа зрелых разрядов к общему числу разрядов. По оси абсцисс обозначения те же, что на рис. 2.

Таблица 1. Характеристики разрядов у крыс линии WAG/Rij в фоне, на 1-й, 3-й и 7-й день после отмены введения ЕТХ и физраствора

Характеристики ПВР	Перед введением	1 день после отмены введения	3 дня после отмены введения	7 дней после отмены введения
Физраствор				
Амплитуда, мкВ	1005.1 ± 15.7	994.5 ± 12.9	977 ± 9.4	999.1 ± 9.1
Индекс асимметрии, %	66.2 ± 1.3	69.0 ± 1.2	68.9 ± 0.9	68.4 ± 0.9
ЕТХ				
Амплитуда, мкВ	1023.8 ± 12.3	364.0 ± 18.3 ^{###}	625.8 ± 35.7 ^{###++}	909.3 ± 16.5 ^{###++^^}
Индекс асимметрии, %	70.4 ± 0.6	56.2 ± 0.6 ^{###}	61.7 ± 1.2 ^{###++}	71.4 ± 1.1 ^{###^^}

Данные представлены в виде средних значений и ошибки средних ($M \pm m$). ^{##} – $p < 0.01$ по сравнению с фоном; ⁺⁺ – $p < 0.01$ по сравнению с 14-дневным введением ЕТХ, ^{^^} – $p < 0.01$ по сравнению с 3-м днем после отмены введения; ^{*} – $p < 0.01$ по сравнению с физраствором.

В 1-й день после отмены введения ЕТХ на ЭЭГ преобладали незрелые разряды в виде веретенообразных осцилляций (рис. 7а, 1), аналогичные разрядам на 1-й стадии возрастзависимого развития у крыс линии WAG/Rij (рис. 7б, 2).

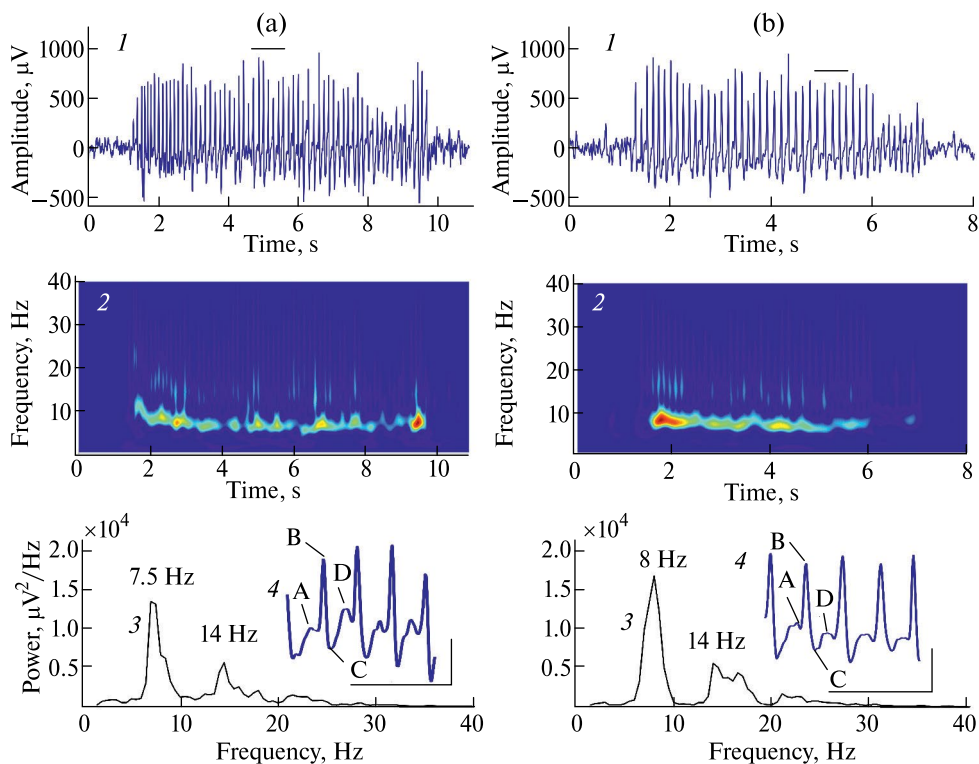


Рис. 6. Типичные пик-волновые разряды, зарегистрированные у крыс линии WAG/Rij в фоновой ЭЭГ (а) и на 1-й день после отмены введения физраствора (б). 1 – ПВР; 2 – вейвлет-спектрограмма, отражающая частотно-временную динамику разряда; 3 – спектральная плотность мощности ПВР; 4 – фрагмент ПВР (отмечен горизонтальной линией над разрядом), представленный на увеличенной по времени шкале с целью иллюстрации его морфологии: А – ранний позитивный переходный процесс (ППП); В – пик 2 (П2); С – поздний PPP; D – волна. Шкалы: время 500 мс (абсцисса), амплитуда 250 мкВ (ордината). Amplitude, μV – амплитуда, мкВ; Time, s – время, с; Power, $\mu V^2/Hz$ – спектральная плотность мощности, мкВ²/Гц; Frequency, Hz – частота, Гц.

Вейвлет-спектрограммы обоих разрядов отражают их нестабильную во времени частоту, колеблющуюся около 8–10 Гц (рис. 7а, б, 2; рис. 7б, 2). На спектрах мощности имеется пик на фундаментальной частоте 8–8.5 Гц и пик на 10.5 Гц, который не является гармоникой и отражает нестабильность частоты разряда (рис. 7а, 3; рис. 7б, 3). На фрагменте разряда, представленного на увеличенной по времени шкале, имеются лишь осцилляции. Пик-волновые комплексы, характерные для ПВР, отсутствуют (рис. 7а, 4; рис. 7б, 4). Таким образом, незрелые разряды на 1-й день после отмены введения ЕТХ и разряды 1-й стадии возрастзависимой эволюции, наблюдавшейся у крыс WAG/Rij в возрасте 2–3 месяцев, по своим частотно-временным и морфологическим характеристикам аналогичны (рис. 7а; рис. 7б).

На 3-й день после отмены введения ЕТХ зрелые разряды отсутствовали у 2 из 9 крыс. На ЭЭГ преобладали незрелые разряды, состоящие из пик-волновых комплексов и осцилляций (рис. 8а, 1), что аналогично незрелым разрядам на 2-й стадии возрастзависимого развития разрядов у крыс линии WAG/Rij (возраст 3–4 месяца) (рис. 8б, 1).

Вейвлет-спектрограммы разрядов на 3-й день после отмены введения ЕТХ и на 2-й стадии возрастзависимого развития разрядов отражают нестабильную частоту разрядов (рис. 8а, б, 2). В то же время на спектрах мощности разрядов появляются, хотя еще

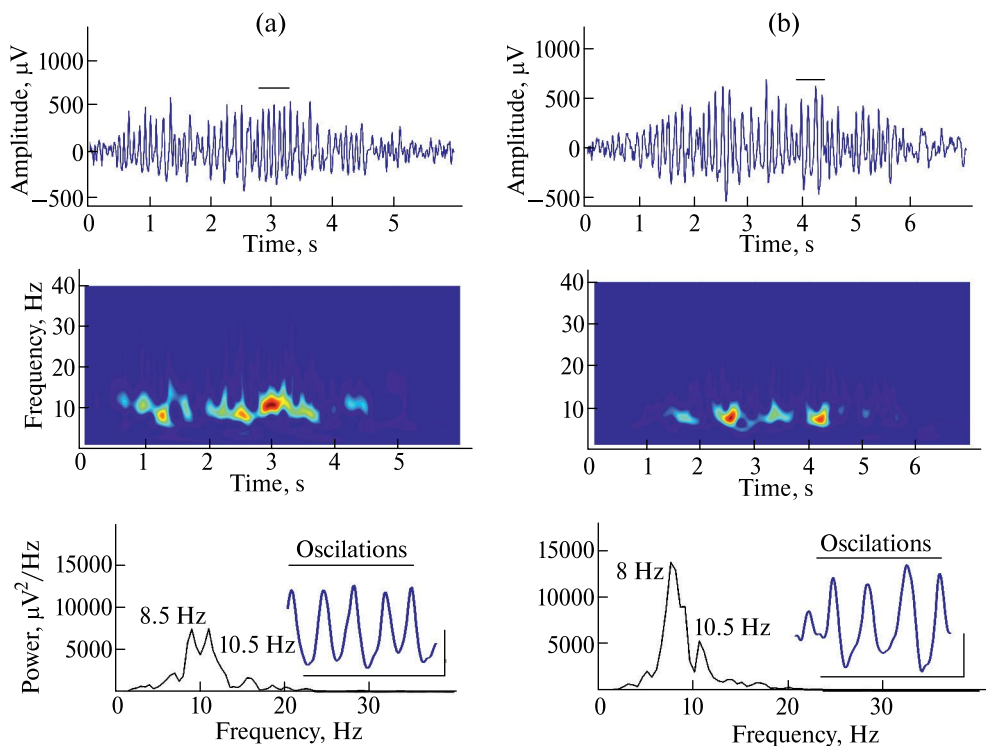


Рис. 7. Сравнение незрелого разряда, регистрируемого на 1-й день после отмены введения ЕТХ (а), с разрядом на 1-й стадии возраст-зависимой эволюции у крыс линии WAG/Rij (б). 1 – незрелый разряд, состоящий из осцилляций; 2 – вейвлет-спектрограмма; 3 – спектральная плотность мощности разряда; 4 – фрагмент разряда (отмечен горизонтальной линией над ЭЭГ разряда), представленный на увеличенной по времени шкале с целью иллюстрации его морфологии. Oscillations – осцилляции. Обозначения на осях те же, что и на рис. 6.

не очень четкие, пик на фундаментальной частоте 7.5 Гц и 1-я гармоника на частоте 14 Гц, мощность которых меньше, чем у зрелых разрядов (рис. 8а, 3; рис. 8б, 3). На фрагментах разрядов, представленных на увеличенной по времени шкале, имеются осцилляции и пик-волновые комплексы. В пик-волновых комплексах имеются все 4 морфологические структуры разряда: ранний ППП, П2, поздний ППП и волна (рис. 8а, 4; рис. 8б, 4). Таким образом, незрелые разряды на 3-й день после отмены ЕТХ по своим характеристикам аналогичны разрядам 2-й стадии возрастзависимого развития разряда у крыс линии WAG/Rij.

После отмены введения ЕТХ на ЭЭГ преобладали незрелые разряды, состоящие преимущественно из осцилляций. Доля осцилляций составляла $97.6 \pm 0.8\%$. На 1-й стадии развития ПБР, которая характерна для крыс линии WAG/Rij в возрасте 2–3 месяцев, доля осцилляций составляла 95.3 ± 1.4 . Подобные изменения морфологии разрядов свидетельствовали о том, что разряды, регистрируемые на 1-й день после отмены ЕТХ и на 1-й стадии развития ПБР в возрасте 2–3 месяцев, аналогичны (рис. 9а, б, 1). На 3-й день после отмены введения ЕТХ число пик-волновых комплексов в структуре незрелого разряда увеличивалось, а доля осцилляций в разряде уменьшалась и составляла $63.4 \pm 6.4\%$. На 2-й стадии развития ПБР, которая характерна для крыс линии WAG/Rij в возрасте 3–4 месяцев, доля осцилляций составляла $54.3 \pm 2.9\%$. На этой стадии в разряде появлялись волны (*W*), которые сопровождалось сжатием осцилляций,

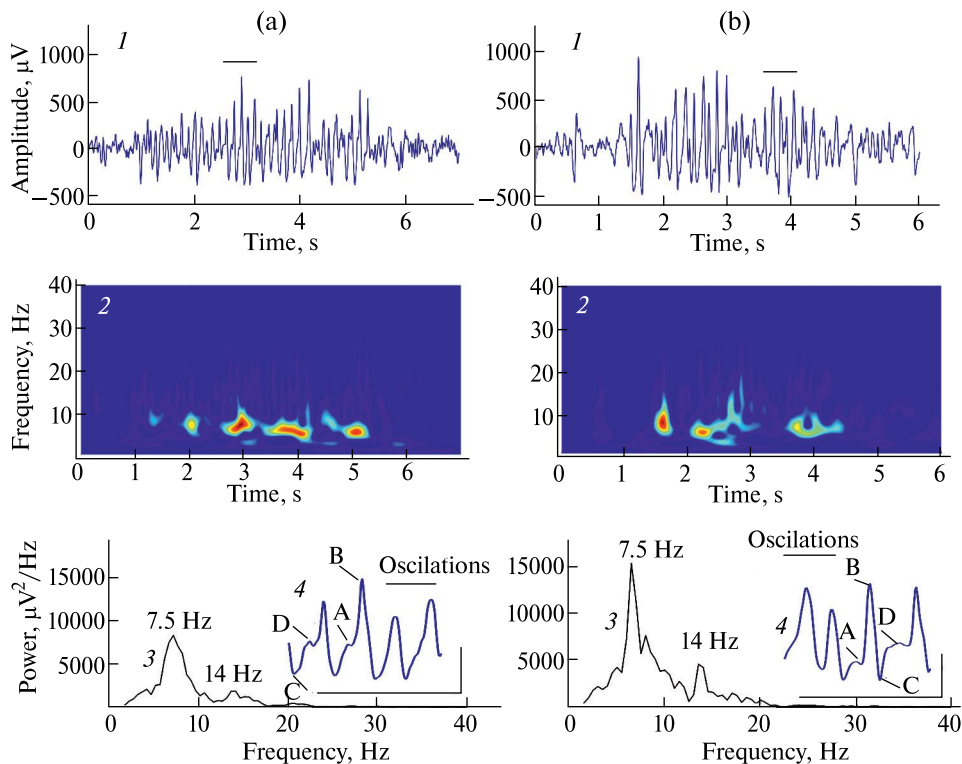


Рис. 8. Сравнение незрелого разряда на 3-й день после отмены введения ЕТХ (а) с разрядом на 2-й стадии возрастзависимой эволюции ПВР (б) у крыс линии WAG/Rij. 1 – незрелый разряд, состоящий из пик-волновых комплексов и осцилляций; 2 – вейвлет-спектрограмма, отражающая частотно-временную динамику разряда; 3 – спектральная плотность мощности разряда; 4 – фрагмент разряда (отмечен горизонтальной линией над ЭЭГ разряда), представленный на увеличенной по времени шкале с целью иллюстрации его морфологии: А – ранний позитивный переходный процесс (ППП); В – пик 2 (П2); С – поздний PPP; D – волна; чертой над фрагментами разрядов отмечены осцилляции. Обозначения на осях те же, что и на рис. 6.

прилегающих к волнам, вследствие чего осцилляции заострялись и становились пиками (S) пик-волнового комплекса. Подобные изменения морфологии разрядов свидетельствовали о том, что разряды, имеющиеся на 3-й день после отмены ЕТХ и на 2-й стадии развития ПВР в возрасте 3–4 месяцев, аналогичны (рис. 9а, б, 2).

На 7-й день после отмены ЕТХ в разрядах преобладали пик-волновые комплексы (рис. 9а, 3), доля осцилляций в разряде составляла $24.4 \pm 4.9\%$, что аналогично 3-й стадии возрастзависимого развития разрядов (доля осцилляций $21.1 \pm 1.9\%$), характерной для крыс линии WAG/Rij в возрасте 5–6 месяцев (рис. 9б, 1). Перед введением ЕТХ разряды состояли практически из одних пик-волновых комплексов с острыми пиками и хорошо выраженной волной (рис. 9а, 4). Доля осцилляций в разряде составляла всего $4.5 \pm 0.8\%$. Возрастзависимые изменения ПВР у крыс линии WAG/Rij не прекращались в возрасте 6–7 месяцев, а продолжались примерно до 7–8-месячного возраста (рис. 9б, 4). В возрасте 7–8 месяцев доля осцилляций составляла $5.7 \pm 0.8\%$. Таким образом, морфологические характеристики разрядов перед введением ЕТХ полностью соответствовали морфологическим характеристикам разрядов, регистрируемых у крыс линии WAG/Rij в возрасте 7–8 месяцев (рис. 9а, б, 4).

Анализ усредненных спектров мощности разрядов (рис. 10) показал, что по мере увеличения сроков после отмены введения ЕТХ мощность спектров увеличивалась.

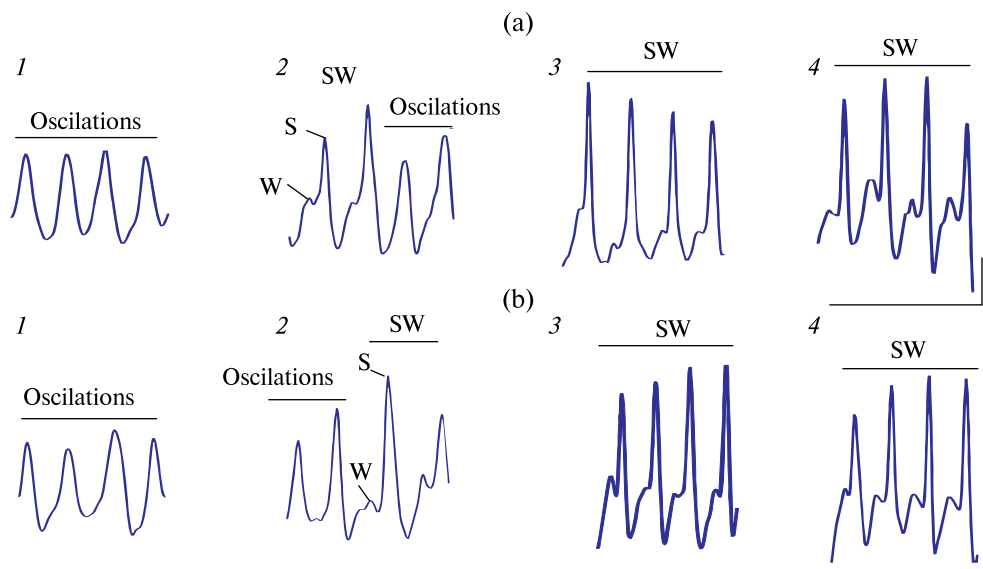


Рис. 9. Изменение морфологии разрядов по мере увеличения времени после отмены введения ЕТХ (а) и по мере увеличения возраста крыс линии WAG/Rij (б). (а): 1 – незрелый разряд на 1-й день после отмены введения ЕТХ; 2 – незрелый разряд на 3-й день после отмены введения ЕТХ; 3 – зрелый разряд на 7-й день после отмены введения ЕТХ; 4 – зрелый разряд до введения ЕТХ. (б): 1 – незрелый разряд в возрасте 2–3 месяцев; 2 – незрелый разряд в возрасте 3–4 месяцев; 3 – зрелый ПВР в возрасте 5–6 месяцев; 4 – зрелый ПВР в возрасте 7–8 месяцев. SW – пик-волновой комплекс; oscillation – осцилляция; S – пик; W – волна.

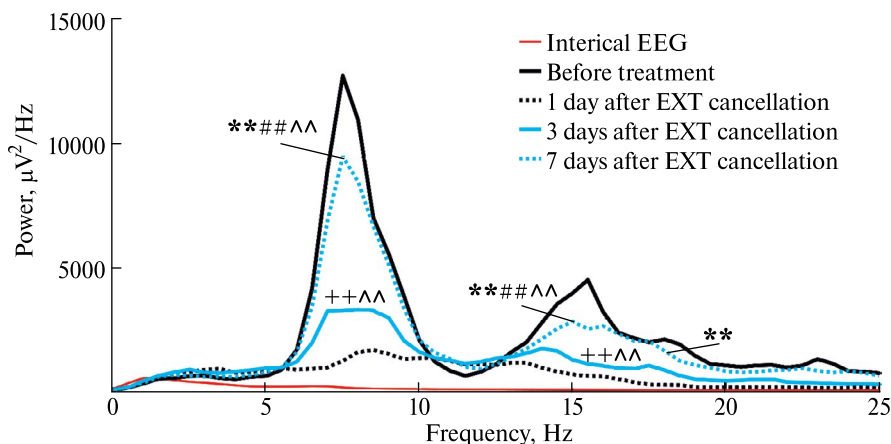


Рис. 10. Усредненные спектры мощности разрядов у крыс линии WAG/Rij. ** – $p < 0.01$ на 7-й день по сравнению с 3-м днем после отмены введения ЕТХ на частотах 6.5–9.5, 15–25 Гц; # – $p < 0.01$ на 7-й день после отмены введения ЕТХ по отношению к показателям до введения на частотах 6–7, 12.5–16, 20.5–21.5 Гц. + – $p < 0.01$ на 3-й день после отмены введения ЕТХ по отношению к показателям до введения на частотах 6.5–9.5, 14–25 Гц; ^ – $p < 0.01$ на 7-й день после отмены введения ЕТХ по отношению к показателям до введения на частотах 6–7.5, 15–25 Гц; 3-й день после введения по отношению к 1-му дню после отмены ЕТХ на частотах 6.5–9.5, 14–25 Гц. На всех сроках эксперимента имеются значимые различия на частотах от 6 до 25 Гц по отношению к спектру интериктальной ЭЭГ. Frequency, Hz – частота; Power, $\mu V^2/Hz$ – спектральная плотность мощности, $мкВ^2/Гц$; обозначения сроков эксперимента те же, что на рис. 2; interictal EEG – интериктальная (между разрядами) ЭЭГ.

В 1-й день после отмены введения ЕТХ усредненный спектр мощности незрелых разрядов был значимо меньше, чем через три дня после отмены ЕТХ почти на всех частотах. Через 3 дня после отмены введения ЕТХ на спектре наблюдается увеличение мощности на частотах 6.5–9.5 Гц, однако спектральная кривая не имеет хорошо выраженного максимума. На 7-й день после отмены ЕТХ спектральная мощность на многих частотах больше, чем на 3-й день после отмены. Имеется также отчетливо выраженный максимум спектральной плотности мощности на фундаментальной частоте 7.5 Гц и единственная 1-я гармоника на 15 Гц. Усредненный спектр мощности разрядов до введения ЕТХ характеризуется хорошо выраженным максимумом спектральной плотности мощности на фундаментальной частоте 7.5 Гц и наличием двух гармоник на кратных частотах – 1-й гармоники на частоте 15 Гц и 2-й гармоники на частоте 23 Гц – меньшей мощности, но превосходящих по мощности спектры разрядов на других сроках эксперимента. Усредненная спектральная плотность мощности интериктальной ЭЭГ на частотах от 7.5 до 25 Гц на порядки меньше, чем у спектров разрядов на всех сроках исследования.

Сравнение усредненных спектров мощности интериктальной ЭЭГ на разных сроках эксперимента – до введения, на 1-й, 3-й и 7-й дни после отмены введения ЕТХ – не выявило значимых различий между ними (рис. 11).

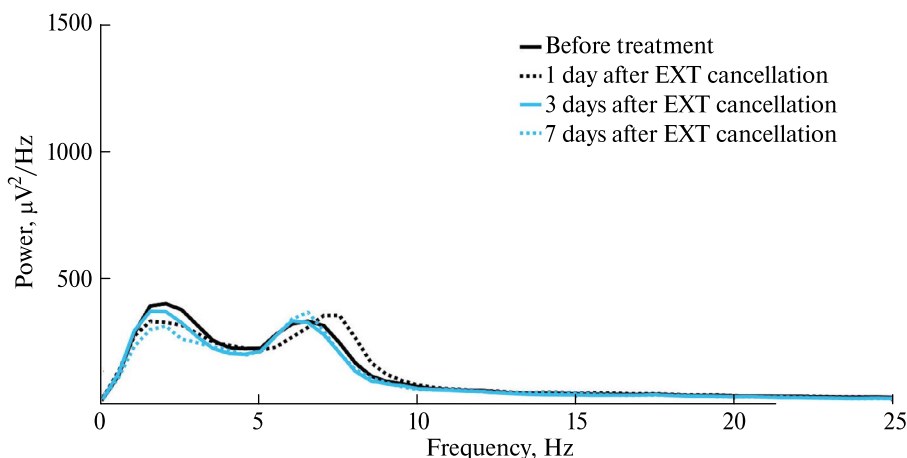


Рис. 11. Усредненные спектры мощности интериктальной ЭЭГ перед введением, на 1-й, 3-й и 7-й дни после отмены введения ЕТХ. На разных сроках эксперимента между усредненными спектрами мощности статистических различий не обнаружено. Frequency, Hz – частота; Power, $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ – спектральная плотность мощности, $\text{мкВ}^2/\text{Гц}$. Обозначения сроков эксперимента те же, что на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

После хронического введения ЕТХ зрелые ПВР на ЭЭГ были полностью подавлены, что согласуется с многочисленными данными, полученными ранее [4–12]. Однако это подавление было временным. Через некоторое время число и длительность ПВР увеличивались, что показано и другими авторами [5, 8, 9, 11, 12, 15, 20]. Отсутствие зрелых ПВР после хронического введения ЕТХ сопровождалось появлением большого числа незрелых разрядов. Одновременно с постепенным восстановлением числа зрелых разрядов уменьшалось число незрелых. Поэтому можно сказать, что зрелые ПВР замещают незрелые разряды, что аналогично процессам замещения,

происходящим при возрастзависимой эволюции разрядов [15]. В пользу этого заключения свидетельствует наличие отрицательной корреляционной связи между числом зрелых и незрелых разрядов. После отмены хронического введения ЕТХ происходит постепенное изменение морфологии разрядов: доля осцилляций в структуре незрелого эпилептического разряда уменьшается и, соответственно, доля пик-волновых комплексов возрастает с увеличением возраста крыс линии WAG/Rij и срока после отмены ЕТХ. Аналогичные изменения были описаны при эволюции разрядов с возрастом у крыс линии GAERS [5]. Вейвлет-спектрограммы и спектры мощности разрядов на разных стадиях восстановления разрядов после отмены введения ЕТХ соответствовали возрастзависимым. Изменения усредненных спектров мощности разрядов (постепенное увеличение мощности, появление фундаментальной частоты и гармоник) на разных этапах восстановления также соответствовали возрастзависимым изменениям, описанным в нашей работе [15].

Известно, что ПВР являются отражением таламокортикальной активности, в основе которой лежит повышенная возбудимость соматосенсорной коры мозга [21]. В работах на крысах линий GAERS и WAG/Rij предполагается, что возрастзависимая эволюция разрядов является результатом постепенного усиления возбудимости нейронов соматосенсорной коры, увеличения их способности генерировать синхронные осцилляции [5, 15]. Известно, что ЕТХ подавляет возбудимость соматосенсорной коры [4–6, 22]. В данной работе показано, что динамика восстановления числа и морфологии разрядов после отмены хронического введения ЕТХ аналогична их возрастзависимой эволюции. Мы предполагаем, что в основе эволюции разрядов после отмены введения ЕТХ также лежит увеличение возбудимости соматосенсорной коры мозга, аналогичное увеличению возбудимости при увеличении возраста крыс.

Имеется несколько гипотез о связи пика и волны в структуре ПВР. Существует мнение, что пик и волна в ПВР неразрывно связаны: в таламусе и коре во время пика возникает синхронное возбуждение нейронов, а затем – период “молчания”, во время которого в коре появляется гиперполяризация, приводящая к появлению волны [23, 24]. В работах Pierre Gloor в 1970-х годах (протитировано по [25]) было показано, что внутримышечное введение пенициллина приводило к возникновению генерализованного ПВР у неэпилептических кошек. Авторы предполагают, что в основе формирования сонного веретена и пик-волнового разряда лежат общие таламокортикальные механизмы. ПВР появляется путем преобразования одного из каждых двух или более веретенных волн в «пиковый» компонент ПВР, в то время как следующие одна или несколько веретенных волн исчезают и заменяются медленной отрицательной волной, что приводит к образованию ПВР частотой около 3 Гц [25]. Однако у крыс линии WAG/Rij в веретенообразных осцилляциях, которые являются разрядами 1-й стадии развития, частота изменяется от 8 до 11 Гц, в то время как основная (фундаментальная) частота разрядов составляет 7–8 Гц [18]. Мы считаем, что хотя частота ПВР несколько меньше, чем частота разряда на 1-й стадии развития, эта разница недостаточна для того, чтобы каждая вторая осцилляция трансформировалась в волну пик-волнового комплекса. Кроме того, анализируя морфологию разрядов, мы не видим промежуточных форм перехода веретена в волну. С другой стороны, в нашей работе [26] было показано, что у эпилептических крыс линии WAG/Rij увеличена амплитуда сонных веретен. Под влиянием препарата флуоксетина, уменьшавшего число и длительность разрядов, а также поведенческие проявления симптомов депрессии, связанной с эпилепсией, амплитуда веретен уменьшалась, приближаясь к величине, близкой к амплитуде сонных веретен у неэпилептических крыс Wistar. Это свидетельствует о том, что при эпилепсии изменяется активность той части таламокортикальной системы, которая отвечает за генерацию веретен. В противоположность работам, в которых предполагается общий механизм появления пика и веретена, существуют исследования [27–30], в которых показано, что в основе возникновения

пиков и волн ПБР лежат процессы, которые не связаны между собой. На крысах линии GAERS было выявлено раздельное образование пиков и волн: локальное фармакологическое ингибирование центромедиального таламуса избирательно подавляло пики, оставляя в эпидуральных записях ЭЭГ автономные волны [27]. В другой работе [30] на четырех разных моделях эпилепсии у крыс было установлено, что пики ПБР являются более устойчивой структурой по частоте, которая не зависит от модели эпилепсии, видов эпилепсии и типов разрядов. Однако частота волн у различных моделей эпилепсии значимо различалась. Sargsyan и соавт. считают, что эти результаты также свидетельствуют о том, что механизмы возникновения пиков и волн не являются связанными [30]. Изучение возрастзависимой эволюции разрядов у крыс линии GAERS привело к выводу о том, что осцилляции, возникающие на начальном этапе появления разрядов, при появлении волн изменяют свою морфологию: одновременно с появлением волны осцилляция, прилегающая к ней, становится более сжатой, заостряется и становится пиком [5]. В данной работе показана аналогичная динамика восстановления морфологии пик-волнового комплекса у крыс линии WAG/Rij после отмены введения ЕТХ. На начальной, 1-й стадии формирования разряда имеются осцилляции, на 2-й стадии развития разряда с появлением волн осцилляции сужаются и заостряются, становясь пиками. Полученные нами данные согласуются с гипотезой Pierre Gloor [25] в той части, где предполагается трансформация веретена в пик по мере развития разряда, но не согласуются с гипотезой о том, что веретено становится волной. В то же время представление о независимом поддержании волны и пика в ПБР не соответствует выявленному нами факту, что пик формируется из осцилляции одновременно с появлением волны. Связь пика и волны в пик-волновом разряде нуждается в дальнейшем исследовании.

Полученные нами результаты способствуют пониманию механизмов формирования ПБР. Они могут использоваться для определения ранних стадий развития пик-волновых разрядов в целях диагностики и лечения пациентов с абсансной эпилепсией.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К. Ю. С.), сбор данных (А. В. Г., Е. А. Ф., А. Б. Ш.), обработка данных (А. В. Г., Е. А. Ф., А. Б. Ш., К. Ю. С.), написание и редактирование манускрипта (А. В. Г., К. Ю. С.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерство науки и высшего образования Российской Федерации на 2025–2027 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этической комиссии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 5 от 02.12.2020 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kessler SK, McGinnis E (2019) A practical guide to treatment of childhood absence epilepsy. *Pediatr Drugs* 21: 15–24.
<https://doi.org/10.1007/s40272-019-00325-x>
2. Lee J (2019) Antiepileptic drugs in children: Current concept. *J Korean Neurosurg Soc* 62: 296–301.
<https://doi.org/10.3340/jkns.2019.0099>
3. Amit R, Vitale S, Maytal J (1995) How long to treat childhood onset absence epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 26: 163–165.
<https://doi.org/10.1177/155005949502600307>
4. Gülhan Aker R, Tezcan K, Çarçak N, Sakalli E, Akin D, Onat FY (2010) Localized cortical injections of ethosuximide suppress spike-and-wave activity and reduce the resistance to kindling in genetic absence epilepsy rats (GAERS). *Epilepsy Res* 89: 7–16.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.10.013>
5. Jarre G, Altwegg-Boussac T, Williams MS, Studer F, Chipaux M, David O, Charpier S, Depaulis A, Mahon S, Guillemain I (2017) Building up absence seizures in the somatosensory cortex: From network to cellular epileptogenic processes. *Cereb Cortex* 27: 4607–4623.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhx174>
6. Polack PO, Charpier S (2009) Ethosuximide converts ictogenic neurons initiating absence seizures into normal neurons in a genetic model. *Epilepsia* 50: 1816–1820.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02047.x>
7. Sarkisova K, van Luijtelaaar G (2011) The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 854–876.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
8. 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: 146–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02260.x>
9. Blumenfeld H, Klein JP, Schridde U, Vestal M, Rice T, Khera DS, Bashyal C, Giblin K, Paul-Laughinghouse C, Wang F, Phadke A, Mission J, Agarwal RK, Englot DJ, Motelow J, Nersesyan H, Waxman SG, Levin AR (2008) Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia* 49: 400–409.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01458.x>
10. Russo E, Citraro R, Scicchitano F, De Fazio S, Perrotta I, Di Paola ED, Constanti A, De Sarro G (2011) Effects of early long-term treatment with antiepileptic drugs on development of seizures and depressive-like behavior in a rat genetic absence epilepsy model. *Epilepsia* 52: 1341–1350.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03112.x>
11. Dezzi G, Ozturk E, Stanic D, Powell KL, Blumenfeld H, O'Brien TJ, Jones NC (2013) Ethosuximide reduces epileptogenesis and behavioral comorbidity in the GAERS model of genetic generalized epilepsy. *Epilepsia* 54: 635–643.
<https://doi.org/10.1111/epi.12118>
12. Leo A, De Caro C, Nesci V, Palma E, Tallarico M, Iannone M, Constanti A, De Sarro G, Russo E, Citraro R (2019) Antiepileptogenic effects of ethosuximide and levetiracetam in WAG/Rij rats are only temporary. *Pharmacol Rep* 71: 833–838.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.017>
13. Sarkisova KY, Gabova AV, Kulikov MA, Fedosova EA, Shatskova AB, Morozov AA (2017) Rearing by foster Wistar mother with high level of maternal care counteracts the development of genetic absence epilepsy and comorbid depression in WAG/Rij rats. *Dokl Biol Sci* 473: 39–42.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617020077>
14. Sarkisova KY, Gabova AV (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17: 1–14.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12477>
15. Gabova AV, Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Morozov AA (2020) Developmental changes in peak-wave discharges in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 50.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00893-y>

16. *Ellens DJ, Hong E, Giblin K, Singleton MJ, Bashyal C, Englot DJ, Mishra AM, Blumenfeld H* (2009) Development of spike-wave seizures in C3H/HeJ mice. *Epilepsy Res* 85: 53–59.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.01.007>
17. *Coenen AML, Drinkenburg WHIM, Inoue M, van Luijtelaa ELJM* (1992) Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res* 12: 75–86.
[https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90029-S](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90029-S)
18. *Bosnyakova D, Gabova A, Zharikova A, Gnezditski V, Kuznetsova G, van Luijtelaa G* (2007) Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats. *Clin Neurophysiol* 118: 1736–1743.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.04.013>
19. *Sitnikova E, Van Luijtelaa G* (2007) Electroencephalographic characterization of spike-wave discharges in cortex and thalamus in WAG/Rij rats. *Epilepsia* 48: 2296–2311.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01250.x>
20. *Coenen AML, Van Luijtelaa ELJM* (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 33: 635–655.
<https://doi.org/10.1023/a:1026179013847>
21. *Meeren HKM, Pijn JPM, Van Luijtelaa ELJM, Coenen AML, Da Silva FHL* (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22: 1480–1495.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-04-01480.2002>
22. *Nejad GG, Shahabi P, Alipoor MR, Pakdel FG, Asghari M, Alvandi MS* (2015) Ethosuximide affects paired-pulse facilitation in somatosensory cortex of WAG/Rij rats as a model of absence seizure. *Adv Pharm Bull* 5: 483–489.
<https://doi.org/10.15171/apb.2015.066>
23. *Bazhenov M, Timofeev I, Fröhlich F, Sejnowski TJ* (2008) Cellular and network mechanisms of electrographic seizures. *Drug Discov Today Dis Model* 5: 45–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2008.07.005>
24. *Pinault D, O'brien TJ* (2005) Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. *Thalamus Relat Syst* 3: 181–203.
<https://doi.org/10.1017/S1472928807000209>
25. *Kostopoulos GK* (2000) Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: The continuing development of a hypothesis. *Clin Neurophysiol* 111 Suppl 2: S27–S38.
[https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00399-0](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00399-0)
26. *Габова АВ, Федосова ЕА, Саркисова КЮ* (2024) Сравнение влияния антидепрессантов имипрамина и флуоксетина на цикл сон – бодрствование и сонные веретена у крыс линии WAG/Rij с абсансной эпилепсией и коморбидной депрессией. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 110(6): 1037–1054. [*Gabova AV, Fedosova EA, Sarkisova KY* (2024) Spindles in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy and Comorbid Depression. *Russ J Physiol* 110(6): 1037–1054. (In Russ)]
<https://doi.org/10.31857/S0869813924060115>
27. *Terlau J, Yang JW, Khastkhodaei Z, Seidenbecher T, Luhmann HJ, Pape HC, Lüttjohann A* (2020) Spike-wave discharges in absence epilepsy: segregation of electrographic components reveals distinct pathways of seizure activity. *J Physiol* 598: 2397–2414.
<https://doi.org/10.1113/JP279483>
28. *Pinault D, Vergnes M, Marescaux C* (2001) Medium-voltage 5-9-Hz oscillations give rise to spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: In vivo dual extracellular recording of thalamic relay and reticular neurons. *Neuroscience* 105: 181–201.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00182-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00182-8)
29. *Ossenblok P, van Houdt P, Colon A, Stroink H, van Luijtelaa G* (2019) A network approach to investigate the bi-hemispheric synchrony in absence epilepsy. *Clin Neurophysiol* 130: 1611–1619.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.05.034>
30. *Sargsyan A, Casillas-Espinosa PM, Melkonian D, O'Brien TJ, van Luijtelaa G* (2024) A spike is a spike: On the universality of spike features in four epilepsy models. *Epilepsia Open* 1–13.
<https://doi.org/10.1002/epi4.13062>

Restoration of Spike-Wave Discharges after their Suppression with Ethosuximide in Wag/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy

A. V. Gabova^{a, #}, E. A. Fedosova^a, A. B. Shackova^a, and K. Yu. Sarkisova^a

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

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

WAG/Rij rats are a genetic model of absence epilepsy, in which generalized spike-wave discharges (SWDs) are registered on EEG. SWDs are generated in the hyperexcited somatosensory cortex of the brain. The antiabsence drug ethosuximide (ETX) reduces the excitability of the cortex and, as a result, suppresses SWDs. The work aims to discover the recovery features of discharges after their complete suppression by ETX. To do this, we compared the dynamics of SWD recovery after cancellation of 14-day ETX administration to 7–8-month-old WAG/Rij rats and the age-dependent maturation of SWDs. Earlier, we showed that the age-dependent maturation of discharges goes through 3 stages: 1 – immature discharges resembling spindle-like oscillations, 2 – immature discharges in which fragments of oscillating activity alternate with fragments of spike-wave complexes, and 3 – mature SWDs. During age-dependent maturation of SWDs, mature discharges gradually replace immature ones and, at the same time, spike-wave complexes replace oscillations. After the cancellation of ETX, only immature discharges were present on EEG, among which oscillations prevailed, which corresponds to the 1st stage of age-dependent development of discharges. On the 3rd day after drug cancellation, on EEG immature discharges prevailed, in which oscillations alternate with spike-wave complexes, which corresponds to the 2nd stage of age-dependent development of discharges. On day 7, mature SWDs prevailed, which corresponds to the 3rd stage. Thus, the 3 stages of discharge recovery after ETX cancellation are similar to the stages of age-dependent evolution of SWDs. In the process of discharge restoration, oscillations first appeared, and then waves. Mature discharges replaced immature ones, and spike-wave complexes replaced oscillations. We assume that the restoration of discharges is the result of increased excitability of the somatosensory cortex of the brain after ETX cancellation. Different points of view are discussed regarding the commonality of mechanisms or the independence of the origin of the wave and spike as indispensable attributes of a mature SWD. The results can be used to determine the early stages of spike-wave discharges development for the diagnostics and treatment of patients with absence epilepsy.

Keywords: WAG/Rij rats, spike-wave discharge (SWD), age-dependent stages of discharge development, ethosuximide (ETX), average spectral power of discharges, morphology of spike-wave complex

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ЧЕТЫРЕХНЕДЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ СЕМАГЛУТИДОМ
И ЕГО КОМБИНАЦИЕЙ С ИНТРАНАЗАЛЬНЫМ ИНСУЛИНОМ НА
ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ТИРЕОИДНОЙ И ГОНАДНОЙ СИСТЕМ
У САМЦОВ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА**

© 2025 г. К. В. Деркач^{1, *}, И. И. Зорина¹, И. В. Федорчук¹, А. О. Шпаков^{1, 2}

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

²*Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: derkach_k@list.ru*

Поступила в редакцию 31.03.2025 г.

После доработки 14.05.2025 г.

Принята к публикации 15.05.2025 г.

В настоящее время семаглутид, агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), широко применяют для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2) и ожирения, но его влияние на функции эндокринной системы, нарушенные при этих заболеваниях, остаются малоизученными. Отсутствуют данные о возможном усилении эффекта семаглутида в присутствии интраназально вводимого инсулина (ИВИ). Целью работы было изучить влияние четырехнедельной обработки половозрелых самцов крыс с СД2 с помощью семаглутида (50 мкг/кг/сутки, подкожно) и его комбинации с ИВИ (2 МЕ/крыса/сутки) на гормональные показатели тиреоидной и гонадной систем. СД2 вызывали высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Наряду с показателями глюкозного гомеостаза и уровнем инсулина в крови животных оценивали уровни тиреоидных гормонов (fT4, tT4, fT3 и tT3), тиреотропного гормона (ТТГ), тестостерона и лютеинизирующего гормона (ЛГ). Показано, что у крыс с СД2 семаглутид снижает массу тела и жира, улучшает толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину, а также восстанавливает уровни трийодтиронина и периферическую конверсию тиреоидных гормонов. Совместное применение с ИВИ усиливало стимулирующие эффекты семаглутида на сниженные при СД2 уровни тиреоидных гормонов и нормализовало повышенный при СД2 уровень ТТГ и чувствительность щитовидной железы к ТТГ, оцениваемую по интегральному тиреоидному индексу. Как монотерапия семаглутидом, так и его комбинация с ИВИ частично восстанавливали сниженные при СД2 уровни тестостерона, предотвращая андрогенный дефицит. Тем самым семаглутид и его комбинация с ИВИ могут быть использованы для коррекции эндокринных нарушений при СД2, что важно для клинической эндокринологии и репродуктивной медицины.

Ключевые слова: эндокринная система, сахарный диабет, семаглутид, интраназальный инсулин, тиреоидный гормон, тиреотропный гормон, тестостерон

DOI: 10.7868/S2658655X25070051, **EDN:** MVPRSU

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних лет для лечения сахарного диабета 2-го типа (СД2), метаболического синдрома и ожирения широко применяют синтетические аналоги глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), которые, как и ГПП-1, специфически связываются с рецепторами ГПП-1 и активируют зависимые от них сигнальные каскады в клетках-мишенях. В сравнении с эндогенным ГПП-1 его синтетические аналоги характеризуются повышенной устойчивостью к протеолизу и имеют большее время полужизни в кровотоке [1, 2]. Сравнительно недавно для лечения пациентов с СД2 и ожирением стали использовать семаглутид, структурный аналог ГПП-1, особенностями которого являются наличие жирнокислотного радикала, обеспечивающего образование прочных комплексов с альбумином и некоторыми другими транспортными белками крови, и замена остатка Ala⁸ на α -аминоизомасляную кислоту, что повышает стабильность семаглутида по отношению к протеолитическим ферментам, в том числе к дипептидпептидазе-4, которая с высокой эффективностью гидролизует и инактивирует природный ГПП-1 [3]. У пациентов с СД2 и ожирением и у животных с моделями этих заболеваний семаглутид и его аналоги нормализуют массу тела, пищевое поведение и липидный обмен, воздействуя на панкреатические клетки, восстанавливают секрецию инсулина и глюкозный гомеостаз, предотвращают дисфункции сердечно-сосудистой системы [4, 5]. Это во многом обусловлено локализацией рецепторов ГПП-1, мишеней семаглутида, во множестве клеток и тканей, включая панкреатические клетки, секретирующих инсулин (β -клетки) и его функциональный антагонист глюкагон (α -клетки), клетки сосудов, миоциты, нейроны гипоталамуса [6].

Важнейшей мишенью ГПП-1 является эндокринная система, которая претерпевает значительные изменения в условиях диабетической патологии. Однако данные о влиянии синтетических аналогов ГПП-1 на активность и гормональный статус центральных и периферических звеньев гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной и гипоталамо-гипофизарно-гонадной осей при СД2 и ожирении немногочисленны и противоречивы [7–9], а в отношении семаглутида – единичны, причем напрямую не относятся к лечению пациентов с СД2 [10]. Поскольку одними из наиболее часто встречающихся осложнений СД2 и абдоминального ожирения являются заболевания щитовидной железы, в том числе аутоиммунный гипотиреоз [11, 12], и репродуктивные расстройства (андрогенная недостаточность у мужчин, синдром поликистозных яичников у женщин) [13, 14], то изучение влияния терапии семаглутидом и другими аналогами ГПП-1 на нарушенные при этих метаболических заболеваниях функции эндокринной системы имеет большое теоретическое и практическое значение.

Одним из путей повышения эффективности семаглутида и снижения его фармакологических доз может быть совместное его применение с другими антидиабетическими препаратами или с усилителями ГПП-1-сигналинга, такими как инъекционный инсулин [15], метформин [16], ингибиторы натрий/глюкозного транспортера-2 [17]. Перспективным кандидатом для усиления эффектов семаглутида может быть и интраназально вводимый инсулин (ИВИ). Минуя гематоэнцефалический барьер, при интраназальном способе введения инсулин транспортируется непосредственно в структуры мозга, включая гипоталамус, где локализованы инсулиновые рецепторы и другие компоненты инсулиновой сигнальной системы [18]. Поскольку в гипоталамических нейронах локализованы рецепторы ГПП-1, то колокализация в них компонентов инсулиновой и ГПП-1 сигнальных систем может опосредовать модулирующее влияние ИВИ на эффекты семаглутида как в отношении регуляции пищевого поведения, периферического метаболизма и инсулиновой чувствительности, так и функций эндокринной системы при СД2 и ожирении. Однако такие исследования в настоящее время отсутствуют.

Основываясь на вышесказанном, целью работы было изучить влияние семаглутида (50 мкг/кг/сутки подкожно) и его комбинации с ИВИ (2 МЕ/крыса/сутки) на гормональные показатели тиреоидной и гонадной систем у половозрелых самцов крыс с СД2, индуцированным длительной высокожировой диетой (15 недель) и низкой дозой стрептозотоцина (25 мг/кг однократно, внутрибрюшинно). Наряду с массой тела и жировой тканью, показателями глюкозного гомеостаза, уровнями инсулина и лептина для оценки гормонального статуса гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси в крови животных оценивали уровни свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина, свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина и тиреотропного гормона (ТТГ), а для оценки гормонального статуса гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси – уровни тестостерона (интегрированные по времени значения) и лютеинизирующего гормона (ЛГ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Для экспериментов были взяты самцы крыс Wistar в возрасте 8–9 недель (масса тела 230–280 г), которых до этого, перед началом экспериментальных процедур, для акклиматизации в течение 10 дней содержали в клетках по 5–6 животных в каждой со свободным доступом к сухому гранулированному корму и питьевой воде. Крыс содержали в условиях стандартного режима освещения (день/ночь: 12 ч/12 ч) и при температуре 21–24 °С. Для измерения концентрации гормонов образцы крови отбирали из хвостовой вены, используя для обезболивания местный наркоз (введение 2%-ного раствора лидокаина в конечной дозе 2–4 мг/кг). По окончании эксперимента крыс декапитировали под общим наркозом (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг).

Модель сахарного диабета 2-го типа

СД2 вызывали комбинацией длительной (15 недель) высокожировой диеты и однократной инъекцией (через 10 недель) стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг. Ежедневная обогащенная насыщенными жирами диета включала 5–7 г смеси, содержащей 52.4% свиного сала, 41.7% творога, 5% свиной печени, 0.5% L-метионина, 0.2% пекарских дрожжей и 0.2% NaCl, как описано ранее [19]. Животные диабетической группы сохраняли свободный доступ к сухому гранулированному корму, потребляя его в среднем по 10–15 г в сутки. Стрептозотцин (Sigma-Aldrich, США) растворяли в охлажденном 0.1 М натрий-цитратном буфере (pH 4.5), избегая попадания прямого солнечного света, и немедленно после этого внутрибрюшинно вводили крысам в объеме 300 мкл. Контрольные животные потребляли только стандартную диету (сухой гранулированный корм) в среднем 20–25 г (2.95 ккал/г) в сутки. Вместо стрептозотоцина в те же сроки и в том же объеме им внутрибрюшинно вводили его растворитель – 0.1 М Na-цитратный буфер (pH 4.5). За 2 недели до инъекции стрептозотоцина и в дальнейшем проводили еженедельный мониторинг массы тела животных и один раз в две недели оценивали уровень глюкозы в крови. Через 4 недели после обработки стрептозотцином оценивали чувствительность к глюкозе с помощью глюкозотолерантного теста (ГТТ). Для этого животным внутрибрюшинно вводили глюкозу (2 г/кг) и оценивали ее уровень через 120 мин после глюкозной нагрузки. Диабетическими считали животных с уровнем глюкозы через 120 мин не ниже 7 ммоль/л и с повышенной массой тела (на 10% и более выше, чем средняя масса тела в контрольной группе). В общей сложности под эти критерии подходило около 75% от получавших высокожировую диету животных. В те же сроки проводили ГТТ в контрольной группе крыс, исключая животных с уровнем глюкозы через 120 мин выше 5.5 ммоль/л.

Экспериментальные группы крыс и их лечение семаглутидом и интраназальным инсулином

Крыс с развившимся СД2 рандомизировали на группы, в каждой по 5 животных, и через неделю на фоне продолжающейся высокожировой диеты в течение 4 недель лечили семаглутидом, ИВИ и их комбинацией. Формировали следующие группы: контроль (С), диабет (D), диабет с обработкой семаглутидом в суточной дозе 50 мкг/кг подкожно (DSem), диабет с обработкой ИВИ в суточной дозе 2 МЕ/крысу (DI), диабет с обработкой совместно семаглутидом и ИВИ (DSemI). Животные групп С и D вместо семаглутида и ИВИ получали их растворители. Препараты вводили ежедневно утром, в промежутке времени от 10:00 до 11:00. Раствор коммерческого препарата семаглутида (Semaglutide J, JODAS EXPOIM, Pvt. Ltd., Индия) вводили микрошприцем подкожно, рассчитывая необходимый объем, исходя из концентрации препарата 1.34 мг/мл. Инсулин для интраназального введения растворяли в 0.1 М натрий-цитратном буфере, pH 4.5.

Глюкозотолерантный тест и оценка уровней глюкозы, инсулина и лептина

ГТТ осуществляли путем внутривентрального введения крысам 40%-ного раствора глюкозы (Глюкоза буфус, АО “Производственная фармацевтическая компания “Обновление””, Россия) в дозе 2 г/кг с мониторингом уровня глюкозы до введения (нулевая точка) и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после введения глюкозы. Перед тестированием животных лишали корма в течение 10 ч, оставляя свободный доступ к воде. Для полученных в ходе проведения ГТТ кривых “концентрация глюкозы, ммоль/л – время (мин)” рассчитывали значение AUC_{0-120} , представляющее собой интегрированную площадь под этими кривыми, и выражали его в условных единицах. Концентрацию глюкозы в крови крыс оценивали с помощью глюкометра (Life Scan Johnson & Johnson, США) и тест-полосок One Touch Ultra (LifeScan Inc., США). Концентрации инсулина и лептина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки оценивали с помощью ИФА-наборов Rat Insulin ELISA kit (Mercodia AB, Швеция) и ELISA for Leptin, Rat (Cloud-Clone Corp., США). Индекс инсулиновой резистентности (ИР) рассчитывали как произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови до (индекс ИР0) или через 120 мин после глюкозной нагрузки (индекс ИР120) и выражали в условных единицах.

Оценка уровней тиреоидных гормонов, тестостерона и гипоталамических гликопротеиновых гормонов в крови

Концентрации fT4, tT4, fT3 и tT3 в крови крыс оценивали с помощью ИФА-наборов фирмы “Иммунотех” (Россия), концентрацию тестостерона – с помощью Testosterone-ELISA kit фирмы “Алкор Био” (Россия), концентрации ЛГ и ТТГ – с помощью ELISA for LH, Rat и ELISA for TSH, Rat (Cloud-Clone Corp., США) соответственно. Для оценки уровня тестостерона, принимая во внимание его колебания в зависимости от пищевого статуса и стрессовых воздействий, измерение проводили трижды – в 10:00, 13:00 и 16:00, рассчитывая показатель $AUC_{10.00-16.00}$, представляющий собой интегрированную площадь под кривыми “концентрация тестостерона, нмоль/л – время, ч (10:00–16:00)”, и выражали его в условных единицах. Уровни тестостерона и ЛГ в крови оценивали за сутки до окончания эксперимента, уровни тиреоидных гормонов и ТТГ – в последний день эксперимента при забое животных. Дополнительно через 2 недели после начала лечения оценивали уровни fT3 и fT4. Индекс периферической конверсии (ИПК) тиреоидных гормонов, отражающий эффективность превращения T4 в его биологически активный метаболит T3, рассчитывали как соотношение fT3/fT4. Интегральный тиреоидный индекс (ИТИ), показывающий баланс между секретируемым гипоталамизмом ТТГ и суммой

тиреоидных гормонов, рассчитывали как соотношение $(fT3 + fT4)/TTF$. Соотношение $AUC_{10.00-16.00}$ (тестостерон) / ЛГ демонстрировало чувствительность семенников к стероидогенному воздействию ЛГ. Все индексы выражали в условных единицах.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для статистической обработки данных, имевших нормальное распределение, применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Post hoc анализ проводили с использованием теста Тьюки. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для данных с ненормальным распределением сравнения между группами проводили с помощью Н-теста Краскела – Уоллиса, попарные сравнения проводили с помощью U-теста Манна – Уитни. Апостериорный анализ был выполнен с использованием теста множественных сравнений Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (25%; 75%). Все различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Четырехнедельная обработка диабетических крыс с помощью семаглутида значительно снижала массу тела и жировой ткани, а также уровни постпрандиальной глюкозы, индекс ИР и уровень лептина через 120 мин после глюкозной нагрузки (табл. 1, 2). Отмечалось частичное восстановление уровней глюкозы натощак, значения AUC_{0-120} для глюкозной кривой в ГТТ, стимулированного глюкозой уровня лептина, базовых значений индекса ИР и уровня лептина. Хотя эти значения в группе DSem значительно не отличались от диабетической группы, но при этом они не отличались и от контроля, в отличие от таковых в группе D (табл. 1, 2). Монотерапия ИВИ была менее эффективна, значительно снижала только уровни глюкозы, инсулина и индекс ИР через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также частично восстанавливала индекс ИР₀ (табл. 1, 2). При совместном введении семаглутида и ИВИ отмечали снижение в сравнении с диабетической группой всех показателей, представленных в табл. 1 и 2, за исключением базового уровня лептина, который, однако, в группе DSemI, в отличие от такового в группе D, от контроля не отличался. Более того, индекс ИР₀ в группе DSemI был ниже, чем в группе DSem, что свидетельствует о потенцирующем влиянии ИВИ на вызываемое семаглутидом восстановление чувствительности к инсулину (табл. 2).

Таблица 1. Влияние четырехнедельной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на массу тела и жировой ткани и показатели глюкозного гомеостаза

Группа	Масса тела, г	Масса жира, г	Глюкоза, натощак, мМ	Глюкоза, 120 мин, мМ	AUC_{0-120} , отн. ед.
C	349.6 $\pm$ 7.4	6.1 $\pm$ 0.4	4.04 $\pm$ 0.11	4.58 $\pm$ 0.21	1142 $\pm$ 78
D	433.4 $\pm$ 9.7***	19.0 $\pm$ 1.0***	5.50 $\pm$ 0.26***	7.86 $\pm$ 0.47***	1723 $\pm$ 68***
DSem	383.8 $\pm$ 13.3 [#]	10.1 $\pm$ 1.1 ^{###}	4.62 $\pm$ 0.26	5.94 $\pm$ 0.42 ^{##}	1427 $\pm$ 84
DI	405.4 $\pm$ 16.2*	15.5 $\pm$ 2.0***	5.24 $\pm$ 0.21**	6.10 $\pm$ 0.36*, [#]	1575 $\pm$ 116*
DSemI	368.8 $\pm$ 9.8 ^{##}	9.4 $\pm$ 1.3 ^{###}	4.48 $\pm$ 0.15 [#]	5.36 $\pm$ 0.29 ^{###}	1303 $\pm$ 75 [#]

Различия с контрольной (*, **, ***) и диабетической (#, ##, ###) группами статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно. Данные представлены как $M \pm SEM$, число животных во всех группах равно 5.

Таблица 2. Влияние четырехнедельной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина и индекс инсулиновой резистентности

Группа	Инсулин [0], нг/мл	Инсулин [120], нг/мл	Индекс ИР [0], отн. ед.	Индекс ИР [120], отн. ед.	Лептин [0], нг/мл	Лептин [120], нг/мл
C	0.69 $\pm$ 0.16	0.93 $\pm$ 0.15	2.02 (1.78; 4.16)	4.37 $\pm$ 0.91	1.58 $\pm$ 0.29	2.33 $\pm$ 0.51
D	1.14 $\pm$ 0.15	2.11 $\pm$ 0.26 ^{*,&}	4.92 (4.54; 8.84) [*]	16.24 $\pm$ 1.45 ^{***,&&}	3.62 $\pm$ 0.40 ^{**}	7.70 $\pm$ 1.21 ^{***,&}
DSem	1.03 $\pm$ 0.13	1.40 $\pm$ 0.19	3.96 (3.60; 6.41)	8.21 $\pm$ 1.02 ^{###,&}	2.55 $\pm$ 0.35	3.93 $\pm$ 0.64 [#]
DI	0.70 $\pm$ 0.14	1.08 $\pm$ 0.19 ^{###,&}	3.30 (2.16; 5.27)	6.42 $\pm$ 0.90 ^{###,&&}	3.22 $\pm$ 0.44 [*]	6.71 $\pm$ 0.74 ^{***,&&}
DSemI	0.60 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.14 ^{##}	2.56 (1.91; 3.36) ^{###,s}	4.58 $\pm$ 0.55 ^{###,&}	2.01 $\pm$ 0.43	3.73 $\pm$ 0.48 ^{#,&}

Различия с контрольной (*, **, ***) и диабетической (#, ##, ###) группами, а также с группой DSem (*) статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно. Различия между значением в нулевой точке и через 120 мин после глюкозной нагрузки в одной и той же группе (&,&&) статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$ соответственно. Данные представлены как $M \pm SEM$. Данные по индексу ИРО имели ненормальное распределение и представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов (25%; 75%). Число животных во всех группах равно 5.

Гормональный статус тиреоидной системы у крыс с СД2 изучали через 2 недели (оценивали уровни fT4 и fT3) и более расширенно в конце эксперимента через 4 недели после начала лечения семаглутидом и ИВИ. У диабетических крыс отмечали снижение уровней fT4 и fT3, повышение уровня ТТГ (рис. 1, 2), а также значительное снижение ИТИ (табл. 3), что указывает на ослабление продукции тиреоидных гормонов тироцитами и снижение их чувствительности к ТТГ. Монотерапия семаглутидом через 2 и 4 недели нормализовала в сравнении с диабетической группой уровень fT3, но слабо влияла на уровень fT4 (рис. 1, 2). Наряду с этим через 4 недели отмечали нормализацию уровня ТТГ (рис. 2) и восстановление значения ИТИ, которые в группе DSem не отличались от контроля (табл. 3). ИВИ был эффективен в отношении восстановления уровней тиреоидных гормонов, в первую очередь Т4, но не влиял на повышенный уровень ТТГ (рис. 1, 2), вследствие чего в группе ДИ оставался сниженным ИТИ (табл. 3).

Комбинированная терапия приводила к восстановлению уровней тиреоидных гормонов (рис. 1, 2). В группе DSemI также отмечали нормализацию уровней ТТГ и ИТИ, которые достоверно отличались от таковых в группе D (рис. 1, табл. 3). Интересные закономерности были выявлены при оценке ИПК, который иллюстрирует интенсивность конверсии Т4 в Т3. При СД2 этот показатель не отличался от контроля, но значимо повышался при лечении крыс семаглутидом и его комбинацией с ИВИ, как через две, так и через 4 недели терапии. Это может указывать на стимулирующее влияние семаглутида на активность дейодиназ, катализирующих превращение Т4 в Т3. ИВИ через 4 недели, напротив, снижал значение ИПК как в сравнении с контролем, так и с диабетической группой (табл. 3).

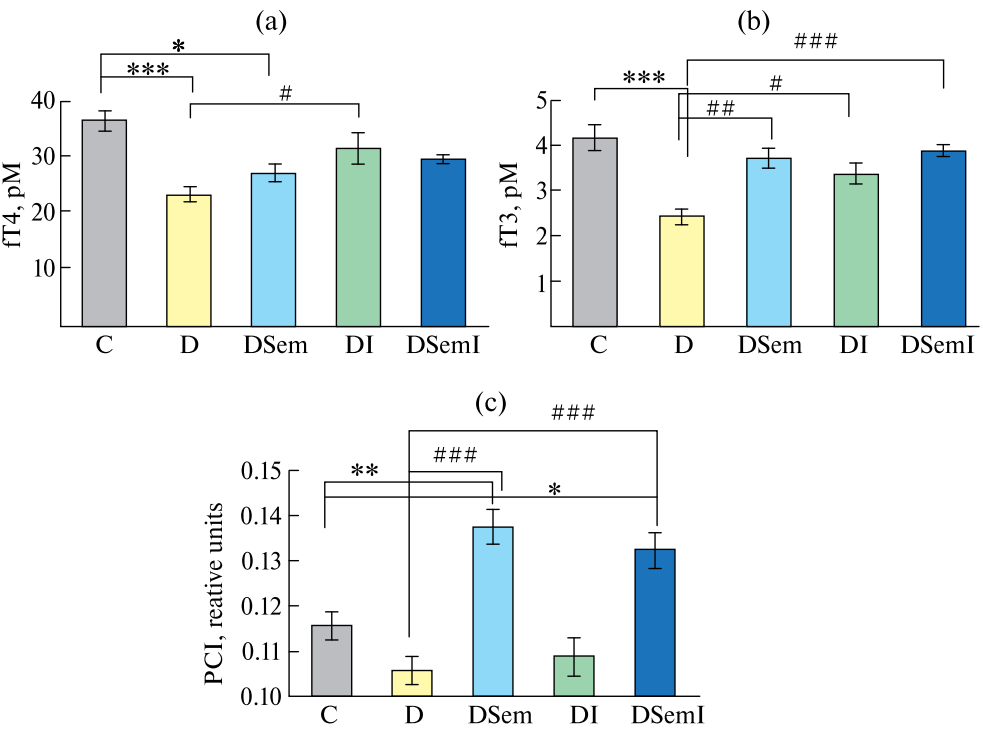


Рис. 1. Влияние двухнедельной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на уровни fT4, fT3 и ИПК. Различия с контрольной (*, **, ***) и диабетической (#, ##, ###) группами статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно. Данные представлены как $M \pm SEM$, число животных во всех группах равно 5. Обозначения групп на рисунке: C – контроль; D – диабет; DSem – диабетические крысы с обработкой семаглутидом; DI – диабетические крысы с обработкой интраназально вводимым инсулином; DSemI – диабетические крысы с совместной обработкой семаглутидом и интраназально вводимым инсулином.

Таблица 3. Влияние четырехнедельной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на индекс периферической конверсии тиреоидных гормонов (ИПК) и интегральный тиреоидный индекс (ИТИ)

Группа	ИПК, fT3/fT4	ИТИ, (fT3+fT4)/TTГ
C	0.118 (0.116; 0.123)	66.8 (37.6; 104.7)
D	0.118 (0.113; 0.121)	16.0 (14.3; 31.8)*
DSem	0.141 (0.126; 0.143)*, ##	34.3 (28.5; 61.5)
DI	0.112 (0.107; 0.123)**, #	30.2 (23.0; 60.1)*
DSemI	0.141 (0.137; 0.149)**, ##	89.4 (35.5; 98.0)#

Различия с контрольной (*, **) и диабетической (#, ##) группами статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$ соответственно. Данные имели ненормальное распределение и представлены в виде медианы и межквартильных диапазонов (25%; 75%). Число животных во всех группах равно 5. Индекс периферической конверсии тиреоидных гормонов (ИПК) рассчитывали как отношение fT3/fT4. Интегральный тиреоидный индекс рассчитывали как отношение суммы fT3 и fT4 к TTГ.

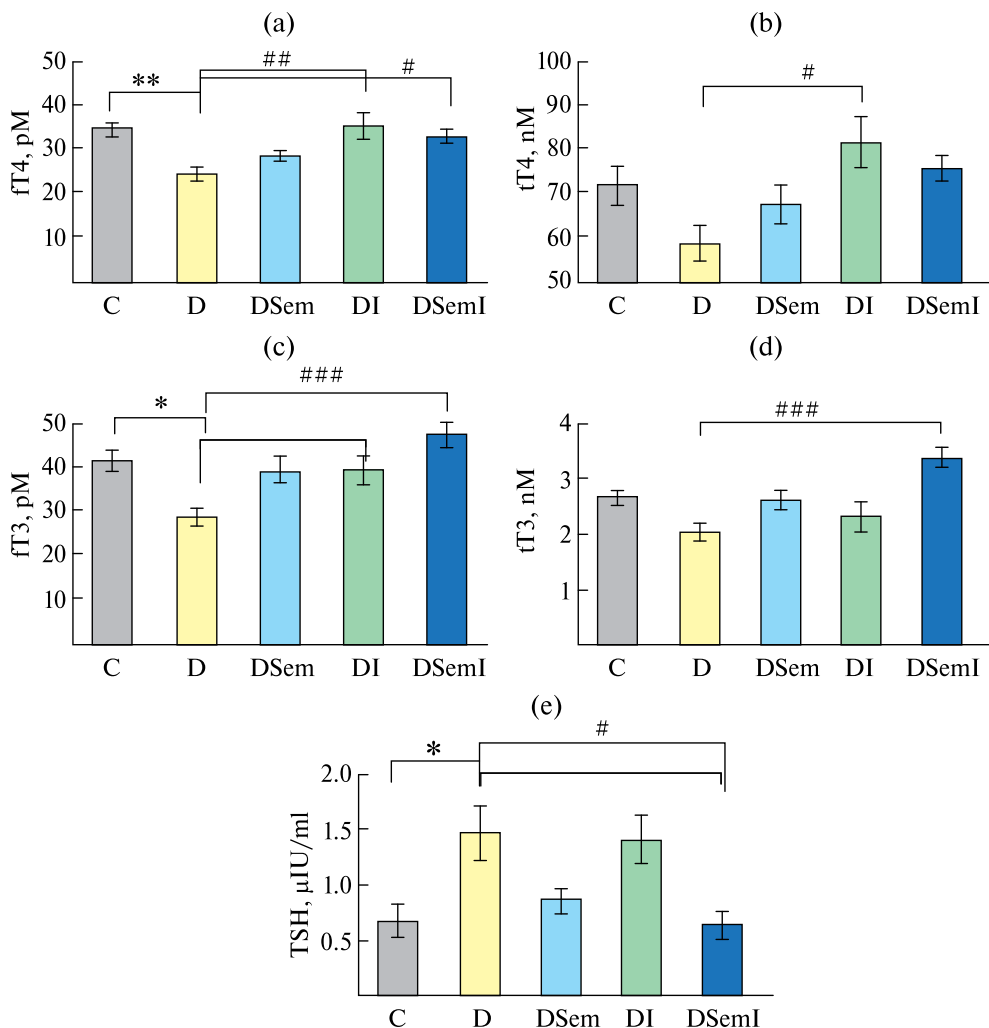


Рис. 2. Влияние четырехнедельной обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на уровни тиреоидных гормонов и ТТГ. Различия с контрольной (*, **) и диабетической (#, ##, ###) группами статистически значимы при $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно. Данные представлены как $M \pm SEM$, число животных во всех группах равно 5. Обозначения групп на рисунке: C – контроль; D – диабет; DSem – диабетические крысы с обработкой семаглутидом; DI – диабетические крысы с обработкой интраназально вводимым инсулином; DSemI – диабетические крысы с совместной обработкой семаглутидом и интраназально вводимым инсулином.

Оценка гормонального статуса гонадной оси показала развитие у СД2 крыс андрогенного дефицита, что выражалось в снижении уровня тестостерона в крови, оцениваемого по значению $AUC_{10.00-16.00}$ (рис. 3). Лечение семаглутидом, ИВИ и их комбинацией частично восстанавливало этот показатель, который в группах с лечением не отличался от контроля (рис. 3). При этом уровни ЛГ в крови и соотношение $AUC_{10.00-16.00}(\text{тестостерон})/\text{ЛГ}$, иллюстрирующее стероидогенный ответ семенников на эндогенный ЛГ, в исследуемых группах не различались (рис. 3).

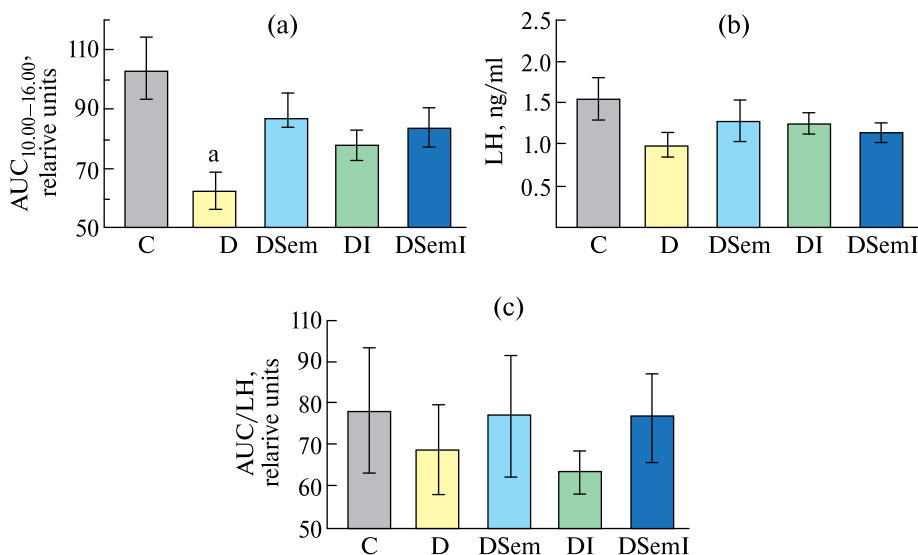


Рис. 3. Влияние обработки самцов крыс с сахарным диабетом 2-го типа с помощью семаглутида, интраназально вводимого инсулина и их комбинации на уровни тестостерона, оцениваемые по значению $AUC_{10.00-16.00}$, уровень ЛГ и соотношение $AUC_{10.00-16.00}$ (тестостерон)/ЛГ. Данные представлены как $M \pm SEM$, число животных во всех группах равно 5. Обозначения групп на рисунке: C – контроль; D – диабет; DSem – диабетические крысы с обработкой семаглутидом; DI – диабетические крысы с обработкой интраназально вводимым инсулином; DSemI – диабетические крысы с совместной обработкой семаглутидом и интраназально вводимым инсулином.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое применение семаглутида в клинике для лечения СД2, метаболического синдрома и абдоминального ожирения обусловлены его способностью нормализовать массу тела и жировой ткани, улучшать глюкозный гомеостаз и липидный обмен, нормализовать секрецию инсулина и инсулиновую чувствительность, а также предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящем исследовании нами на экспериментальной модели СД2 у крыс, индуцированной длительной высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, продемонстрирована способность семаглутида, взятого в сравнительно низкой дозе (50 мкг/кг, подкожно), уменьшать массу тела и жировой ткани, восстанавливать толерантность к глюкозе, снижать инсулиновую резистентность и гиперлептемию. Ранее другими авторами сходные положительные эффекты семаглутида были показаны при лечении грызунов с различными моделями СД2 и ожирения [20–22].

Предполагается, что семаглутид также способен восстанавливать нарушенные при СД2 функции эндокринной системы, включая гипоталамо-гипофизарно-тиреоидную и гипоталамо-гипофизарно-гонадную оси. Однако сведения о его влиянии на их гормональный статус ограничены и противоречивы, что не позволяет в полной мере раскрыть терапевтический потенциал семаглутида в отношении ассоциированных с СД2 заболеваний щитовидной железы и репродуктивных дисфункций. Нами впервые показано, что монотерапия крыс с СД2 с помощью семаглутида уже через 2 недели восстанавливает уровни трийодтиронина, и этот эффект сохраняется как минимум в течение 4 недель. Семаглутид также нормализовал уровень ТТГ, повышенный при СД2, восстанавливал ИТИ, сниженный у диабетических крыс, и повышал ИПК как по сравнению с группой D, так и с контролем. Эти данные указывают на отчетливо

выраженную способность семаглутида нормализовать функции тиреоидной системы при СД2-индуцированном гипотиреозе, причинами чего могут быть восстановление чувствительности тироцитов к ТТГ, повышение эффективности синтеза тиреоидных гормонов и усиление конверсии Т4 в Т3, основной эффекторный гормон тиреоидной оси. Действие семаглутида на тиреоидную систему может осуществляться как опосредованно, путем восстановления энергетического обмена и широкого спектра физиологических процессов в организме, так и вследствие непосредственного воздействия семаглутида на ключевые компоненты тиреоидной системы, тем более что высокая плотность рецепторов ГПП-1 показана как в гипоталамических тиролиберин-экспрессирующих нейронах (TRN-нейронах) [9, 23], так и в различных типах клеток щитовидной железы [24, 25]. Рецепторы к ГПП-1 также обнаружены в культуре тиреотрофов аденогипофиза, продуцирующих ТТГ в ответ на стимуляцию тиролиберинном [26].

В настоящее время механизмы регуляции агонистами ГПП-1 тиреоидной системы изучены недостаточно, и одним из факторов, затрудняющих их расшифровку, является множественность и разнонаправленность таких механизмов. Недавно было показано, что ГПП-1 нейронального происхождения вовлечен в регуляцию TRN-нейронов, локализованных в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса. При этом ГПП-1 способен как стимулировать TRN-нейроны посредством взаимодействия с локализованными на их поверхности рецепторами ГПП-1, так и ингибировать эти нейроны, осуществляя модуляцию активности ГАМКергических нейронов, иннервирующих TRN-нейроны [9]. В свою очередь, циркулирующий в крови ГПП-1 вовлечен в негативную регуляцию секреторной активности гипофизотропных TRN-нейронов в срединном возвышении гипоталамуса, лишенном гематоэнцефалического барьера. ГПП-1 активирует рецепторы ГПП-1, локализованные в аксонах гипофизотропных TRN-нейронов, и подавляет выброс ими тиролиберина, снижая уровень ТТГ в крови [9]. Это указывает на то, что на уровне гипоталамуса ГПП-1 осуществляет тонкую настройку активности TRN-нейронов, обеспечивая баланс регуляторных влияний во всей гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, в том числе в условиях диабетической патологии [8]. Возможно, этим, по крайней мере, частично объясняется выявленная нами способность семаглутида нормализовать уровень ТТГ в крови диабетических крыс.

В этой связи следует привести данные о влиянии фармакологических аналогов ГПП-1 на уровне ТТГ в крови пациентов и экспериментальных животных. Лечение в течение 6–12 месяцев пациентов с СД2 эксенатидом, устойчивым к протеолизу агонистом рецептора ГПП-1, значительно снижало уровень ТТГ [27, 28]. К сходному эффекту приводило длительное (до 40 месяцев) лечение лираглутидом пациентов с СД2 и неалкогольной жировой болезнью печени [29]. Мы рассчитали соотношение ИТИ после лечения диабетических пациентов синтетическими агонистами рецептора ГПП-1 и показали, что оно повышалось в среднем на 25–28% в сравнении с нелечеными пациентами. Это указывает на повышение чувствительности щитовидной железы к ТТГ в условиях терапии агонистами рецептора ГПП-1. Имеется исследование о нормализующем влиянии лираглутида на повышенный уровень ТТГ у крыс со стрептозотоцин/никотинамид-индуцированным СД2 [30]. В отношении семаглутида имеется описание только одного клинического случая, когда подкожное введение семаглутида пациенту с тиреоидэктомией снижало уровень у него ТТГ [10]. В то же время данные о влиянии семаглутида на гормональный статус тиреоидной системы при СД2 отсутствуют.

Необходимо отметить, что актуальность проведенного нами исследования обусловлена не только необходимостью оценки терапевтического потенциала семаглутида в отношении функций щитовидной железы, но и безопасности его применения в клинике. Имеются данные, полученные на экспериментальных животных, о потенциальных рисках развития дисфункций щитовидной железы при применении семаглутида [31] и других агонистов рецептора ГПП-1 [25]. Показано, что эти препараты негативно влияют на С-клетки щитовидной железы и вызывают их гиперплазию и злокачественное

перерождение [8, 25, 31]. Несмотря на то что данные о взаимосвязи между применением семаглутида и других агонистов рецептора ГПП-1 и развитием тиреоидного рака не получили достаточного подтверждения в клинике, до сих пор пациентам, имеющим в анамнезе – как личном, так и семейном – медуллярную карциному щитовидной железы или синдром множественной эндокринной неоплазии 2-го типа, применение таких препаратов не рекомендовано [8, 10].

Наряду с тиреоидной системой ГПП-1 и его аналоги могут влиять на гонадную ось [7, 32, 33]. Это обусловлено локализацией рецептора ГПП-1 и сопряженных с ним сигнальных каскадов в различных ее звеньях – в гипоталамических нейронах, вовлеченных в контроль синтеза и секреции гонадолиберина [34], и в семенниках, где осуществляются тестикулярный стероидогенез и сперматогенез [35]. Нами впервые показано, что лечение семаглутидом самцов крыс с СД2 приводит к частичному восстановлению уровня тестостерона. При этом значимого влияния на уровень ЛГ и соотношение тестостерон/ЛГ, характеризующее чувствительность семенников к ЛГ, отмечено не было (рис. 3). Как мы полагаем, это обусловлено использованной нами моделью СД2, при которой не происходит значимого снижения уровня гонадотропинов. Так, другие авторы, которые использовали более жесткую модель СД2 у крыс с сильно сниженными уровнями тестостерона и гонадотропинов, обнаружили восстанавливающий эффект восьминедельного лечения лираглутидом самцов крыс с СД2 на уровне тестостерона и ЛГ в крови, а также на экспрессию гипоталамических и тестикулярных генов, ответственных за гормональный статус гонадной оси [7]. Имеются работы, в которых показана стимуляция ГПП-1 и его аналогом эксендином-4 уровней ЛГ у овец в фолликулярной фазе эстрального цикла [36, 37]. При этом стимулирующее влияние агонистов рецептора ГПП-1 может реализовываться при их непосредственном воздействии на гонадолиберин-экспрессирующие нейроны (GnRH-нейроны) или путем стимуляции ксиспептин-продуцирующих нейронов, позитивно регулирующих активность GnRH-нейронов [34, 37]. Немногочисленные данные, полученные на животных, подтверждаются рядом клинических исследований по восстановлению лираглутидом андрогенного статуса у мужчин с тяжелыми формами ожирения и СД2 и с явными признаками гипогонадотропного гипогонадизма [38, 39]. Важно отметить, что введение агонистов рецептора ГПП-1 здоровым мужчинам, в том числе со слабо выраженным ожирением, не влияло на уровни ЛГ и тестостерона. Более того, в клинических исследованиях было продемонстрировано повышение риска эректильной дисфункции у мужчин с ожирением, но без признаков СД2, получавших длительную терапию семаглутидом и имеющих значительную потерю массы тела [40, 41]. Тем самым эффекты семаглутида и других агонистов рецептора ГПП-1, восстанавливающие функции гонадной оси, выявляются в основном на фоне выраженного андрогенного дефицита, ассоциированного с СД2 и/или тяжелой формой ожирения.

Для усиления эффекта семаглутида могут быть использованы другие антидиабетические препараты или усилители ГПП-1-сигналинга, среди которых значительный интерес представляет ИВИ. Поступая к гипоталамическим структурам, он влияет на активность функционирующих в них сигнальных каскадов, включая регулируемые ГПП-1 [18]. Учитывая тот факт, что в гипоталамусе ГПП-1, как и инсулин, стимулирует проопиомеланокортин-экспрессирующие нейроны, которые положительно влияют на активность TRH- и GnRH-нейронов, и, напротив, угнетает нейроны, экспрессирующие нейропептид Y и агути-подобный пептид, оказывающие на TRH- и GnRH-нейроны ингибирующий эффект [42, 43], то неудивительно, что ГПП-1 и инсулин действуют синергично, активируя тиреоидную и гонадную оси. Нами как ранее [44], так и в настоящем исследовании показан отчетливо выраженный стимулирующий эффект ИВИ на уровни ТГ и ТТГ при различных формах диабетической патологии (рис. 1, 2). Наряду с этим продемонстрирована однонаправленность эффектов ГПП-1 и ИВИ на уровни глюкозы и инсулиновую чувствительность [42], в пользу чего свидетельствует частичное восстановление глюкозного гомеостаза и снижение ИР в группах DSem и DI (табл. 1).

Далее впервые показано, что комбинация семаглутида и ИВИ приводит к более выраженному эффекту в отношении снижения массы жировой ткани, восстановления глюкозного гомеостаза, уровней инсулина и лептина, которые в группе DSemI не только отличались от группы D, но и не имели различий с контрольными животными (табл. 1, 2). Более того, индекс IP0 в группе DSemI был достоверно ниже, чем в группе DSem, что указывает на потенцирование эффекта семаглутида на инсулиновую чувствительность в присутствии ИВИ (табл. 2). В группе DSemI отмечали более выраженное в сравнении с группой DSem повышение уровней тиреоидных гормонов. При совместном применении семаглутида и ИВИ достоверно снижался уровень ТТГ, что приводило к повышению ИТИ до его значений в контроле (рис. 2, табл. 3). Важно, что ИПК как в группе DSem, так и в группе DSemI был значимо повышен по сравнению с ИПК в диабетической и контрольной группах, и это указывает на усиление конверсии Т4 в Т3 при обработке крыс семаглутидом (табл. 3). Конверсия Т4 в Т3 катализируется дейодиназой 2-го типа, которая генерирует активную форму Т3, и в меньшей степени дейодиназой 1-го типа, которая также генерирует реверсивную, неактивную форму Т3 [45]. Полученные данные позволяют предположить, что нормализация уровня Т3 при лечении семаглутидом, а при совместном его введении с ИВИ – и повышение уровня Т3 выше контрольных значений могут быть связаны с повышением экспрессии и/или активности этих дейодиназ. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о способности лираглутида повышать экспрессию гена дейодиназы 2-го типа в жировой ткани пациентов с СД1 и ожирением [46], а также в буром жире мышей линии C57BL/6J [47]. Косвенно на усиление конверсии Т4 в Т3 указывают данные о ГПП-1-стимулированном термогенезе в жировой ткани, который зависит от уровня Т3 [48].

При изучении влияния комбинированной терапии на гонадную ось крыс с СД2 было показано, что уровни тестостерона в группах DSem и DSemI не различались ни между собой, ни с контролем (рис. 3). Это свидетельствует о сопоставимой эффективности монотерапии семаглутидом и комбинированной терапии семаглутидом и ИВИ в отношении восстановления андрогенного дефицита. Возможно, это обусловлено тем, что при монотерапии достигается определенный предел восстановления тестикулярного стероидогенеза, вследствие чего дополнительное усиление активности гонадной оси с помощью ИВИ на гипоталамическом уровне уже не вносит заметного вклада в этот эффект семаглутида.

Таким образом, впервые показано, что у самцов крыс с СД2 семаглутид не только снижает массу тела и жировой ткани, нормализует показатели глюкозного гомеостаза и инсулиновую чувствительность, ослабляет гиперинсулинемию и гиперлептинемию, но и положительно влияет на функции эндокринной системы, нарушенные в условиях диабетической патологии. Четырехнедельная обработка семаглутидом восстанавливала уровни Т3 и нормализовала периферическую конверсию Т4 в Т3, что может быть обусловлено повышением активности дейодиназы 2-го типа. Совместное применение семаглутида с ИВИ не только способствовало более эффективному в сравнении с монотерапией восстановлению глюкозного гомеостаза и инсулиновой чувствительности, но и потенцировало эффекты семаглутида на тиреоидный статус у диабетических крыс, нормализуя чувствительность щитовидной железы к ТТГ. Определенный вклад в это может вносить стимулирующее воздействие семаглутида и ИВИ на гипоталамические звенья тиреоидной оси, что требует дополнительных исследований. Наряду с этим семаглутид и его комбинация с ИВИ частично восстанавливали уровни тестостерона, предотвращая андрогенный дефицит. Тем самым применение семаглутида и его комбинаций с ИВИ может стать перспективным подходом для коррекции эндокринных нарушений у мужчин, вызываемых СД2 и другими метаболическими расстройствами, что весьма важно для оптимизации терапевтических схем применения семаглутида в клинической эндокринологии и репродуктивной медицине.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе исследуются сравнительно малые выборки животных ($n = 5$) и сравнительно короткий срок терапии семаглутидом, ИВИ и совместно ИВИ и семаглутидом (4 недели). Исследование молекулярных механизмов воздействия семаглутида на ГПП-1-регулируемую сигнальную систему в гипоталамических, гипофизарных и периферических звеньях тиреоидной и гонадной осей не было предметом настоящей работы, но в перспективе оно позволит оценить, какие из этих звеньев являются мишенями семаглутида и какие внутриклеточные каскады вовлечены в выявленные нами эффекты семаглутида на гормональный статус тиреоидной и гонадной осей.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. О. Ш., К. В. Д.), сбор данных (К. В. Д., И. И. З., И. И. Ф.), обработка данных (К. В. Д., И. И. З., И. И. Ф.), написание и редактирование манускрипта (А. О. Ш., К. В. Д., И. И. З., И. И. Ф.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-00263-25-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, рекомендациям European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals и требованиям биоэтического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол № 4-4/2023 от 25 апреля 2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nauck MA, Müller TD (2023) Incretin hormones and type 2 diabetes. *Diabetologia* 66(10): 1780–1795.
<https://doi.org/10.1007/s00125-023-05956-x>
2. Wang T, Ding J, Cheng X, Yang Q, Hu P (2024) Glucagon-like peptide-1 receptor agonists: new strategies and therapeutic targets to treat atherosclerotic cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 15: 1396656.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1396656>
3. Mahapatra MK, Karuppasamy M, Sahoo BM (2022) Semaglutide, a glucagon like peptide-1 receptor agonist with cardiovascular benefits for management of type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 23(3): 521–539.
<https://doi.org/10.1007/s11154-021-09699-1>
4. Blundell J, Finlayson G, Axelsen M, Flint A, Gibbons C, Kvist T, Hjerpsted JB (2017) Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes Obes Metab* 19(9): 1242–1251.
<https://doi.org/10.1111/dom.12932>
5. Gibbons C, Blundell J, Tetens Hoff S, Dahl K, Bauer R, Baekdal T (2021) Effects of oral semaglutide on energy intake, food preference, appetite, control of eating and body weight in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 23(2): 581–588.
<https://doi.org/10.1111/dom.14255>

6. McLean BA, Wong CK, Campbell JE, Hodson DJ, Trapp S, Drucker DJ (2021) Revisiting the Complexity of GLP-1 Action from Sites of Synthesis to Receptor Activation. *Endocr Rev* 42(2): 101–132.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa032>
7. Fathy MA, Alsemeh AE, Habib MA, Abdel-Nour HM, Hendawy DM, Eltaweel AM, Abdelkhalek A, Ahmed MM, Desouky MK, Hua J, Fericean LM, Banatean-Dunea I, Arisha AH, Khamis T (2023) Liraglutide ameliorates diabetic-induced testicular dysfunction in male rats: role of GLP-1/Kiss1/GnRH and TGF- β /Smad signaling pathways. *Front Pharmacol* 14: 1224985.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1224985>
8. Capuccio S, Scilletta S, La Rocca F, Miano N, Di Marco M, Bosco G, Di Giacomo Barbagallo F, Scicali R, Piro S, Di Pino A (2024) Implications of GLP-1 Receptor Agonist on Thyroid Function: A Literature Review of Its Effects on Thyroid Volume, Risk of Cancer, Functionality and TSH Levels. *Biomolecules* 14(6): 687.
<https://doi.org/10.3390/biom14060687>
9. Ruska Y, Peterfi Z, Szilvasy-Szabó A, Kovari D, Hrabovszky E, Doroghazi B, Gereben B, Tóth B, Matziari M, Wittmann G, Fekete C (2024) GLP-1 Receptor Signaling Has Different Effects on the Perikarya and Axons of the Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone Synthesizing Neurons in Male Mice. *Thyroid* 34(2): 252–260.
<https://doi.org/10.1089/thy.2023.0284>
10. Wilcox L, Van Dril E (2024) Suppressed thyroid stimulating hormone levels after initiation of a subcutaneous glucagon-like peptide-1 receptor agonist in a post-thyroidectomy patient managed with levothyroxine case report. *J Am Pharm Assoc* (2003) 64(6): 102185.
<https://doi.org/10.1016/j.japh.2024.102185>
11. Han C, He X, Xia X, Li Y, Shi X, Shan Z, Teng W (2015) Subclinical Hypothyroidism and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 10(8): e0135233.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135233>
12. Hadgu R, Worede A, Ambachew S (2024) Prevalence of thyroid dysfunction and associated factors among adult type 2 diabetes mellitus patients, 2000–2022: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 13(1): 119.
<https://doi.org/10.1186/s13643-024-02527-y>
13. Gibb FW, Strachan MW (2014) Androgen deficiency and type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 47(10–11): 940–949.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.04.004>
14. Khalil SHA, Dandona P, Osman NA, Assaad RS, Zaitoon BTA, Almas AA, Amin NG (2024) Diabetes surpasses obesity as a risk factor for low serum testosterone level. *Diabetol Metab Syndr* 16(1): 143.
<https://doi.org/10.1186/s13098-024-01373-1>
15. Chen B, Tao L, Tian M, Ji Z (2025) Efficacy and safety of combination of semaglutide and basal insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN* 66: 564–572.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2025.01.056>
16. Li J, Li K, Liu Z, Yu H, Zhang J (2024) Efficacy and safety of semaglutide combined with metformin in treating T2DM with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transl Res* 16(8): 3545–3556.
<https://doi.org/10.62347/RYLN5360>
17. Scheen AJ (2024) GLP-1 Receptor Agonists and SGLT2 Inhibitors in Type 2 Diabetes: Pleiotropic Cardiometabolic Effects and Add-on Value of a Combined Therapy. *Drugs* 84(11): 1347–1364.
<https://doi.org/10.1007/s40265-024-02090-9>
18. Shpakov AO, Zorina II, Derkach KV (2023) Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium. *Int J Mol Sci* 24(4): 3278.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043278>
19. Derkach KV, Pechalnova AS, Sorokoumov VN, Zorina II, Morina IY, Chernenko EE, Didenko EA, Romanova IV, Shpakov AO (2025) Effect of a Low-Molecular-Weight Allosteric Agonist of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor on Basal and Thyroliberin-Stimulated Activity of Thyroid System in Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* 26(2): 703.
<https://doi.org/10.3390/ijms26020703>

20. Gabery S, Salinas CG, Paulsen SJ, Ahnfelt-Rønne J, Alanentalo T, Baquero AF, Buckley ST, Farkas E, Fekete C, Frederiksen KS, Helms HCC, Jeppesen JF, John LM, Pyke C, Nøhr J, Lu TT, Polex-Wolf J, Prevot V, Raun K, Simonsen L, Sun G, Szilvásy-Szabó A, Willenbrock H, Secher A, Knudsen LB, Hogendorf WFJ (2020) Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways. *JCI Insight* 5(6): e133429.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.133429>
21. Kloock S, Haerting N, Herzog G, Oertel M, Geiger N, Geier A, Sequeira V, Nickel A, Kohlhaas M, Fassnacht M, Dischinger U (2024) Effects of NPY-2 Receptor Antagonists, Semaglutide, PYY3-36, and Empagliflozin on Early MASLD in Diet-Induced Obese Rats. *Nutrients* 16(6): 904.
<https://doi.org/10.3390/nu16060904>
22. Larsen AT, Mohamed KE, Melander SA, Karsdal MA, Henriksen K (2024) The enduring metabolic improvement of combining dual amylin and calcitonin receptor agonist and semaglutide treatments in a rat model of obesity and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 327(2): E145–E154.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00092.2024>
23. Farr OM, Sofopoulos M, Tsoukas MA, Dincer F, Thakkar B, Sahin-Efe A, Filippaios A, Bowers J, Srnka A, Gavrieli A, Ko BJ, Liakou C, Kanyuch N, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS (2016) GLP-1 receptors exist in the parietal cortex, hypothalamus and medulla of human brains and the GLP-1 analogue liraglutide alters brain activity related to highly desirable food cues in individuals with diabetes: a crossover, randomised, placebo-controlled trial. *Diabetologia* 59(5): 954–965.
<https://doi.org/10.1007/s00125-016-3874-y>
24. Gier B, Butler PC, Lai CK, Kirakossian D, DeNicola MM, Yeh MW (2012) Glucagon like Peptide-1 Receptor Expression in the Human Thyroid Gland. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 121–131.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-2407>
25. Rosol TJ (2013) On-target effects of GLP-1 receptor agonists on thyroid C-cells in rats and mice. *Toxicol Pathol* 41(2): 303–309.
<https://doi.org/10.1177/0192623312472402>
26. Beak SA, Small CJ, Ilovaishaika I, Hurley JD, Ghatei MA, Bloom SR, Smith DM (1996) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) releases thyrotropin (TSH): characterization of binding sites for GLP-1 on alpha-TSH cells. *Endocrinology* 137(10): 4130–4138.
<https://doi.org/10.1210/endo.137.10.8828468>
27. Sencar ME, Sakiz D, Calapkulu M, Hepsen S, Kizilgul M, Ozturk IU, Ucan B, Bayram M, Cagir BB, Akin S, Ozbek M, Cakal E (2019) The Effect of Exenatide on Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid Volume. *Eur Thyroid J* 8(6): 307–311.
<https://doi.org/10.1159/000501895>
28. Tee SA, Tsalidis V, Razvi S (2023) The GLP-1 receptor agonist exenatide reduces serum TSH by its effect on body weight in people with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 99(4): 401–408.
<https://doi.org/10.1111/cen.14901>
29. Ye J, Xu J, Wen W, Huang B (2022) Effect of Liraglutide on Serum TSH Levels in Patients with NAFLD and its Underlying Mechanisms. *Int J Clin Pract* 2022: 1786559.
<https://doi.org/10.1155/2022/1786559>
30. El Medany AMH, Hammad SHM, Khalifa HM, Ghazala RA, Zakaria Mohammed HS (2022) The vascular impact of dapagliflozin, liraglutide, and atorvastatin alone or in combinations in type 2 diabetic rat model. *Fundam Clin Pharmacol* 36(4): 731–741.
<https://doi.org/10.1111/fcp.12765>
31. Feier CVI, Vonica RC, Faur AM, Streinu DR, Muntean C (2024) Assessment of Thyroid Carcinogenic Risk and Safety Profile of GLP1-RA Semaglutide (Ozempic) Therapy for Diabetes Mellitus and Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Mol Sci* 25(8): 4346.
<https://doi.org/10.3390/ijms25084346>
32. Outeiriño-Iglesias V, Román-Pérez M, González-Matías LC, Vigo E, Mallo F (2015) GLP-1 Increases Preovulatory LH Source and the Number of Mature Follicles, As Well As Synchronizing the Onset of Puberty in Female Rats. *Endocrinology* 156(11): 4226–4237.
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1978>
33. Cannarella R, Calogero AE, Condorelli RA, Greco EA, Aversa A, La Vignera S (2021) Is there a role for glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of male infertility? *Andrology* 9(5): 1499–1503.
<https://doi.org/10.1111/andr.13015>

34. *Oride A, Kanasaki H, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Hara T, Tumurbaatar T, Kyo S* (2017) GLP-1 increases Kiss-1 mRNA expression in kisspeptin-expressing neuronal cells. *Biol Reprod* 97(2): 240–248. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox087>
35. *Caltabiano R, Condorelli D, Panza S, Boitani C, Musso N, Ježek D, Memeo L, Colarossi L, Rago V, Mularoni V, Spadola S, Castiglione R, Santoro M, Aquila S, D'Agata R* (2020) Glucagon-like peptide-1 receptor is expressed in human and rodent testis. *Andrology* 8(6): 1935–1945. <https://doi.org/10.1111/andr.12871>
36. *Arbabi L, Li Q, Henry BA, Clarke IJ* (2021) Glucagon-like peptide-1 control of GnRH secretion in female sheep. *J Endocrinol* 248(3): 325–335. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0335>
37. *Simpson EM, Clarke IJ, Scott CJ, Stephen CP, Rao A, Gunn AJ* (2023) The GLP-1 agonist, exendin-4, stimulates LH secretion in female sheep. *J Endocrinol* 259(1): e230105. <https://doi.org/10.1530/JOE-23-0105>
38. *Giagulli VA, Carbone MD, Ramunni MI, Licchelli B, De Pergola G, Sabbà C, Guastamacchia E, Triggiani V* (2015) Adding liraglutide to lifestyle changes, metformin and testosterone therapy boosts erectile function in diabetic obese men with overt hypogonadism. *Andrology* 3(6): 1094–1103. <https://doi.org/10.1111/andr.12099>
39. *Jensterle M, Podbregar A, Goricar K, Gregoric N, Janez A* (2019) Effects of liraglutide on obesity-associated functional hypogonadism in men. *Endocr Connect* 8(3): 195–202. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0514>
40. *Jeibmann A, Zahedi S, Simoni M, Nieschlag E, Byrne MM* (2005) Glucagon-like peptide-1 reduces the pulsatile component of testosterone secretion in healthy males. *Eur J Clin Invest* 35(9): 565–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01542.x>
41. *Izzi-Engbeaya C, Jones S, Crusna Y, Machenahalli PC, Papadopoulou D, Modi M, Panayi C, Starikova J, Eng PC, Phylactou M, Mills E, Yang L, Ratnasabapathy R, Sykes M, Plumpre I, Coumbe B, Wing VC, Pacuszka E, Bech P, Minnion J, Tharakan G, Tan T, Veldhuis J, Abbara A, Cominos AN, Dhillo WS* (2020) Effects of Glucagon-like Peptide-1 on the Reproductive Axis in Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab* 105(4): 1119–1125. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa072>
42. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1(3): FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
43. *Dong Y, Carty J, Goldstein N, He Z, Hwang E, Chau D, Wallace B, Kabahizi A, Lieu L, Peng Y, Gao Y, Hu L, Betley JN, Williams KW* (2021) Time and metabolic state-dependent effects of GLP-1R agonists on NPY/AgRP and POMC neuronal activity in vivo. *Mol Metab* 54: 101352. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101352>
44. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 47(12): 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
45. *Angela De Stefano M, Porcelli T, Schlumberger M, Salvatore D* (2023) Deiodinases in thyroid tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* 30(5): e230015. <https://doi.org/10.1530/ERC-23-0015>
46. *Ghanim H, Batra M, Green K, Abuaysheh S, Hejna J, Makdissi A, Borowski R, Kuhadiya ND, Chaudhuri A, Dandona P* (2020) Liraglutide treatment in overweight and obese patients with type 1 diabetes: A 26-week randomized controlled trial; mechanisms of weight loss. *Diabetes Obes Metab* 22(10): 1742–1752. <https://doi.org/10.1111/dom.14090>
47. *Oliveira FCB, Bauer EJ, Ribeiro CM, Pereira SA, Beserra BTS, Wajner SM, Maia AL, Neves FAR, Coelho MS, Amato AA* (2022) Liraglutide Activates Type 2 Deiodinase and Enhances β 3-Adrenergic-Induced Thermogenesis in Mouse Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 803363. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.803363>
48. *Staifeev I, Sorkina E, Koksharova E, Tumanyan T, Sklyanik I, Menshikov M, Mayorov A, Parfyonova Y, Shestakova M* (2021) The Effects of Glucagon-Like Peptide Type 1 (GLP-1) and its Analogues in Adipose Tissue: Is there a way to Thermogenesis? *Curr Mol Med* 21(7): 527–538. <https://doi.org/10.2174/1566524020666201201095029>

Effect of Four-Week Semaglutide Therapy and its Combination with Intranasal Insulin on Thyroid and Gonadal Status in Male Rats with Type 2 Diabetes

K. V. Derkach^{a,*}, I. I. Zorina^a, I. V. Fedorchuk^a, and A. O. Shpakov^{a,b}

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

^bFaculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

**e-mail: derkach_k@list.ru*

Currently, semaglutide, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist, is widely used to treat type 2 diabetes mellitus (T2DM) and obesity, but its effect on the endocrine system functions disrupted in the diseases remains poorly understood. There are no data on the possible enhancement of the effect of semaglutide in the presence of intranasal administered insulin (IAI). The aim of the work was to study the effect of a four-week treatment of adult male rats with T2DM with semaglutide (50 µg/kg/day, subcutaneously) and its combination with IAI (2 IU/rat/day) on the hormonal parameters of the thyroid and gonadal systems. T2DM was induced by a high-fat diet and a low-dose streptozotocin. Along with glucose homeostasis parameters and insulin levels, the levels of thyroid hormones (fT4, tT4, fT3, and tT3), thyroid-stimulating hormone (TSH), testosterone and luteinizing hormone (LH) were assessed in the blood of animals. In rats with T2DM, semaglutide was shown to reduce body weight and fat mass, improve glucose tolerance and insulin sensitivity, and restore triiodothyronine levels and peripheral thyroid hormone conversion. Combined use with IAI enhanced the stimulating effects of semaglutide on the decreased levels of thyroid hormones in T2DM and normalized the increased level of TSH in T2DM and the sensitivity of the thyroid gland to TSH, assessed by the integral thyroid index. Both monotherapy with semaglutide and its combination with IAI partially restored testosterone levels decreased in T2DM, preventing androgen deficiency. Thus, semaglutide and its combination with IAI can be used to correct endocrine disorders in T2DM, which is important for clinical endocrinology and reproductive medicine.

Keywords: endocrine system, diabetes mellitus, semaglutide, intranasal insulin, thyroid hormone, thyroid stimulating hormone, testosterone

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННО ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ МАТКИ КРЫС**

© 2025 г. Н. Б. Тихонова^{1,*}, А. А. Темнов², В. В. Алексанкина¹,
А. П. Алексанкин¹, Т. В. Фокина¹, А. Н. Склифас², Е. В. Кузнецова¹,
А. П. Милованов¹, Л. М. Михалева¹

¹Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия,

²Пуцинский научный центр биологических исследований РАН – обособленное подразделение
Института биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: morpholhum@list.ru

Поступила в редакцию 01.11.2024 г.

После доработки 11.05.2025 г.

Принята к публикации 15.05.2025 г.

Цель работы – установить влияние кондиционированной среды и лизата культивируемых аутологических стромальных клеток костного мозга (КМСК), выращенных при 10% O₂, на иммунологическую регуляцию заживления стенки маточного рога крысы линии Sprague – Dawley после сквозного хирургического разреза. В первой группе животных ($n = 14$) разрез маточной стенки перед ушиванием обрабатывали кондиционированной средой, во второй группе ($n = 14$) обработку разреза не проводили. Область заживления исследовали на 5-е и 15-е сутки после операции гистологическими (окраски гематоксилин и эозин и по Маллори), иммуногистохимическими (CD68, FABP4) методами и полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-РВ для IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10). Площадь зоны заживления в обработанной группе была ниже по сравнению с контрольной группой во все сроки мониторинга ($p < 0.05$). На 5-е сутки в обработанной группе экспрессия IL-4 и IL-10 была ниже, чем в контрольной, а на 15-е сутки IL-1 β оказался ниже в контрольной группе. С 5-х на 15-е сутки экспрессия IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10 в контрольной группе снизилась ($p < 0.05$), в обработанной группе достоверных различий не обнаружено ($p < 0.05$). Количество CD68⁺ макрофагов снизилось на 15-е сутки в обработанной группе по сравнению с 5-ми сутками и оказалось ниже, чем в контрольной группе. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного миометрия на 15-е сутки в обеих группах практически исчезли за исключением 2 животных в контрольной группе. В зоне поврежденного периметрия скопления FABP4⁺-клеток увеличились на 15-е сутки, а в обработанной группе снизились и оказались достоверно ниже, чем в контрольной группе. Таким образом, применение КМСК привело к сокращению зоны между разобщенными в результате разреза слоями миометрия, снижению воспалительной реакции и ускорению восстановления маточной стенки.

Ключевые слова: матка крысы, заживление раны, кондиционированная среда, макрофаги, адипоциты, интерлейкины

DOI: 10.7868/S2658655X25070061, EDN: MVRBMQ

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процессов регенерации маточной стенки модельных животных, в частности грызунов, после сквозного хирургического разреза вызывает интерес как с позиции фундаментальной науки, накапливающей сведения об особенностях восстановления различных тканей и органов, так и с позиции клинической медицины, стремящейся минимизировать осложнения после кесарева сечения и гистеротомии. Поиск новых препаратов, способствующих быстрому и полноценному восстановлению стенки матки, выявление возможных побочных эффектов и разработка наиболее эффективных схем применения лекарств представляют собой важные задачи экспериментальной морфологии и клеточной биологии. Терапевтическое воздействие на рану компонентов культивирования мезенхимальных полипотентных стромальных клеток (МСК) различного происхождения рассматривают как наиболее перспективный способ лечения хронических ран и предотвращения патологического заживления [1–3]. На особенности процесса заживления может оказать влияние как состав используемых продуктов культивирования, так и источник происхождения или условия культивирования МСК [4, 5]. Количественные и качественные показатели секрета культивируемых МСК достаточно сильно зависят от условий культивирования. Влияние гипоксических условий культивирования МСК костномозгового происхождения на состав их секрета изучалось в ранее опубликованных работах [6–8]. Секретом МСК, который включает цитокины и факторы роста, значительно изменяется при гипоксии. Гипоксические МСК продуцируют большее количество проангиогенных и противовоспалительных факторов по сравнению с их нормоксическими аналогами. Считается, что это изменение секрета усиливает терапевтический потенциал МСК в регенеративной медицине [9, 10]. Однако эффект компонентов умеренно гипоксических МСК на иммунологическую регуляцию заживления поврежденной маточной стенки неизвестен. Целью исследования стало определение влияния кондиционированной среды и лизата МСК, культивированных в умеренно гипоксических условиях (10% O_2 в атмосферном воздухе), на иммунологическую регуляцию заживления сквозного разреза стенки матки крыс.

Основное управление процессами заживления раны осуществляют макрофаги, которые участвуют во всех фазах заживления и регулируют как воспалительную реакцию, так и пролиферативную. В качестве метода оценки макрофагов в зоне заживления мы выбрали иммуногистохимическое исследование общего маркера макрофагов – белка CD68 [11]. Для оценки интенсивности воспалительной реакции в зоне заживления решено было изучить уровень экспрессии мРНК для провоспалительных цитокинов IL-1b и IL-6 [12, 13] и противовоспалительных IL-4 и IL-10 [14].

В отличие от кожных ран, доступность раны матки после ушивания ограничена. Поэтому единственным наименее травматичным методом применения препарата МСК после сквозного разреза маточной стенки является нанесение его на края раны до ушивания. В связи с этим возникает ограничение во времени влияния компонентов МСК на отдаленные стадии заживления, и основной эффект становится возможен, с одной стороны, только на первых этапах, но, с другой стороны, последствия могут значительно изменить скорость и качество регенерации.

Данное исследование являлось экспериментальным, и в качестве модельного животного была выбрана лабораторная крыса, что накладывает дополнительные ограничения на использование результатов работы. Кроме того, маточная стенка подвержена значительному влиянию эстрального цикла, управляемого половыми гормонами, которые также влияют на воспалительную и пролиферативную реакции в процессе заживления [15, 16]. Оценка влияния препарата на уровень экспрессии цитокинов при заживлении маточной стенки осложнялась изменением их экспрессии в зависимости от фазы эстрального цикла. Мы попытались минимизировать влияние эстрального цикла на исследуемые показатели и проводили сквозной разрез только на одном маточном

роге крысы, а второй (неоперированный) использовали в качестве внутреннего (сравнительного) контроля для ПЦР-РВ. Для дополнительной стандартизации результатов эксперимента и минимизации влияния фазы эстрального цикла сквозной разрез выполнялся всегда в фазу эструса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Животных содержали в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. С учетом этических соображений и существующих данных литературы [9, 10], с целью снижения количества экспериментальных животных в работу не были включены контрольные группы, в которых рану обрабатывали препаратами из МСК, культивированными в условиях атмосферной нормоксии (21% O₂) или гипоксии (5% O₂).

Фазы эстрального цикла определяли исследованием вагинальных мазков [17], окрашенных “Диахим-Дифф-Квик” (“Абрис+”, Россия).

Операция. Хирургическую операцию проводили, как описано ранее [18, 19]. Оперировали под общим наркозом, вводили анестетик “Золетил” (Vibrac, Франция) – 10 мг/кг и седативный препарат “Ксиланит” (“Нита-Фарм”, Россия) – 0.1 мг/кг. Матку и брюшную стенку ушивали нитью “Ультрасорб USP 6/0” (ООО “Линтекс”, Россия), кожу – нитью “Моносорб USP 4/0” (ООО “Линтекс”, Россия). Половозрелым самкам крыс Sprague – Dawley ($n = 28$; возраст 4–5 месяцев, масса тела 260–320 г; длительность эстрального цикла 5–6 суток) в фазу эструса рассекали кожу и слои брюшной стенки, выводили правый рог матки из брюшной полости, наносили продольный сквозной разрез (1 см) стенки с антимезометриальной стороны маточного рога, левый рог оставляли интактным в качестве контроля. Контрольной группе (Группа 1, $n_1 = 14$) края раны не обрабатывали, особям экспериментальной группы (Группа 2, $n_2 = 14$) в разрез вносили препарат кондиционированной среды (20 мкл), разрез матки и брюшную стенку ушивали непрерывным обвивным швом нитью “Ультрасорб USP 6/0”, кожу – П-образным узловым швом нитью “Моносорб USP 4/0”. Шов обрабатывали 0.05%-ным раствором “Хлоргексидин Биглюконат” (“ЮжФарм”, Россия) и спреем “Террамицин Аэрозоль” (IGS Aerosol GmbH, Германия). Для взятия материала животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза на пятые сутки после операции – 1-я контрольная точка для Группы 1 ($n_{1.1} = 7$) и Группы 2 ($n_{2.1} = 7$) и на 15-е сутки – 2-я контрольная точка для Группы 1 ($n_{1.2} = 7$) и Группы 2 ($n_{2.2} = 7$).

Препарат кондиционированной среды. Первичные мультипотентные стромальные клетки (КМСК) были извлечены из костного мозга бедренной кости крыс SD под общим наркозом. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (DMEM-FCS), до получения монослоя. Мультипотентность подтверждали методами, определяющими способность клеток к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференциации. Клеточный монослой культивировали в условиях атмосферной гипоксии (10% O₂, 5% CO₂) в течение 3 суток, собирали культуральную среду и объединяли с растворимой фракцией клеточного лизата, который был получен после двух циклов замораживания-оттаивания для получения препарата кондиционированной среды [20].

Гистология и иммуногистохимия. Для морфологической оценки зоны заживления участок рога матки фиксировали в забуференном 10%-ном растворе формалина и готовили парафиновые срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Маллори. За площадь зоны заживления принимали площадь участка, ограниченного разобщенными разрезом краями миометриальных слоев. Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к CD68 (#ab31630, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 200)

и кроличьи моноклональные антитела к FABP4 (#ab219595, Abcam, San Francisco, Калифорния, США, разведение 1 : 200). Перед нанесением первичных антител проводили тепловую демаскировку антигенов в цитратном буфере pH 6.0 в микроволновой печи при мощности 500 Вт в течение 5 мин. Перед заключением иммуногистохимические препараты докрашивали гематоксилином Майера. Гистопрепараты исследовали под микроскопом Nexcore NE930 (Китай) с видеокамерой TUCSEN Michrome 5 Pro и с программным приложением Mosaic2.4 (Tucsen Photonics, Китай). В зоне заживления использовали программу QuPath ver. 0.5.0 (Эдинбург, Великобритания).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) [21]. Для количественного определения экспрессии генов участки маточной стенки замораживали и хранили при -70°C . После размораживания и гомогенизации получали тотальную РНК коммерческим набором “Проба-НК” (“ДНК-Технология”, Россия). Обратную транскрипцию проводили набором “Реверта-L” (“ИнтерЛабсервис”, Россия). Уровень экспрессии генов определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием готовой смеси для ПЦР 5x qPCRmix-HSSYBR (“Евроген”, Россия) и со специфичными праймерами (“Евроген”, Россия) для IL-1b (for 5'-CTGTCTGACCCATGTGAGCT-3'; rev 5'-ACTCCACTTGGTCTTGACTT-3'), IL-4 (for 5'-ATGTAACGACAGCCCTCTGA-3'; rev 5'-AGCACGGAGGTACATCACG-3'), IL-6 (for 5'-TACATATGTTCTCAGGGAGAT-3'; rev 5'-GGTAGAAACGGAAGTCCAG-3'), IL-10 (for 5'-GCCCAGAAATCAAGGAGCAT-3'; rev 5'-TGAGTGTACGTAGGCTTCTA-3') и референс-ген *rGAPDH* (for 5'-GCGAGATCCCGCTAACATCA-3'; rev 5'-CCCTTCCACGATGCCAAAGT-3'). Результаты анализировали в программе Real Time PCR 7.10 (“ДНК-Технология”, Россия). Относительную экспрессию мРНК определяли с помощью метода $\Delta\Delta\text{Ct}$, нормализуя по референс-гену *rGAPDH* для ΔCt и по внутреннему контролю (интактный ро) для $\Delta\Delta\text{Ct}$. Кратность различий в экспрессии целевого гена в участке заживления относительно неоперированного рога матки выражали в $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$.

Методы статистики. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах STATISTICA (Ver.12, StatSoft Inc., Tulsa, Оклахома, США) и Prism (Ver.8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, Калифорния, США). Распределение показателей выборки оценивали через медиану (Me) и квартили (Q1; Q3). Значимость различий при множественном сравнении определяли с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, используя для попарного сравнения критерий Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К 5-м суткам после операции произошло полное смыкание маточной стенки. Площадь между разобщенными мышечными слоями у группы, получившей препарат кондиционированной среды, была достоверно меньше по сравнению с контрольной группой на 5-е ($p < 0.05$) и на 15-е сутки ($p < 0.05$). В контрольной группе площадь заживления увеличилась ($p < 0.05$). В контрольной и экспериментальной группах увеличение площади заживления с 5-х по 15-е сутки было недостоверным ($p > 0.05$), но в контрольной группе наблюдалась тенденция к увеличению (рис. 1а).

При иммуногистохимическом исследовании в экспериментальной группе на 15-е сутки наблюдалось уменьшение количества клеток, содержащих белок CD68 (CD68⁺ клетки) в зоне заживления. Кроме того, на 15-е сутки количество CD68⁺ клеток было ниже в экспериментальной группе по сравнению с контролем (рис. 2).

При иммуногистохимическом исследовании белка FABP4 в зоне между поврежденными слоями миометрия на 5-е сутки в экспериментальной и контрольной группах площадь скоплений клеток, содержащих FABP4, была больше по сравнению с 15-ми

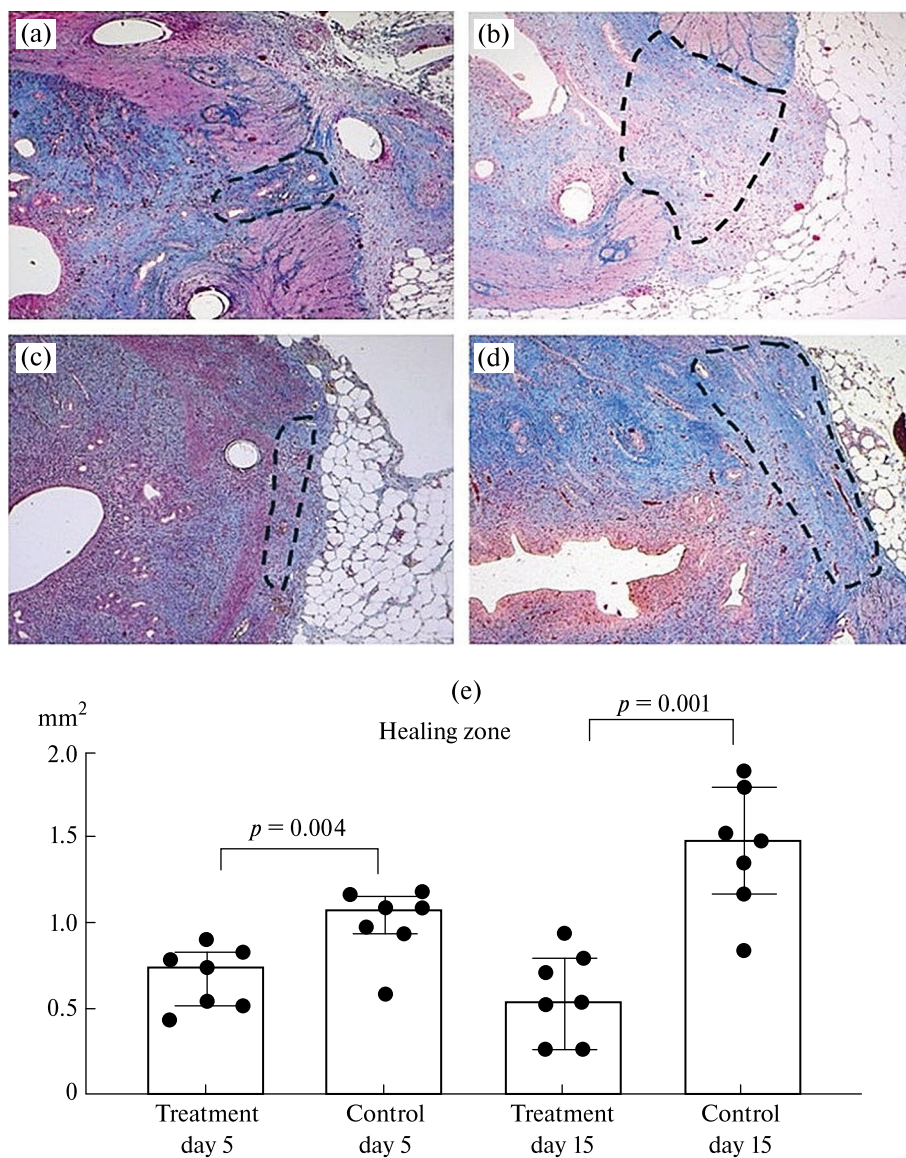
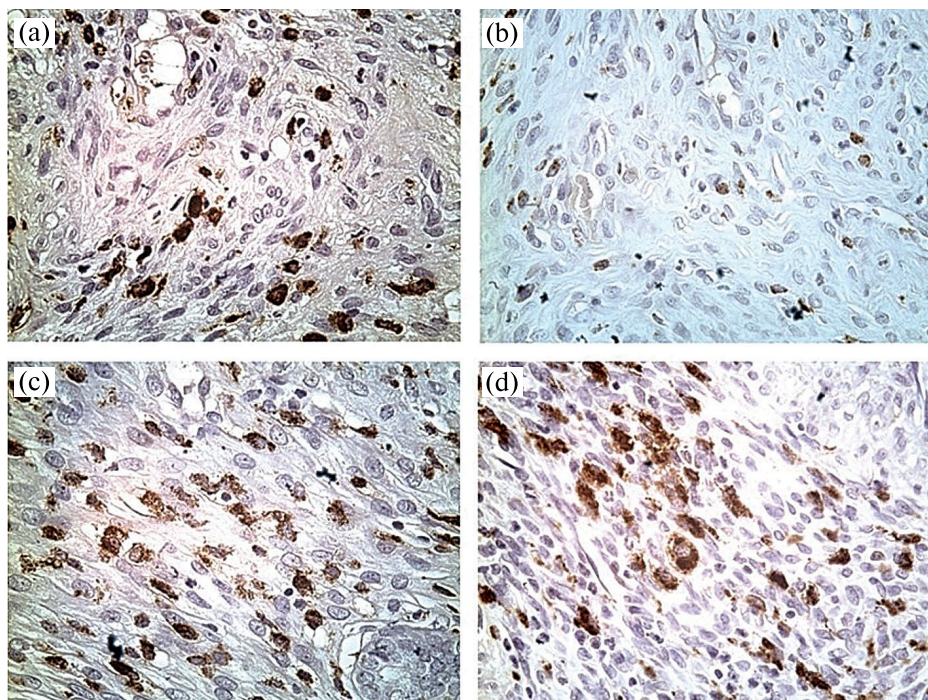


Рис. 1. Зона заживления на 5-е и 15-е сутки после сквозного разреза маточной стенки крысы, окраска по Маллори, х50; прерывистой линией обозначена вычисляемая зона заживления. (а) – Эксперимент на 5-е сутки. (б) – Контроль на 5-е сутки. (с) – Эксперимент на 15-е сутки. (д) – Контроль на 15-е сутки. (е) – Площадь зоны заживления.

сутками; несмотря на преимущественно большие показатели в контроле, на 5-е сутки достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами не выявлено. В экспериментальной группе на 15-е сутки в зоне заживления между разобщенным миометрием скопления FABP4 отсутствовали, в экспериментальной группе только у 2 животных (30%) присутствовали FABP4⁺-клетки (рис. 3).

Поврежденная зона маточной стенки со стороны брюшной полости во всех наблюдениях была покрыта жировой тканью, которая прикреплялась к периметрию. В зоне



(e)

CD68

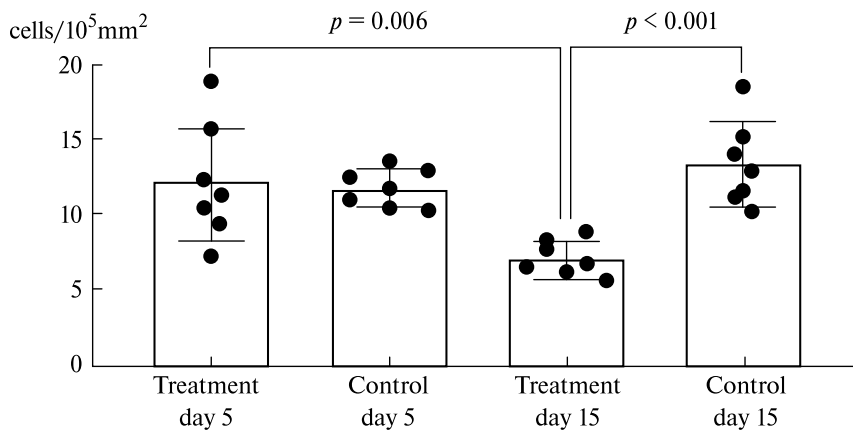


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание клеток CD68⁺ в зоне поврежденного миометрия после сквозного хирургического разреза матки крысы, х400. (а) – Эксперимент на 5-е сутки. (б) – Контроль на 5-е сутки. (с) – Эксперимент на 15-е сутки. (д) – Контроль на 15-е сутки. (е) – Плотность клеток CD68 в зоне повреждения миометрия, число клеток CD68 в 10⁵ мкм².

прикрепления жировой ткани в периметрии на 5-е сутки в экспериментальной группе наблюдалась тенденция к более обширным скоплениям ($p = 0.07$) по сравнению с контролем. На 15-е сутки площадь FABP-скоплений была ниже в группе, получавшей препарат ($p = 0.008$). С 5-х по 15-е сутки в экспериментальной группе уровень FABP4 снизился ($p = 0.038$), а в контрольной группе повысился ($p = 0.018$) (рис. 4).

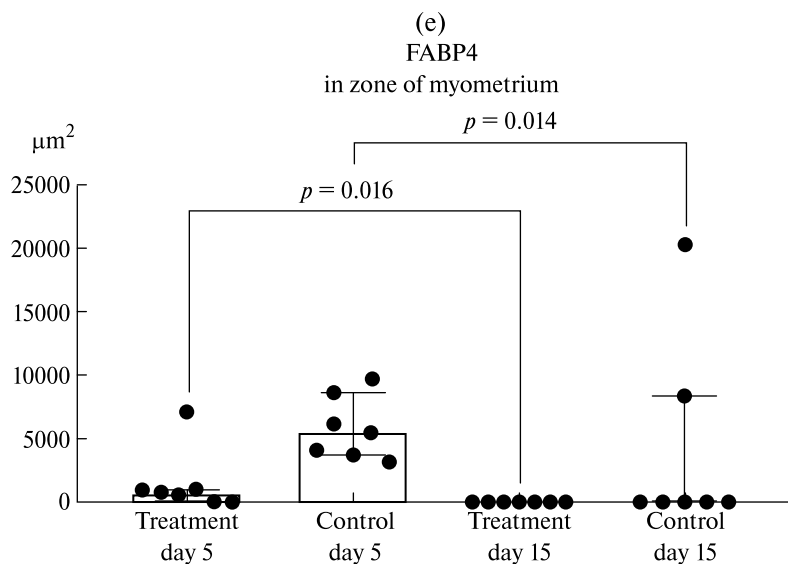
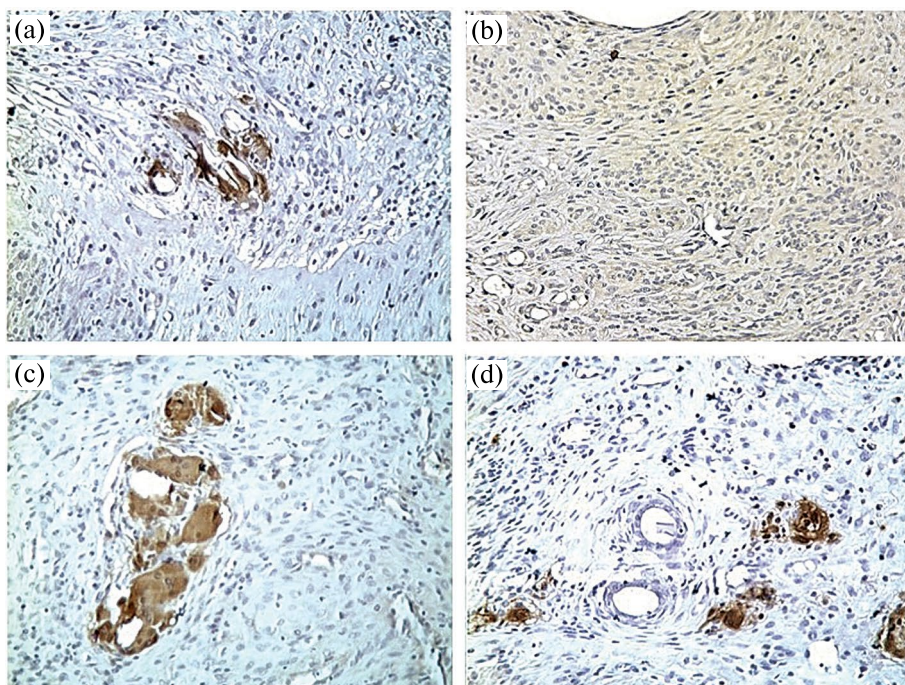


Рис. 3. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного миометрия после сквозного разреза маточной стенки, x200. (a) – Эксперимент на 5-е сутки. (b) – Контроль на 5-е сутки. (c) – Эксперимент на 15-е сутки. (d) – Контроль на 15-е сутки. (e) – Площадь скоплений FABP4⁺-клеток в зоне повреждения миометрия.

При исследовании экспрессии генов IL-1b, IL-4, IL-6 и IL-10 обнаружено их снижение на 15-е сутки в контрольной группе. На 5-е сутки отмечена более низкая экспрессия IL-4 и IL-10 в экспериментальной группе по сравнению с контролем. На 15-е сутки отмечена более низкая экспрессия IL-1b и IL-6 в контроле (рис. 5).

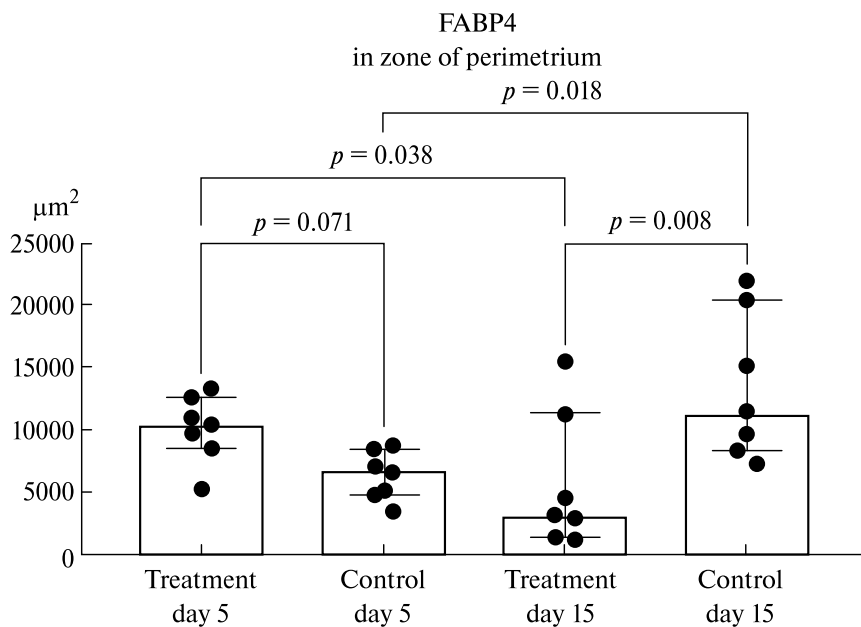
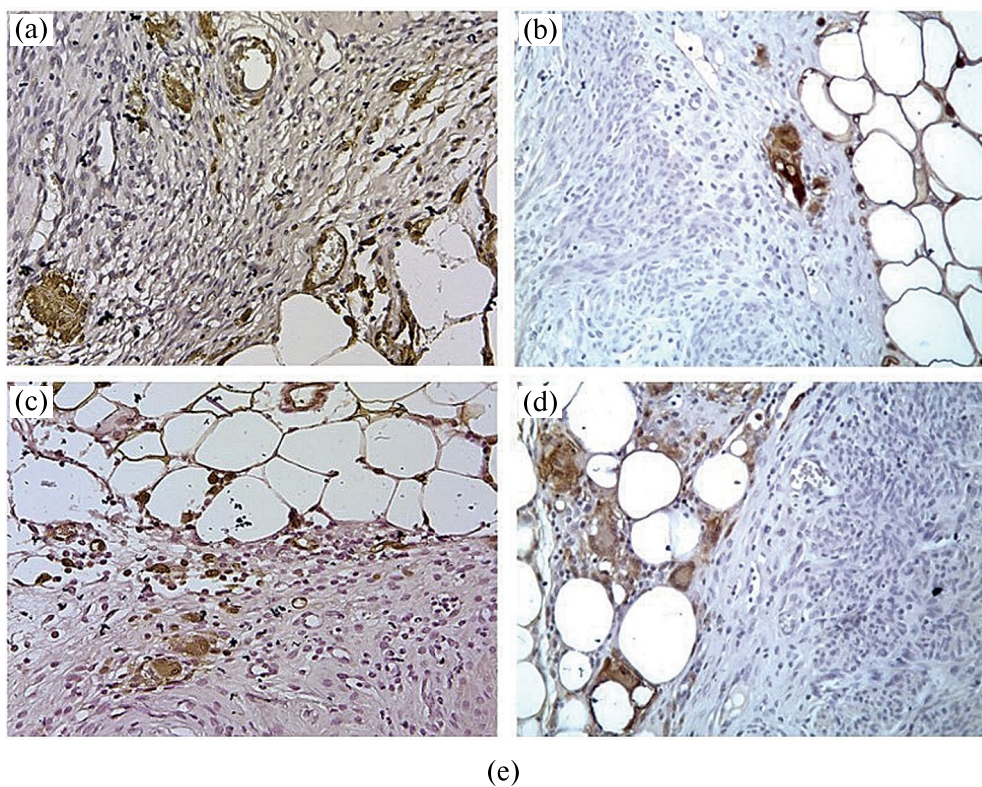


Рис. 4. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного периметрия после сквозного разреза маточной стенки, x200. (a) – Эксперимент на 5-е сутки. (b) – Контроль на 5-е сутки. (c) – Эксперимент на 15-е сутки. (d) – Контроль на 15-е сутки. (e) – Площадь групп клеток, содержащих FABP4, в зоне повреждения периметрия.

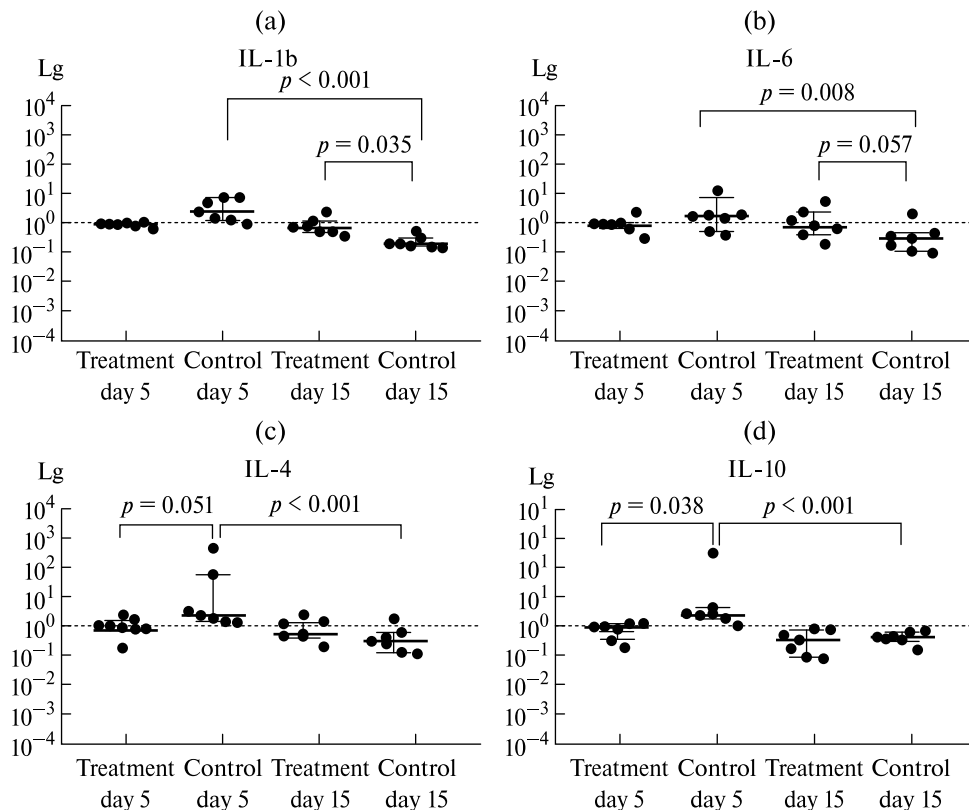


Рис. 5. Уровень экспрессии интерлейкинов в зоне заживления после сквозного хирургического разреза маточной стенки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для уменьшения влияния фазы эстрального цикла на сравнение показателей между группами мы нормализовали показатель степени экспрессии генов в зоне заживления относительно неоперированного маточного рога для каждого животного. Таким образом, значение экспрессии гена в неповрежденной маточной стенке принималось за 1. Однако маточная стенка крысы – очень пластичный орган, быстро реагирующий на смену гормонального фона в коротком эстральном цикле изменением в экспрессии множества факторов, включая представленные в этом исследовании. Более того, гормональный фон оказывает влияние на скорость восстановления стенки матки, поэтому длительность фаз заживления может отличаться в зависимости от фазы эстрального цикла, в которую проводилась операция на матке. Учитывая эти нюансы, воспалительная фаза заживления при повреждении в фазу эструса совпадает с воспалительной реакцией маточной стенки в метэструсе, и последующее повышение эстрогенов оказывает дополнительный стимул для этапа пролиферации при регенерации [16, 17]. В нашем исследовании у крыс при заживлении после сквозного разреза в фазу эструса к 5-м суткам раневой канал полностью заполняется соединительной тканью, что согласуется с ранее полученными результатами [18, 19]. Все животные в обеих группах показали восстановление целостности поврежденной стенки к 5-м суткам (рис. 1а, б),

что свидетельствует об отсутствии нарушений на первых этапах заживления при использовании кондиционированной среды. Снижение площади новообразованной ткани между разобщенными разрезом слоями миометрия (рис. 1) может отражать сниженную или ограниченную по продолжительности пролиферативную активность в зоне повреждения у экспериментальной группы, но недостаточную для восстановления целостности органа. Косвенно о более раннем завершении фазы пролиферации или более раннем начале фазы ремоделирования в экспериментальной группе может свидетельствовать появление на 5-е сутки вокруг разобщенных мышечных слоев темно-голубой плотной соединительной ткани (рис. 1а).

У крыс белок CD68 относят к общим маркерам макрофагов, однако в резидентных перитонеальных макрофагах его экспрессия обычно низкая и может значительно повышаться в ответ на воспалительные стимулы. [11]. В матке крыс на распределение макрофагов влияют колебания уровней половых гормонов в течение эстрального цикла [22]. Информация о распределении макрофагов в матке грызунов противоречивая и, возможно, связана с используемыми маркерами. Во время эструса и метэструса количество макрофагов F4/80⁺ выше, чем в диэструсе и проэструсе [23]. По другим данным, количество CD68⁺ макрофагов выше на стадиях диэструса и проэструса [24]. В наше исследование были включены животные со стабильным 5-дневным эстральным циклом, и на 5-е и 15-е сутки предполагалось, что крысы будут находиться в фазе эструса или в соседних фазах. Однако оперативное вмешательство могло спровоцировать индивидуальные отклонения от длительности цикла. Снижение на 15-е сутки CD68⁺-клеток в экспериментальной группе определенно указывало на восстановление иммунологической среды, соответствующей фазе эструса в этой группе. Высокое значение CD68 в контрольной группе на 15-е сутки не отличалось от значений на 5-е сутки в обеих группах и могло свидетельствовать о продолжающейся воспалительной реакции в процессе.

Связывающий жирные кислоты белок 4 (FABP4) интенсивно экспрессируется в адипоцитах и макрофагах, умеренно – в эндотелиоцитах и слабо – в других тканях и типах клеток, участвует в метаболизме и накоплении липидов. FABP4 широко используется в качестве маркера дифференцированных адипоцитов [25], но также экспрессируется в адипогенных предшественниках [26]. FABP4 усиливает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, способствует ангиогенезу [27]. Уровень экспрессии FABP4 в адипоцитах примерно в 10000 раз выше, чем в макрофагах [25]. В макрофагах FABP4 активирует провоспалительные сигнальные пути, приводя к выработке провоспалительных цитокинов, в том числе к высвобождению IL-1b [28]. Таким образом, выявленные на 5-е сутки в зоне заживления кластеры FABP4-клеток могут свидетельствовать о воспалительной реакции в зоне заживления, которая к 15-м суткам завершается. В экспериментальной группе более низкий уровень FABP4 указывает на более раннее завершение фазы воспаления в маточной стенке. Сниженная экспрессия воспалительных цитокинов IL-1b и IL-6 в этой группе также подтверждает окончание фазы воспаления (рис. 5). В области прикрепления жировой ткани площадь FABP4-кластеров в периметрии к 15-м суткам снижается в экспериментальной группе, а в контрольной увеличивается, что также подтверждает модулирующее влияние препарата на воспалительную фазу заживления. Увеличение FABP4 к 15-м суткам в экспериментальной группе (рис. 4е) может говорить о продолжающихся процессах с затратой энергии (воспалительных или пролиферативных) в этой локализации, что согласуется и с повышенным количеством CD68 в зоне поврежденного миометрия (рис. 2d, e). Ранее нами было показано участие жировой ткани в заживлении маточного рога у крыс после сквозного разреза [18, 19, 29]. Полное окутывание поврежденного рога жировой тканью отмечается уже на 5-е сутки [18, 19]. Полное освобождение рога от жировой ткани происходит на 30–60-е сутки после повреждения [29]. В этом исследовании жировая ткань покрывала поврежденный рог в обеих группах на 5-е и на 15-е сутки, но FABP4 в зоне периметрия значительно снизился только в экспериментальной группе, что может свидетельствовать о завершающем этапе

воспалительной реакции и начале освобождения от жировой ткани. Увеличение этого маркера на границе соединения с жировой тканью в контроле на 15-е сутки может указывать на активизацию процессов взаимодействия восстановленной маточной стенки с прикрепленной жировой тканью в этот период.

Уровень мРНК всех исследованных цитокинов на 5-е сутки был выше в контрольной группе, но только IL-4 и IL-10 показали достоверные различия с экспериментальными животными. На 15-е сутки в контрольной группе произошло снижение уровня всех исследованных цитокинов, что также свидетельствует о процессах завершения воспалительной фазы заживления. В экспериментальной группе фаза воспаления, по-видимому, завершилась к 5-м суткам, так как отличий в уровне цитокинов в точках мониторинга не отмечено. Более высокие значения на 5-е сутки по сравнению с 15-ми сутками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в контроле могут свидетельствовать об активном процессе разрешения воспалительной реакции на 5-е сутки. Это предположение поддерживает высокий уровень противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 на 5-е сутки в контрольной группе по сравнению с экспериментальной, эти цитокины участвуют в переходе от воспалительной реакции к пролиферативной [14]. Интересно, что в экспериментальной группе к 15-м суткам в зоне заживления достоверно снизилось количество макрофагов, клетки, содержащие FABP4, исчезли, и исследованные интерлейкины находились на уровне физиологической нормы.

Как уже было отмечено, мы попытались снизить физиологический вклад эстрального цикла на уровень цитокинов, относящийся к процессу заживления, используя в качестве внутреннего контроля неоперированный рог матки и вычитая его показатели из показателей оперированного рога. На рис. 5 пунктирная линия указывает на показатель неоперированного рога, равный 1. Значения уровня экспрессии цитокинов экспериментальной группы на 5-е сутки группируются вокруг этой линии, и медиана совпадает с показателями неоперированного рога, что свидетельствует о физиологических значениях этих цитокинов. Значения IL-10 для всех наблюдений в экспериментальной группе на 15-е сутки находятся ниже физиологической нормы, так же как и медианы показателей IL-1b, IL-4 и IL-6, отражая продолжающийся процесс регенерации, однако достоверных различий с 5-ми сутками не достигают.

IL-1 β играет решающую роль в переходе от воспаления к пролиферации во время заживления ран. Первоначально уровень IL-1 β резко возрастает после повреждения ткани, достигая максимума в течение первых 12–24 ч, а затем возвращается к норме после завершения стадии пролиферации [30, 31]. В эстральном цикле IL-1 β повышается в фазу проэструса и эструса и затем снижается в диэструсе [32]. Высокие значения IL-1b на 5-е сутки в контрольной группе отражают продолжающуюся воспалительную реакцию, связанную с процессом заживления. К 15-м суткам воспалительная фаза в контрольной группе завершается.

IL-4 способствует пролиферации эндометриальных стромальных клеток [33], стимулирует продукцию противовоспалительных цитокинов, активацию макрофагов M2 [34] и ингибирует продукцию IL-1b, IL-6 и других провоспалительных цитокинов [14]. Различий в уровне IL-4 в матке грызунов в эстральном цикле не обнаружено [35]. Высокие уровни IL-6 могут способствовать воспалению и образованию гипертрофических рубцов путем нарушения процесса ремоделирования внеклеточного матрикса [36]. В матке грызунов мРНК и биоактивность IL-6 достигают пика во время проэструса и эструса аналогично IL-1 β [37]. IL-10 относится к противовоспалительным цитокинам, способствует переходу от воспалительной к пролиферативной фазе заживления раны [14, 38]. Таким образом, высокие значения IL-1b, IL-4, IL-6 и IL-10 в контроле на 5-е сутки могут свидетельствовать о переходе от воспалительной фазы к пролиферативной. В экспериментальной группе низкие значения этих цитокинов указывают на завершившуюся к 5-м суткам воспалительную реакцию. Сниженные значения IL-1b и IL-6 на 15-е сутки в контрольной группе по сравнению

с экспериментальной и неповрежденным рогом указывают на продолжающийся процесс регенерации и, возможно, активную фазу ремоделирования [39].

В предыдущих исследованиях было показано, что умеренно гипоксическая кондиционированная среда способствовала ингибированию воспалительных реакций в поврежденной печени [20] и снижению патологического ангиогенеза в роговице глаза [40]. Однако ее влияние на заживление маточной стенки после сквозного хирургического разреза было установлено впервые. Наши результаты подтверждают способность кондиционированной среды снижать воспалительную реакцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компоненты кондиционированной среды МСК костномозгового происхождения, культивированных при умеренных гипоксических условиях (10% O₂), ускоряют заживление сквозного разреза маточной стенки в фазу эструса, снижают воспалительную реакцию и способствуют полному завершению воспалительной фазы уже к 5-м суткам. Обработка кондиционированной средой раны до ушивания способствует уменьшению площади заживления и восстановлению физиологического уровня интерлейкинов в поврежденном роге. Исчезновение FABP4⁺-клеток в области поврежденного миометрия и снижение в периметрии в зоне взаимодействия с жировой тканью также указывают на завершение процесса регенерации и, возможно, начало процесса освобождения от жировой ткани. Роль и механизмы взаимодействия эндогенной жировой ткани с поврежденной маточной стенкой исследованы недостаточно и требуют дальнейшего изучения. Однако результаты этой работы указывают, что компоненты кондиционированной среды умеренно гипоксических МСК могут влиять на характер взаимодействия поврежденной маточной стенки и эндогенной жировой ткани.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н. Б. Т., А. А. Т. и А. П. М.), сбор данных (В. В. А., Н. Б. Т., Е. В. К. и А. Н. С.), обработка данных (Н. Б. Т., Т. В. Ф. и А. П. А.), написание и редактирование манускрипта (Н. Б. Т., А. А. Т., А. П. М., Л. М. М.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках государственного задания № 123030700105-0 (FURG-2023-0046) Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных. Исследование одобрено Комиссией по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского” (протокол № 35 (11) от 23.03.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC* (2019) Stem cell therapies for wound healing. *Expert Opin Biol Ther* 19(6): 575–585.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>
2. *Raghuram AC, Yu RP, Lo AY, Sung CJ, Bircan M, Thompson HJ, Wong AK* (2020) Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. *World J Stem Cells* 12(7): 659–675.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.659>
3. *Abdel-Gawad DRI, Moselhy WA, Ahmed RR, Al-Muzafar HM, Amin KA, Amin MM, El-Nahass ES, Abdou KAH* (2021) Therapeutic effect of mesenchymal stem cells on histopathological, immunohistochemical, and molecular analysis in second-grade burn model. *Stem Cell Res Ther* 12(1): 308.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02365-y>
4. *Zhou J, Shi Y* (2023) Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): origin, immune regulation, and clinical applications. *Cell Mol Immunol* 20(6): 555–557.
<https://doi.org/10.1038/s41423-023-01034-9>
5. *Egger D, Tripisciano C, Weber V, Dominici M, Kasper C* (2018) Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering (Basel)* 5(2): 48.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering5020048>
6. *Múzes G, Sipos F* (2022) Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells* 11(15): 2300.
<https://doi.org/10.3390/cells11152300>
7. *Giovannelli L, Bari E, Jommi C, Tartara F, Armocida D, Garbossa D, Cofano F, Torre ML, Segale L* (2023) Mesenchymal stem cell secretome and extracellular vesicles for neurodegenerative diseases: Risk-benefit profile and next steps for the market access. *Bioact Mater* 29: 16–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.013>
8. *Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM* (2018) Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Preconditioning. *Front Immunol* 9: 2837.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
9. *Volkova MV, Shen N, Polyanskaya A, Qi X, Boyarintsev VV, Kovaleva EV, Trofimenko AV, Filkov GI, Mezentshev AV, Rybalkin SP, Durymanov MO* (2023) Tissue-Oxygen-Adaptation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhances Their Immunomodulatory and Pro-Angiogenic Capacity, Resulting in Accelerated Healing of Chemical Burns. *Int J Mol Sci* 24(4): 4102.
<https://doi.org/10.3390/ijms24044102>
10. *Pezzi A, Amarin B, Laureano Á, Valim V, Dahmer A, Zambonato B, Sehn F, Wilke I, Bruschi L, Silva MALD, Filippi-Chiela E, Silla L* (2017) Effects of Hypoxia in Long-Term In Vitro Expansion of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem* 118(10): 3072–3079.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25953>
11. *Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV* (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97(1): 4–13.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
12. *Lopez-Castejon G, Brough D* (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(4): 189–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
13. *Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T* (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10): a016295
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
14. *Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM* (2014) Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol* 5: 253.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>
15. *Park DW, Yang KM* (2011) Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med* 38(4): 179–185.
<https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.4.179>
16. *Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT* (2009) Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain Behav Immun* 23(5): 629–635.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.12.001>

17. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR (2005) A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 80(2): 79–87.
<https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
18. Tikhonova NB, Milovanov AP, Aleksankina VV, Fokina TV, Boltovskaya MN, Aleksankin AP, Artem'eva KA (2021) Analysis of Healing of Rat Uterine Wall After Full-Thickness Surgical Incision. *Bull Exp Biol Med* 172(1): 100–104.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05340-y>
19. Tikhonova NB, Milovanov AP, Aleksankina VV, Fokina TV, Boltovskaya MN, Aleksankin AP (2021) The role of adipose tissue in the healing of rat uterine wall after a full-thickness surgical incision. *Clin Exp Morphol* 10: 72–80.
<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.72-80>
20. Temnov AA, Rogov KA, Sklifas AN, Klychnikova EV, Hartl M, Djinovic-Carugo K, Charnagalov A (2019) Protective properties of the cultured stem cell proteome studied in an animal model of acetaminophen-induced acute liver failure. *Mol Biol Rep* 46(3): 3101–3112.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04765-z>
21. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
22. De M, Wood GW (1990) Influence of oestrogen and progesterone on macrophage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 126(3): 417–424.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1260417>
23. Huang J, Roby KF, Pace JL, Russell SW, Hunt JS (1995) Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J Leukoc Biol* 57(1): 27–35.
<https://doi.org/10.1002/jlb.57.1.27>
24. Zhang L, Long W, Xu W, Chen X, Zhao X, Wu B (2022) Digital Cell Atlas of Mouse Uterus: From Regenerative Stage to Maturational Stage. *Front Genet* 13: 847646.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.847646>
25. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T (2015) Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 8(Suppl 3): 23–33.
<https://doi.org/10.4137/CMC.S17067>
26. Shan T, Liu W, Kuang S (2013) Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB J* 27(1): 277–287.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-211516>
27. Elmasri H, Ghelfi E, Yu CW, Traphagen S, Cernadas M, Cao H, Shi GP, Plutzky J, Sahin M, Hotamisligil G, Cataltepe S (2012) Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. *Angiogenesis* 15(3): 457–468.
<https://doi.org/10.1007/s10456-012-9274-0>
28. Steen KA, Xu H, Bernlohr DA (2017) FABP4/aP2 Regulates Macrophage Redox Signaling and Inflammasome Activation via Control of UCP2. *Mol Cell Biol* 37(2): e00282–16.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00282-16>
29. Tikhonova N, Milovanov AP, Aleksankina VV, Kulikov IA, Fokina TV, Aleksankin AP, Belousova TN, Mikhaleva LM, Nizhaeva NV (2023) Adipocytes in the Uterine Wall during Experimental Healing and in Cesarean Scars during Pregnancy. *Int J Mol Sci* 24(20): 15255.
<https://doi.org/10.3390/ijms242015255>
30. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S (1996) Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 8(7): 548–556.
<https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0074>
31. Macleod T, Berekméri A, Bridgewood C, Stacey M, McGonagle D, Wittmann M (2021) The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier. *Front Immunol* 12: 808012.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808012>
32. Hickey DK, Fahey JV, Wira CR (2013) Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, α -/ β -defensins and TLRs. *Innate Immun* 19(2): 121–131.
<https://doi.org/10.1177/1753425912454026>

33. *Vicetti Miguel RD, Quispe Calla NE, Dixon D, Foster RA, Gambotto A, Pavelko SD, Hall-Stoodley L, Cherpes TL* (2017) IL-4-secreting eosinophils promote endometrial stromal cell proliferation and prevent *Chlamydia*-induced upper genital tract damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(33): E6892–E6901.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1621253114>
34. *Salmon-Ehr V, Ramont L, Godeau G, Birembaut P, Guenounou M, Bernard P, Maquart FX* (2000) Implication of interleukin-4 in wound healing. *Lab Invest* 80(8): 1337–1343.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780141>
35. *Lopez MC, Stanley MA* (2005) Cytokine profile of mouse vaginal and uterus lymphocytes at estrus and diestrus. *Clin Dev Immunol* 12(2): 159–164.
<https://doi.org/10.1080/17402520500141010>
36. *Sun Q, Tang L, Zhang D* (2023) Molecular mechanisms of uterine incision healing and scar formation. *Eur J Med Res* 28(1): 496.
<https://doi.org/10.1186/s40001-023-01485-w>
37. *De M, Sanford TR, Wood GW* (1992) Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone. *Dev Biol* 151(1): 297–305.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90234-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90234-8)
38. *Singampalli KL, Balaji S, Wang X, Parikh UM, Kaul A, Gilley J, Birla RK, Bollyky PL, Keswani SG* (2020) The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Front Cell Dev Biol* 8: 636.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00636>
39. *Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM* (2020) The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines* 8(5): 101.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8050101>. PMID: 32365896; PMCID: PMC7277690
40. *Kodunov A, Temnov A, Tereshchenko A, Trifanenkova I, Sklifas A, Shatskikh A* (2022) Mechanisms of the influence of conditioned medium of cultured stem cells on the development of pathological angiogenesis in the eye cornea in experiment. *Patogenez (Pathogenesis)* 19(4): 41–52.
<https://doi.org/10.25557/2310-0435.2021.04.41-52>

Immunological Effect of Moderately Hypoxic Mesenchymal Stromal Cell Culture Conditions on Uterine Healing in Rats

N. B. Tikhonova^{a,*}, A. A. Temnov^b, V. V. Aleksankina^a, T. V. Fokina^a, A. P. Aleksankin^a,
A. N. Sklifas^b, E. V. Kuznetsova^a, A. P. Milovanov^a, and L. M. Mikhaleva^a

^a*Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia*

^b*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

^{*}*E-mail: morpholhum@list.ru*

The aim is to determine the influence of conditioned medium of autologous bone marrow stromal cells (CMSC) cultured at 10% O₂, on the healing of the rat uterus after a thorough surgical incision. Methods: In the treated group of animals ($n = 14$), the edges of the uterine wound were processed with a conditioned medium prior to suturing, in the control group of animals ($n = 14$), the incision was not processed. Results: On the 5th and 15th days after the operation, morphological studies of the healing zone were carried out. The number of macrophages CD68, FABP4+ cells and the level of mRNA expression of inflammatory cytokine IL-1b, IL-6 and anti-inflammatory IL-4, IL-10 were assessed. The healing area in the treated group was lower than the reference area in all monitoring periods ($p < 0.05$). From the 5th to the 15th day, the expression of IL-1b, IL-4, IL-6 and IL-10 in the control group decreased ($p < 0.05$), in the processed group no valid differences were found ($p < 0.05$). On the 5th day in the treatment group, the expression of IL-4 and IL-10 was lower than in the control, and on the 15th day the expression of IL-1b was lower in the control group. The number of macrophages of CD68 decreased by 15th day in the treated group compared to 5th day and was lower than in the control group. The FABP4 cell clusters in the area of damaged myometrium at 15 days in both groups were almost eliminated except for 2 animals in the control group. In the area of damaged perimetrium, FABP4 clusters increased in the control group by 15th day, and in the treated group decreased and was reliably lower than in the control group. Thus, the application of CMSC has resulted in a reduction of the damage area, reduced inflammatory response and accelerated recovery of the uterine wall.

Keywords: rat uterus, wound healing, conditioned medium, CD68, FABP4, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ САМЦОВ
АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*NEOGALE VISON*) ПРИ ОТБОРЕ НА РУЧНОЕ
И АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ**

© 2025 г. Э. В. Панова^{1,*}, С. Н. Калинина¹, О. В. Трапезов², В. А. Илюха³

¹Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук,
Петрозаводск, Россия

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

³Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
пос. Борок, Ярославская обл., Россия

*E-mail: panova550@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2025 г.

После доработки 19.05.2025 г.

Принята к публикации 19.05.2025 г.

Искусственный отбор животных, направленный на усиление или ослабление оборонительной реакции на человека, влияет на изменчивость функционального состояния регуляторных систем, физиологических функций организма и на сезонность биологических циклов размножения и обмена веществ. Модельным объектом в исследовании влияния отбора на физиологические функции млекопитающих служит сезонно размножающийся хищник семейства Mustelidae американская норка *Neogale vison*. В ходе многолетнего отбора по оборонительной реакции на человека за 27 поколений были созданы две линии норок с ярко выраженными агрессивным и ручным типами поведения, нехарактерными для животных промышленных популяций. Исследования биохимической картины сыворотки крови млекопитающих для оценки состояния обменных процессов организма в условиях отбора по поведению ранее не проводились. Цель работы – анализ биохимических параметров сыворотки крови ручных и агрессивных американских норок клеточного разведения в летний и осенний периоды года. Показано, что как сезон года, так и тип поведения животных оказывают влияние на биохимические параметры крови. Так, содержание общего белка, билирубина, глюкозы и мочевой кислоты были выше, а активность щелочной фосфатазы (ЩФ) – ниже в сыворотке крови животных в осенний период по сравнению с летним независимо от типа поведения. Кроме этого, у агрессивных животных наблюдались более высокие активность амилазы, уровень триглицеридов, но более низкая активность липазы осенью по сравнению с летним периодом. У ручных норок активность аспартатаминотрансферазы (АСТ) и уровень холестерина были выше в осенний период по сравнению с летним. Агрессивные животные по сравнению с ручными характеризовались более высокими уровнями альбумина, глюкозы и холестерина, а также активности АСТ, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), липазы в летний период и более высокими уровнями глюкозы и ЛДГ, но более низкими – мочевины и ЩФ осенью. Таким образом, в ходе многолетней селекции американских норок по поведению меняются показатели обмена веществ при одновременном сохранении сезонных колебаний отдельных биохимических параметров крови, что отражает эволюционно сложившуюся адаптивную особенность норок к циклическим изменениям условий среды.

Ключевые слова: американская норка, отбор по поведению, биохимия крови, доместикация

DOI: 10.7868/S2658655X25070071, **EDN:** MVRMLZ

ВВЕДЕНИЕ

Процесс одомашнивания диких животных и растений, ознаменовавший начало неолитической революции, можно считать самым первым интеллектуальным достижением человечества [1]. При одомашнивании изначально дикие популяции животных адаптируются к антропогенной среде благодаря генетическим изменениям, затрагивающим изменение поведения [2–4].

Однако на сегодняшний день физиологические механизмы данного процесса остаются не до конца изученными [5–7]. Большое количество исследований сущности процесса одомашнивания животных разных таксонов позволило выделить основные закономерности этого явления. Во-первых, искусственный отбор происходит под контролем человека, и успешность размножения в антропогенных условиях становится важным признаком селекции. Во-вторых, одомашниваемые животные характеризуются усилением темпов и размаха изменчивости по различным признакам и даже появлением признаков *de novo*, которые прежде не встречались в эволюционной истории вида, кроме того, у взрослых особей могут сохраняться ювенильные признаки (неотения). В-третьих, у одомашненных особей развивается так называемый одомашнивающий синдром [8], при котором у животных проявляются некоторые признаки, ценимые человеком, но опасные для животных в естественной среде обитания (например, окраска волосяного покрова). И в-четвертых, одомашненные животные утрачивают сезонность размножения, фотопериодизм и приспособленность к определенному суточному ритму [5].

В середине прошлого столетия академиком Беляевым был предложен оригинальный подход в изучении генетико-эволюционных механизмов одомашнивания, идея которого заключалась в организации контролируемого отбора по принципу коррелятивной изменчивости в заранее указанном направлении. Беляев отмечал, что ведущую роль в эволюции и селекции играют коррелятивные связи, входящие в эволюционно сложившуюся систему регуляции онтогенеза [9]. При этом он подчеркивал, что ускорение темпов одомашнивания зависит от систематического отбора животных по поведению относительно реакции на человека, а также от формирования эмоционально-положительных реакций на него [9]. В многолетнем эксперименте Беляева и Трут по отбору на одомашнивающее поведение серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes*) была смоделирована ситуация, которая демонстрирует процессы исторической одомашнивания животных [6]: возникновение особенностей коммуникативного поведения, морфологических и физиологических изменений, характерных для домашних собак, а также появление пегостей на кожно-меховом покрове вследствие замедления темпов развития эмбриональных предшественников меланоцитов [10].

Клеточное пушное звероводство является относительно молодой отраслью животноводства, созданной в начале XX века. Самому жесткому отбору пушные животные подверглись на ранних этапах одомашнивания – при отлове из дикой природы и перемещении в антропогенную среду. На начальных стадиях в условиях промышленного разведения пушных зверей происходили морфологические и функциональные изменения, а также наблюдались различия в поведенческих реакциях [11]. Важными факторами сначала естественного, а затем и искусственного отбора в условиях одомашнивания стал отбор на стрессоустойчивость по отношению к человеку, генетическую адаптацию и способность давать потомство в новых условиях [11]. Начальный период одомашнивания пушных зверей в первую очередь коснулся изменений типа высшей нервной деятельности [12].

В 1970-х годах было установлено, что мутантные формы норки (hedlund white – *h/h*, aleutian – *a/a*, royal pastel – *b/b*, american palomino – *k/k*, sapphire – *a/a p/p*) в сравнении с носителями окраски дикого типа Standard dark brown (+/+) отличались более ручным поведением [13, 14]. Беляевым [9] и Трут [15, 16] на серебристо-черных лисицах было

показано, что характер оборонительного поведения и способность к приручению хорошо наследуются. Однако на процесс отбора по поведению могут влиять средовые условия [12].

Удобным объектом для исследования физиологических функций у млекопитающих разных поведенческих типов является американская норка *Neogale vison* (Carnivora, Mustelidae). Наличие уникальных моделей агрессии и коммуникативности американской норки позволяет провести сравнительный анализ функционирования организма у животных, не являющихся лабораторными, отличающихся от привычных модельных организмов и содержащихся на звероферме в одинаковых условиях. Ранее было показано, что селекция норок по оборонительной реакции на человека сопровождается изменениями в интенсивности пигментации волосяного покрова, роста и развития, метаболизма нейромедиаторов (серотонина и катехоламинов), стресс-реактивности, функциональной активности репродуктивной системы, активности пищеварительных ферментов [17–19]. Отбор по поведению вызывает коррелятивные перестройки регуляторных систем и физиологических функций организма [9, 20–30].

Кровь является наиболее распространенным материалом исследования в лабораторной диагностике. Основное внимание при этом уделяется биохимическому анализу сыворотки крови, который отражает состояние обмена веществ [31], что позволяет применять этот анализ для ранней диагностики заболеваний и выявления нарушений в работе внутренних органов, а мониторинг за состоянием здоровья животных способствует повышению сохранности поголовья и его продуктивности [32]. Обмен веществ и энергии составляет основу процессов жизнедеятельности организма и включает в себя совокупность изменений, которые претерпевают вещества от момента их поступления в пищеварительный тракт до образования конечных продуктов распада.

Для многих лабораторных животных установлены определенные половозрастные нормы биохимических показателей сыворотки крови [32], тем не менее существуют некоторые трудности при установлении референсных значений биохимических показателей для американских норок. Ограниченное количество работ [12, 33–36] посвящено изучению биохимических показателей крови при нарушениях обмена веществ при различных заболеваниях пушных зверей [37]. Противоречия в имеющихся немногочисленных данных объясняются различными методиками взятия и исследования крови, получением крови от животных различных фенотипов, полов и возрастов [37]. Кроме того, под влиянием отбора по поведению у животных происходят перестройки регуляторных систем и физиологических функций организма, что также может сказываться на биохимических показателях сыворотки крови. Эталонные величины этих параметров, определенные для американской норки, не являются стабильными из-за физиологических перестроек и/или изменения диеты животных на зверофермах. Данные биохимические значения могут изменяться в течение 10–15 лет [38]. Кроме того, у норок гематологические показатели белкового, липидного и углеводного обменов зависят от генотипа [39]. Цель данной работы состояла в изучении влияния отбора на ручное и агрессивное поведение на биохимические параметры сыворотки крови норок в летний и осенний периоды.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В эксперимент были взяты самцы американской норки ($n = 50$; возраст – 1–2 года; фенотип – Standard dark brown (+/+)) клеточного разведения, содержащиеся на экспериментальной звероферме Института цитологии и генетики СО РАН. Рацион был составлен в соответствии с рекомендациями для данного вида. Животные

в пятимесячном возрасте были протестированы на оборонительную реакцию на человека (агрессия, страх, ручное поведение) согласно методике *hand catch test* [40]. Каждый тип поведения соотносился со значениями на условной шкале, где 0 обозначает реакцию страха, значения от -1 до -4 свидетельствуют об агрессивном поведении, а значения от $+1$ до $+6$ – о ручном. В данном исследовании использовались 2 группы норок из 19–27-го поколений селекции по оборонительной реакции на человека – с агрессивным -3 и ручным $+6$ поведением. Группа -3 отличается активным нападением вне укрытия. Группа $+6$ характеризуется уникальным ручным поведением, которое возникает *de novo* и никогда не встречается среди норок в исходной промышленной популяции, не затронутой специальным отбором по поведению, звери сами проявляют активность по отношению к человеку и исследуют его руки. Взятие биоматериала осуществлялось у ручных и агрессивных животных летом (июнь) (по $n = 15$), после сезона размножения, в период полового покоя и осенью (октябрь) (по $n = 10$), перед сезоном размножения, в период подготовки организма к зиме.

Забор крови. Образцы крови брали между 9:00 и 13:00 ч, до кормления. Забор крови осуществлялся согласно учебно-методическим рекомендациям по работе с пушными животными [41] без использования седативных средств или анестетиков с соблюдением правил асептики и антисептики. Для получения образцов крови американской норки животное фиксировали, выстригали волосы на расстоянии 1 см от кончика хвоста, кожные покровы обрабатывали спиртом и ножницами отсекали около 3 мм хвоста. Кровь собирали в центрифужные пробирки, контролируя, чтобы она стекала по внутренней стенке, не соприкасаясь с волосатым покровом для исключения гемолиза. Кровотечение останавливали путем наложения лигатуры с последующей обработкой кончика хвоста стрептоцидом [41]. Пробирки с образцами центрифугировали через 1.5 ч в течение 30 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования образовавшуюся сыворотку отделяли и аликвоты хранили в герметичных полипропиленовых микроцентрифужных пробирках при температуре -80°C до проведения анализа.

Определение биохимических показателей. Лабораторные исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования Карельского научного центра РАН. С помощью соответствующих наборов реактивов производства “Вектор-Бест” (Россия) исследовали содержание альбумина, билирубина, глюкозы, креатинина, мочевины, мочевой кислоты, общего белка, триглицеридов (ТГ), холестерина, а также активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), α -амилазы, аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), липазы, щелочной фосфатазы (ЩФ). Анализы проводились на мультимодальном планшетном ридере SuPerMax 3100 (Shanghai Flash Spectrum Biotechnology Co., LTD, Китай).

Статистическая обработка данных. Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами статистики в программе Statgraphics Centurion 19. Выборки имели распределение, отличающееся от нормального, поэтому данные представлены в виде медиан, а также нижнего и верхнего квартилей – Me [Q_1 ; Q_3]. Для оценки влияния факторов “сезон” и “тип поведения” на исследуемые показатели использовали многофакторный дисперсионный анализ с оценкой достоверности различий по непараметрическому критерию Краскела – Уоллиса. Расчет силы влияния фактора (η) производился по формуле: $\text{Sum of Squares between group/Total (Corr.)} \times 100$ и выражался в процентах. Для выявления взаимосвязей, а также оценки их силы и направленности между изучаемыми показателями использовали корреляционный анализ (ранговый критерий Спирмена, r). Для получения небольшого количества линейных комбинаций и объяснения большей части изменчивости данных применяли метод главных компонент (РСА). Также применяли дискриминантный анализ. Статистически значимыми считали различия с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы нами были получены данные, характеризующие биохимическую картину сыворотки крови американских норок двух типов поведения в период полового покоя и начала подготовки к сезону размножения (табл. 1).

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови агрессивных и ручных американских норок (*Neogale vison*) в период полового покоя (лето) и начала подготовки к сезону размножения (осень) (Ме [Q1; Q3])

Биохимические показатели	Единицы измерения	Лето		Осень	
		Агрессивные <i>n</i> = 15	Ручные <i>n</i> = 15	Агрессивные <i>n</i> = 10	Ручные <i>n</i> = 10
АЛТ	Ед/л	120.20 [107.80; 150.30]	108.70 [97.24; 129.10]	152.90 [123.80; 222.80]	130.80 [111.40; 238.0]
Альбумин	г/л	45.77 [42.02; 50.22]	36.98* [33.38; 38.64]	40.59 [37.76; 44.03]	43.96 [39.52; 45.13]
Амилаза	Ед/л	230.10 [215.50; 266.5]	261.40 [211.70; 270.30]	327.35▲ [279.90; 386.30]	290.70 [221.20; 342.30]
АСТ	Ед/л	113.20 [100.80; 130.80]	99.01* [93.70; 107.80]	129.10 [114.90; 169.70]	152.05▲ [122.80; 252.80]
Билирубин	мкмоль/л	6.54 [5.26; 8.45]	4.58 [4.09; 5.90]	15.30▲ [13.89; 19;33]	15.78▲ [14.01; 18.24]
Глюкоза	ммоль/л	8.23 [7.82; 9.40]	6.51* [5.92; 7.38]	11.17▲ [9.84; 11.80]	8.13*▲ [6.61; 8.87]
Креатинин	мкмоль/л	—	—	48.73 [31.52; 61.30]	60.44 [38.23; 99.67]
ЛДГ	Ед/л	1239.00 [1048.00; 1424.00]	665.8* [613.10; 1009.00]	1107.50 [903.10; 1417.00]	735.00* [646.00; 804.20]
Липаза	МЕ/л	56.59 [46.12; 61.10]	27.58* [19.31; 53.80]	31.36▲ [28.75; 35.46]	47.79 [44.39; 52.03]
Мочевая кислота	мкмоль/л	276.56 [268.42; 282.96]	269.25 [254.66; 308.38]	319.33▲ [289.57; 387.99]	309.22▲ [295.21; 321.98]
Мочевина	ммоль/л	7.91 [4.47; 8.99]	3.11 [2.94; 8.93]	7.29 [6.63; 7.63]	8.47* [8.28; 8.66]
Общий белок	г/л	65.23 [61.95; 71.09]	65.09 [59.58; 68.41]	74.43▲ [67.79; 78.90]	71.36▲ [67.18; 75.47]
ТГ	ммоль/л	1.28 [1.19; 1.38]	1.30 [1.12; 1.39]	1.71▲ [1.53; 1.98]	1.38 [1.32; 1.47]
Холестерол	ммоль/л	5.99 [4.97; 6.75]	3.73* [3.31; 4.66]	6.01 [5.42; 6.45]	6.17▲ [5.62; 7.02]
ЩФ	Ед/л	82.71 [77.75; 100.60]	96.09 [86.85; 107.20]	68.09▲ [63.41; 73.89]	88.64*▲ [76.92; 96.50]

Различия показателей статистически значимы ($p < 0.05$): * – между агрессивными и ручными животными в одном сезоне; ▲ – у одной и той же поведенческой группы животных, исследованной в разные периоды года; “—” – показатель не измеряли.

Обнаружено статистически значимое изменение изученных показателей под влиянием (критерий Краскела – Уоллиса, $p < 0.05$) воздействия как сезона года, так и типа поведения животных. Так, содержание общего белка, билирубина, глюкозы и мочевой кислоты были выше, а активность ЩФ – ниже в сыворотке крови американских норок

в осенний период по сравнению с летним независимо от типа поведения. Помимо этого, осенью у агрессивных животных наблюдались более высокие активность амилазы, уровень ТГ, но более низкая активность липазы, чем летом. У ручных норок активность АСТ и уровень холестерина были выше в осенний период по сравнению с летним.

Различия биохимических показателей между американскими норками двух типов поведения состояли в следующем. Агрессивные животные по сравнению с ручными характеризовались более высокими уровнями альбумина, глюкозы, холестерина, активности АСТ, ЛДГ и липазы в летний период, а также более высокими уровнями глюкозы и ЛДГ, но более низкими – мочевины и ЩФ осенью.

В результате применения метода главных компонент было установлено, что две из них (первая и четвертая) значимо коррелируют с изучаемыми факторами – сезоном и типом поведения. Первая главная компонента была связана с обоими факторами, а четвертая – только с типом поведения. Первая главная компонента характеризовала 29.37% изменчивости и формировалась такими параметрами, как альбумин, билирубин, глюкоза, мочевины, мочевиная кислота, ТГ и холестерол, а также активностью АЛТ, АСТ, α -амилазы и ЛДГ. Четвертая главная компонента формировалась за счет уровня общего белка и креатинина, а также активности липазы (с отрицательным значением) и ЩФ и снимала 8.98% общей дисперсии. Распределение групп животных по изученным показателям в пространстве двух главных компонент отражено на рис. 1.

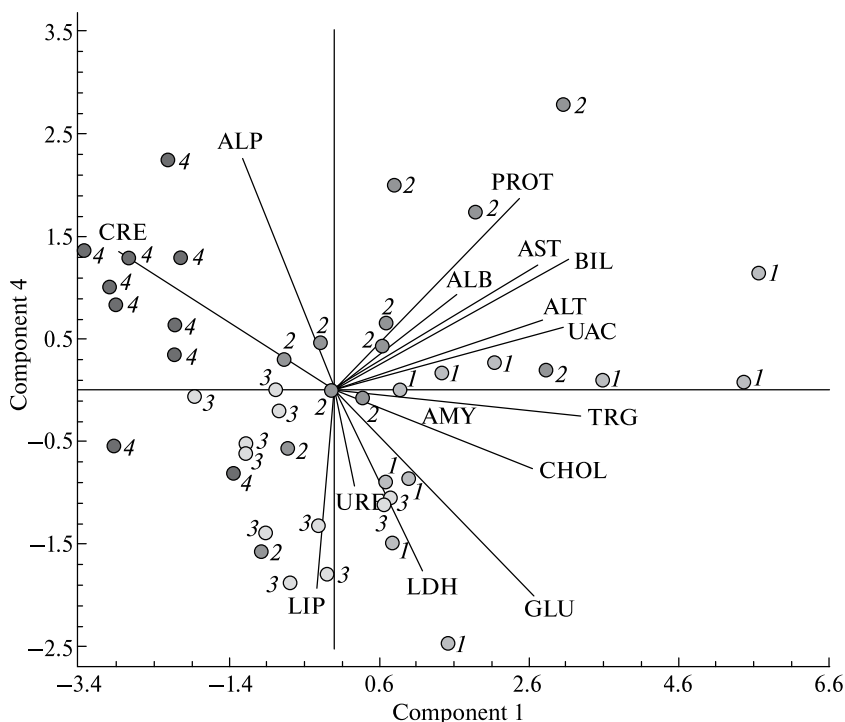


Рис. 1. Расположение экспериментальных групп животных для пула исследованных показателей сыворотки крови норок на плоскости двух главных компонент. Обозначения: Component 1, 4 – главные компоненты 1 и 4; группы животных: 1 – агрессивные, лето; 2 – ручные, лето; 3 – агрессивные, осень; 4 – ручные, осень. ALB – альбумин, г/л; ALP – щелочная фосфатаза, Ед/л; ALT – аланинаминотрансфераза, Ед/л; AMY – α -амилаза, Ед/л; AST – аспартатаминотрансфераза, Ед/л; BIL – билирубин, мкмоль/л; CHOL – холестерол, ммоль/л; CRE – креатинин, мкмоль/л; GLU – глюкоза, ммоль/л; LDH – лактатдегидрогеназа, Ед/л; LIP – липаза, МЕ/л; PROT – общий белок, г/л; TRG – триглицериды, ммоль/л; UAC – мочевиная кислота, мкмоль/л; URE – мочевина, ммоль/л.

При анализе экспериментальных данных было выявлено статистически значимое влияние сезонного фактора (рис. 2) на такие показатели сыворотки крови, как АСТ ($\eta = 18.68\%$), билирубин ($\eta = 51.81\%$) и холестерол ($\eta = 17.85\%$). Уровень этих биохимических показателей крови норок был выше в осенний период по сравнению с летним. В биохимической картине крови исследуемых животных отмечаются межгрупповые различия (рис. 2), которые заключаются в более высоком содержании глюкозы ($\eta = 33.14\%$), креатинина ($\eta = 28.71\%$), холестерола ($\eta = 10.12\%$) и активности ЛДГ ($\eta = 23.13\%$) у агрессивных норок по сравнению с ручными. Совместное статистически значимое влияние факторов “тип поведения” и “сезон” (рис. 2) было установлено для содержания холестерола ($\eta = 17.24\%$), активностей АСТ ($\eta = 7.40\%$) и липазы ($\eta = 17.71\%$).

В ходе корреляционного анализа было обнаружено, что в сыворотке крови самцов американских норок обоих поведенческих типов, взятой в летний период, выявляется большее число корреляционных плед, чем в сыворотке крови животных в осенний период (рис. 3). Наибольшее число корреляций между биохимическими показателями сыворотки крови было выявлено у агрессивных самцов летом, минимальное – у ручных самцов осенью. У агрессивных самцов в летний период года преобладали отрицательные корреляции (7 из 13), в то время как в других группах преобладали положительные (у ручных летних – 6 из 8, у агрессивных осенних – 4 из 7, у ручных осенних – 6 из 6). У самцов доместикационного типа поведения были обнаружены замкнутые циклы положительных корреляций: летний период – “альбумин – АСТ – ЛДГ”, осенний период – “альбумин – АЛТ – ЛДГ”, тогда как у агрессивных самцов в летний период – замкнутый цикл из двух отрицательных и одной положительной корреляции: “АСТ – мочевины – ЛДГ”.

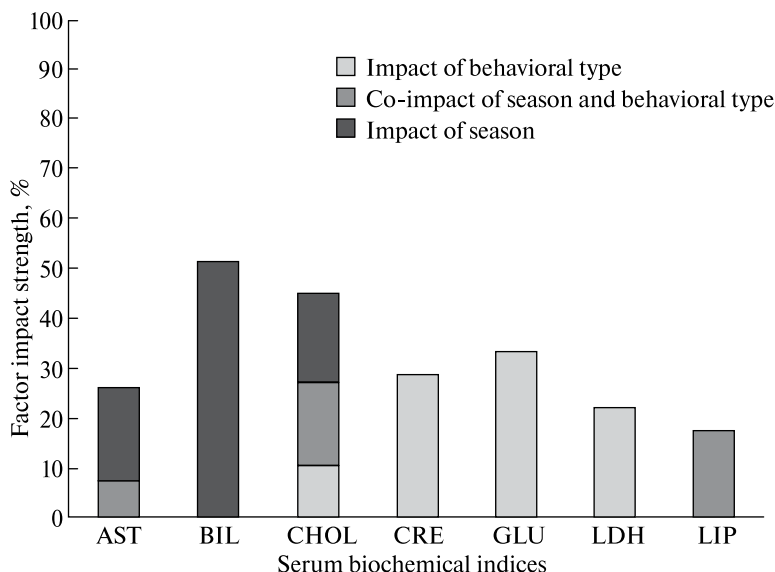


Рис. 2. Влияние факторов “тип поведения” и “сезон” на биохимические показатели сыворотки крови американских норок. Обозначения: Strength of influence of the factor, % – Сила влияния фактора, %; Biochemical parameter of blood serum – Биохимические параметры сыворотки крови; ||| – влияние фактора “тип поведения”, /// – влияние фактора “сезон”, – – – совместное влияние факторов “тип поведения” и “сезон”; AST – аспартатаминотрансфераза, Ед/л; BIL – билирубин, мкмоль/л; CHOL – холестерол, ммоль/л; CRE – креатинин, мкмоль/л; GLU – глюкоза, ммоль/л; LDH – лактатдегидрогеназа, Ед/л; LIP – липаза, МЕ/л. На рисунке представлены статистически значимые показатели сыворотки крови американских норок ($p < 0.05$).

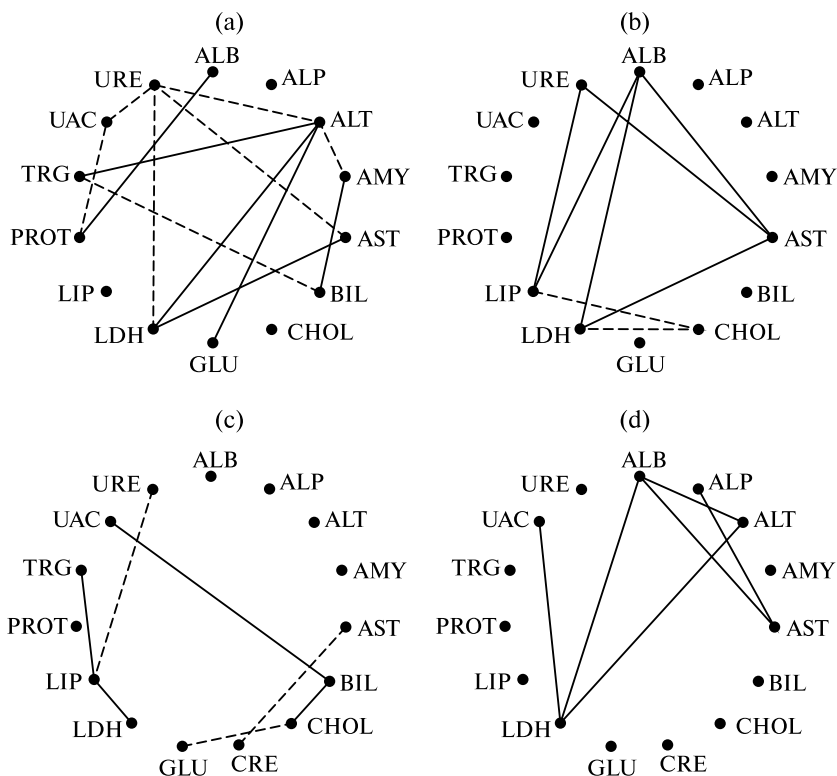


Рис. 3. Корреляционные плеяды биохимических показателей сыворотки крови американских норков двух типов поведения в разные сезоны ($p < 0.05$). Обозначения: (а) – У агрессивных животных в летний период. (б) – У ручных животных в летний период. (с) – У агрессивных животных в осенний период. (д) – У ручных животных в осенний период. Сплошная линия – положительная корреляция; пунктирная линия – отрицательная корреляция; ALB – альбумин, г/л; ALP – щелочная фосфатаза, Ед/л; ALT – аланинаминотрансфераза, Ед/л; AMY – α -амилаза, Ед/л; AST – аспартатаминотрансфераза, Ед/л; BIL – билирубин, мкмоль/л; CHOL – холестерин, ммоль/л; CRE – креатинин, мкмоль/л; GLU – глюкоза, ммоль/л; LDH – лактатдегидрогеназа, Ед/л; LIP – липаза, МЕ/л; PROT – общий белок, г/л; TRG – триацилглицерины, ммоль/л; UAC – мочевая кислота, мкмоль/л; URE – мочеви́на, ммоль/л.

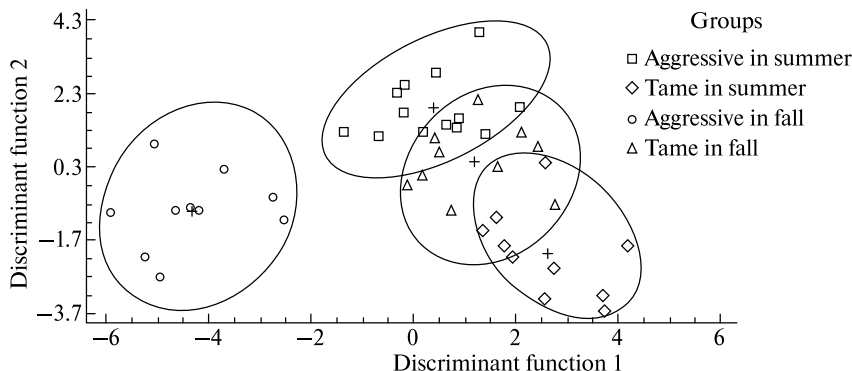


Рис. 4. Расположение экспериментальных групп животных на плоскости двух дискриминантных функций. Обозначения: Discriminant function 1, 2 – дискриминантные функции 1 и 2; $\square$ – агрессивные норки летом; $\diamond$ – ручные норки летом; $\circ$ – агрессивные норки осенью; $\triangle$ – ручные норки осенью.

В ходе пошагового дискриминантного анализа было установлено, что, базируясь на таких показателях, как уровни глюкозы, билирубина, холестерина, активности АЛТ, ЛДГ и липазы, можно корректно классифицировать изученных норок по четырем группам в 97.67% случаев. Расположение экспериментальных групп на плоскости двух дискриминантных функций достаточно четко выявляет влияние типа поведения и сезона на исследуемые показатели (рис. 4). Группы агрессивных норок были удалены друг от друга, занимали отдельные, различные неперекрывающиеся позиции. Две группы ручных норок занимали близкое перекрывающееся положение между собой. Кроме того, группа агрессивных летних животных пересекалась с группой ручных летних норок, в то время как агрессивные осенние самцы находились в стороне от других групп.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования дают дополнительную информацию о сезонной изменчивости биохимических показателей сыворотки крови у половозрелых самцов американской норки с агрессивным и ручным поведением по отношению к человеку. Несмотря на то что линии агрессивных и ручных животных относятся к 19–27-м поколениям отбора по поведению, сезон существенно влияет на биохимические показатели сыворотки крови исследованных животных.

Американские норки, как и другие сезонно размножающиеся животные умеренных широт, характеризуются периодом покоя в апреле – сентябре, началом подготовки к размножению с ноября по декабрь и активной фазой в январе – марте [42]. Обмен веществ у животных также подвержен сезонным изменениям, что является эволюционно сложившейся адаптивной особенностью организма для преодоления в естественных условиях недостатка пищи путем накопления питательных жировых запасов осенью [43]. Это, несомненно, отражается на колебаниях большинства биохимических показателей с их увеличением в зимний период и снижением – в летний, что отмечалось ранее другими исследователями [12, 33, 43, 44].

Гематологические и биохимические показатели отражают физиологическое состояние животного на момент забора крови. На эти параметры влияют несколько факторов, включая пол и возраст животного, стресс и сезон [45].

У американских норок, содержащихся на звероферме в Забайкальском крае, в зимний период показатели общего белка, билирубина, глюкозы, мочевины, холестерина и ТГ были выше по сравнению с летним, а концентрации креатинина, общих липидов и мочевой кислоты не различались [43]. В исследовании Lasota с соавт. [45] было выявлено, что у самцов американских норок (фенотипы Black и Sapphire) значения уровней глюкозы, белка, холестерина, а также активность АСТ повышались в репродуктивный сезон (январь – март) по сравнению со значениями вне периода размножения (сентябрь – ноябрь).

У норок клеточного содержания отмечаются сезонные метаболические колебания, так, например, максимальный расход энергии характерен для летнего периода, минимальный – для зимнего [46]. Со скоростью обмена веществ отрицательно коррелирует масса тела – наибольшая зимой и наименьшая летом [47]. В нашем исследовании было выявлено, что в летний период у норок обоих поведенческих типов количество коррелирующий между биохимическими показателями выше, чем осенью. Данная сезонная цикличность может быть связана с накоплением жира в осенне-зимний период и утратой его весной и ранним летом [47].

Сезонный характер углеводного обмена у американских норок был установлен в работах Берестова [33] и Петровой [44], характеризующийся постепенным снижением концентрации глюкозы в сыворотке крови с февраля по сентябрь и дальнейшим ее нарастанием к зиме. В исследовании Берестова и Кожевниковой [12] были

выявлены сезонные колебания активности амилазы в крови с наименьшими показателями в летний период и постепенным увеличением к зиме. Сезонность интенсивности углеводного обмена у американских норок может быть обусловлена исторически сложившейся приспособленностью животных к изменяющимся условиям среды и характеру питания [33, 44, 48]. Выявленный нами характер противоположно направленного взаимодействия трансаминаз находит подтверждение в работе Берестова и Кожевниковой [12], где у норок была также обнаружена зависимость активностей АЛТ и АСТ от сезона года – активность АСТ увеличивалась к лету, тогда как активность АЛТ, наоборот, уменьшалась. Подобный характер изменений указанных ферментов был также отмечен у бычков и ягнят [49, 50]. Следовательно, степень изменения активности данных трансаминаз в зависимости от сезона года указывает на специфичность этих энзимов, регулирующих перераспределение аминокислотного фонда в строго определенное время года [12]. Аминотрансферазы играют центральную роль в белковом обмене [31]. Активность трансаминаз в сыворотке крови пушных зверей колеблется в значительных пределах, что может быть обусловлено мышечным напряжением и возбуждением, вызванным отловом и последующей фиксацией зверя [33]. Так, например, в работе Берестова [33] приводится следующее значение для АСТ – 154 ± 8.48 Ед/л, что согласуется с нашими данными, характерными для ручных норок в октябре.

Основным показателем состояния углеводного обмена является содержание глюкозы в крови. Поскольку глюкоза равномерно распределена между плазмой и форменными элементами крови, то ее концентрацию можно определить как в сыворотке, так и в цельной крови [31]. Естественная диета американских норок в дикой природе основана в основном на добыче, содержащей малое количество углеводов. Поэтому норки эволюционно адаптированы к использованию преимущественно белков и жиров в качестве источников энергии. Облигатным хищникам, к которым относятся и американская норка, приходится использовать белок для поддержания концентрации глюкозы в крови даже при его ограниченном источнике в рационе, поскольку глюкоза является наиболее важным углеводом, характеризующим энергетические запасы организма, а также косвенно свидетельствующим об относительно спокойном состоянии организма в отсутствие стресса [32, 51]. При приеме пищи, содержащей углеводы, увеличивается приток крови к скелетным мышцам, что, в свою очередь, увеличивает доставку и запасание глюкозы в виде гликогена в мышцах, снижение липолиза и увеличение запасов ТГ в адипоцитах [52]. Уровень гликемии в каждый конкретный момент времени зависит от: скорости, с которой глюкоза поступает в циркулирующую кровь; скорости, с которой она распределяется по всему кровообращению; скорости, с которой она распределяется между эритроцитами и плазмой; скорости, с которой она удаляется из кровообращения [52]. Содержание глюкозы в крови регулируется центральной нервной системой [31]. Сниженный уровень глюкозы в крови возбуждает в гипоталамусе области, участвующие в активации адренокортикотропной функции гипофиза [53]. У людей низкий уровень глюкозы у человека (относительно нормы) в крови коррелирует с повышенной агрессией и импульсивностью, возможно, из-за отсутствия адекватных энергетических субстратов для поддержания нейронного и, следовательно, поведенческого торможения [54, 55]. В нашем исследовании было установлено, что концентрация глюкозы у агрессивных животных была выше, чем у ручных во все сезоны, что может быть связано с более интенсивным обменом веществ у агрессивных норок по сравнению с ручными, а также с гормональными различиями между животными двух типов поведения, поскольку адреналин, глюкагон, АКТГ, СТГ, глюкокортикоиды повышают уровень глюкозы в крови [31].

ЛДГ является ферментом, катализирующим последний этап гликолиза, при котором под воздействием кофермента НАД пируват восстанавливается до лактата, выделяющегося в кровь [56]. ЛДГ содержится во всех органах и тканях животных и человека, однако его активность в органах различна. Так, например, самая высокая активность

ЛДГ характерна для почек и сердца, а самая низкая – для сыворотки крови [57]. Под влиянием внешних и внутренних факторов, таких как воздействие низких и высоких температур на организм, мышечные нагрузки, а также различные патологии, активность ЛДГ может возрастать [12]. В нашем исследовании было обнаружено влияние типа поведения на активность ЛДГ в сыворотке крови американских норок, однако влияние сезона выявлено не было. Берестовым и Кожевниковой [12] была выявлена сезонная динамика активности ЛДГ – у норок *Standard dark brown* (+/+) активность непрерывно снижалась в период с зимы до осени, достигая минимального значения в осенний период. Выявленные нами различия в активности ЛДГ у американских норок разных поведенческих фенотипов могут быть связаны с тем, что ручные животные обладают более низким основным обменом и интенсивностью потребления кислорода, чем агрессивные. Кроме того, более низкая активность ЛДГ у ручных животных может свидетельствовать о снижении общей доли гликолиза в энергетическом обмене организма. Межгрупповые различия активности ЛДГ в сыворотке могут быть связаны также с гормональным фактором. Так, например, было установлено, что у енотовидной собаки повышение активности щитовидной железы сопровождается увеличением потребления кислорода, отсюда же вытекает зависимость активности ЛДГ от уровня гормонов [58].

Креатинин является конечным продуктом азотистого обмена, характеризующим функциональную активность почек и мышечной массы [59, 60]. Уровень креатинина в крови зависит от многих факторов – например, его снижение может наблюдаться во время голодания, при снижении мышечной массы и после употребления кортикостероидов [59]. Сывороточный креатинин может меняться не только в зависимости от скорости клубочковой фильтрации, но и от мышечной массы, поскольку он является продуктом катаболизма мышц [61–63]. Концентрация креатинина в плазме прямо пропорционально связана с содержанием тестостерона и обратно пропорционально – с уровнем кортизола [64]. В литературе приводятся следующие диапазоны стандартных величин для данного показателя у американских норок: 50.9 ± 2.2 мкмоль/л [32], 48–69.2 мкмоль/л [36]. Полученные в ходе нашего исследования результаты демонстрируют более низкий уровень креатинина в сыворотке крови у ручных американских норок по сравнению с агрессивными. Данное межгрупповое различие может быть связано с тем, что источником креатинина является пищевой белок, содержащийся в первую очередь в мясных кормах. Можно предположить, что поскольку у агрессивных норок активнее функционирует протеолитическая ферментная цепь, нежели у животных с доместикационным типом поведения [19], то усвоение креатинина из пищи у них происходит в большем объеме.

Основной чертой холестеролового обмена у хищных млекопитающих является его устойчивая сбалансированность: содержание холестерина в сыворотке крови в норме с возрастом практически не изменяется [33]. Повышение или снижение данного показателя в крови может свидетельствовать о различных патологиях внутренних органов, некоторых инфекционных и вирусных заболеваниях [65]. Скорость окисления холестерина регулируется на начальной стадии, катализируемой 7 α -гидроксилазой, которая, в свою очередь, находится под гормональным контролем. Так, половые гормоны и тироксин активируют фермент, увеличивая скорость окисления холестерина [31]. Выдвигается предположение, что низкое содержание холестерина в крови связано с повышенной агрессией, характерной в том числе и для приматов, осуществляющейся через вовлечение в процесс центральной серотонинергической активности [66]. Все чаще высказывается мнение о взаимосвязи повышенного риска агрессивного поведения людей и приема препаратов, понижающих уровень холестерина, а также с бедным пищевым рационом или отсутствием аппетита [67, 68]. Однако нами было выявлено, что для агрессивных норок характерен более высокий уровень холестерина по сравнению с ручными. Полученные нами значения данного показателя у агрессивных норок

летом и осенью и у ручных норок осенью попадают в диапазон референсных значений, указанных другими авторами (5.9 ± 0.1 ммоль/л [69], 6.5 ± 0.58 ммоль/л [43]), в то время как уровень холестерина у американских норок в летний период заметно ниже. Вероятно, что у животных данного поведенческого типа по сравнению с агрессивными снижается эффективность липидного обмена, о чем может свидетельствовать более низкая активность липаз в различных отделах пищеварительной системы [19].

Результаты данного исследования позволяют предположить, что плеiotропное действие генов, контролирующих поведение, также вовлечено в регуляцию биохимических показателей сыворотки крови американских норок, отбираемых по поведению. Таким образом, в ходе длительной селекции американских норок по поведению показатели обмена веществ существенно меняются, однако сохраняются некоторые сезонные колебания отдельных биохимических параметров крови, что отражает эволюционно сложившуюся адаптивную особенность норок.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О. В. Т.), сбор биологического материала (О. В. Т., С. Н. К., Э. В. П.), проведение лабораторных анализов (Э. В. П.), статистическая обработка данных (Э. В. П., В. А. И.), написание первого варианта статьи (Э. В. П.), обсуждение и редактирование статьи – все авторы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра РАН (FMEN-2022-0003), Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0023), Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (№ 124032500016-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Института биологии Карельского научного центра РАН (протокол № 3, 07.12.2022 г.). Были соблюдены все применимые международные, национальные и институциональные рекомендации по уходу за животными и их этическому использованию. Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму количество используемых животных и их страдания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дарвин Ч* (1941) Изменения животных и растений в домашнем состоянии. Сельхозгиз. Москва. [*Darvin Ch* (1941) Changes in animals and plants in domestic conditions. Sel'khozgiz. Moskva. (In Russ)].
2. *Price EO, King JA* (1968) Domestication and adaptation. ESE Hafes (ed) Adaptation of Domestic Animals. 34–45.
3. *Ratner SC, Boice R* (1975) Effects of domestication on behavior. ESE Hafes (ed) 3 ed. The Behavior of Domestic Animals. 3–19.

4. Price EO (1984) Behavioural aspects of animal domestication. *Qurt Rev Biol* 59(1): 1–32.
5. Трапезов ОВ (2013) Доместикация как самое раннее интеллектуальное достижение человечества. Вавилов журн генетики селекции 7(4/2): 872–883. [Trapezov OV (2013) Domestication as the earliest intellectual achievement of mankind. *Vavilov zhurn genetiki selektsii* 7(4/2): 872–883. (In Russ)].
6. Трапезов ОВ (2014) Генетические основы доместикации. Мол приклад генетика 18: 118–131. [Trapezov OV (2014) Genetic bases of domestication. *Mol priklad genetika* 18: 118–131. (In Russ)].
7. Purugganan MD (2022) What is domestication? *Trends Ecol Evol* 37(8): 663–671. <https://doi.org/0.1016/j.tree.2022.04.006>
8. Wilkins AS, Wrangham R, Fitch WT (2021) The neural crest/domestication syndrome hypothesis, explained: reply to Johnsson, Henriksen, and Wright. *Genetics* 219(1): 1–7. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab098>
9. Беляев ДК (1962) О некоторых проблемах коррелятивной изменчивости и ее значении для теории эволюции и селекции животных. Известия Сиб отдел АН СССР 10: 111–124. [Belyayev DK (1962) On some problems of correlative variability and its significance for the theory of evolution and selection of animals. *Izvest Sibirsk otdel AN SSSR* 10: 111–124. (In Russ)].
10. Трут ЛН (2007) Доместикация животных в историческом процессе и в эксперименте. Информ вестн ВОГиС 11(2): 273–289. [Trut LN (2007) Domestication of animals in the historical process and in experiment. *Inform vestn VOGiS* 11(2): 273–289. (In Russ)].
11. Колдаева ЕМ, Колдаев НА (2007) Доместикация и хозяйственно полезные признаки у пушных зверей. Вестн ВОГиС 11(1): 62–75. [Koldayeva EM, Koldayev NA (2007) Domestication and economically useful traits in fur animals. *Vestn VOGiS* 11(1): 62–75. (In Russ)].
12. Берестов ВА, Кожевникова ЛК (1981) Ферменты крови пушных зверей. Наука. Ленинград. [Berestov VA, Kozhevnikova LK (1981) Blood enzymes of fur animals. *Nauka. Leningrad*. (In Russ)].
13. Афанасьев ВА (1972) Изменение пушных зверей при разведении в клетке. Пробл доместик животн растен: 33–37. [Afanasyev VA (1972) Changes in fur animals during cage breeding. *Probl domestik zhivotn rasten*: 33–37. (In Russ)].
14. Вайн-Риб МА, Сегаль АН (1974) Влияние двигательной активности на энергетический метаболизм американской норки. Физиол исслед адает природ факторам выс широт: 153–157. [Wein-Reeb MA, Segal AN (1974) Effect of locomotor activity on energy metabolism in the American mink. *Fiziol issled adapt prirod faktorom vys shirot*: 153–157. (In Russ)].
15. Трут ЛН (1969) Некоторые новые данные по селекции серебристо-черных лисц (*Vulpes fulvus* Dems.) по свойствам их оборонительного поведения. Генет повед: 107–119. [Trut LN (1969) Some new data on the selection of silver foxes (*Vulpes fulvus* Dems.) for defensive behavior. *Genet poved*: 107–119. (In Russ)].
16. Трут ЛН (1978) Очерки по генетике поведения. Новосибирск. [Trut LN (1978) Essays on the genetics of behavior. *Novosibirsk*. (In Russ)].
17. Трапезов ОВ, Трапезова ЛИ, Алехина ТА, Иванов ЮН (2009) Влияние моно- и дирекссивности по мутациям, затрагивающим окраску меха, на уровень содержания моноаминов в мозге у американской норки. Генетика 45(12): 1641–1645. [Trapezov OV, Trapezova LI, Alekhina TA, Ivanov YuN (2009) Effect of mono- and direciveness of mutations affecting fur color on the monoamine content in the brain of the American mink. *Genetika* 45(12): 1641–1645. (In Russ)].
18. Kulikov AV, Bazhenova EY, Kulikova EA, Fursenko DV, Trapezova LI, Terenina EE, Mormede P, Popova NK, Trapezov OV (2016) Interplay between aggression, brain monoamines and fur color mutation in the American mink. *Genes Brain Behav* 15(8): 733–740. <https://doi.org/10.1111/gbb.12313>
19. Калинина СН, Илюха ВА, Трапезов ОВ, Морозов АВ, Трапезова ЛИ, Некрасова МА, Степанова МА, Сысоева ЕА (2022) Активность пищеварительных ферментов у американских норок (*Neovison vison*) при отборе на агрессивное и ручное поведение. Журн эвол биохим физиол 58(1): 61–68. [Kalinina SN, Ilyukha VA, Trapezov OV, Morozov AV, Trapezova LI, Nekrasova MA, Stepanova MA, Sysoyeva EA (2022) Digestive enzyme activity in American minks (*Neovison vison*) during selection for aggressive and tame behavior. *Zhurn evol biokhim fiziol* 58(1): 61–68. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044452922010028>
20. Belyayev DK (1969) Domestication of animals. *Science J (UK)* 5: 47–52.

21. *Беляев ДК* (1970) Биологические аспекты domestикации животных. Генетика и селекция новых пород сельскохозяйственных животных. Мат Всесоюз совещ 24–26 окт 1968 г. Наука. Алма-Ата. 30–44. [*Belyaev DK* (1970) Biological aspects of animal domestication. Genetics and selection of new breeds of farm animals. Mat Vsesoyuz soveshch 24–26 okt 1968 g. Nauka. Alma-Ata. 30–44. (In Russ)].
22. *Беляев ДК* (1972) Генетические аспекты domestикации животных: Проблемы domestикации животных и растений. Наука. Москва. [*Belyaev DK* (1972) Genetic aspects of animal domestication: Problems of domestication of animals and plants. Nauka. Moskva. (In Russ)].
23. *Беляев ДК* (1974) О некоторых вопросах стабилизирующего и дестабилизирующего отбора: История и теория эволюционного учения. Наука. Ленинград. [*Belyaev DK* (1974) On some issues of stabilizing and destabilizing selection: History and theory of evolutionary teaching. Nauka. Leningrad. (In Russ)].
24. *Беляев ДК* (1979) Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestикации. Природа 2: 36–45. [*Belyaev DK* (1979) Destabilizing selection as a factor of variability during domestication. Priroda 2: 36–45. (In Russ)].
25. *Belyaev DK, Khvostova VV* (1974) Domestication, Plant and Animal. Encyclop Britan: 936–942.
26. *Belyaev DK* (1979) Destabilizing selection as a factor in domestication. J Heredity 70: 301–308.
27. *Трут ЛН, Науменко ЕВ, Беляев ДК* (1972) Изменение гипофизарно-надпочечниковой функции серебристо-черных лисиц при селекции по поведению. Генетика 8(5): 35–43. [*Trut LN, Naumenko EV, Belyaev DK* (1972) Changes in the pituitary-adrenal function of silver foxes during selection for behavior. Genetika 8(5): 35–43. (In Russ)].
28. *Трут ЛН* (1986) Пути развития концепции дестабилизирующего отбора: Биография эволюционных идей академика Д.К. Беляева (1917–1985). Журн общей биол 47(4): 435–444. [*Trut LN* (1986) [Paths of development of the concept of destabilizing selection: Biography of evolutionary ideas of academician DK Belyaev (1917–1985). Zhurn obshch biol 47(4): 435–444. (In Russ)].
29. *Никулина ЭМ, Трапезов ОВ, Харламова АА, Попова НК* (1993) Аффективное защитное поведение норок: воздействия на серотонергическую и дофаминергическую системы. Сибир биол журн 3: 9–12. [*Nikulina EM, Trapezov OV, Kharlamova AA, Popova NK* (1993). Affective defensive behavior of minks: effects on the serotonergic and dopaminergic systems. Sibir biol zhurn 3: 9–12. (In Russ)].
30. *Гулевич РГ, Трапезов ОВ, Маслова ЛН, Харламова АВ* (1995) Функция надпочечников у норок *Mustela vison*, селекционируемых по типу поведения. Журн эвол биохим физиол 31(4): 444–448. [*Gulevich RG, Trapezov OV, Maslova LN, Kharlamova AV* (1995) Adrenal function in minks *Mustela vison* selected for behavior. Zhurn evol biokhim fiziol 31(4): 444–448. (In Russ)].
31. *Бородин ЕА* (1991) Биохимический диагноз (физиологическая роль и диагностическое значение биохимических компонентов крови и мочи). Учеб пособие в 2-х частях. Часть 1. Благовещенск. [*Borodin EA* (1991) Biochemical diagnosis (physiological role and diagnostic value of biochemical components of blood and urine). Ucheb posobiye v 2-kh chastyakh. Chast' 1. Blagoveshchensk. (In Russ)].
32. *Березина АН, Беспятных ОЮ, Кокорина АЕ* (2011) Биохимическая картина сыворотки крови молодняка норки. Аграр наука Евро-Северо-Востока 2(21): 39–42. [*Berezina AN, Bespyatnykh OY, Kokorina AE* (2011) Biochemical picture of blood serum of young mink. Agrar nauka Yevro-Severo-Vostoka 2(21): 39–42. (In Russ)].
33. *Берестов ВА* (1971) Биохимия и морфология крови пушных зверей. Петрозаводск. [*Berestov VA* (1971) Biochemistry and morphology of blood of fur animals. Petrozavodsk. (In Russ)].
34. *Унжаков АР, Антонова ЕП, Сергина СН, Баишникова ИВ, Чернобровкина НП, Робонен ЕВ* (2017) Влияние обогащенного L-аргинином хвойного экстракта на биохимические показатели крови щенков-гипотрофиков норки. Кроликовод зверовод 3: 104–105. [*Unzhakov AR, Antonova EP, Sergina SN, Baishnikova IV, Chernobrovkina NP, Robonen EV* (2017) Effect of L-arginine-enriched coniferous extract on biochemical parameters of blood of hypotrophic mink puppies. Krolikovod zverovod 3: 104–105. (In Russ)].
35. *Окулова ИИ, Беспятых ОЮ, Домский ИА, Березина ЮА, Бельтюкова ЗН, Кошурникова МА* (2019) Биохимические показатели крови у норки под действием биопрепаратов. Учен запис Казан гос акад ветерин мед им НЭ Баумана: 185–189. [*Okulova II, Bespyatykh OYu, Domskiy IA, Berezina YuA, Bel'tyukova ZN, Koshurnikova MA* (2019) Biochemical blood parameters in minks under the influence of biopreparations. Uchon zapis Kazan gos akadem veterin med im NE Bauman: 185–189. (In Russ)].

36. Сухинин АА, Гумберидзе ММ (2022) Биохимическая картина крови больных алеутской болезнью норок под действием аллоферона. Междунар вестн ветерин 4(42): 42–47. [Sukhinin AA, Gumberidze MM (2022) Biochemical picture of blood of minks sick with Aleutian disease under the influence of alloferon. Mezhdunar vestn veterinar 4(42): 42–47. (In Russ)]. <https://doi.org/10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.42>
37. Перельдик ДН, Губский ВВ, Куликов НЕ (1980) Биохимические показатели крови норок. Кроликовод зверовод 4: 30–31. [Pereldik DN, Gubskiy VV, Kulikov NE (1980) Biochemical indices of mink blood. Krolikovod zverovod 4: 30–31. (In Russ)].
38. Тютюнник НН, Кожевникова ЛК (1996) Биохимическое тестирование как способ оценки физиологического состояния пушных зверей, разводимых в промышленных комплексах. Сельскохозяйств биол 2: 39–49. [Tyutyunnik NN, Kozhevnikova LK (1996) Biochemical testing as a method for assessing the physiological state of fur animals bred in industrial complexes. Sel'skokhoz biol 2: 39–49. (In Russ)].
39. Берестов ВА, Тютюнник НН (1969) Уровень липидов, холестерина и липопротеидов в сыворотке крови пушных зверей. Учен запис Петрозавод гос универ 17(4): 21–29. [Berestov VA, Tyutyunnik NN (1969) Level of lipids, cholesterol and lipoproteins in the blood serum of fur animals. Uchon zapis Petrozavod gos univer 17(4): 21–29. (In Russ)].
40. Trapezov OV, Voitenko NN, Kulikov VA (2004) Have fur bearers become domesticated (behavioral and brain biochemistry aspects). Notes Group Edit 1: 24–32.
41. Ковалёнок ЮК (2019) Взятие крови у животных: учебно-методическое пособие для студентов высшего образования, обучающихся по специальностям 1-74 03 02. Ветерин мед. ВГАВМ. Витебск. [Kovalonok YuK (2019) Taking blood from animals: a teaching aid for students of higher education studying in specialties 1-74 03 02. Veterin med. VGAVM. Vitebsk. (In Russ)].
42. Чащухин ВА (2009) Норка американская. Товарищ научн издан. КМК. Москва. [Chashchukhin VA (2009) American mink. Tovarithsch nauchn izdan. KMK. Moskva. (In Russ)].
43. Батоев ЦЖ, Санжиева СЕ, Бердников ПП, Мантатова НВ (2013) Экологическое значение сезонной изменчивости биохимических показателей крови американских норок и серебристо-черных лисц. Вестн Бурятск гос универ. Биология. География 4: 179–184. [Batoyev TsZh, Sanzhiyeva SE, Berdnikov PP, Mantatova NV (2013) Ecological significance of seasonal variability of biochemical parameters of blood of American minks and silver-black foxes. Vestn Buryatsk gos univer. Biologiya. Geografiya 4: 179–184. (In Russ)].
44. Петрова ГГ (1971) Возрастная и сезонная динамика гематологических показателей норок *Mustela vison* Busson с различной окраской меха. Автореф дис канд биол наук. Петрозаводск. [Petrova GG (1971) Age and seasonal dynamics of hematological parameters of minks *Mustela vison* Busson with different fur colors. Abstract of Cand Biol Sci Dissert Petrozavodsk. (In Russ)].
45. Lasota B, Maslowska A, Felska-Blaszczyk L, Seremak B, Dziadosz M, Mandziak B (2014) Blood biochemical parameters in Male American Mink (*Neovison vison*) before and During the Breeding Season. Pakistan Veterin J 34(2): 197–200.
46. Перельдик НШ, Титова МИ (1950) Экспериментальное обоснование норм кормления племенных норок. Каракулевод зверовод 2: 29–35. [Pereldik NSh, Titova MI (1950) Experimental substantiation of feeding standards for breeding minks. Karakulevod zverovod 2: 29–35. (In Russ)].
47. Сегаль АН (1975) Очерки экологии и физиологии американской норки. Наука. Новосибирск. [Segal AN (1975) Essays on the ecology and physiology of the American mink. Nauka. Novosibirsk. (In Russ)].
48. Абрамов МД (1974) Норководство. Москва. [Abramov MD (1974) Mink breeding. Moskva. (In Russ)].
49. Санников МИ, Казановский СА, Анфигенова ТА (1973) Ферментативная активность крови у помесных и чистопородных животных с различной энергией роста. Докл ВАСХНИЛ 1: 34–37. [Sannikov MI, Kazanovskiy SA, Anfigenova TA (1973) Enzymatic activity of blood in crossbred and purebred animals with different growth energy. Dokl VASKHNIL 1: 34–37. (In Russ)].
50. Heidler W, Lindemann E (1973) Untersuchungen uber die Beziehungen zwischen den wiederholtbestimmten Transaminasenaktivitaten des Blutserums und den Mastund Schlachtleistungen bei Jungbullen. Arch Tierzucht 16(6): 479–487.
51. Zoran DL (2002) The carnivore connection to nutrition in cats. J Am Veterin Med Associat 221(11): 1559–1567. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.1559>

52. Zierler K (1999) Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol* 276(3): 409–426.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.3.E409>
53. Генес СГ (1970) Гипогликемия, гипогликемический симптокомплекс. Москва. [Genes SG (1970) Hypoglycemia, hypoglycemic symptom complex. Moskva. (In Russ)].
54. Gailliot MT, Baumeister RF (2007) The physiology of willpower: Linking blood glucose to self-control. *Personal Soc Psychol Rev* 11(4): 303–327.
<https://doi.org/10.1177/1088868307303030>
55. Bushman BJ, Dewall CN, Pond RS, Hanus MD (2014) Low glucose relates to greater aggression in married couples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(17): 6254–6257.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1400619111>
56. Ленинджер А (1976) Биохимия. Москва. [Lehninger A (1976) Biochemistry. Moskva. (In Russ)].
57. Wroblewski F (1957) The clinical significance of alterations in lactic dehydrogenase activity of body fluids. *Am J Med Sci* 234(3): 301–312.
58. Соколов ЕА (1949) Сезонные изменения в основном в гистологической структуре щитовидной и половой желез у енотовидной собаки. Труды Московск пушно-мехов инст 2: 28–50. [Sokolov EA (1949) Seasonal changes mainly in the histological structure of the thyroid and sex glands in the raccoon dog. Trudy Moskovsk pushno-mekh inst 2: 28–50. (In Russ)].
59. Назаренко ЭА, Сергеева ТА, Солдаткин АП (2009) Креатинин и методы его определения. *Biotechnol Acta* 2(1): 107–111. [Nazarenko EA, Sergeyeva TA, Soldatkin AP (2009) Creatinine and methods for its determination. *Biotechnol Acta* 2(1): 107–115. (In Russ)].
60. Hessels L, Koopmans N, Gomes Neto AW, Volbeda M, Koeze J, Lansink-Hartgring AO (2018) Urinary creatinine excretion is related to short-term and long-term mortality in critically ill patients. *IntensivCare Med* 44: 1699–1701.
<https://doi.org/10.1007/s00134-018-5359-6>
61. Heymsfield SB, Arteaga C, McManus C, Smith J, Moffitt S (1983) Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am J Clin Nutr* 37(3): 478–494.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/37.3.478>
62. Spencer K (1986) Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Ann Clin Biochem* 23(1): 1–25.
<https://doi.org/10.1177/000456328602300101>
63. Perrone RD, Madias NE, Levey AS (1992) Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 38(10): 1933–1953.
64. Arazi H, Rahmanina F, Hosseini K, Asadi A (2015) Effects of short-term creatine supplementation and resistance exercises on resting hormonal and cardiovascular responses. *Science and Sports* 30(2): 105–109.
<https://doi.org/10.1016/j.scispo.2014.03.006>
65. Brandt A (1989) Hematology and clinical chemistry of fur animals. *Lipids – A current Treatias*. Finland.
66. Kaplan JR, Manuch SB, Shively C (1991) The effects of fat and cholesterol on social behavior in monkeys. *Psychosomat Med* 53: 634–642.
<https://doi.org/10.1097/00006842-199111000-00005>
67. Brown S (1996) Lowered serum cholesterol and low mood. *BMJ* 313: 637–638.
<https://doi.org/0.1136/bmj.313.7058.637>
68. Wardle J, Armitage J, Collins R, Wallendszus K, Keech A, Lawson A (1996) Randomised placebo controlled trial of effect on mood of lowering cholesterol concentration. *BMJ* 313: 75–78.
<https://doi.org/10.1136/bmj.313.7049.75>
69. Kuznetsov YuE, Lunegov AM, Ponamarev VS, Romashova EB (2024) Serum total bile acids correlate with blood biochemical parameters in minks (*Mustela vison* Schreber, 1777) under fatty liver degeneration and toxic hepatitis. *Agricult Biol* 59(2): 375–384.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2024.2.375eng>

**Biochemical Indicators of Blood Serum of Male American Minks (*Neogale Vison*)
Involved in Selection for Tame and Aggressive Behavior**

E. V. Panova^{a,*}, S. N. Kalinina^a, O. V. Trapezzov^b, and V. A. Ilyukha^c

^a*Institute of Biology, Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russia*

^b*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^c*Institute of Biology of Inland Waters named after I.D. Papanin of the Russian Academy of Sciences,
Borok settlement, Yaroslavl region, Russia*

^{*}*e-mail: panova550@gmail.com*

Artificial selection of animals aimed at strengthening or weakening the defensive reaction to humans affects the variability of the functional state of regulatory systems, physiological functions of the body and the seasonality of biological cycles of reproduction and metabolism. The model object in the study of the influence of selection on the physiological functions of mammals is the seasonally breeding predator of the Mustelidae family, the American mink *Neogale vison*. In the course of many years of selection for a defensive reaction to humans, two lines of mink with pronounced aggressive and tame types of behavior, not typical for animals of industrial populations, were created over 27 generations. Studies of the biochemical picture of the blood serum of mammals to assess the state of metabolic processes in the body, under conditions of selection for behavior, have not been previously conducted. The aim of the work is to analyze the biochemical parameters of the blood serum of tame and aggressive American mink of cage breeding in the summer and autumn periods of the year. It is shown that both the season of the year and the type of animal behavior affect the biochemical parameters of the blood. Thus, the content of total protein, bilirubin, glucose and uric acid were higher, and the activity of alkaline phosphatase (ALP) was lower in the blood serum of animals in the autumn period compared to the summer, regardless of the type of behavior. In addition, aggressive animals had higher amylase activity, triglyceride levels, but lower lipase activity in the autumn compared to the summer period. In tame mink, the activity of aspartate aminotransferase (AST) and cholesterol levels were higher in the autumn period compared to the summer. Aggressive animals, compared to tame ones, were characterized by higher levels of albumin, glucose and cholesterol, as well as the activity of AST, lactate dehydrogenase (LDH), lipase in the summer and higher levels of glucose and LDH, but lower levels of urea and ALP in the fall. Thus, in the course of many years of selection of American mink for behavior, metabolic rates change while seasonal fluctuations in individual biochemical parameters of the blood are maintained, which reflects the evolutionary adaptive feature of mink to cyclic changes in environmental conditions.

Keywords: American mink, selection by behavior, blood biochemistry, domestication

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ –
РЕГУЛЯТОРЫ НЕЙРОГЛИОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА, ПРИ ОБУЧЕНИИ
В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА: ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ СТРЕССА
И ФОРМИРОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС ВИСТАР**

© 2025 г. А. М. Ратмиров¹, М. А. Грудень¹, З. И. Сторожева^{1,*}

¹Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских
и фармацевтических технологий, Москва, Россия

*E-mail: storozheva_zi@academpharm.ru

Поступила в редакцию 10.02.2024 г.

После доработки 12.05.2025 г.

Принята к публикации 24.05.2025 г.

Образование новых, а также модификация работы ранее существовавших нейронных сетей и синаптических контактов, лежащие в основе обучения и памяти, в значительной степени зависят от транскрипционной активности генов, вовлеченных в регуляцию сопряженных процессов нейроглиогенеза и апоптоза. При этом выявление изменений работы генома, специфичных для когнитивных функций, требует одновременной оценки влияния стрессирующих факторов как неотъемлемого компонента всех моделей обучения лабораторных животных. Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ экспрессии генов регуляторов нейроглиогенеза (*S100A6*, *Ascl1*), а также апоптоза (*Apaf1*, *Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) у животных, обученных пространственному навыку в водном лабиринте Морриса и подвергнутых принудительному плаванию в соответствии с режимом обучения. Эксперименты проведены на молодых половозрелых самцах крыс Вистар, распределенных по следующим группам: Обучение (с формированием навыка поиска скрытой платформы в водном лабиринте в течение 4 дней), Контроль (плавание в лабиринте без платформы в течение 4 дней) и Интактные (пребывание в домашних клетках). В образцах ткани гиппокампа, фронтальной коры и мозжечка, выделенных сразу после окончания экспериментов в лабиринте, определяли экспрессию целевых генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Было обнаружено, что когнитивная активность снижает экспрессию проапоптотических генов, возрастающую в условиях стрессового воздействия, и, напротив, стимулирует активность генов, регулирующих нейроглиогенез и синаптогенез в структурах, релевантных для различных стадий формирования следа памяти. Полученные результаты наряду с теоретическим вкладом представляют интерес для определения мишеней направленной терапии когнитивных нарушений.

Ключевые слова: пространственная память, стресс, экспрессия генов, апоптоз, нейроглиогенез

DOI: 10.7868/S2658655X25070081, **EDN:** MVRQWS

ВВЕДЕНИЕ

Формирование индивидуального опыта и адаптивных форм поведения на разных этапах жизненного цикла организма связано с образованием и модификацией работы нейронных сетей, обеспечивающих клеточные механизмы долговременной памяти, включая генерацию и селекцию новых нейронов, а также формирование, элиминацию и изменение эффективности синаптических контактов [1, 2]. Исследование молекулярно-генетических механизмов этих процессов, в частности выявление роли отдельных генов, является одним из важнейших направлений современной нейробиологии. Сопряженные механизмы нейроглиогенеза и апоптоза, обеспечивающие формирование нервной системы на стадии эмбрионального развития, играют также существенную роль в механизмах нейропластичности на ранних этапах постнатального онтогенеза [3, 4]. С возрастом у млекопитающих наблюдается снижение интенсивности нейроглиогенеза, и в зрелом мозге в стандартном режиме условной нормы эти процессы наблюдаются в нескольких специализированных отделах, таких как субвентрикулярная зона, субгранулярная зона зубчатой фассии гиппокампа, а также, предположительно, гипоталамус [5, 6].

В последнее время появляются данные о нейрогенезе в других областях зрелого мозга млекопитающих, в частности в коре больших полушарий и стриатуме, однако многие исследователи считают, что новые глиальные и нейрональные клетки попадают в эти отделы из нейрогенных ниш через роstralную систему миграции, и этот вопрос остается пока открытым [6, 7].

Функциональная роль вновь образованных клеток в зрелом мозге является предметом активного изучения. Выдвинута гипотеза, что взаимодействие зрелых и вновь образованных гранулярных нейронов в зубчатой фассии гиппокампа обеспечивает процессы разделения и интеграции паттернов при кодировании данных, передаваемых в кору больших полушарий [8]. Также сформулировано предположение об участии астроцитов в организации сетевых пространств и формировании доменов (информационных файлов) [9, 10].

При различных патологических условиях могут наблюдаться разнонаправленные изменения интенсивности нейрогенеза в зрелом мозге. Так, при черепно-мозговых травмах, ишемических повреждениях, нейродегенеративных процессах, вызывающих массовую гибель нейронов, можно наблюдать его активацию [11], в то время как при нарушениях метаболизма, воспалении и воздействии хронического стресса наблюдается подавление процесса. Физические упражнения и обогащенная среда стимулируют нейрогенные механизмы, способствуя их восстановлению после патологических нарушений, например хронического стресса [12, 13].

Многие белки-морфогены, выступающие в эмбриональном и раннем постнатальном развитии индукторами и регуляторами нейроглиогенеза, в зрелых нейронных сетях участвуют в модуляции синаптической передачи [14, 15]. Значительное число таких морфогенов являются транскрипционными факторами, и в число их мишеней входят гены, влияющие на синаптическую пластичность. В связи с этим могут наблюдаться многочисленные связи между динамикой их активности и особенностями адаптивного поведения, изучение которых требует системного подхода.

Одним из ключевых регуляторов нейроглиогенеза является транскрипционный фактор *Ascl1* (*Achaete-scute complex homolog1*), участвующий в первичных стадиях трансформации клеток-предшественников и способствующий последовательной пролиферации и дифференцировке [16]. Ген *Ascl1* экспрессируется в нейрогенных зонах зрелого мозга, а среди мишеней самого фактора представлены гены, регулирующие синтез и высвобождение медиаторов, а также передачу нервного импульса [17]. Среди белков, не являющихся транскрипционными факторами, но регулирующих поддержание пролиферативной активности, значительный интерес представляет

Ca^{2+} - и Zn^{2+} -связывающий белок *S100A6*, экспрессирующийся в нейрональных и глиальных предшественниках [18, 19]. Внутри клетки *S100A6* оказывает влияние на активность циклинов, кроме того, его лигандами являются белки, от которых зависит структура цитоскелета и проницаемость мембраны, а также ряд протеинов, обладающих шаперонной активностью. *S100A6* также секретируется в межклеточное пространство и оказывает аутокринное и паракринное действие через рецепторы RAGE, модулирующие активность ряда сигнальных систем [20].

Апоптоз (программируемая клеточная гибель) является одним из основных механизмов селекции функционально активных клеток мозга на всех этапах жизненного цикла. В зрелом мозге в норме активность апоптотических процессов максимальна в тех же зонах, где наблюдается нейрогенез. Показано, что многие ключевые регуляторы апоптотических процессов, в частности *Apaf1*, *Bax* (проапоптотический член семейства *Bcl*), эффекторная каспаза *Casp3*, вовлечены также в генерацию и селекцию синаптических контактов и в механизмы таких форм синаптической пластичности, как долговременная потенция и долговременная депрессия [21–23]. Наблюдаемая в течение жизненного цикла динамика экспрессии “проапоптотических” генов и одновременное изменение эпигенетических механизмов ее регуляции [24], предположительно, могут отражать системные изменения в молекулярных механизмах формирования нейронных сетей, происходящие при созревании и старении. Таким образом, изучение изменений экспрессии генов, регуляторов апоптоза и нейроглиогенеза при когнитивной активности необходимо как для понимания принципов работы нервной системы, так и для выявления потенциальных мишеней терапии нарушений внимания, обучения и памяти. Следует отметить, что проведение таких исследований предъявляет особые требования к валидности контрольных групп, поскольку активность целевых генов существенно изменяется при стрессовых воздействиях, являющихся компонентом любой модели обучения. Для исследования гиппокамповозависимой памяти широко используется модель водного лабиринта Морриса. Однако лишь в единичных работах проводился сравнительный анализ влияния стресса, вызванного принудительным плаванием животных в стохастическом режиме, и формирования пространственной памяти с возможностью избегания опасности. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что обучение в лабиринте Морриса вызывает сильный стресс, к которому, однако, с течением времени происходит привыкание. При этом различия в уровне экспрессии генов кортикотропин-рилизинг-гормона и его рецептора между обученными крысами и животными, подвергнутыми принудительному плаванию, были незначительными [25].

В другом исследовании, включавшем контроль на принудительное плавание, не было выявлено существенных различий между контрольными и обучавшимися крысами в уровне экспрессии немедленных ранних генов *c-Fos*, *Egr-1*, *Arc* [26]. Авторы высказывают предположение, что специфичные изменения экспрессии генов могут быть выявлены при анализе генов второй и последующих “волн”.

Ранее при изучении генов *Ascl1*, *S100A6* и *Casp3* в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке нами были показаны различия в характере влияния обучения и стресса принудительного плавания в лабиринте Морриса на уровень экспрессии этих генов, а также на профиль корреляций между показателями экспрессии в различных структурах [27]. На основании этих данных была выдвинута гипотеза о том, что стрессирующее воздействие в виде принудительного плавания повышает уровень экспрессии генов, кодирующих белки – регуляторы апоптоза, а специфичными изменениями, связанными с формированием пространственной памяти, являются снижение их экспрессии и повышение экспрессии генов, кодирующих стимуляторы нейро- и синаптогенеза.

Для проверки этой гипотезы в настоящем исследовании была поставлена цель провести сравнительную оценку влияния обучения и стресса на экспрессию более широкого, чем ранее, набора генов, включающего наряду с *Ascl1*, *S100A6* и *Casp3* гены *Bax*, *Apaf1* и *Bcl2*. В исследовании также использован обновленный протокол обучения

с повышением временных лимитов поиска платформы и числа проб в сеансах обучения. Это позволило несколько увеличить время принудительного плавания у животных группы активного контроля, что создает дополнительные возможности для дифференциации эффектов стресса и обучения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на взрослых крысах-самцах линии Вистар, полученных из питомника “Столбовая” Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” России, массой 220 ± 20 г ($n = 36$). Животные содержались по 4–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12 / 12 ч при свободном доступе к корму и воде. Крыс случайным образом распределяли по трем экспериментальным группам: группа 1 – Интактные крысы ($n = 12$), группа 2 – Контроль ($n = 12$), 3-я группа – Обучение крысы, обучавшиеся в водном лабиринте ($n = 12$). Эксперименты выполнены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур) и ГОСТ 33216-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами).

Обучение в водном лабиринте

Водный лабиринт Морриса представлял собой круглый бассейн серого цвета диаметром 180 см, наполненный водой, имеющей температуру 21 °С, на высоту 40 см. Бассейн располагался в центре комнаты с большим количеством обстановочных стимулов [28]. В центре одного из квадрантов находилась скрытая под водой на глубине 2.0 см прозрачная круглая платформа диаметром 15 см. Животных погружали в воду в случайно расположенных точках возле стенки бассейна, время свободного поиска платформы составляло 120 с, а крыс, не нашедших платформу за это время, мягко направляли к ней. Время пребывания на платформе составляло 30 с, после чего животное помещали в отдельную клетку на 90 с. Обучение проводили в течение 4 дней по 5 проб в каждый из дней. С помощью программы Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия) фиксировали время достижения платформы и пройденную дистанцию.

Животных из группы Контроля заставляли плавать в отсутствие платформы ежедневно в течение 4 дней (5 попыток в день). Протокол эксперимента был разработан таким образом, что временной профиль периодов принудительного плавания каждого животного из группы Контроля соответствовал таковому для одного, случайным образом поставленного ему в соответствие животного из группы Обучения, а интервал между пробами составлял 120 с.

Определение экспрессии генов

Через 24 ч после окончания поведенческих экспериментов животных каждой группы декапитировали, извлекали мозг и выделяли на холоде образцы церебральных структур: гиппокампа (координаты AP, от -2.0 до -7.0 ; L, ± 4.0 ; DV, от 1.8 до 4.0), фронтальной коры (ФК, координаты AP, от $+2.5$ до $+5.0$; L, 0 ± 4.0 ; DV, от 1.8 до 4.0) и мозжечка (координаты AP, от -9.0 до -15.0 ; L, ± 5.0 ; DV, от 1.1 до 7.0). Образцы сразу после выделения замораживали в жидком азоте. Для определения координат при выделении структур мозга использовали атлас мозга крыс [29].

Из выделенных структур мозга всех животных экстрагировали общую фракцию РНК с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом

производителя, применяя гомогенизатор DIAХ 100 (Heidolph, Германия), режим: 5000 об/мин в течение 15 с. Полученные препараты РНК очищали от примесей геномной ДНК, обрабатывая ферментом ДНКазой I в течение 30 мин при 37 °С в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ MgSO₄, 1 мМ СаСl₂), а затем добавляли стоп-раствор (2 мМ этиленгликоль-тетрауксусная кислота, рН 8.0) и прогревали 10 мин при 65 °С (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, США). Концентрацию выделенной РНК определяли на флуориметре Qubit с применением Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Для проведения обратной транскрипции 0.5 мкг выделенных образцов тотальной РНК из церебральных структур инкубировали с 2 мкл олиго-(dT)15 (10 мкМ) и 1 мкл (1 е.а./мкл) ингибитора РНКаз RiboCare (Promega, США) в течение 2 мин при +70 °С, после чего сразу помещали на лед. При этом 1 е.а. – это количество ингибитора РНКаз RiboCare, которое соответствует таковому в мкг и инактивирует 5 нг РНКазы А на 50%.

Обратную транскрипцию проводили в объеме 30 мкл в среде, содержащей (мМ) 10 Трис-НСl (рН 8.3), 25 KCl, 0.6 MgCl₂, 2 дитиотреитол, с добавлением 200 единиц ревертазы М-MLV (Promega, США) и 4 мкл dNTP (10 мМ) и последующей инкубацией в течение 1 ч 45 мин при 37 °С. Фермент затем инактивировали нагреванием до 95 °С в течение 5 мин. Полученную кДНК разводили деионизированной водой в 10 раз и хранили при –80 °С. В качестве отрицательного контроля вместо РНК использовали деионизированную воду.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили в объеме 25 мкл с использованием 1 мкл разведенной кДНК, 0.2 мкМ готовой смеси праймеров (SABiosciences, США) и готовой смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия), однократный состав которой включал интеркалирующий краситель SYBR Green I, Taq-полимеразу с горячим стартом, 3 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ каждого нуклеотидтрифосфата. Были использованы праймеры (“Евроген”, Россия), структуры которых приведены в табл. 1.

Использовали детектирующий амплификатор ДТпрайм (“ДНК-Технологии”, Россия). Программа амплификации: 94 °С – 1.5 мин; 50 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с, отжиг праймеров при 64 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 30 с. Специфичность ПЦР-продуктов подтверждали проведением электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, окрашенном этидиумом бромидом; использовали маркер длин ДНК GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). В качестве референсного использовали ген β-актина для последующего расчета относительного уровня экспрессии изучаемых генов по методу 2^{-ΔCt} [30]. Затем показатели экспрессии в группах Обучения и Контроля нормировали по отношению к показателям Интактной группы, средние значения которых принимали за единицу.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени

Ген	Праймер	
	Прямой	Обратный
<i>ASCL1</i>	CTTCGCAGTCCCCTTCCTT	TCTCCTGCCATCCTGCTTCCAA
<i>S100A6</i>	TCATTGTCTGACGTGTGCTTCTAGC	ATCAAAGCCAAGGCCCCCAG
<i>Apa1</i>	GGCAAGTCCATCGAGGTGAT	CGAGCATGAGCCAAGCCT
<i>Bcl2</i>	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
<i>Bax</i>	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA
<i>Casp3</i>	CGAGCTTGGAACGCGAAGA	CCAGTGCTCACAAGGTGGGT

Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США). С учетом размеров выборок и характера их распределения для анализа применяли следующие непараметрические методы: дисперсионный анализ с повторными измерениями Фридмана (Friedman ANOVA) при оценке динамики обучения в водном лабиринте группы Контроля и дисперсионный анализ Краскелла – Уоллиса с последующими парными сравнениями методом Манна – Уитни при сравнении показателей экспрессии генов. Тест Манна – Уитни применяли, кроме того, при сравнении пройденной дистанции и скорости плавания животных групп Контроля и Обучения. Вычисляли также ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика выполнения пространственного навыка в ходе обучения

Анализ показателей времени и пройденной дистанции до достижения скрытой платформы в группе Обучения с использованием непараметрического теста для зависимых переменных Friedman ANOVA показал, что значения этих параметров статистически значимо снижались в течение 4 дней обучения ($\text{Chi Sqr. } (N = 12, \text{df} = 3) > 28.10, p < 0.001$) (рис. 1a, b). Животные группы Контроля и Обучения не различались по средней скорости плавания ($11.8 \pm 1.4 \text{ см/с}$ и $12.6 \pm 0.9 \text{ см/с}$ соответственно, $Z = 1.01, p = 0.31$). Также ни в один из дней не было обнаружено различий между группами по показателю пройденной дистанции ($Z < 0.68, p > 0.69$, рис. 1b).

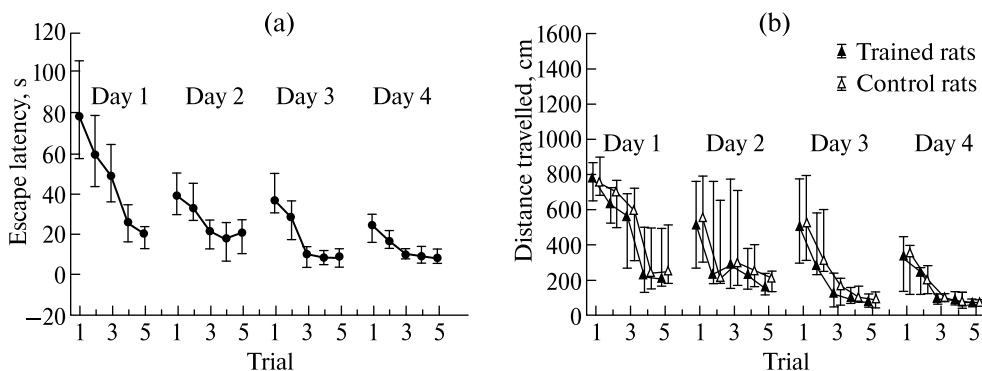


Рис. 1. (a) – Показатели времени достижения скрытой платформы в лабиринте Морриса у крыс из группы Обучения (и соответственно времени принудительного плавания в группе Контроля). (b) – Показатели дистанции до скрытой платформы в лабиринте Морриса у крыс из групп Обучения и Контроля. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

Показатели экспрессии исследованных генов в гиппокампе животных разных групп

Тест Краскелла – Уоллиса выявил статистически значимые межгрупповые различия экспрессии всех исследованных генов, за исключением экспрессии гена *S100A6* в гиппокампе (табл. 2).

Таблица 2. Результаты анализа межгрупповых различий экспрессии исследованных генов с использованием теста Краскелла – Уоллиса

Ген	Структура		
	Гиппокамп	Фронтальная кора	Мозжечок
<i>Apafl</i>	H (2, N = 36) = 21.1, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 16.4, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 20.1, $p < 0.001$
<i>Bax</i>	H (2, N = 36) = 21.4, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 10.2, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 21.9, $p < 0.001$
<i>Bcl2</i>	H (2, N = 36) = 25.7, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 19.3, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 25.7, $p < 0.001$
<i>Casp3</i>	H (2, N = 36) = 7.1, $p = 0.046$	H (2, N = 36) = 13.5, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 11.2, $p < 0.01$
<i>Sl00A6</i>	H (2, N = 36) = 4.1, $p = 0.329$	H (2, N = 36) = 11.9, $p < 0.01$	H (2, N = 36) = 11.1, $p < 0.01$
<i>Ascl1</i>	H (2, N = 36) = 22.2, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 17.6, $p < 0.001$	H (2, N = 36) = 17.7, $p < 0.001$

Анализ попарных различий между группами проводили с помощью теста Манна – Уитни. В гиппокампе экспрессия гена *Apafl* повышалась у животных группы Контроля по сравнению с Интактной группой ($Z = 2.88, p = 0.002$). У обученных животных этот показатель не демонстрировал отличий от уровня интактных крыс ($Z = 1.12, p = 0.31$) и был существенно ниже, чем в Контроле ($Z = 2.74, p = 0.006$), (рис. 2а). Сходный с *Apafl* профиль экспрессии в гиппокампе был выявлен для генов *Bax* (рис. 2б) и *Bcl2* (рис. 2с). Повышение этих показателей относительно Интактной группы наблюдалось только в группе Контроля ($Z = 2.90, p = 0.004$ и $Z = 3.02, p = 0.002$ соответственно), но не Обучения ($Z = 1.33, p = 0.29$ и $Z = 0.16, p = 0.94$ соответственно), при этом у обученных крыс они были статистически значимо ниже, чем в Контроле ($Z = 2.90, p = 0.004$ и $Z = 2.88, p = 0.004$ соответственно).

Экспрессия гена *Casp3* в гиппокампе была повышена по сравнению с интактными животными как у контрольных ($Z = 2.88, p = 0.004$), так и у обученных крыс ($Z = 2.40, p = 0.016$), однако в группе Обучения этот показатель был существенно ($Z = 2.56, p = 0.010$) ниже, чем в Контроле (рис. 2д). Межгрупповых различий в уровне экспрессии *Sl00A6* в гиппокампе выявлено не было ($Z < 0.64, p > 0.52$), (рис. 2е).

Экспрессия гена *Ascl1* в гиппокампе была статистически значимо выше интактного уровня (рис. 2ф) как в группе Контроля ($Z = 2.56, p = 0.010$), так и в группе Обучения ($Z = 2.90, p = 0.004$). При этом обученные животные демонстрировали повышенный уровень активности гена в сравнении с контрольными ($Z = 2.18, p = 0.038$).

Показатели экспрессии исследованных генов во фронтальной коре животных разных групп

Во ФК экспрессия гена *Apafl* повышалась у контрольных животных (рис. 3а) по сравнению с Интактной ($Z = 1.86, p = 0.063$), при этом у обученных животных ее уровень не демонстрировал отличий от уровня интактных крыс ($Z = 1.12, p = 0.31$) и был существенно ниже, чем в Контроле ($Z = 2.29, p = 0.022$).

Экспрессия гена *Bax* во ФК контрольных животных была существенно ($Z = 2.65, p = 0.008$) выше, чем у интактных (рис. 3б); у обученных животных ее уровень не демонстрировал отличий от такового у интактных крыс ($Z = 0.85, p = 0.39$) и на уровне тенденции ($Z = 1.86, p = 0.063$) был ниже, чем в Контроле.

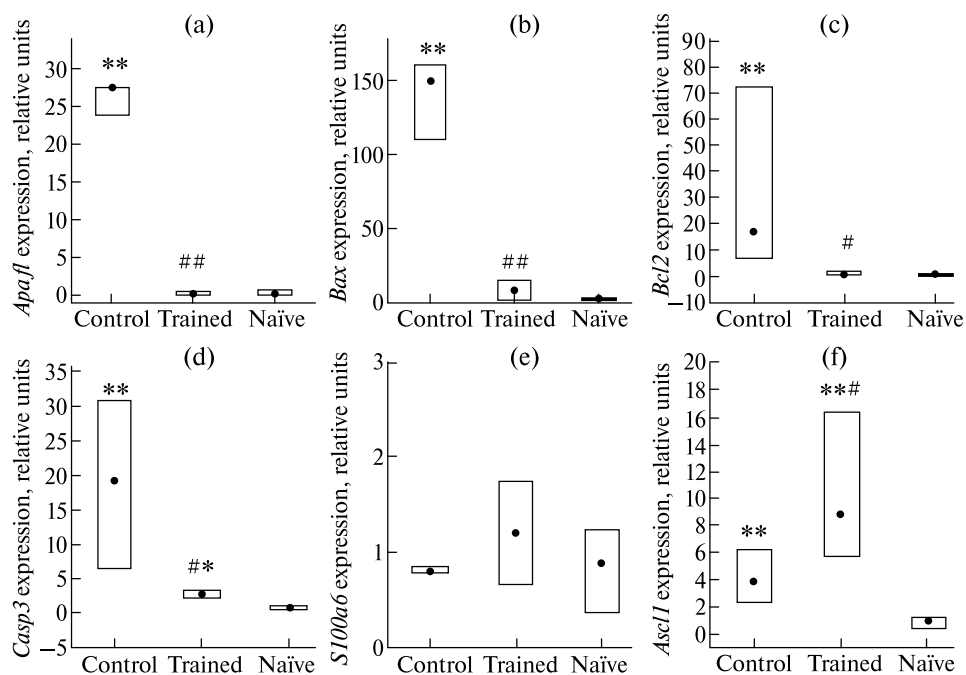


Рис. 2. Показатели экспрессии исследованных генов в гиппокампе животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* $-p < 0.05$, ** $-p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # $-p < 0.05$, ## $-p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

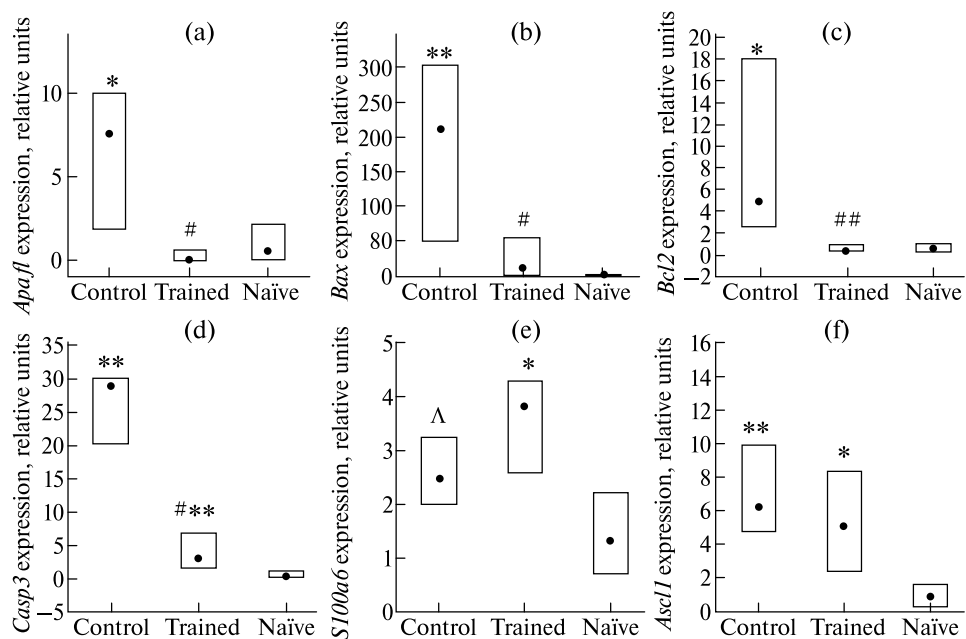


Рис. 3. Показатели экспрессии исследованных генов во фронтальной коре животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* $-p < 0.05$, ** $-p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # $-p < 0.05$, ## $-p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

Профиль межгрупповых различий в экспрессии *Bcl2* во ФК был сходным с таковым для *Apafl*: наблюдалось существенное возрастание ее в Контроле ($Z = 2.37, p = 0.018$), отсутствие различий между обученными и интактными животными и снижение по сравнению с Контролем у обученных крыс ($Z = 2.88, p = 0.004$), (рис. 3с).

Как и в гиппокампе, экспрессия *Casp3* во ФК была повышена по сравнению с интактными животными и у контрольных ($Z = 3.00, p = 0.003$), и у обученных крыс ($Z = 2.10, p = 0.043$), однако в группе Обучения этот показатель был существенно ($Z = 2.88, p = 0.004$) ниже, чем в Контроле (рис. 3д).

Экспрессия *S100A6* во ФК у контрольных крыс демонстрировала тенденцию к повышению относительно уровня Интактной группы ($Z = 1.70, p = 0.08$). У обученных животных такое повышение было статистически значимо ($Z = 2.27, p = 0.02$), (рис. 3е), при этом отличий от Контрольной группы выявлено не было.

Экспрессия гена *Ascl1* во ФК была статистически значимо выше интактного уровня (рис. 3ф) в группе Контроля ($Z = 2.64, p = 0.008$) и в группе Обучения ($Z = 2.34, p = 0.019$). При этом различий между контрольными и обученными крысами выявлено не было ($Z = 0.85, p = 0.39$).

Показатели экспрессии исследованных генов в мозжечке животных разных групп

В мозжечке экспрессия *Apafl* была повышена у животных Контрольной группы относительно интактных животных ($Z = 2.84, p = 0.004$) и снижена у обученных крыс по сравнению с интактными ($Z = 2.19, p = 0.028$) и с контрольными ($Z = 2.88, p = 0.002$) животными (рис. 4а). По сравнению с Интактной группой экспрессия *Vax* была повышена как у контрольных ($Z = 2.65, p = 0.008$), так и у обученных ($Z = 2.34, p = 0.019$) животных (рис. 4б), однако у обученных крыс этот показатель был ниже, чем в Контроле ($Z = 2.29, p = 0.022$). Экспрессия *Bcl2* в мозжечке была повышена у контрольных крыс ($Z = 2.69, p = 0.007$) по сравнению с интактными животными (рис. 4с), в то время как между интактными и обученными крысами различий не наблюдалось ($Z = 0.36, p = 0.43$). В группе Обучения экспрессия *Bcl2* была значимо ниже, чем в Контроле ($Z = 2.73, p = 0.004$).

Экспрессия гена *Casp3* не различалась у контрольных и интактных животных ($Z = 1.29, p = 0.2$), однако была снижена в мозжечке обученных крыс по сравнению с показателями Интактной ($Z = 2.88, p = 0.003$) и Контрольной ($Z = 2.00, p = 0.046$) групп (рис. 4д). Экспрессия гена *S100A6* была снижена у контрольных животных относительно показателей интактных крыс ($Z = 2.08, p = 0.038$), (рис. 4е). У обученных крыс этот показатель не отличался от уровня Интактной группы ($Z = 0.21, p = 0.83$) и был существенно ($Z = 2.57, p = 0.010$) выше, чем в группе Контроль. Экспрессия гена *ASCL1* в мозжечке у контрольных крыс не отличалась от уровня Интактной группы ($Z = 0.05, p = 0.99$), а у обученных крыс этот показатель был существенно выше ($Z > 2.13, p < 0.033$), чем у интактных особей и контрольных животных (рис. 4ф).

Профили корреляционных связей между исследованными показателями

Анализ профилей корреляционных связей между показателями экспрессии изученных генов показал, что у интактных животных во всех трех исследованных структурах наблюдаются корреляции экспрессии индукторов пролиферации и дифференцировки генов *Ascl1* и *S100A6* с активностью проапоптотических генов. В Контроле такие связи отсутствуют, при этом появляются положительные связи между экспрессией *Vax* и *Bcl2*, которых не было в Интактной группе.

У животных из группы Обучения была выявлена только положительная корреляция между показателями экспрессии *Ascl1* и *Casp3* в гиппокампе (рис. 5).

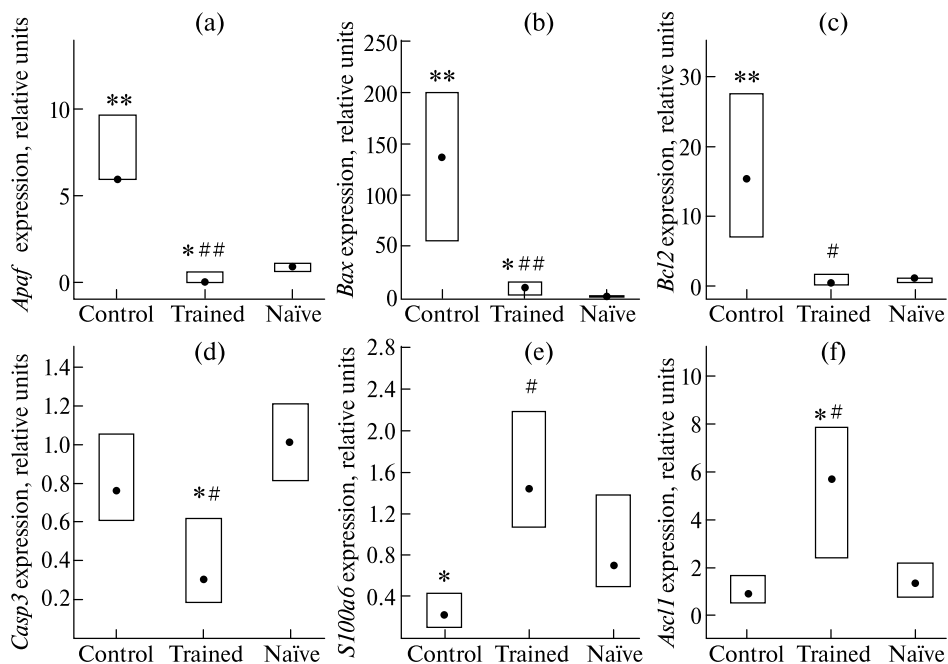


Рис. 4. Показатели экспрессии исследованных генов в мозжечке животных разных групп. Приведены значения медиан, верхних и нижних квартилей.

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с Интактной группой, # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

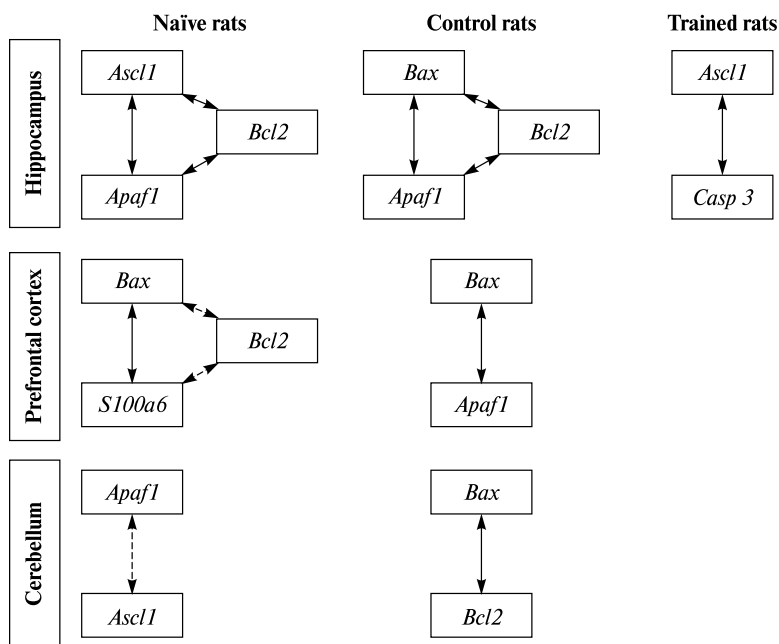


Рис. 5. Корреляционные связи экспрессии исследованных генов в структурах мозга у крыс различных групп. Приведены корреляции со значениями $R > 0.85$, $p < 0.01$.

↔ – положительные корреляции, прерывистые стрелки – отрицательные корреляции.

В группе Контроля была обнаружена негативная корреляция суммарного времени плавания с экспрессией *Sl00A6* ($R = -0.78$, $t = 2.84$, $p = 0.036$) и позитивная – с экспрессией *Apafl* ($R = 0.94$, $t = 5.56$, $p = 0.004$), *Bax* ($R = 0.93$, $t = 5.02$, $p = 0.005$), *Bcl2* ($R = 0.95$, $t = 5.0$, $p = 0.004$) в гиппокампе. Также у контрольных животных наблюдалась положительная корреляция времени плавания в 4-й день эксперимента и суммарного времени плавания за 4 дня с экспрессией *Casp3* ($R = 0.89$, $t = 4.43$, $p = 0.007$ и $R = 0.86$, $t = 3.72$, $p = 0.014$ соответственно) во ФК.

В группе Обучения выявлены отрицательные корреляции среднего времени достижения платформы в 3-й и в 4-й дни с экспрессией *Ascl1* в мозжечке ($R = -0.89$, $t = 3.81$, $p = 0.019$ и $R = -0.82$, $t = 2.96$, $p = 0.042$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленном исследовании проведен сравнительный анализ изменений экспрессии генов, кодирующих белки – регуляторы процессов нейроглиогенеза и апоптоза, в различных структурах мозга животных после формирования пространственной памяти в лабиринте Морриса и после стрессового воздействия в виде принудительного плавания, осуществленного по протоколу, соответствующему временному режиму поиска платформы у обучавшихся животных (табл. 3).

Таблица 3. Схематичное изображение изменений экспрессии в структурах мозга контрольных и обученных крыс

Гены	Гиппокамп			Фронтальная кора			Мозжечок		
	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль	Контроль/ Нативные	Обучение/ Нативные	Обучение/ Контроль
<i>Apafl</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↓	↓
<i>Bax</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↑	↓
<i>Bcl2</i>	↑	↔	↓	↑	↔	↓	↑	↔	↓
<i>Casp3</i>	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↔	↓	↓
<i>Sl00A6</i>	↔	↔	↔	↑	↑	↔	↓	↔	↑
<i>Ascl1</i>	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↔	↑	↑

Стрелка вверх – повышение; стрелка вниз – понижение; стрелка двусторонняя – горизонтальная – отсутствие отличий; стрелка прерывистая вниз – тенденция к снижению ($0.05 < p < 0.1$); стрелка прерывистая вверх ($0.05 < p < 0.1$) – тенденция к повышению.

Было обнаружено, что принудительное плавание без возможности избегания приводит к повышению экспрессии проапоптотических генов *Apafl*, *Bax* и *Casp3* в гиппокампе и фронтальной коре, а также *Apafl* и *Bax* в мозжечке. Существенно, что при этом во всех исследованных структурах наблюдается также повышение экспрессии гена *Bcl2*, продукт активности которого подавляет апоптоз.

Данные о повышении экспрессии гена *Casp3* в гиппокампе и фронтальной коре контрольных животных и выявленные корреляции ее с длительностью принудительного плавания в целом согласуются с полученными нами ранее результатами [27].

В литературе также имеются сведения о стимулирующем влиянии стресса на активность гена *Casp3* [31].

Возрастание экспрессии гена *Bax* в гиппокампе и коре П ФК мозга под влиянием хронических стрессовых воздействий было показано ранее [32], кроме того, обнаружено, что экспрессия гена *Bax* повышается в течение 4–7 дней после однократного стрессового воздействия, включающего иммобилизацию и принудительное плавание [33, 34]. Примечательно, что в этих работах также наблюдали повышение экспрессии гена *Bcl2*. В нашем исследовании положительные корреляции между экспрессией *Bcl2* и *Bax* наблюдались в гиппокампе и мозжечке контрольных (стрессированных) крыс, но не у интактных животных. Совокупность наших данных и сведений, имеющих в литературе, позволяет рассматривать повышение экспрессии *Bcl2* у контрольных животных как элемент компенсаторных механизмов в условиях индукции проапоптотических изменений под воздействием стресса [33, 34]. Подобное компенсаторное повышение также можно наблюдать при воздействии токсинов и при развитии нейродегенеративных процессов [35–37].

Повышение в мозге активности гена *Apafl*, одного из ключевых факторов апоптоза, в условиях эмоционального стресса и ассоциация его экспрессии с длительностью стрессирующего воздействия (принудительного плавания) показаны нами впервые.

Так же как и в исследовании, проведенном ранее [27], в данной работе обнаружено снижение экспрессии *Casp3* у обученных животных по сравнению с Контролем. Аналогичные различия между крысами, подвергнутыми принудительному плаванию, и животными со сформированным пространственным навыком наблюдались и при сравнении экспрессии генов *Apafl*, *Bax* и *Bcl2* во всех исследованных структурах. Эти результаты позволяют предположить, что процесс обучения с возможностью избегания угрожающей ситуации (получение подкрепления) снижает интенсивность проапоптотических процессов, вызванных ситуацией принудительного плавания. Согласно данным литературы, процедура обучения в водном лабиринте Морриса приводит к повышению уровня сывороточного кортикостерона, что свидетельствует о ее стрессогенном воздействии [38]. К сожалению, в литературе отсутствуют исследования, посвященные сравнительному анализу показателей стресса при обучении пространственному навыку в лабиринте Морриса и после принудительного плавания в сопоставимом временном режиме. Вместе с тем при использовании другой оригинальной модели пространственного обучения показано, что когнитивная активность повышает такой маркер эмоциональной устойчивости, как отношение дегидроэпиандростерон ДГЭА/кортикостерон в сыворотке крови крыс [39]. Показано также, что ДГЭА стимулирует нейрогенез в зрелом гиппокампе и повышает выживаемость новых клеток, в том числе в условиях повышенного уровня кортикостерона [40]. Можно предположить, что изменения соотношения кортикостероидов в мозге являются одним из механизмов наблюдаемых антиапоптотических эффектов когнитивной активности в стрессовых ситуациях, однако в целом этот феномен нуждается в дальнейших исследованиях на системном уровне.

Следует отметить, что экспрессия гена *Casp3* в гиппокампе и П ФК обученных крыс, хотя и была снижена по сравнению с контролем, однако статистически значимо превышала уровень, наблюдавшийся у интактных животных. Согласно данным литературы, каспаза-3 играет особую роль в таких механизмах синаптической пластичности, как селекция синапсов и регуляция количества синаптических везикул, что обусловлено особенностями в регуляции ее активности и локализации в нейронах [41]. Показано также вовлечение каскада Bad-Bax-Caspase3 в молекулярные механизмы формирования условного страха [42].

Существенно, что у обученных животных, в отличие от контрольных, не наблюдалось корреляций активности генов *Bax*, *Bcl2*, *Apafl* и *Casp3* с длительностью плавания. Эти различия являются дополнительным подтверждением антиапоптотического

влияния фактора обучения и негативного подкрепления (возможности избегания) на экспрессию генов в условиях умеренного стрессового воздействия.

Наблюдаемый после обучения и принудительного плавания профиль изменений экспрессии генов *S100A6* и *Ascl1*, продукты которых вовлечены в регуляцию нейроглиогенеза, существенно отличался от такового для генов, регулирующих апоптоз.

В частности, после принудительного плавания у животных контрольной группы не наблюдалось изменений экспрессии *S100A6* в гиппокампе и ПФК, а в мозжечке наблюдалось ее снижение по сравнению с Интактной группой животных. В то же время у обученных животных во ПФК и гиппокампе наблюдалась активация экспрессии гена *S100A6* относительно уровня контрольных крыс. В литературе имеются сведения об экспрессии гена *S100A6* стволовыми клетками – предшественниками нейронов и глии зрелого гиппокампа [18], а также стволовыми клетками субэпендимальной нейрогенной зоны [19], в том числе мигрирующими через ростральную систему миграции в обонятельную луковицу и, возможно, во ПФК [43]. Кроме того, *S100A6* экспрессируется зрелыми нейрональными и глиальными клетками различных отделов мозга и оказывает множественные влияния на их функции [44]. В исследовании, посвященном оценке влияния 4-дневного стресса на содержание белка *S100A6* в мозге мышей, обнаружено его снижение в мозжечке, гиппокампе и дугообразном ядре гипоталамуса [45]. Полученные этими авторами данные о снижении *S100A6* в мозжечке согласуются с нашими результатами. В то же время использованное нами стрессовое воздействие было более мягким, с этим может быть связано отсутствие у контрольных животных снижения активности гена *S100A6* в гиппокампе. Тем не менее нами была выявлена отрицательная корреляция экспрессии гена *S100A6* в гиппокампе контрольных крыс и времени принудительного плавания, указывающая на связь между продолжительностью стрессового воздействия и снижением активности гена.

Следует отметить, что белок *S100A6* рассматривают в качестве маркера нейродегенеративных процессов, однако значительное количество данных позволяет предположить, что его повышение связано с компенсаторными механизмами, например, в случае болезни Альцгеймера со связыванием Zn^{2+} и деградацией амилоидных бляшек [46]. Кроме того, показано, что черепно-мозговая травма приводит к снижению экспрессии *S100A6* в гиппокампе крыс, которая возвращается к нормальному уровню через 14 дней после повреждения, параллельно с восстановлением нарушенной пространственной памяти [47]. Таким образом, совокупность сведений литературы и полученных нами данных указывает на вовлеченность гена *S100A6* в обеспечение когнитивных функций, и механизмы этого участия должны стать предметом дальнейших исследований. Тот факт, что возрастания экспрессии гена *S100A6* при обучении не наблюдалось в гиппокампе, позволяет высказать предположение, что роль этого белка в молекулярных механизмах пространственной памяти связана преимущественно с его влиянием на функциональную активность зрелых клеток нервной ткани, в том числе на процессы синаптогенеза.

Влияние группы на экспрессию гена *Ascl1* существенно различалось в исследованных отделах мозга. Наиболее выраженные эффекты наблюдались в гиппокампе – структуре, включающей одну из основных нейрогенных зон зрелого мозга и вовлеченной как в механизмы пространственной памяти, так и в обеспечение адаптивных реакций на стрессовые воздействия [48]. Из всех исследованных генов экспрессия гена *Ascl1* в гиппокампе демонстрировала уникальный паттерн изменений таким образом, что ее повышение наблюдалось у животных с опытом принудительного плавания и было еще более значительным в группе обучения. Это позволяет предположить, что рост экспрессионной активности гена *Ascl1* у животных группы контроля отражает адаптивный компонент реакции на умеренные стрессовые воздействия. В определенной степени подтверждением такого предположения могут служить данные литературы о том, что среди стволовых клеток зрелого гиппокампа наибольшая устойчивость

к воздействию жесткого стресса (6-часовая иммобилизация в течение 7 дней) наблюдается в популяции, экспрессирующей ген *Ascl1* [49]. Возрастание экспрессии гена *Ascl1* в гиппокампе крыс наблюдалось также после физической нагрузки (бег в тредбане 15 мин/день, 7 дней) [50]. В то же время превышение транскрипционной активности гена *Ascl1* в гиппокампе обученных животных над контрольным уровнем свидетельствует об участии кодирующего данным геном белка *Ascl1* в механизмах долговременной пространственной памяти. Возможно, что наблюдаемое при обучении повышение экспрессии *Ascl1* в гиппокампе отражает активацию процессов нейрогенеза, а специфичная для группы Обучения корреляция между активностью *Ascl1* и *Casp3* может отражать сопряженность механизмов образования и селекции новых нейронов как одного из факторов дальнейшей консолидации/модификации пространственного навыка.

Во ФК принудительное плавание вызывало повышение экспрессии *Ascl1*, при этом обучение не приводило к ее изменению относительно уровня, наблюдавшегося у стрессированных животных контрольной группы. Согласно данным литературы, в коре больших полушарий зрелого мозга в состоянии физиологического покоя активность транскрипционного фактора *Ascl1* мала [51]. Вместе с тем показано, что ишемические повреждения вызывают повышение числа клеток, экспрессирующих *Ascl1* [52, 53]. Таким образом, отсутствие различий между обученными и контрольными животными с учетом литературных данных о значительном влиянии стресса на экспрессию генов после обучения в лабиринте Морриса [25, 26] позволяет предположить, что, в отличие от гиппокампа, повышение экспрессии гена *Ascl1* во фронтальной коре не свидетельствует о вовлечении вновь образованных клеток этого отдела мозга в механизмы когнитивной активности.

В мозжечке повышение активности гена *Ascl1* наблюдалось только у обучавшихся животных. Согласно современным представлениям, нейрогенез в зрелом мозжечке млекопитающих в состоянии физиологического покоя не детектируется. Несмотря на то что стволовые клетки, меченные бромдезоксифурином, выявляются в этой структуре мозга в достаточном количестве, большинство из них находятся в состоянии покоя и лишь немногие являются *Ascl1*- или нестин-позитивными [54]. Вместе с тем даже внешние по отношению к этой структуре воздействия (такие, как повреждение периферического нерва) вызывают активацию нейрогенеза с повышением экспрессии регулирующих его генов [55]. Результаты данного исследования свидетельствуют, что формирование пространственной памяти вызывает активацию регулятора нейрогенеза гена *Ascl1*. Более того, повышенная экспрессия гена *Ascl1* в мозжечке демонстрирует ассоциацию с высоким уровнем выполнения пространственного навыка на стадии его закрепления (3-й и 4-й дни), что подтверждает специфичность вклада транскрипционной активности гена в механизмы автоцентрической стадии формирования пространственного навыка, связанной с регуляцией собственных движений в условиях сформированной карты пространства [56].

Совокупность полученных результатов свидетельствует в пользу правомерности высказанной гипотезы о том, что формирование пространственной памяти снижает экспрессию проапоптотических генов, возрастающую в условиях стрессового воздействия, и, напротив, стимулирует транскрипционную активность генов, кодирующих белки – регуляторы нейрогенеза и синаптогенеза, в мозговых структурах, вовлеченных в формирование следа памяти. В отличие от экспрессии “немедленных ранних” генов, для которой не было обнаружено существенных различий между группами принудительного плавания и обучения [26], изменения экспрессии изученных в настоящей работе “поздних” генов при формировании пространственной памяти продемонстрировали достаточно высокий уровень специфичности. Развитие исследований, направленных на выявление более полного комплекса генов, демонстрирующих такую специфичность, и механизмов, ее обеспечивающих, представляет интерес как для расширения представлений о молекулярных основах интегративной деятельности

ЦНС, так и для определения мишеней фармакологической коррекции когнитивных нарушений.

Ограничения при интерпретации результатов проведенного исследования связаны с тем, что была проведена оценка только транскрипционной активности генов без одновременного исследования содержания их белковых продуктов и их биологической активности (в частности, протеазной активности каспазы-3). Следует отметить, что для получения этих данных необходимо привлечение других подходов и методов в связи с ограниченным количеством биологического материала. Такое исследование может быть проведено в дальнейшем и направлено на комплексную оценку наиболее значимых генов и их белковых продуктов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (А. М. Р., М. А. Г.), проведение экспериментов (А. М. Р., З. И. С., М. А. Г.), анализ данных (А. М. Р., З. И. С.), подготовка черновика статьи (А. М. Р., М. А. Г.), редактирование и подготовка финальной версии (М. А. Г., З. И. С.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. 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 биомедицинской этике Федерального исследовательского центра оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (протокол № 06 от 18.03.2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chang WL, Hen R* (2024) Adult Neurogenesis, Context Encoding, and Pattern Separation: A Pathway for Treating Overgeneralization. *Adv Neurobiol* 38: 163–193.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-62983-9_10
2. *Forrest MP, Parnell E, Penzes P* (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 19(4): 215–234.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2018.16>
3. *Pumo GM, Kitazawa T, Rijli FM* (2022) Epigenetic and Transcriptional Regulation of Spontaneous and Sensory Activity Dependent Programs During Neuronal Circuit Development. *Front Neur Circ* 16: 911023.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2022.911023>
4. *Petanjek Z, Banovac I, Sedmak D, Hladnik A* (2023) Dendritic Spines: Synaptogenesis and Synaptic Pruning for the Developmental Organization of Brain Circuits. *Advanc Neurobiol* 34: 143–221.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-36159-3_4
5. *Gomazkov OA* (2016) Neurogenesis as an organizing function of the adult brain: is there enough evidence? *Biol Bull Rev* 6(6): 457–472.
<https://doi.org/10.1134/S2079086416060013>

6. Šimončičová E, Henderson Pekarik K, Vecchiarelli HA, Lauro C, Maggi L, Tremblay ME (2024) Adult Neurogenesis, Learning and Memory. *Advanc Neurobiol* 37: 221–242. https://doi.org/10.1007/978-3-031-55529-9_13
7. Jurkowski MP, Bettio LK, Woo E, Patten A, Yau SY, Gil-Mohapel J (2020) Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci* 14: 576444. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>
8. Chang WL, Hen R (2024) Adult Neurogenesis, Context Encoding, and Pattern Separation: A Pathway for Treating Overgeneralization. *Advanc Neurobiol* 38: 163–193. https://doi.org/10.1007/978-3-031-62983-9_10
9. Gomazkov OA (2019) Astrocytes as the elements of the regulation of higher brain functions. *Neurochem J* 13(4): 313–319. <https://doi.org/10.1134/s1819712419030073>
10. Machado-Santos AR, Loureiro-Campos E, Patrício P, Araújo B, Alves ND, Mateus-Pinheiro A, Correia JS, Morais M, Bessa JM, Sousa N, Rodrigues AJ, Oliveira JF, Pinto L (2022) Beyond New Neurons in the Adult Hippocampus: Imipramine Acts as a Pro-Astroglialogenic Factor and Rescues Cognitive Impairments Induced by Stress Exposure. *Cells* 11(3): 390. <https://doi.org/10.3390/cells11030390>
11. Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH (2019) The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry* 24(1): 67–87. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0036-2>
12. Lambertus M, Geiseler S, Morland C (2024) High-intensity interval exercise is more efficient than medium intensity exercise at inducing neurogenesis. *J Physiol* 602(24): 7027–7042. <https://doi.org/10.1113/JP287328>
13. Ghayourbabaie F, Farzin M, Keshavarzi Z, Saburi E, Khodadadegan MA, Hajali V (2025) Anxiety-like behaviors in rats exposed to the single and combined program of running exercise and environmental enrichment. *Neuroreport* 36(1): 31–38. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000002117>
14. Samoilova EM, Baklaushev VP, Belopasov VV (2021) Transcriptional factors of direct neuronal reprogramming in ontogenesis and ex vivo. *Mol Biol* 55(5): 645–669. <https://doi.org/10.1134/S0026893321040087>
15. Khaspekov LG, Frumkina LE (2023) Molecular mechanisms of astrocyte involvement in synaptogenesis and brain synaptic plasticity. *Biochemistry (Moscow)* 88(4): 502–514. <https://doi.org/10.1134/s0006297923040065>
16. Abashkin DA, Karpov DS, Kurishev AO, Marilovtseva EV, Golimbet VE (2023) ASCL1 Is Involved in the Pathogenesis of Schizophrenia by Regulation of Genes Related to Cell Proliferation, Neuronal Signature Formation, and Neuroplasticity. *Int J Mol Sci* 24(21): 15746. <https://doi.org/10.3390/ijms242115746>
17. Soares DS, Homem CCF, Castro DS (2022) Function of Proneural Genes Ascl1 and Asense in Neurogenesis: How Similar Are They? *Front Cell Development Biol* 10: 838431. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.838431>
18. Yamada J, Jinno S (2014) *S100A6* (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus. *Hippocampus* 24(1): 89–101. <https://doi.org/10.1002/hipo.22207>
19. Kjell J, Fischer-Sternjak J, Thompson AJ, Friess C, Sticco MJ, Salinas F, Cox J, Martinelli DC, Ninkovic J, Franze K, Schiller HB, Götz M (2020) Defining the Adult Neural Stem Cell Niche Proteome Identifies Key Regulators of Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 26(2): 277–293.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.002>
20. Leśniak W, Filipiek A (2023) *S100A6* Protein-Expression and Function in Norm and Pathology. *Int J Mol Sci* 24(2): 1341. <https://doi.org/10.3390/ijms24021341>
21. Gu Q, Duan K, Petralia RS, Wang YX, Li Z (2022) BAX regulates dendritic spine development via mitochondrial fusion. *Neurosci Res* 182: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.06.002>
22. Li Z, Sheng M (2012) Caspases in synaptic plasticity. *Mol Brain* 5: 15. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-15>

23. Kudryashova IV, Kudryashov IE, Gulyaeva NV (2006) Long-term potentiation in the hippocampus in conditions of inhibition of caspase-3: analysis of facilitation in paired-pulse stimulation. *Neurosci Behav Physiol* 36(8): 817–824.
<https://doi.org/10.1007/s11055-006-0092-y>
24. Jiang W, Chen L, Zheng S (2021) Global Reprogramming of Apoptosis-Related Genes during Brain Development. *Cells* 10(11): 2901.
<https://doi.org/10.3390/cells10112901>
25. Aguilar-Valles A, Sánchez E, de Gortari P, Balderas I, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, Joseph-Bravo P (2005) Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82(5-6): 306–319.
<https://doi.org/10.1159/000093129>
26. Carter SD, Mifsud KR, Reul JM (2015) Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Front Behav Neurosci* 9: 156.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00156>
27. Gruden MA, Storozheva ZI, Sewell RD, Kolobov VV, Sherstnev VV (2013) Distinct functional brain regional integration of Casp3, Ascl1 and *S100A6* gene expression in spatial memory. *Behav Brain Res* 252: 230–238.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.024>
28. Terry AV, Jr (2009) Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco (Ed), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis.
29. Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition. Acad Press. San Diego.
30. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocol* 3(6): 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
31. Pei H, Shen H, Bi J, He Z, Zhai L (2024) Gastrodin improves nerve cell injury and behaviors of depressed mice through Caspase-3-mediated apoptosis. *CNS Neurosci Therap* 30(3): e14444.
<https://doi.org/10.1111/cns.14444>
32. Parul MA, Singh S, Singh S, Tiwari V, Chaturvedi S, Wahajuddin M, Palit G, Shukla S (2021) Chronic unpredictable stress negatively regulates hippocampal neurogenesis and promote anxious depression-like behavior via upregulating apoptosis and inflammatory signals in adult rats. *Brain Res Bull* 172: 164–179.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.017>
33. Li Y, Han F, Shi Y (2013) Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Mol Neurosci* 51(1): 127–137.
<https://doi.org/10.1007/s12031-013-9965-z>
34. Li X, Han F, Liu D, Shi Y (2010) Changes of Bax, Bcl-2 and apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. *Neurol Res* 32(6): 579–586.
<https://doi.org/10.1179/016164110X12556180206194>
35. Ahmadian N, Mahmoudi J, Talebi M, Molavi L, Sadigh-Eteghad S, Rostrup E, Ziaee M (2018) Sleep deprivation disrupts striatal anti-apoptotic responses in 6-hydroxy dopamine-lesioned parkinsonian rats. *Iran J Basic Med Sci* 21(12): 1289–1296.
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.28546.6919>
36. Niu Q, Yang Y, Zhang Q, Niu P, He S, Di Gioacchino M, Conti P, Boscolo P (2007) The relationship between Bcl-gene expression and learning and memory impairment in chronic aluminum-exposed rats. *Neurotox Res* 12(3): 163–169.
<https://doi.org/10.1007/BF03033913>
37. Miguel-Hidalgo JJ, Paul IA, Wanzo V, Banerjee PK (2012) Memantine prevents cognitive impairment and reduces Bcl-2 and caspase 8 immunoreactivity in rats injected with amyloid β 1-40. *Eur J Pharmacol* 692(1–3): 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.07.032>
38. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 198(1): 247–251.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>

39. Crawford LE, Knouse LE, Kent M, Vavra D, Harding O, LeServe D, Fox N, Hu X, Li P, Glory C, Lambert KG (2020) Enriched environment exposure accelerates rodent driving skills. *Behav Brain Res* 378: 112309.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112309>
40. Karishma KK, Herbert J (2002) Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci* 16(3): 445–453.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02099.x>
41. Györfy BA, Kun J, Török G, Bulyáki É, Borhegyi Z, Gulyácssy P, Kis V, Szocsics P, Micsonai A, Matkó J, Drahos L, Juhász G, Kékesi KA, Kardos J (2018) Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning. *Proceed Natl Acad Sci U S A* 115(24): 6303–6308.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1722613115>
42. Gu Q, Jiao S, Duan K, Wang YX, Petralia RS, Li Z (2021) The BAD-BAX-Caspase-3 Cascade Modulates Synaptic Vesicle Pools via Autophagy. *J Neurosci* 41(6): 1174–1190.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-20.2020>
43. De Bastiani MA, Bellaver B, Carello-Collar G, Zimmermann M, Kunach P, Lima-Filho RAS, Forner S, Martini AC, Pascoal TA, Lourenco MV, Rosa-Neto P, Zimmer ER (2023) Cross-species comparative hippocampal transcriptomics in Alzheimer's disease. *iScience* 27(1): 108671.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108671>
44. Filipek A, Leśniak W (2020) *S100A6* and Its Brain Ligands in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* 21(11): 3979.
<https://doi.org/10.3390/ijms21113979>
45. Bartkowska K, Swiatek I, Aniszewska A, Jurewicz E, Turlejski K, Filipek A, Djavadian RL (2017) Stress-Dependent Changes in the CacyBP/SIP Interacting Protein *S100A6* in the Mouse Brain. *PloS One* 12(1): e0169760.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169760>
46. Tian ZY, Wang CY, Wang T, Li YC, Wang ZY (2019) Glial *S100A6* Degrades β -amyloid Aggregation through Targeting Competition with Zinc Ions. *Aging Disease* 10(4): 756–769.
<https://doi.org/10.14336/AD.2018.0912>
47. Fang B, Liang M, Yang G, Ye Y, Xu H, He X, Huang JH (2014) Expression of *S100A6* in rat hippocampus after traumatic brain injury due to lateral head acceleration. *Int J Mol Sci* 15(4): 6378–6390.
<https://doi.org/10.3390/ijms15046378>
48. McEwen BS (2001) Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann New York Acad Sci* 933: 265–277.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x>
49. Jung S, Choe S, Woo H, Jeong H, An HK, Moon H, Ryu HY, Yeo BK, Lee YW, Choi H, Mun JY, Sun W, Choe HK, Kim EK, Yu SW (2020) Autophagic death of neural stem cells mediates chronic stress-induced decline of adult hippocampal neurogenesis and cognitive deficits. *Autophagy* 16(3): 512–530.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1630222>
50. Uda M, Ishido M, Kami K (2007) Features and a possible role of Mash1-immunoreactive cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Brain Res* 1171: 9–17.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.099>
51. Oproescu AM, Han S, Schuurmans C (2021) New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14: 642016.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.642016>
52. Zhang RL, Chopp M, Roberts C, Jia L, Wei M, Lu M, Wang X, Pourabdollah S, Zhang ZG (2011) Ascl1 lineage cells contribute to ischemia-induced neurogenesis and oligodendrogenesis. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 31(2): 614–625.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.134>
53. Faiz M, Sachewsky N, Gascón S, Bang KW, Morshead CM, Nagy A (2015) Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17(5): 624–634.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.002>

54. Su X, Guan W, Yu YC, Fu Y (2014) Cerebellar stem cells do not produce neurons and astrocytes in adult mouse. *Biochem Biophys Res Communicat* 450(1): 378–383.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.131>
55. Rusanescu G, Mao J (2017) Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling. *J Cell Mol Med* 21(2): 299–314.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12965>
56. Storozheva ZI, Zakharova EI, Proshin AT (2021) Evaluation of the Activity of Choline Acetyltransferase From Different Synaptosomal Fractions at the Distinct Stages of Spatial Learning in the Morris Water Maze. *Front Behav Neurosci* 15: 755373.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.755373>

Transcriptional Activity of Genes Regulating Neurogliogenesis and Apoptosis in Rats Trained in Morris Water Maze: the Influence of Stress and Spatial Memory Formation

A. M. Ratmirov^a, M. A. Gruden^a, and Z. I. Storozheva^{a, *}

^a*Federal Research Center for Innovator and Perspective Biomedical and Pharmaceutical
Technologies, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: storozheva_zi@academpharm.ru*

The formation of new neural networks and the modification of pre-existing synaptic contacts, which underlie learning and memory, largely depend on the activity of genes involved in the regulation of the associated processes of neurogliogenesis and apoptosis. At the same time, the identification of changes in the functioning of the genome specific to cognitive functions requires a simultaneous assessment of the influence of stressful factors as a persistent component of all models of laboratory animal learning. The aim of this study was to compare the expression of genes regulating neurogliogenesis (*Sl00A6*, *Ascl1*), and apoptosis (*Apaf1*, *Bax*, *Casp3*, *Bcl2*) in animals trained in spatial Morris maze and those subjected to forced swimming in accordance with the training regime. The experiments were conducted on young adult male Wistar rats, distributed into the following groups: Training (trained to find a hidden platform in a water maze for 4 days), Control (swimming in a maze without a platform for 4 days) and Intact (staying in home cages). In tissue samples of the hippocampus, prefrontal cortex, and cerebellum obtained immediately after the end of experiments in the maze, the expression of target genes was determined by real-time polymerase chain reaction. It was found that cognitive activity reduces the expression of pro-apoptotic genes, which increases under stress conditions, and, on the contrary, stimulates the activity of genes regulating neurogliogenesis and synaptogenesis in structures relevant for various stages of memory trace formation. The results obtained, are of interest for understanding molecular mechanisms of stress and cognition as well as for determining the targets of therapy for cognitive disorders.

Keywords: spatial memory, stress, gene expression, apoptosis, neurogenesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОСОБЕННОСТИ АФФЕРЕНТНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ МЫШЦ-
АНТАГОНИСТОВ ГОЛЕНИ БИЛАТЕРАЛЬНЫХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ
СКОРОСТНЫХ ЛОКОМОТОРНЫХ ДВИЖЕНИЯХ**

© 2025 г. А. А. Челноков^{1,*}, М. Г. Барканов¹, Д. А. Гладченко¹, Р. М. Городничев¹

¹*Великолукская государственная академия физической культуры и спорта,*

Великие Луки, Россия

**E-mail: and-chelnokov@yandex.ru*

Поступила в редакцию 29.03.2025 г.

После доработки 28.05.2025 г.

Принята к публикации 29.05.2025 г.

В статье представлена специфика внутри-, межмышечных и перекрестных проявлений импульсной активности различных групп афферентов (Ia, Ib и II) мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей при выполнении скоростных локомоторных движений. В исследовании приняли участие 9 мужчин-спортсменов, специализирующихся в беге на короткие дистанции, которые выполняли локомоторный тест – проталкивание пассивной ленты тредбана в течение 10 с с максимально возможной скоростью. Во время бега регистрировали электромиограммы мышц-антагонистов голени (*m. tibialis anterior*, *m. gastrocnemius med.*) с последующей их обработкой в программе MatLab и расчетом импульсной активности первичных и вторичных афферентов с помощью математической модели, основанной на прогнозировании срабатывания мышечных веретен. Установлено, что скоростной бег представляет собой перекрестный внутри-мышечный ЭМГ-паттерн напряжения мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей с переходом к их расслаблению, который зависит от фазы движения. Такая работа мышц в отдельные фазы скоростного бегового шага проявлялась эффективной межмышечной координацией флексора и экстензора в фазах опоры и переноса правой конечности, выраженными реципрокными отношениями гомонимных мышц-антагонистов голени в фазу переноса правой и опорный период левой конечностей. Внутри-мышечная проприоцептивная афферентация мышц-антагонистов голени скоростного движения характеризуется проявлением сильной импульсной активности афферентов Ib, умеренной – афферентов II и слабой – Ia афферентов флексоров и экстензоров голени симметричных конечностей. Показана фазозависимая модуляция межмышечной афферентации первичных и вторичных волокон флексоров и экстензоров голени билатеральных конечностей в фазы опоры и переноса скоростного бегового шага. Установлены характерные для скоростного бегового шага перекрестные взаимодействия афферентной активности гомологичных мышц голени билатеральных конечностей в разные фазы движения. Выявленные особенности внутри-, межмышечной и перекрестной афферентной активности во время бега отражают их ключевую роль в регуляции тормозной интернейрональной сети спинного мозга, обеспечивающей поддержание заданного мышечного сокращения и изменение параметров моторного выхода в целом. Обсуждаются полагаемые рефлекторные механизмы регуляции скоростных локомоторных движений на основе известных феноменов, связанных с взаимодействием различных афферентных входов на нейрональный аппарат спинного мозга в системе мышц-антагонистов голени.

Ключевые слова: афференты, интернейроны, спинальное торможение, мышцы, центральный генератор паттернов, скоростные локомоторные движения

DOI: 10.7868/S2658655X25070091, **EDN:** MVSCOP

ВВЕДЕНИЕ

Локомоция животных и человека представляет собой сложное чередование мышечных сокращений, постоянно модифицирующихся для адаптации к окружающей среде. Во время локомоции необходима точная координация мышц-флексоров и экстензоров не только в пределах одной конечности, но также между гомологичными мышцами билатеральных конечностей. Экспериментальные данные, полученные на животных и людях, свидетельствуют о том, что различные модели локомоции могут быть обусловлены главным образом периферическими факторами, такими как мышечная активность или проприоцептивная обратная связь, а также взаимодействием корковых, подкорковых и спинальных нейрональных сетей [1–6].

Афферентные сигналы, поступающие на пре- и мотонейронный уровни спинного мозга, имеют ключевое значение для корректировки локомоторного ритма под конкретные двигательные задачи и условия внешней среды [3, 7]. Конвергенция различных афферентных входов на спинальном уровне осуществляется посредством возбуждающих и тормозных интернейронов, опосредуя реципрокные модуляции восходящих афферентных и нисходящих потоков, предотвращая передачу аберрантных сенсорных сигналов [8, 9]. Предыдущие исследования на людях были сосредоточены в основном на изучении афферентных взаимодействий мышц-антагонистов и синергистов в пределах одной конечности [4]. В отдельных исследованиях была показана роль первичных (Ia и Ib) и вторичных (II) афферентов скелетных мышц одной конечности, реализующих моно-, поли- и олигосинаптические рефлексy на спинальном уровне, во время ходьбы и бега в различные фазы движения [10–16]. Фазозависимая модуляция рефлексa на растяжение, сухожильных и кожных рефлексов во время ходьбы человека приводит к облегчению и/или подавлению возбудимости α -мотонейронов и контролируется центральным генератором автоматизированных движений (или центральный генератор паттернов – ЦГП) [6, 17, 18].

Лишь в немногих исследованиях рассматривались перекрестные афферентные влияния от мышечных рецепторов одной конечности к мотонейронам противоположной конечности [19–23]. В недавних исследованиях с помощью математической модели, основанной на прогнозировании срабатывания мышечных веретен, Gervasio с соавт. [24] установили, что произвольная ходьба человека характеризуется наличием перекрестных коротколатентных рефлексов с наибольшей внутримышечной импульсной активностью афферентов II группы экстензора контралатеральной конечности, в отличие от афферентов I (Ia и Ib). В последующем с применением той же модели нами [9] были установлены особенности внутри- и межмышечных проявлений импульсной активности первичных и вторичных афферентных волокон мышц-антагонистов голени правой конечности при ходьбе, причем также была показана эффективность чрескожной электрической стимуляции дорсальных корешков нижнегрудного отдела спинного мозга при ходьбе в повышении импульсной активности отдельных афферентных волокон мышц-антагонистов голени.

В связи с этим цель исследования состояла в изучении специфики внутри-, межмышечных и перекрестных проявлений импульсной активности различных групп афферентов (Ia, Ib и II) мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей при выполнении скоростных локомоторных движений, характеризующихся сложной координацией и большими мышечными усилиями.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 9 спортсменов-легкоатлетов мужского пола в возрасте 18–27 лет (21.86 ± 1.18 лет; кандидаты в мастера спорта, I и II разряды, специализация – бег на короткие дистанции). Для уменьшения влияния эффекта тренировок

на результаты исследований эксперименты проводились в переходный период, когда интенсивность тренировочного воздействия на спортсменов снижена. Испытуемым в ходе исследования предлагалось выполнить локомоторный тест на беговой дорожке Venus Saturn (HP Cosmos, Германия), который включал проталкивание пассивной ленты tread-bana в течение 10 с с максимально возможной скоростью, держась за поручни беговой дорожки. Для анализа беговой шаг был разделен на фазу переноса – с момента отрыва нижней конечности от места опоры до момента постановки конечности на опору – и фазу опоры – с момента постановки конечности на место опоры до момента отрыва конечности от опоры [25]. За 10 с испытуемые выполняли от 16 до 20 беговых циклов.

Биоэлектрическую активность *m. tibialis anterior* (ТА), *m. gastrocnemius medialis* (ГМ) билатеральных конечностей регистрировали биполярными поверхностными электродами посредством телеметрического 16-канального электронейромиографа ME-6000 (Mega Electronics Ltd, Куопио, Финляндия) с полосой пропускания частот от 10 до 100 кГц и дискретизацией с частотой 2000 Гц. Активный накожный электрод ($\varnothing = 9$ мм) фиксировался в проекции двигательной точки мышцы, референтный электрод – по ходу ее волокон на расстоянии 2.0–2.5 см к сухожилию. Записи ЭМГ мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей проводили в программе MegaWin (Mega Electronics Ltd, Куопио, Финляндия), а их анализ (нормализация, выпрямление, усреднение) осуществляли при помощи интерактивного пакета программы MatLab 2018b (MathWorks, США). У всех испытуемых в обработку ЭМГ-записей брали 16 беговых циклов.

Для оценки реципрокных координационных отношений мышц билатеральных конечностей рассчитывали коэффициент реципрокности (1) [9]:

$$КР = ЭМГ_{АН} / ЭМГ_{АГ} \quad (1)$$

где КР – коэффициент реципрокности (усл. ед.); $ЭМГ_{АН}$ – показатель амплитуды ЭМГ-антагониста; $ЭМГ_{АГ}$ – показатель амплитуды ЭМГ-агониста. Постулируется, чем меньше показатель КР, тем больше выражены координационные отношения мышц.

Для характеристики афферентного обеспечения скоростных локомоторных движений рассчитывалась импульсная активность первичных (Ia и Ib) и вторичных (II) афферентов мышц-антагонистов голени с помощью математической модели, основанной на прогнозировании срабатывания мышечных веретен [9, 24, 26–31]. В основе представленных математических моделей находятся физиологические процессы, связанные с изменением длины интрафузальных мышечных волокон с ядерной цепочкой и ядерной сумкой, силы, развиваемой исследуемой мышцей, и активности мотонейронных пулов, выраженной через ЭМГ-сигналы, обработанные в программе MatLab 2018b (MathWorks, США). Импульсную активность Ia афферентов вычисляли по следующей модели (2, 3):

$$Ia = 4.3 \times v^{0.6} + 2 \times l + b + f(ЭМГ), \quad (2)$$

$$f = ЭМГ \times 120 \times (s + 1) / (s + 20), \quad (3)$$

где v – скорость изменения длины мышечных пучков (46.6); l – изменения длины мышечных пучков (4); b – значения смещения (для Ia афферентов – 285); $f(ЭМГ)$ – сигнал, представляющий связанное фузимоторное действие; ЭМГ – выпрямленный, усредненный и нормализованный сигналы исследуемой мышцы; s – оператор Лапласа.

Активность волокон Ib рассчитывалась на основе мышечной силы (F_m) с использованием математической модели (4, 5):

$$Ib = 10^{0.4939 \times \log_{10}(F) + 3.2154}, \quad (4)$$

$$F_m = S_m \times \sigma_m, \quad (5)$$

где S_m – поперечное сечение мышцы (для ТА – 9.9 см², GM – 32.4 см²); σ_m – напряжение мышцы (30 Н/см²).

Импульсная активность афферентов II группы вычислялась по формуле (6):

$$\Pi = 13.5 \times l + b + 20 \times \text{ЭМГ}, \quad (6)$$

где l – изменения длины мышечных волокон (4); b – значения смещения (для II афферентов – 190); ЭМГ – выпрямленный, усредненный и нормализованный сигналы исследуемой мышцы.

Средние значения показателей активности первичных и вторичных групп афферентов выражались как импульсы в секунду (для афферентов Ia и II в имп/с $\times 10^3$, афферентов Ib – имп/с $\times 10^4$).

Анализ полученных данных осуществлялся в современном программном обеспечении Statistica 10 (StatSoft Inc., США), GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, США). Проверку нормальности распределения переменных проводили с помощью критериев Shapiro-Wilk W и Levene's test. Результаты графических данных на рис. 1 представлены как медианы, межквартильные размахи 25–75% процентилей, минимальные и максимальные значения, на рис. 3 – средняя арифметическая (M) и стандартная (SEM) ошибки средней. Статистическую значимость различий между ЭМГ-параметрами определяли с помощью Wilcoxon Matched Pairs Test. Внутримышечная координация дистальных мышц (ТА_{правая} $\times$ ТА_{левая}, GM_{правая} $\times$ GM_{левая}) и межмышечная координация экстензоров/флексоров (ТА_{правая} $\times$ GM_{правая}, ТА_{левая} $\times$ GM_{левая}) нижних конечностей в различные фазы движения оценивались с помощью множественного регрессионного линейного анализа (Multiple linear regression, рис. 2). С помощью множественного анализа (Friedman ANOVA) оценивались различия во внутри-, межмышечной и перекрестной афферентной активности мышц-антагонистов билатеральных конечностей в различные фазы движения. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ ЭМГ-активности мышц-антагонистов голени, зарегистрированной при проталкивании пассивной ленты тредбана во время скоростного локомоторного движения, выявил, что в фазе опоры правой конечности активность ТА (266.39 ± 10.38 мкВ) больше, чем GM (135.17 ± 7.54 мкВ), а при ее переносе, наоборот, больше GM (279.65 ± 8.00 мкВ) в сравнении с ТА (203.09 ± 5.93 мкВ) (рис. 1а). В опорную фазу левой конечности возрастала амплитуда ЭМГ GM (309.65 ± 12.23 мкВ) по сравнению с ТА (135.17 ± 7.54 мкВ), а во время ее переноса наоборот повышалась ТА (254.31 ± 7.70 мкВ), чем GM (154.74 ± 6.06 мкВ).

Оценка выраженности реципрокных координационных отношений гомонимных мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей на основе расчета коэффициента реципрокности выявила повышение их реципрокности в фазе опоры левой и переносе правой конечности во время выполнения скоростного бегового шага (рис. 1б). Так, коэффициент реципрокности в фазе опоры левой конечности составил 0.85 ± 0.08 усл. ед. и был достоверно ниже на 1.04 усл. ед. ($p < 0.001$), чем в фазе ее переноса (1.89 ± 0.10 усл. ед.), а в фазе переноса правой конечности равен 0.81 ± 0.04 усл. ед. и был достоверно меньше на 2.05 усл. ед. ($p < 0.001$) в сравнении с опорной фазой (2.86 ± 0.25 усл. ед.).

Из данных регрессионного анализа, представленного на рис. 2а, видно, что эффективная внутримышечная координация флексоров и экстензоров голени при выполнении бега с максимальной скоростью наблюдалась только в фазах опоры ($p < 0.001$) и переноса ($p < 0.001$) правой конечности, чем при опоре и переносе левой конечности ($p > 0.05$). При скоростном беговом шаге у спортсменов выявлена эффективная

межмышечная координация дистальных мышц билатеральных конечностей, которая выражалась в фазе опоры увеличением ЭМГ-активности флексора (TA) правой конечности на 71.07 мкВ ($p < 0.001$), чем левой, и его экстензора (GM) левой конечности – на 174.47 мкВ ($p < 0.001$) в сравнении с правой конечностью, а в фазе переноса, наоборот, повышением активности флексора левой конечности на 51.22 мкВ ($p < 0.001$) и его экстензора правой конечности – на 124.91 мкВ ($p < 0.05$, рис. 2b).

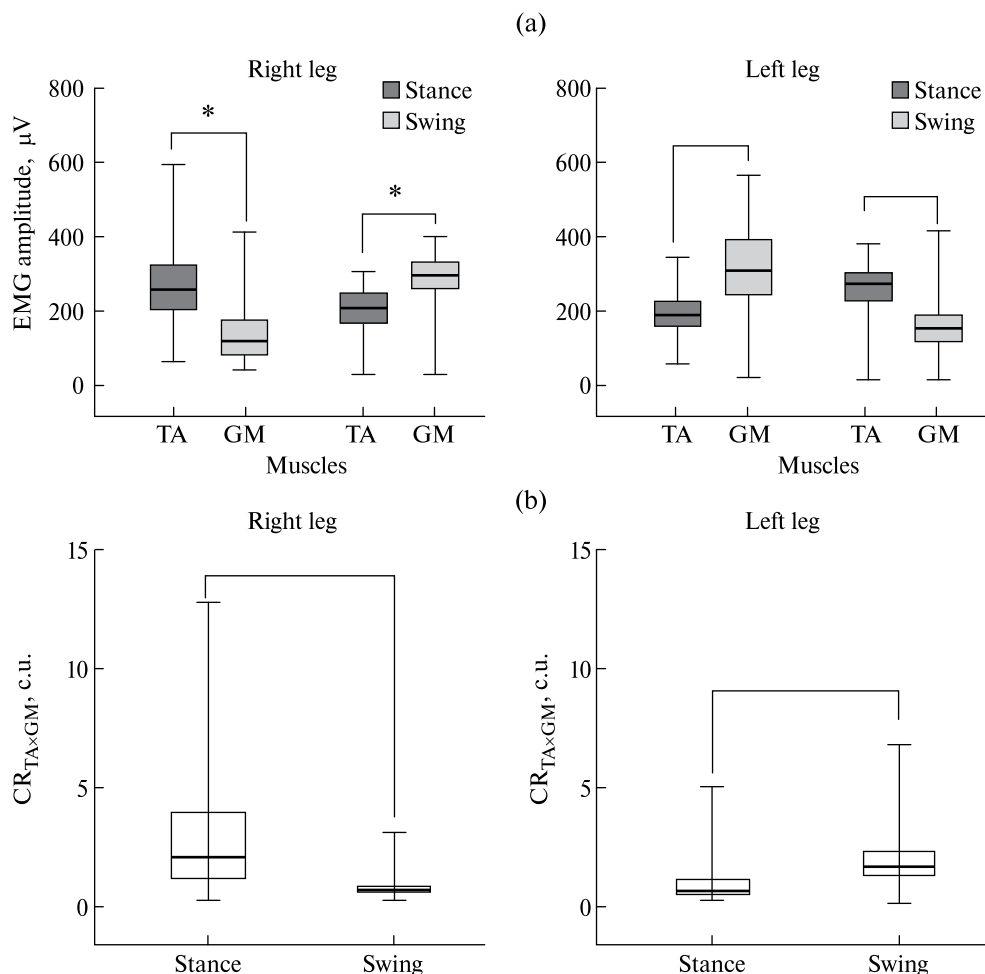


Рис. 1. Амплитуда ЭМГ-активности мышц билатеральных нижних конечностей (а) и коэффициенты реципрокности (б) в фазах опоры и переноса бегового шага во время проталкивания пассивной беговой дорожки. * – Достоверные отличия при уровне значимости $p < 0.001$, Wilcoxon Matched Pairs Test.

Данные рис. 3 свидетельствуют, что при скоростном движении по пассивной беговой дорожке внутримышечная афферентация билатеральных мышц-антагонистов голени вне зависимости от фазы бегового шага характеризуется сильной импульсной активностью афферентов Ib флексоров и экстензоров голени, умеренной – афферентов II ($p < 0.001$ *) и слабой – Ia афферентов ($p < 0.001$ *). Однако в разные фазы бегового шага отмечаются изменения в межмышечной афферентации мышц-антагонистов голени,

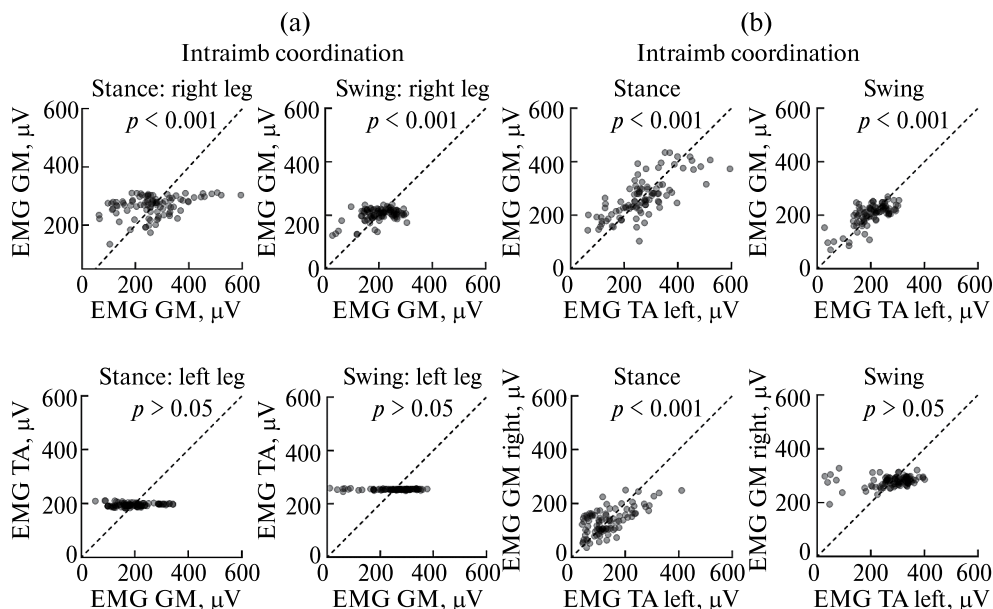


Рис. 2. Внутри- (а) и межмышечные (б) координации мышц голени билатеральных конечностей в фазах опоры и переноса бегового шага во время проталкивания пассивной беговой дорожки. $p < 0.05$, $p < 0.001$ – достоверные отличия, Multiple linear regression.

сопровождающиеся в фазе опоры правой конечности повышением импульсной активности афферентных волокон Ia и II TA на 0.78 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) и 2.62 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) соответственно, чем GM, но все же более выраженной активностью Ib афферентов GM на 2.09 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) в сравнении с активностью аналогичных афферентов TA. В фазе переноса правой конечности активность первичных (Ia и Ib) и вторичных афферентов GM, в сравнении с афферентами TA, больше на 0.46 имп/с ($p < 0.001^{\#}$), 7.62 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) и 1.53 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) соответственно. Импульсная активность афферентов Ia, Ib и II афферентов GM в фазе опоры левой конечности проявлялась аналогичным образом, как и при переносе правой конечности: их активность больше на 0.68 имп/с ($p < 0.001^{\#}$), 8.36 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) и 2.29 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) соответственно, по сравнению с афферентами TA. При переносе левой конечности импульсная активность афферентов Ia и II TA проявлялась аналогичным образом, как и при опоре правой конечности: их активность выше на 0.60 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) и на 1.99 имп/с ($p < 0.001^{\#}$) соответственно, по сравнению с афферентами GM, но для афферентов группы Ib GM активность была больше на 3.10 имп/с ($p < 0.001^{\#}$), чем у сенсорных волокон Ib TA.

Сравнительный анализ афферентной активности билатеральных мышц голени в зависимости от фазы бегового шага, представленный на рис. 3, выявил, что в фазе опоры правой конечности во время бега наиболее выражена активность афферентов Ia, Ib, II TA ($p < 0.001^{+}$), а в фазе переноса – аналогичных афферентов GM ($p < 0.001^{+}$). В фазе опоры левой конечности, наоборот, наиболее выражена активность афферентов Ia, Ib, II GM ($p < 0.001^{+}$), а при переносе левой конечности – соответствующих афферентов TA ($p < 0.001^{+}$).

Наши данные указывают также о перекрестных эффектах афферентной активности гомологичных мышц голени билатеральных конечностей в разные фазы скоростного движения. Так, при беге в фазу опоры правой конечности импульсная активность Ia, Ib, II афферентов TA больше на 0.42, 1.08, 1.42 имп/с ($p < 0.001^{**}$, рис. 3) соответственно,

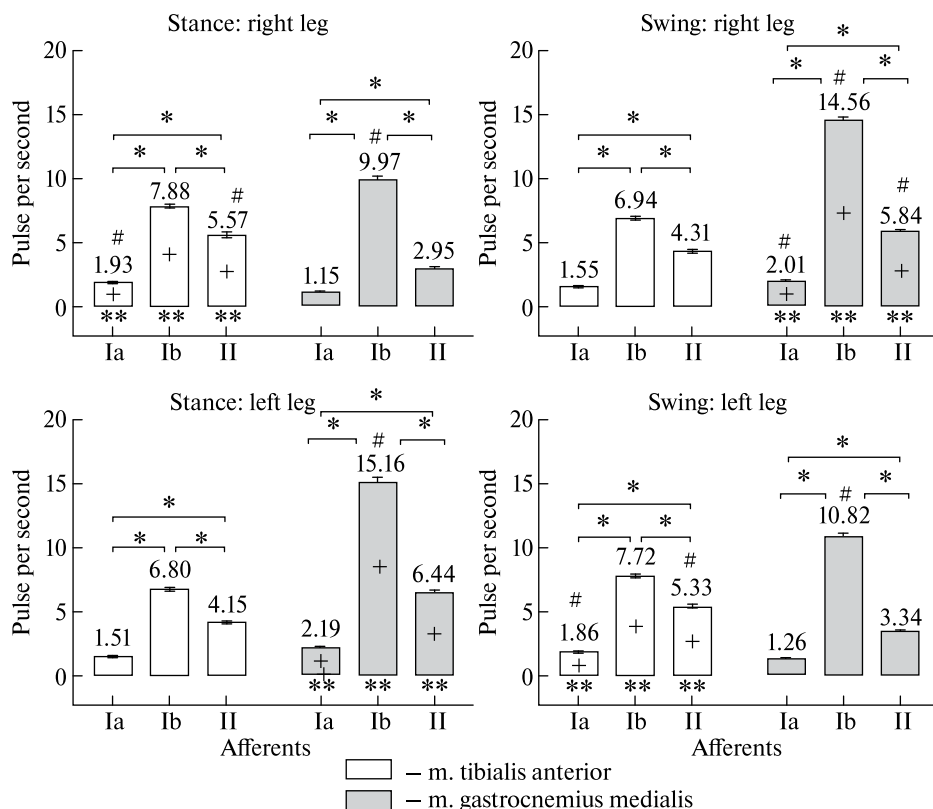


Рис. 3. Импульсная активность афферентов Ia, Ib и II групп мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей в фазах опоры и переноса бегового шага во время проталкивания пассивной беговой дорожки, имп/с.

* – Достоверные отличия во внутримышечной афферентной активности различных афферентов флексора и экстензора голени; # – достоверные отличия в межмышечной афферентной активности различных афферентов в системе мышц-антагонистов; ** – достоверные отличия в перекрестных эффектах афферентной активности гомологичных мышц билатеральных конечностей; + – достоверные отличия в импульсной активности афферентов мышц-антагонистов между фазами опоры и переноса (Friedman ANOVA); активность афферентов Ia и II представлена на графиках в имп/с $\times 10^3$, афферентов Ib – имп/с $\times 10^4$.

чем афферентов ТА левой конечности, а Ia, Ib, II афферентов ГМ левой конечности больше на 1.04, 5.19, 3.49 имп/с ($p < 0.001^{**}$) в сравнении с правой конечностью. В фазу переноса левой конечности импульсная активность Ia, Ib, II афферентов ТА выше на 0.31, 0.78, 1.02 имп/с ($p < 0.001^{**}$) по сравнению с афферентами ТА правой конечности, а Ia, Ib, II афферентов ГМ правой конечности больше на 0.75, 3.74, 2.50 имп/с ($p < 0.001^{**}$) в сравнении с левой конечностью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что скоростной бег представляет собой перекрестный внутримышечный паттерн напряжения мышц-антагонистов голени билатеральных конечностей с переходом к их расслаблению, который зависит от фазы движения. Такая работа мышц в отдельные фазы скоростного бегового шага проявляется согласованной межмышечной координацией флексоров и экстензоров в фазах опоры и переноса

правой конечности, выраженной реципрокными отношениями гомонимных мышц-антагонистов голени в фазу переноса правой конечности и опорный период левой конечности. На основании полученных данных можно предположить, что всю совокупность количественных сдвигов в ЭМГ-активности мышц голени билатеральных конечностей при скоростных локомоторных движениях в фазы опоры и переноса следует представить как следствие внутриспинального и рефлекторного взаимодействия, обусловленного облегчением или торможением спинальных моторных центров флексоров и экстензоров, а также опосредуемых реципрокными модуляциями различных афферентных сигналов на интернейрональный аппарат спинного мозга.

Впервые установлены особенности внутримышечной проприоцептивной афферентации мышц-антагонистов голени скоростных локомоторных движений, характеризующиеся проявлением сильной импульсной активности афферентов Ib, умеренной – афферентов II и слабой – Ia афферентов флексоров и экстензоров голени симметричных конечностей. Показана фазозависимая модуляция межмышечной афферентации первичных и вторичных волокон флексоров и экстензоров голени билатеральных конечностей в фазы опоры и переноса скоростного бегового шага. Установлены перекрестные взаимодействия афферентной активности гомологичных мышц голени билатеральных конечностей в разные фазы скоростного движения.

Перед тем как рассмотреть полагаемые рефлекторные механизмы регуляции скоростных локомоторных движений на основе известных феноменов, связанных с взаимодействием различных афферентных входов на нейрональный аппарат спинного мозга в системе мышц-антагонистов голени, стоит интерпретировать ограничения нашего исследования, связанные с объемом ($n = 9$) и составом выборки (спортсмены-легкоатлеты мужского пола). Мы осознанно ограничились спортсменами, специализирующимися в беге на короткие дистанции, чтобы минимизировать вариабельность, обусловленную различиями в технике движения, по сравнению с нетренированными испытуемыми. Несмотря на малый размер выборки, в ряде работ [10, 11, 13, 16, 23, 25, 34] анализ нейрофизиологических параметров проводился от 7 до 10 испытуемых и является типичным для исследований подобного дизайна. Однако интерпретировать результаты следует с осторожностью, учитывая возможное влияние «конфаундеров» (например, индивидуальные вариации в квалификации спортсменов). Результаты, полученные нами с помощью множественного сравнения Friedman ANOVA, демонстрируют значимые различия во внутри-, межмышечной и перекрестной афферентной активности мышц-антагонистов билатеральных конечностей в фазах опоры и переноса бегового шага во время проталкивания пассивной беговой дорожки ($p < 0.001$). Наши данные согласуются с работами, описывающими фазозависимую модуляцию афферентного контроля рефлекторной возбудимости спинальных α -мотонейронов мышцы-экстензора во время ходьбы и бега [10–16].

Специальных исследований, направленных на изучение афферентного контроля скоростных беговых движений у человека, мы не обнаружили. Имеется несколько работ, посвященных изучению афферентного Ib контроля ходьбы у человека на основе методики подавления амплитуды Н-рефлекса экстензора (камбаловидная мышца) голени коротколатентной кондиционирующей стимуляции высокопороговых афферентов [12–14]. Показано, что кожная коротколатентная стимуляция афферентов Ib правой медиальной головки икроножной мышцы в начале фаз опоры и окончания шагательного цикла человека снижает их активность, что приводит к облегчению моносинаптического Н-рефлекса камбаловидной мышцы, т.е. к снижению нерципрокного (Ib) торможения [12–14]. Установленный нами факт, свидетельствующий о том, что в фазах переноса правой и опоры левой конечностей активность афферентов Ib разгибателя стопы в сравнении с ее сгибателем была выражена больше, чем в фазах переноса левой и опоры правой конечностей, позволяет предположить, что для скоростного бега характерно повышение импульсной активности Ib афферентов от сухожильных органов Гольджи в ответ на усиление сократительного эффекта мышц голени при

проталкивании пассивной беговой дорожки, что, вероятно, обуславливает более сильное нерцепируемое (Ib) торможение α -мотонейронов мышц экстензоров (GM) и менее выраженное – мышц флексоров (TA). Учитывая физиологическую роль нерцепируемого торможения – предохранение от чрезмерного напряжения скелетных мышц, растяжения сухожилий и обеспечения согласованной координации в активности разных мышечных групп и суставов, можно выразить мнение, что данные нерцепирующие тормозные взаимодействия мышц-антагонистов голени отражают мощность, развиваемую мышцами в течение цикла скоростного локомоторного движения.

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, во время скоростного бега при проталкивании пассивной беговой дорожки умеренное влияние оказывали афференты II группы. Известно, что влияние импульсов, поступающих по афферентам группы II к двигательным центрам спинного мозга, может быть различным в зависимости от характера движений конечности, позы, локомоции и при внезапном ощущении препятствий при передвижении [7, 24, 32]. Применяя ту же математическую модель, которая использовалась в нашем исследовании, Gervasio с соавт. [24] показали, что внутримышечный афферентный контроль ходьбы человека по тредмиллу в нормальном темпе сопровождается наибольшей импульсной активностью афферентов II группы икроножной мышцы правой конечности в сравнении с афферентами I группы (Ia и Ib). В недавних наших исследованиях [9] установлена иная закономерность внутримышечного проявления импульсной активности первичных и вторичных афферентных волокон мышц-антагонистов голени правой конечности при ходьбе с постоянной скоростью 3 км/ч по подвижной ленте тредбана, которая характеризуется сильной импульсной активностью II, Ia афферентов и слабой – Ib афферентов флексора стопы, сильной активностью II афферентов, умеренной – Ia афферентов и слабой – Ib афферентов экстензора стопы.

Самым слабым афферентным притоком при скоростном локомоторном движении оказался приток от волокон Ia мышц-антагонистов голени обеих конечностей. Как показали многие исследования [4, 10, 33], при увеличении скорости локомоторных движений и во время бега неперенным атрибутом является повышение электрической активности скелетных мышц голени и фазозависимая модуляция Н-рефлекса мышц-синергистов голени (камбаловидная и икроножная), причем модуляция моно-синаптического рефлекса упомянутых мышц осуществляется синхронно изменению ЭМГ-активности мышц в течение цикла ходьбы и бега. Сенсорные входы афферентов Ia являются важнейшими в контроле произвольных и локомоторных движений. Активность Ia афферентов от мышц-антагонистов голени во время ходьбы и бега связана с непосредственным участием системы пресинаптического торможения. Эти данные хорошо согласуются с результатами Mummidisetty с соавт. [34], которые показали, что при стимуляции низкопороговых Ia афферентов правого сгибателя стопы во время ходьбы длиннолатентное пресинаптическое торможение (D_2 -торможение) усиливается при опоре на пятку, затормаживая активность α -мотонейронов разгибателя стопы, но снижается в поздней фазе опоры и начальной фазе переноса конечности. При беговом шаге, как указывают ранние исследования Capaday и Stein [10], активация электрической стимуляцией афферентных волокон Ia TA подавляет возбудимость мотонейронного пула вследствие усиления функциональной активности пресинаптического торможения Ia терминалей, проецирующих на мотонейроны камбаловидной мышцы. Следовательно, полученные нами данные, свидетельствующие о слабой импульсной активности Ia афферентов в цикле скоростного бегового шага, позволяют предположить, что пресинаптическое торможение может быть первым фактором в регуляции афферентной активности скоростных локомоторных движений. По-видимому, для выяснения этого предположения принципиальное значение имеет последующее изучение особенностей пресинаптического тормозного обеспечения флексоров и экстензоров при скоростных циклических движениях.

Следует отметить, что в сложных процессах регуляции локомоторных движений участвует спинальный координатор – дисинаптическое реципрокное торможение, реализуемое волокнами Ia через тормозной интернейрон Ia. Отметим, что регуляция реципрокных отношений (или торможения) в спинальных центрах мышц-антагонистов осуществляется непосредственно с участием пресинаптического торможения и супраспинальных влияний. О функциональной активности реципрокного тормозного механизма можно косвенно судить по коэффициенту реципрокности мышц-антагонистов. Результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что при скоростном беге реципрокность гомонимных мышц-антагонистов голени фазозависима и сопровождается ее повышением в фазу переноса правой конечности и опорный период левой конечности. Исследования других авторов подтверждают наличие фазозависимых реципрокных отношений гомонимных мышц-антагонистов при нормальной ходьбе [34]. При коротколатентной стимуляции афферентов Ia флексора стопы установлена фазозависимая модуляция реципрокного торможения гомонимных α -мотонейронов экстензора стопы при ходьбе, сопровождающаяся его уменьшением в середине фазы переноса конечности, но усилением – в ее поздней фазе, а также на протяжении всей фазы переноса. Другие авторы [35] свидетельствуют, что коротколатентная стимуляция афферентов Ia флексора правой конечности во время медленной ходьбы повышает активность тормозных интернейронов Ia реципрокного гомонимного торможения экстензора стопы, при этом с увеличением темпа ходьбы выраженность реципрокного торможения α -мотонейронов гомонимной мышцы-экстензора возрастает.

Проведенные нами исследования также показывают, что кроме внутримышечной афферентации мышц-антагонистов голени, скоростным локомоторным движениям свойственна межмышечная афферентация мышц-антагонистов голени, которой присуща разнонаправленная импульсная активность первичных и вторичных волокон в обеспечении скоростного бегового движения в разные фазы движения. Такая разнонаправленная межмышечная афферентация, вероятно, необходима не только для активации возбуждающих и тормозных интернейронов, но и для осуществления разнообразных коррекций на спинальном уровне и в структурах головного мозга. В отличие от скоростного бега, как показано нами ранее [9], межмышечное афферентное обеспечение при локомоции по подвижной ленте тредбана сопровождалось сильной импульсной активностью афферентов I (Ia и Ib) и II групп экстензора стопы и ослаблением афферентной активности флексора стопы. На основе известных феноменов, связанных с взаимодействием различных афферентных входов на нейрональный аппарат мышц-антагонистов и синергистов, авторы полагают, что во время ходьбы афференты групп I и II мышцы-экстензора подвергаются на премотонейронном уровне спинного мозга большим тормозным влияниям на интернейрональный аппарат спинного мозга со стороны афферентных каналов мышцы-флексора, вероятнее всего, с помощью систем пресинаптического и реципрокного торможения [9].

Кроме того, афферентные влияния наиболее выражены в те фазы скоростного движения, когда отмечается наибольшая ЭМГ-активность мышц. Так, в фазе опоры бегового шага наиболее активны афференты Ia, Ib, II правого флексора стопы и левого экстензора стопы и, соответственно, их ЭМГ-активность, а в фазе переноса – левого флексора стопы и правого экстензора стопы и их ЭМГ-активность. Роль афферентных влияний заметно снижается в фазы низкоамплитудной ЭМГ-активности мышц-антагонистов голени.

Обнаруженные нами перекрестные явления в афферентной активности, вероятно, обусловлены афферентным перекрестным торможением через комиссуральные интернейроны спинного мозга при альтернирующей активации билатеральных флексоров и экстензоров в фазы опоры и переноса конечностей. Коротколатентные перекрестные тормозные пути афферентов группы I и II к экстензорам голени билатеральных конечностей у человека обнаружены сравнительно недавно [19, 36]. Авторы показали, что

электрическая кондиционирующая стимуляция Ia афферентов ипсилатерального большеберцового нерва, иннервирующего камбаловидную мышцу ипсилатеральной конечности, наносимая за 37–41 мс до тестирующего раздражения, вызывает снижение ЭМГ-активности (или Н-рефлекса) камбаловидной мышцы контралатеральной конечности во время выполнения слабого по величине изометрического сокращения (10–20% от максимального произвольного сокращения), сидя и при ходьбе [36]. Предполагают, что возможным механизмом перекрестного торможения спинальных α -мотонейронов камбаловидной мышцы контралатеральной конечности является коротколатентное дисинаптическое реципрокное торможение, опосредованное активацией Ia афферентов гомологичной мышцы ипсилатеральной конечности через комиссуральные интернейроны на тормозные интернейроны Ia реципрокного торможения [37]. Перекрестный эффект кожных афферентов II при стимуляции тыльной поверхности контралатеральной стопы облегчает α -мотонейроны камбаловидной мышцы ипсилатеральной конечности в положении стоя и подавляет в начале опорной фазы постановки конечности, поздних фазах опоры и переноса [20, 23]. Современные электрофизиологические данные показывают, что комиссуральные интернейроны как группы I, так и II участвуют в перекрестных сгибательных рефlekсах мышц голени у человека [22, 24, 38], а их функциональная активность подавляется нисходящими сигналами, активируемыми транскраниальной магнитной стимуляцией первичной моторной коры или во время локомоторного движения [22, 39, 40].

С точки зрения существующей концептуальной двухуровневой нейронной модели ЦГП [3, 5, 6] и известных взаимодействий различных проприорецептивных афферентных входов на интернейрональный аппарат спинного мозга [3, 4, 7] можно предположить, что в реализации сложнокоординированных скоростных движений в разные их фазы конвергенция афферентных потоков от билатеральных мышц флексоров и экстензоров модулирует спинальные интернейроны, α -, γ -мотонейроны и ЦГП, обеспечивая тем самым реципрокные взаимоотношения мышц-антагонистов. Характерный локомоторный паттерн скоростных движений подвержен нисходящим тоническим (кортикоспинальный тракт) и фазическим (или циклическим) (ретикуло- и вестибуло-спинальные тракты) влияниям от коры головного мозга, мозжечка, ядер ствола мозга, ретикулярной формации, оказывающим возбуждающие и тормозные влияния, адресованные интернейронам и мотонейронам моно-, поли- и олигосинаптических рефлекторных дуг спинного мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы, написание и редактирование манускрипта (А. А. Ч.), организация и участие в проведении экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, обработка данных (М. Г. Б.), анализ полученных данных, обработка данных (Д. А. Г.), идея работы, общее руководство и планирование эксперимента (Р. М. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Великолукской государственной академии физической культуры и спорта. 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 Великолукской государственной академии физической культуры и спорта, протокол № 4 от 7 ноября 2022 г. Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pearson KG* (2004) Generating the walking gait: role of sensory feedback. *Prog Brain Res* 143: 123–129.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)43012-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)43012-4)
2. *Cappellini G, Ivanenko YP, Poppele RE, Lacquaniti F* (2006) Motor patterns in human walking and running. *J Neurophysiol* 95(6): 3426–3437.
<https://doi.org/10.1152/jn.00081.2006>
3. *Rybak IA, Stecina K, Shevtsova NA, McCrear DA* (2006) Modelling spinal circuitry involved in locomotor pattern generation: insights from the effects of afferent stimulation. *J Physiol* 577(Pt 2): 641–658.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118711>
4. *Pierrot-Deseilligny E, Burke D* (2012) *The Circuitry of the Human Spinal Cord: Spinal and Corticospinal Mechanisms of Movement*. United States: Cambridge Univer Press.
5. *Rybak IA, Dougherty KJ, Shevtsova NA* (2015) Organization of the Mammalian Locomotor CPG: Review of Computational Model and Circuit Architectures Based on Genetically Identified Spinal Interneurons(1,2,3). *eNeuro* 2(5): ENEURO.0069-15.2015.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0069-15.2015>
6. *Dubuc R, Cabelguen JM, Ryczko D* (2023) Locomotor pattern generation and descending control: a historical perspective. *J Neurophysiol* 130(2): 401–416.
<https://doi.org/10.1152/jn.00204.2023>
7. *Pleshchinskii IN, Alekseeva NL* (1996) Spinal cord: afferent interactions. *Hum Physiol* 22(1): 123–130.
8. *Stachowski NJ, Dougherty KJ* (2021) Spinal Inhibitory Interneurons: Gatekeepers of Sensorimotor Pathways. *Int J Mol Sci* 22(5): 2667.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052667>
9. *Gladchenko DA, Alekseeva IV, Chelnokov AA, Barkanov MG* (2024) Modeling of Impulse Activity of Afferent Fibers of Antagonist Muscles during Transcutaneous Electrical Stimulation of the Spinal Cord During Walking. *Hum Physiol* 50: 25–34.
<https://doi.org/10.1134/S0362119723600091>
10. *Capaday C, Stein RB* (1987) Difference in the amplitude of the human soleus H reflex during walking and running. *J Physiol* 392: 513–522.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016794>
11. *Simonsen EB, Dyhre-Poulsen P* (1999) Amplitude of the human soleus H reflex during walking and running. *J Physiol* 515 (Pt 3): 929–939.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.929ab.x>
12. *Stephens MJ, Yang JF* (1996) Short latency, non-reciprocal group I inhibition is reduced during the stance phase of walking in humans. *Brain Res* 743(1-2): 24–31.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)00977-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)00977-8)

13. *Faist M, Hoefer C, Hodapp M, Dietz V, Berger W, Duysens J* (2006) In humans Ib facilitation depends on locomotion while suppression of Ib inhibition requires loading. *Brain Res* 1076(1): 87–92.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.069>
14. *Grey MJ, Nielsen JB, Mazzaro N, Sinkjaer T* (2007) Positive force feedback in human walking. *J Physiol* 581(Pt 1): 99–105.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130088>
15. *Duysens J, Tax AA, Trippel M, Dietz V* (1992) Phase-dependent reversal of reflexly induced movements during human gait. *Exp Brain Res* 90(2): 404–414.
<https://doi.org/10.1007/BF00227255>
16. *Duysens J, Tax AA, Nawijn S, Berger W, Prokop T, Altenmüller E* (1995) Gating of sensation and evoked potentials following foot stimulation during human gait. *Exp Brain* 105(3): 423–431.
<https://doi.org/10.1007/BF00233042>
17. *Selverston AI* (2010) Invertebrate central pattern generator circuits. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1551): 2329–2345.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0270>
18. *Grillner S, El Manira A* (2020) Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion. *Physiol Rev* 100(1): 271–320.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2019>
19. *Stubbs PW, Mrachacz-Kersting N* (2009) Short-latency crossed inhibitory responses in the human soleus muscle. *J Neurophysiol* 102(6): 3596–3605.
<https://doi.org/10.1152/jn.00667.2009>
20. *Stubbs PW, Nielsen JF, Sinkjaer T, Mrachacz-Kersting N* (2011) Phase modulation of the short-latency crossed spinal response in the human soleus muscle. *J Neurophysiol* 105(2): 503–511.
<https://doi.org/10.1152/jn.00786.2010>
21. *Stevenson AJ, Geertsens SS, Andersen JB, Sinkjaer T, Nielsen JB, Mrachacz-Kersting N* (2013) Interlimb communication to the knee flexors during walking in humans. *J Physiol* 591(19): 4921–4935.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257949>
22. *Hanna-Boutros B, Sangari S, Karasu A, Giboin LS, Marchand-Pauvert V* (2014) Task-related modulation of crossed spinal inhibition between human lower limbs. *J Neurophysiol* 111(9): 1865–1876.
<https://doi.org/10.1152/jn.00838.2013>
23. *Suzuki S, Nakajima T, Futatsubashi G, Mezzarane RA, Ohtsuka H, Ohki Y, Komiyama T* (2016) Phase-dependent reversal of the crossed conditioning effect on the soleus Hoffmann reflex from cutaneous afferents during walking in humans. *Exp Brain Res* 234(2): 617–626.
<https://doi.org/10.1007/s00221-015-4463-x>
24. *Gervasio S, Voigt M, Kersting UG, Farina D, Sinkjaer T, Mrachacz-Kersting N* (2017) Sensory Feedback in Interlimb Coordination: Contralateral Afferent Contribution to the Short-Latency Crossed Response during Human Walking. *PLoS One* 12(1): e0168557.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168557>
25. *Barkanov MG, Gorodnichev RM* (2022) Peculiarities of Induced Muscle Responses and Kinematic Parameters of High-Speed Locomotor Movements under Percutaneous Electrical Stimulation of Different Spinal Cord Areas. *Hum Physiol* 48: 526–534.
<https://doi.org/10.1134/S036211972204003X>
26. *Voigt M, Bojsen-Møller F, Simonsen EB, Dyhre-Poulsen P* (1995) The influence of tendon Young's modulus, dimensions and instantaneous moment arms on the efficiency of human movement. *J Biomech* 28(3): 281–291.
[https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)00071-b](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)00071-b)
27. *Voigt M, Simonsen EB, Dyhre-Poulsen P, Klausen K* (1995) Mechanical and muscular factors influencing the performance in maximal vertical jumping after different prestretch loads. *J Biomech* 28(3): 293–307.
[https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)00062-9](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)00062-9)
28. *Voigt M, Dyhre-Poulsen P, Simonsen EB* (1998) Modulation of short latency stretch reflexes during human hopping. *Acta Physiol Scand* 163(2): 181–194.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.00351.x>

29. Prochazka A, Gorassini M (1998) Ensemble firing of muscle afferents recorded during normal locomotion in cats. *J Physiol* 507 (Pt 1): 293–304.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.293bu.x>
30. Mileusnic MP, Loeb GE (2009) Force estimation from ensembles of Golgi tendon organs. *J Neural Eng* 6(3): 036001.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/6/3/036001>
31. Enoka RM (2015) *Neuromechanics of Human Movement*. Champaign, IL, United States.
32. Labrecque C, Belanger M (1994) The Effects of Low Intensity Cutaneous Stimulation on the H-Reflex Modulation during Static and Dynamic Cycling Movements. *Dept Kinaanthropol Soc Neurosci Abstr* 20(715): 7.
33. Витензон АС (1998) Закономерности нормальной и патологической ходьбы человека. М. ООО Зеркало-М. [Vitenzon AS (1998) Patterns of normal and pathological human walking. М. ООО Zerkalo-M. (In Russ)].
34. Mummidisetty CK, Smith AC, Knikou M (2013) Modulation of reciprocal and presynaptic inhibition during robotic-assisted stepping in humans. *Clin Neurophysiol* 124(3): 557–564.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.09.007>
35. Kido A, Tanaka N, Stein RB (2004) Spinal reciprocal inhibition in human locomotion. *J Appl Physiol* 96(5): 1969–1977.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01060.2003>
36. Stubbs PW, Nielsen JF, Sinkjaer T, Mrachacz-Kersting N (2011) Crossed spinal soleus muscle communication demonstrated by H-reflex conditioning. *Muscle Nerve* 43(6): 845–850.
<https://doi.org/10.1002/mus.21964>
37. Mrachacz-Kersting N, Geertsen SS, Stevenson AJ, Nielsen JB (2017) Convergence of ipsi- and contralateral muscle afferents on common interneurons mediating reciprocal inhibition of ankle plantarflexors in humans. *Exp Brain Res* 235(5): 1555–1564.
<https://doi.org/10.1007/s00221-016-4871-6>
38. Gervasio S, Farina D, Sinkjaer T, Mrachacz-Kersting N (2013) Crossed reflex reversal during human locomotion. *J Neurophysiol* 109(9): 2335–2344.
<https://doi.org/10.1152/jn.01086.2012>
39. Mrachacz-Kersting N, Gervasio S, Marchand-Pauvert V (2018) Evidence for a Supraspinal Contribution to the Human Crossed Reflex Response During Human Walking. *Front Hum Neurosci* 12: 260.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00260>
40. Hiraoka K (2021) Phase-Dependent Crossed Inhibition Mediating Coordination of Anti-phase Bilateral Rhythmic Movement: A Mini Review. *Front Hum Neurosci* 15: 668442.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.668442>

Peculiarities of Afferent Innervation of Antagonist Muscles of the Bilateral Lower Legs During High-Speed Locomotor Movements

A. A. Chelnokov^{a,*}, M. G. Barkanov^a, D. A. Gladchenko^a, and R. M. Gorodnichev^a

^aVelikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia

**e-mail: and-chelnokov@yandex.ru*

The article presents the specifics of intra-, intermuscular, and cross-manifestations of impulse activity of various groups of afferents (Ia, Ib, and II) of the antagonist muscles of the bilateral lower legs when performing high-speed locomotor movements. The study involved 9 male athletes specializing in short-distance running who performed a locomotor test – pushing a passive treadmill belt for 10 seconds at the fastest possible speed. Electromyograms of the antagonist muscles lower legs (m. tibialis anterior, m. gastrocnemius med.) were recorded during running, followed by its processing in the MatLab program and calculation of the impulse activity of primary and secondary afferents using mathematical model based on the prediction of the triggering of muscle spindles. It has been established that high-speed running is a cross intramuscular EMG pattern of tension of the antagonist muscles of the bilateral lower legs with a transition to their relaxation, which depends on the phase of movement. Such muscle innervation in the individual phases of a high-speed running step was manifested by effective intermuscular coordination of the flexor and extensor in the phases of stance and swing of the right leg, pronounced reciprocal relations of homonymous antagonistic muscles of the lower leg in the phases of swing of the right and stance of the left legs. Intramuscular proprioceptive afferentation of the antagonist muscles lower legs of high-speed movement is characterized by the manifestation of strong impulse activity of afferents Ib, moderate afferents II and weak Ia afferents of flexors and extensors of the of symmetrical legs. A phase-dependent modulation of the intermuscular afferentation of the primary and secondary fibers of the flexors and extensors of the bilateral lower legs in the phases of stance and swing of a high-speed running step is shown. The cross-interactions of afferent activity of homologous muscles of the bilateral lower legs in different phases of movement, characteristic of a high-speed running step, have been established. The identified features of intramuscular, intermuscular, and cross-limb afferent activity during running reflect their key role in regulating the inhibitory interneuron network of the spinal cord, which maintains targeted muscle contraction and modulates motor output parameters as a whole. The supposed reflex mechanisms of high-speed locomotor movements are discussed on the basis of well-known phenomena associated with the interaction of various afferent inputs to the spinal cord neuronal apparatus in the system of lower leg antagonist muscles.

Keywords: afferents, interneurons, spinal inhibition, muscles, central pattern generator, high-speed locomotor movements

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПОЛ И ВОЗРАСТ ВЛИЯЮТ НА ПИЩЕВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ
И АДАПТАЦИЮ К КРАТКОВРЕМЕННОМУ ПОТРЕБЛЕНИЮ
ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ “ВКУСНОЙ” ПИЩИ У МЫШЕЙ**

© 2025 г. Е. Н. Макарова^{1,*}, П. Е. Орлов¹, А. Ю. Казанцева¹, Т. В. Яковлева¹,
Н. М. Бажан¹

¹*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

**E-mail: maken@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 12.02.2025 г.

После доработки 29.05.2025 г.

Принята к публикации 02.06.2025 г.

В настоящее время частота возникновения тяжелых форм ожирения увеличивается среди молодых людей и зависит от пола. Развитию ожирения способствует потребление высококалорийной “вкусной” пищи, однако влияние возраста и пола на адаптацию к высококалорийным диетам изучено мало. Задачей исследования было изучение влияния пола и возраста на краткосрочную адаптацию к высококалорийной “вкусной” диете (ВД: стандартный корм, сало и сладкое печенье) в период от юности до зрелости у мышей. Самцов и самок мышей линии C57Bl/6J содержали на ВД в течение 2 недель, начиная с возраста 7 (юные), 17 (молодые) и 27 недель (взрослые). Оценивали потребление энергии, выбор пищи, морфометрические и биохимические параметры. Пол и возраст влияли на выбор пищи и все изучаемые параметры. От юного к молодому возрасту уровень фактора роста фибробластов 21 (FGF21 – Fibroblast Growth Factor 21) в крови снижался, а потребление печенья увеличивалось. ВД увеличивала массу белого жира и уровень глюкозы в крови и снижала толерантность к глюкозе у юных самок в большей степени, чем у юных самцов. У молодых мышей ВД не оказывала влияния на толерантность к глюкозе и уровень глюкозы в крови. У взрослых мышей ВД увеличивала массу тела, вызывала развитие гиперлептинемии, гипергликемии, гиперинсулинемии и снижение толерантности к глюкозе только у самцов и не влияла на эти показатели у самок. Таким образом, реакция на высококалорийную диету меняется с возрастом и по-разному в зависимости от пола: самцы более, чем самки, устойчивы к ВД в юности, и менее – в зрелости. Пол и возраст начала диеты являются важными факторами в патофизиологии ожирения.

Ключевые слова: мыши C57Bl, высококалорийная диета, возраст, пол, метаболическая адаптация, выбор пищи, фактор роста фибробластов

DOI: 10.7868/S2658655X25070101, **EDN:** MVWUSA

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине ожирение является одной из основных проблем, и все большее число молодых людей и детей страдают избыточной массой тела [1, 2]. Популяционные исследования показывают, что наряду с общим ростом заболеваемости

ожирением распространенность его тяжелых форм ($\text{ИМТ} > 30$) увеличивается больше у мужчин, чем у женщин, и в большей степени среди молодых людей, чем среди людей среднего и пожилого возраста [2, 3]. Кроме того, среди молодых людей (20–40 лет) растет заболеваемость диабетом, тогда как в старших возрастных группах – снижается [4]. Эти тенденции диктуют необходимость более глубокого изучения причин и механизмов, вызывающих ожирение в молодости и в среднем возрасте.

В качестве основной причины ожирения рассматривается избыточное потребление энергии в сочетании со снижением физической активности [5]. Широкая доступность пищевых продуктов позволяет формировать состав потребляемой пищи на основе вкусовых предпочтений, и предпочтение высококалорийных жирных и сладких продуктов способствует большему потреблению энергии и таким образом повышает риск развития ожирения [5, 6]. Не только общее потребление энергии, но и состав потребляемой пищи влияют на развитие ожирения и метаболический фенотип особей [7, 8], вследствие чего вкусовые предпочтения могут влиять на риск развития ожирения через состав и калорийность предпочитаемых продуктов. Показано, что самки, как правило, предпочитают сладкое в большей степени, чем самцы [9, 10], и эти предпочтения могут меняться с возрастом [10, 11]. Если выбор пищи зависит от пола и меняется с возрастом, это может привести к возрастным и половым различиям в частоте и скорости развития ожирения. Однако влияние пола и возраста на пищевые предпочтения при переходе от юности к зрелости остается недостаточно изученным.

Многочисленные исследования алиментарного ожирения на лабораторных моделях продемонстрировали, что развитие ожирения и связанные с ним метаболические нарушения зависят от возраста начала потребления высококалорийных диет и от пола животных. Если мышей начинали содержать на диете с высоким содержанием жира (ВЖД) в препубертатный период, самцы быстрее, чем самки, набирали массу и приобретали резистентность к инсулину [12–18]. Однако когда потребление ВЖД начиналось в период полового созревания (9 недель), и самцы, и самки реагировали одинаково, в то время как начало диеты во взрослом возрасте (32 недели) приводило к более быстрому набору массы и более выраженному снижению толерантности к глюкозе у самок по сравнению с самцами [19]. Можно предположить, что эти различия формируются в начале адаптации к высококалорийной диете, поскольку метаболический ответ на начальных стадиях потребления ВЖД определяет темпы развития алиментарного ожирения и его выраженность в дальнейшем. Показано, что у изогенных мышей степень ожирения, вызванного ВЖД, пропорциональна набору массы тела в течение первой недели содержания на диете [20]. Возможно, метаболический ответ на начальных этапах потребления высококалорийной пищи зависит от пола животных, и половые различия по-разному проявляются в разном возрасте. Однако влияние пола и возраста на адаптацию к высококалорийной пище на начальных этапах ее потребления изучалось мало.

Адаптация к потреблению высококалорийной пищи наряду с перестройками в метаболизме жиров и углеводов [20–22] включает в себя гормональный контроль за количеством и нутриентным составом потребляемой пищи. В ответ на поступление высококалорийной сладкой и жирной пищи возрастают уровни гормона жировой ткани лептина [23] и гормона печени FGF21 в крови [24]. Лептин снижает аппетит [23], а FGF21 снижает тягу к сладкому [24] и повышает тягу к сбалансированной диете [25]. Неизвестно, зависит ли ответ этих гормонов на поступление высококалорийной пищи от возраста и пола особей.

Мыши линии C57Bl склонны к развитию ожирения, индуцированного диетой, и широко используются в качестве лабораторной модели алиментарного ожирения. Согласно физиологическим оценкам, у мышей юный возраст 7–8 недель (возраст полового созревания) соответствует возрасту 13–14 лет у человека, а возраст в 6 месяцев соответствует зрелому (middle adult) возрасту у человека [26]. В моделях

на животных диета со свободным выбором жирных и сладких компонентов наилучшим образом имитирует ситуацию с потреблением “вкусной” пищи, вызывающей ожирение у людей [27], и позволяет оценивать вкусовые предпочтения в контролируемых условиях.

Целью данного исследования явилось изучение влияния пола и возраста на краткосрочную адаптацию к высококалорийной диете в возрастном интервале от юности до зрелости у мышей линии C57Bl/6J. В работе оценивали выбор пищи, а также гормональные и метаболические реакции на двухнедельное потребление высококалорийной “вкусной” (сладкой и жирной) пищи у самцов и самок мышей разного возраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента

Эксперименты проводили на самцах ($n = 54$) и самках ($n = 54$) мышей линии C57Bl/6J в виварии Института цитологии и генетики, г. Новосибирск, Россия. Животные содержали при 12-часовом световом дне со свободным доступом к воде и пище. После отъема от матерей в возрасте 4–5 недель мышей помещали по 3 особи в клетку. Все мыши были случайным образом разделены на три возрастные группы. Начиная с возраста 7 (юные), 17 (молодые) и 27 (взрослые) недель, 9 самок из трех клеток и 9 самцов из трех клеток продолжали получать стандартный гранулированный корм (стандартная диета, СД), а 9 самцов из трех клеток и 9 самок из трех клеток начинали получать свиное сало и сладкое печенье в дополнение к стандартному корму (“вкусная” диета, ВД) в течение двух недель.

Стандартный корм, печенье и сало заменяли три раза в неделю. Количество съеденных стандартных гранул, сала и печенья подсчитывали как разницу между весом свежей порции и тем, что оставалось от этой порции перед заменой. Подсчитывали вес стандартного корма, сала и печенья, съеденных мышами в каждой клетке в течение 2 недель. Для каждой клетки рассчитывали удельное потребление энергии как общее количество потребленной энергии, отнесенное к общему весу мышей в данной клетке. Для мышей, получавших ВД, рассчитывали энергию, потребленную с каждым видом пищи, как процент от общего количества потребленной энергии. Клетка была экспериментальной единицей, когда анализировалось потребление энергии и выбор пищи. После 2 недель эксперимента мыши были подвергнуты тесту на толерантность к глюкозе (ТТГ), а затем умерщвлены путем декапитации через два дня после теста. Образцы крови собирали в пробирки с ЭДТА, помещали на лед, центрифугировали, затем плазму от каждой мыши расфасовывали по нескольким пробиркам и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до измерения биохимических показателей. Массу печени, межлопаточной бурой жировой ткани, подкожной и брюшной белой жировой ткани измеряли, а затем массу белого жира из разных депо суммировали. Мышь была экспериментальной единицей для морфометрического анализа, а образец плазмы был экспериментальной единицей для биохимических анализов.

Тест на толерантность к глюкозе (ТТГ)

Мышей лишали пищи с утра на 6 ч, затем внутрибрюшинно вводили глюкозу в дозе 1 г/кг. Концентрацию глюкозы в крови хвостовой вены определяли с помощью глюкометра (One Touch Select Plus) перед инъекцией (0 мин), а затем через 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции глюкозы. Для каждой мыши строили график изменения концентраций глюкозы в течение теста по пяти точкам в программе OriginLab 2015 и определяли площади под кривой с помощью этой программы.

Рационы

Стандартный корм был приобретен в BioPro, Новосибирск, Россия. Состав: двух-компонентная зерновая смесь, молочные компоненты, высокобелковые компоненты (растительные и животные белки), растительное масло, аминокислоты, органические кислоты, витаминно-минеральный комплекс и клетчатка. Сырой белок – 22%. Энергетическая ценность – 250 ккал/100 г. Свиное сало и печень были куплены в продуктовом магазине. Состав печени (г/100 г): белки – 6.9, жиры – 18.4, углеводы – 71.8. Энергетическая ценность – 458 ккал/100 г. Сало (подкожный жир): белки – 1.8, жиры – 94.2, углеводы – 0. Энергетическая ценность – 800 ккал/100 г.

Биохимические показатели плазмы крови

Концентрации инсулина и лептина измеряли с помощью наборов Rat/Mouse Insulin ELISA Kit и Mouse Leptin ELISA Kit (EMD Millipore, St. Charles, MO, США), концентрации FGF21 – с помощью набора Mouse/Rat FGF-21 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Inc., США) согласно инструкции к набору. Концентрации глюкозы, триглицеридов и холестерина измеряли колориметрически с использованием Fluitest GLU, Fluitest TG и Fluitest CHOL (Analyticon® Biotechnologies AG Am Mühlenberg 10, 35, 104 Lichtenfels, Германия) соответственно, согласно рекомендациям производителей.

Статистический анализ

Данные анализировали с помощью программы STATISTICA 10.0. Описательная статистика использовалась для определения средних значений и стандартной ошибки (*SE*) среднего значения. Удельное потребление энергии и долю энергии, потребляемой с различными компонентами ВД, анализировали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (*U*-test) для парных сравнений независимых групп при $n = 3$ в каждой группе. Вне зависимости от возраста оценивали влияние пола на удельное потребление энергии на ВД и СД по отдельности и на вкусовые предпочтения с помощью критерия Манна – Уитни при $n = 9$ в каждой группе. Данные по массе тела и органов при $n = 9$ для каждой группы, данные по биохимическим параметрам, концентрациям инсулина и лептина, площадей под кривой в ТТГ при $n = 6$ или 7 в каждой группе проверяли на соответствие нормальному распределению с помощью критериев Колмогорова – Смирнова и Лиллиефорса и затем анализировали сначала с помощью 3-way ANOVA с факторами “пол” (самцы, самки), “диета” (СД, ВД) и “возраст” (начало диеты – 7, 17, 27 недель), а затем отдельно для каждого возраста с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” и “диета”. Концентрации FGF21 измеряли только у мышей, потреблявших ВД, и анализировали с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” и “возраст”. Для оценки парных различий между группами использовали апостериорный тест Tukey HSD. Подсчитывали коэффициент корреляции Спирмана *R* между массой белого жира и уровнем лептина в плазме крови для всей выборки вне зависимости от пола и потребляемой пищи. Данные представлены как среднее значение $\pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Потребление энергии и пищевые предпочтения

Поскольку самцы и самки мышей линии C57Bl/6J различались по массе, и мыши из разных возрастных групп тоже различались по массе, для анализа влияния возраста и пола на потребление энергии использовали отношение потребленной энергии к массе тела (удельное потребление энергии). Удельное потребление энергии зависело от возраста (рис. 1): у юных мышей обоего пола оно было выше, чем у мышей более

старшего возраста, независимо от диеты. Молодые и взрослые мыши по этому параметру не различались. Потребление ВД значительно увеличивало удельное потребление энергии во всех возрастах. Влияние пола на этот показатель зависело от диеты: на стандартной диете удельное потребление энергии было одинаковым у самцов и самок: 5.2 ± 0.3 ($n = 9$) и 5.4 ± 0.3 ($n = 9$), самцы и самки соответственно, на “вкусной” диете оно было выше у самок, чем у самцов: 7.1 ± 0.3 ($n = 9$) и 8.4 ± 0.3 ($n = 9$), самцы и самки соответственно, $p < 0.05$, U-тест Манна – Уитни.

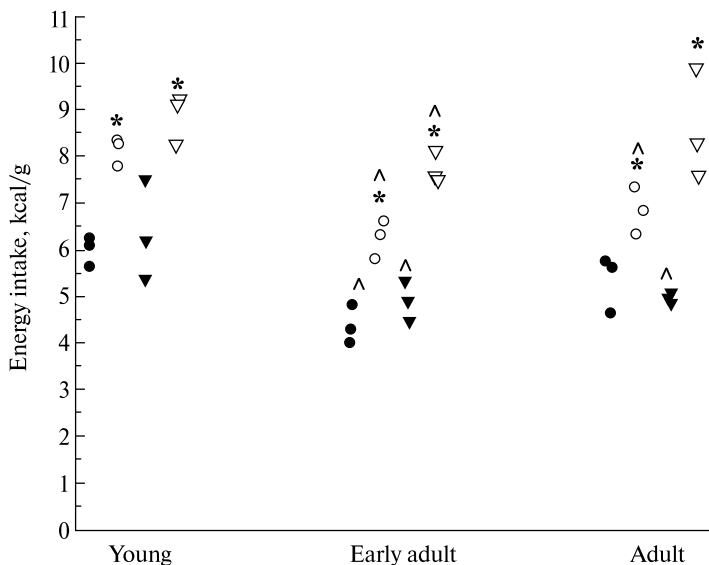


Рис. 1. Отношение потребленной энергии к массе тела (удельное потребление энергии) у самцов и самок мышей, получавших стандартную (SD) или высококалорийную “вкусную” (PD) диету в течение двух недель в юном (young), молодом (early adult) и зрелом (adult) возрастах. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SE. * – $p < 0.05$, ВД против СД, ^ – $p < 0.05$, юные (young) против молодых (early adult) и взрослых (adult), U-тест Манна – Уитни.

Вкусовые предпочтения зависели от пола и менялись с возрастом. Самцы в большей, чем самки, степени предпочитали стандартный корм: $22.6 \pm 1.7\%$ ($n = 9$) и $15.5 \pm 2.1\%$ ($n = 9$), самцы и самки соответственно, $p < 0.05$, U-тест Манна – Уитни и в меньшей степени – печенье $42.5 \pm 2.1\%$ ($n = 9$) и $54.3 \pm 4.6\%$ ($n = 9$), самцы и самки соответственно, $p < 0.05$, U-тест Манна – Уитни. У мышей обоего пола вклад печенья в общее потребление энергии возрастал от юного к молодому возрасту (рис. 2) и затем не менялся. При этом у самок от юного к молодому возрасту снижался вклад стандартного корма, а у самцов – сала.

Характеристики массы тела

В течение периода исследования мыши продолжали расти, и масса тела у самок была значительно меньше, чем у самцов (рис. 3а). Влияние ВД наблюдалось только у взрослых мышей и только у самцов: взрослые самцы, получавшие ВД, обладали большей массой тела, чем те, что потребляли СД (рис. 3а).

Влияние диеты на прирост массы тела было различным у самцов и самок разного возраста (рис. 3б). У самок ВД увеличивала прирост массы тела только в группе юных мышей ($p = 0.05$, Tukey HSD, 2-way ANOVA с факторами “пол” и “диета”) и не влияла

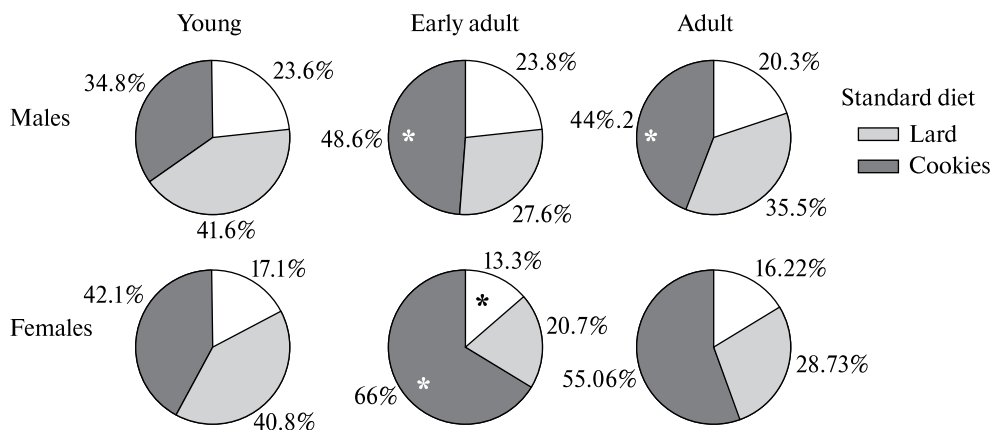


Рис. 2. Вклад компонентов диеты (стандартный гранулированный корм (standard diet), сало (lard), печенье (cookies)) в общее потребление энергии у самцов и самок мышей юного (young), молодого (early adult) и зрелого (adult) возрастов. Данные представлены как среднее из трех значений. * – $p < 0.05$, юные (young) против молодых (early adult) и взрослых (adult), U-тест Манна – Уитни.

на прирост массы тела в более старших возрастах. У самцов, наоборот, ВД не влияла на рост в группе юных мышей и значительно увеличивала прирост массы у молодых и взрослых мышей (рис. 3b).

Влияние диеты на массу тела, вероятно, было связано с ее влиянием на накопление белого жира, поскольку диета не влияла на мышечную массу ни у самцов, ни у самок (данные не показаны). На стандартной диете относительная масса белого жира не зависела от возраста и была выше у самок, чем у самцов (СД, 2-way ANOVA, “пол” $p < 0.001$ *), половые различия в относительной массе белого жира достигали статистической значимости у взрослых мышей ($p < 0.001$, Tukey HSD). “Вкусная” диета увеличивала относительную массу белого жира у мышей обоих полов, но по-разному в зависимости от возраста. У самок ВД достоверно увеличивала относительную массу белого жира только у юном возрасте (рис. 3с), а у самцов – в молодом и зрелом возрасте (рис. 3с).

При использовании стандартной диеты относительная масса бурого жира не зависела от возраста и пола мышей (рис. 3d). “Вкусная” диета стимулировала накопление бурого жира, однако по-разному в зависимости от пола и возраста (ВД, “пол”, “возраст” $p < 0.01$, “пол” * “возраст” $p < 0.05$, 2-way ANOVA). ВД значительно увеличивала количество бурого жира у молодых и взрослых самцов и только у молодых самок, но в меньшей степени, чем у самцов. В результате относительная масса бурого жира у молодых и зрелых мышей, потреблявших ВД, была выше у самцов, чем у самок (рис. 3d).

При использовании стандартной диеты относительная масса печени не зависела от возраста и была ниже у самок, чем у самцов (СД, $p < 0.001$ *, “пол”, 2-way ANOVA), половые различия достигали статистической значимости в группе юных мышей ($p < 0.05$, Tukey HSD). “Вкусная” диета противоположным образом влияла на относительную массу печени в зависимости от пола: увеличивала относительную массу печени у юных самок и уменьшала этот показатель у молодых и зрелых самцов (рис. 4а). В результате при использовании ВД в группе молодых мышей относительная масса печени у самок значительно превышала таковую у самцов (рис. 4а).

Содержание триглицеридов (ТГ) в печени

При использовании СД содержание ТГ в печени не зависело от возраста и было выше у самок, чем у самцов (СД, $p < 0.001$, “пол”, 2-way ANOVA), хотя значимых

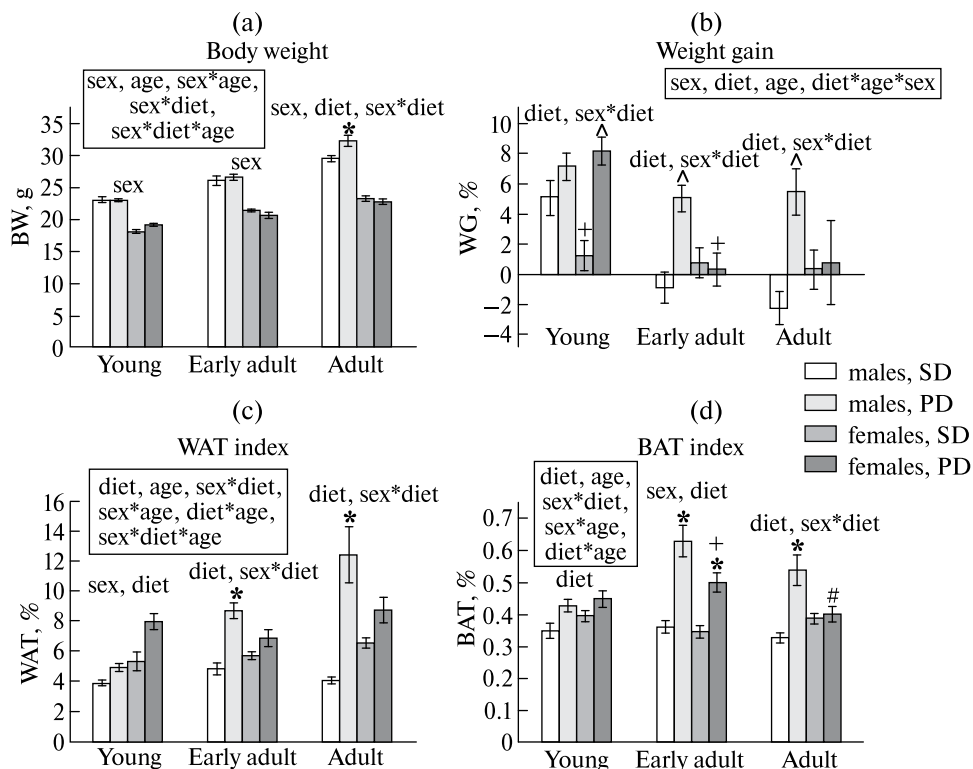


Рис. 3. Влияние ВД на массу тела (а), прирост массы тела (б) и относительную массу белого жира (с) и бурого жира (д) у самцов и самок мышей в юном (young), молодом (early adult) и зрелом (adult) возрастах. Данные были проанализированы с помощью 3-way ANOVA с факторами “пол” (sex), “диета” (diet) и “возраст” (age), факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на плашке с тенью. Кроме того, данные были проанализированы отдельно для каждого возраста с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” и “диета”, факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на рисунке для каждого возраста. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SE. SD – стандартная диета (СД), PD – “вкусная” диета (ВД). * – $p < 0.05$, ВД против СД, # – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 3-way ANOVA, ^ – $p < 0.05$, ВД против СД, + – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 2-way ANOVA в разных возрастах.

межгрупповых различий не было. ВД оказывала повышающее действие на содержание ТГ в печени у юных мышей обоих полов без значимых межгрупповых различий, увеличивала содержание ТГ в печени только у самцов в группе молодых мышей и удваивала содержание ТГ в печени как у самцов, так и у самок в группе зрелого возраста (рис. 4б).

Приведенные выше результаты показывают, что при содержании на ВД накопление липидов в белом жире и печени увеличивалось с возрастом, но имело различную возрастную динамику в зависимости от пола. У самцов количество липидов прогрессивно возрастало, начиная с молодого возраста. У самок ВД вызывала накопление липидов у юных и зрелых мышей, а в молодом возрасте не влияла на этот показатель.

Гормональные и метаболические параметры крови

Уровни ТГ в плазме крови менялись с возрастом, но по-разному в зависимости от пола (рис. 4с). У самцов ТГ независимо от диеты увеличивались от юного к молодому возрасту (самцы, “возраст”, $p < 0.001$, 2-way ANOVA), тогда как у самок в этом

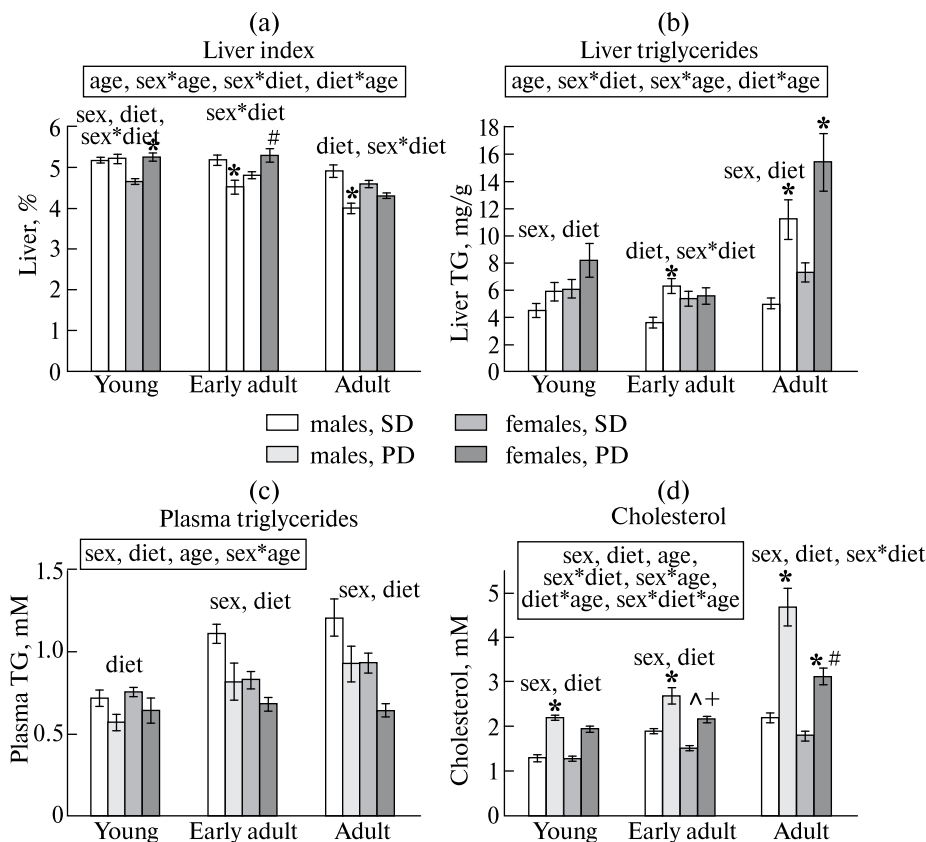


Рис. 4. Влияние ВД на относительную массу печени (а), содержание триглицеридов в печени (б) и концентрацию триглицеридов (с) и холестерина в плазме (д) у самцов и самок мышей в юном (young), молодом (early adult) и зрелом (adult) возрастах. Данные были проанализированы с помощью 3-way ANOVA с факторами “пол” (sex), “диета” (diet) и “возраст” (age), факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на плашке с тенью. Кроме того, данные были проанализированы отдельно для каждого возраста с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” и “диета”, факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на рисунке для каждого возраста. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SE. SD – стандартная диета (СД), PD – “вкусная” диета (ВД).

* – $p < 0.05$, ВД против СД, # – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 3-way ANOVA, ^ – $p < 0.05$, ВД против СД, + – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 2-way ANOVA в разных возрастах.

возрастном интервале они существенно не менялись. ВД снижала уровни ТГ у мышей обоих полов во всех возрастах. У юных мышей не наблюдалось половых различий по ТГ, а у молодых и зрелых мышей ТГ у самцов были выше, чем у самок, независимо от диеты, хотя межгрупповые различия не достигали статистической значимости.

Подобно ТГ, при использовании СД уровни общего холестерина в плазме крови по-разному изменялись с возрастом в зависимости от пола: прогрессивно увеличивались у самцов и возрастали только в зрелом возрасте у самок (рис. 4д). Независимо от диеты, у самцов были более высокие уровни холестерина, чем у самок, за исключением молодых мышей на стандартной диете. Содержание на ВД увеличило уровень холестерина во всех возрастных группах. Это увеличение было значительно более выражено у зрелых мышей, чем в других возрастных группах. В группе взрослых мышей концентрации холестерина у самцов были выше, чем у самок (рис. 4д).

У сытых мышей, получавших СД, концентрации глюкозы в плазме крови не зависели от возраста. Содержание на ВД оказывало влияние на уровень глюкозы в сытом состоянии, но ответ зависел от возраста (рис. 5а). Как у самцов, так и у самок ВД повышала уровень глюкозы в плазме в группе юных и взрослых мышей и не оказывала влияния на этот показатель в группе молодых мышей (рис. 5а).

При содержании на СД уровни инсулина в плазме крови сытых мышей не зависели от возраста (рис. 5б). Реакция на потребление ВД зависела от пола мышей. У самок ни возраст, ни диета не влияли на уровень инсулина в плазме. У самцов потребление ВД постепенно увеличивало уровень инсулина с возрастом (самцы, $p < 0.05$, возраст, $p < 0.05$, диета, 2-way ANOVA). В результате у зрелых мышей уровни инсулина у самцов, потреблявших ВД, были выше, чем у контрольных самцов, и выше, чем у самок.

Уровни глюкозы натощак также увеличивались при потреблении ВД (рис. 5с). Пол по-разному влиял на уровни глюкозы натощак в разных возрастных группах. У самок ВД увеличивала уровень глюкозы натощак только в молодом возрасте и не оказала никакого влияния на этот показатель в более старшем возрасте. У самцов, напротив, потребление ВД значительно увеличивало уровень глюкозы натощак только в группе взрослых мышей. При использовании ВД у зрелых самцов уровень глюкозы был выше, чем у самок и контрольных самцов.

Толерантность к глюкозе и влияние ВД на этот показатель зависели от пола животных, но эта зависимость по-разному проявлялась в разном возрасте, о чем свидетельствует достоверное взаимодействие факторов “пол” * “возраст” (рис. 5d, e). Двух-факторный дисперсионный анализ с факторами “пол” и “диета” в разных возрастных группах показал, что у юных мышей площади под кривой были ниже у самок, чем у самцов. В этой возрастной группе потребление ВД увеличивало площади под кривой, но только у самок это увеличение достигало статистически значимых величин (рис. 5е). У молодых мышей ни пол, ни диета не оказывали влияния на толерантность к глюкозе. У взрослых мышей ВД увеличивала площади под кривой, и этот эффект был более выражен у самцов, о чем свидетельствует достоверное взаимодействие факторов “пол” * “диета”. При содержании на ВД площади под кривой у взрослых самцов были выше, чем у контрольных самцов, и выше, чем у самок (рис. 5е).

Концентрации FGF21 в плазме крови определяли только в тех группах, которых содержали на ВД, так как в стандартных условиях уровень FGF21 в крови очень низок. При использовании ВД уровни FGF21 в плазме крови были одинаковыми у самцов и самок и зависели от возраста. Уровень FGF21 был самым высоким у юных мышей, затем снижался и не различался у молодых и зрелых мышей (рис. 6а).

Содержание на ВД увеличивало уровни лептина в плазме крови, но по-разному в зависимости от пола и возраста (рис. 6б). ВД увеличивала уровни лептина у юных самок, а также у молодых и зрелых самцов (рис. 6б). Изменения уровня лептина в крови соответствовали изменениям в массе белого жира, коэффициент корреляции между массой белого жира и значениями концентраций лептина составил $R = 0.93$ ($n = 75$), $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы впервые оценили, влияет ли возраст в период от пубертации до зрелости на начальный метаболический ответ, вызванный потреблением сладкой и жирной “вкусной” пищи, у мышей разного пола. В литературе имеются сведения об оценке реакции на начальное потребление диеты, индуцирующей ожирение, в старости по сравнению с юностью [28], но систематических исследований этого вопроса мы не обнаружили. В этом исследовании мы оценивали ответ на краткосрочное потребление сладкой и жирной пищи (стандартный корм, свиное сало и сладкое печенье)

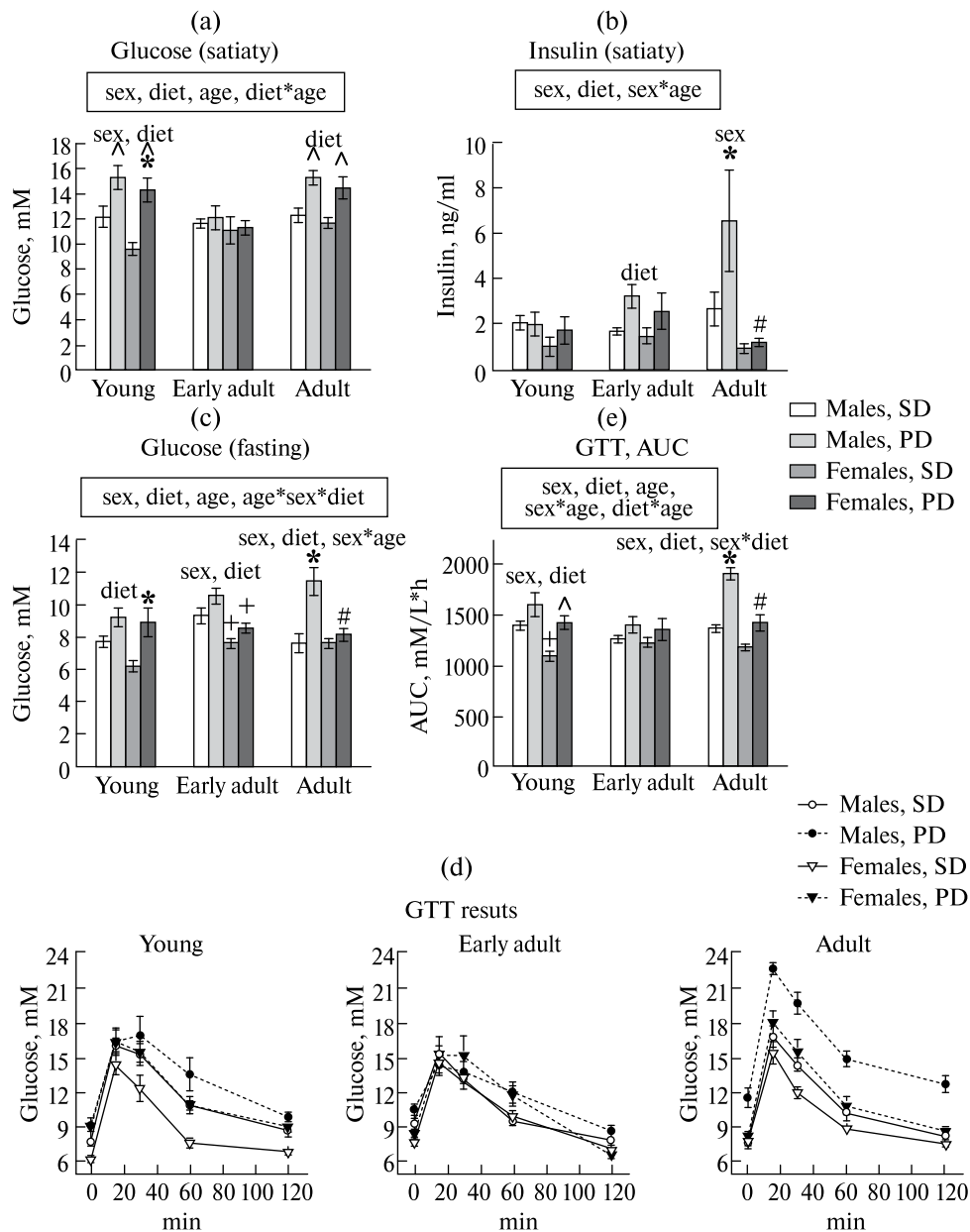


Рис. 5. Влияние ВД на уровни глюкозы (а) и инсулина (б) в плазме крови у сытых мышей, уровни глюкозы в крови натощак (с), уровни глюкозы в крови (д) и площади под кривыми во время ТТГ (е) у самцов и самок мышей в юном (young), молодом (early adult) и зрелом (adult) возрастах. Данные (а, б, с, е) анализировали с помощью 3-way ANOVA с факторами “пол” (sex), “диета” (diet), “возраст” (age), факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на плашке с тенью. Кроме того, данные анализировали для каждого возраста по отдельности с помощью 2-факторного ANOVA с факторами “пол” и “диета”, факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на рисунке для каждого возраста. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SE. SD – стандартная диета (СД), PD – “вкусная” диета (ВД). * – $p < 0.05$, ВД против СД, # – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 3-way ANOVA, ^ – $p < 0.05$, ВД против СД, + – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 2-way ANOVA в разных возрастах.

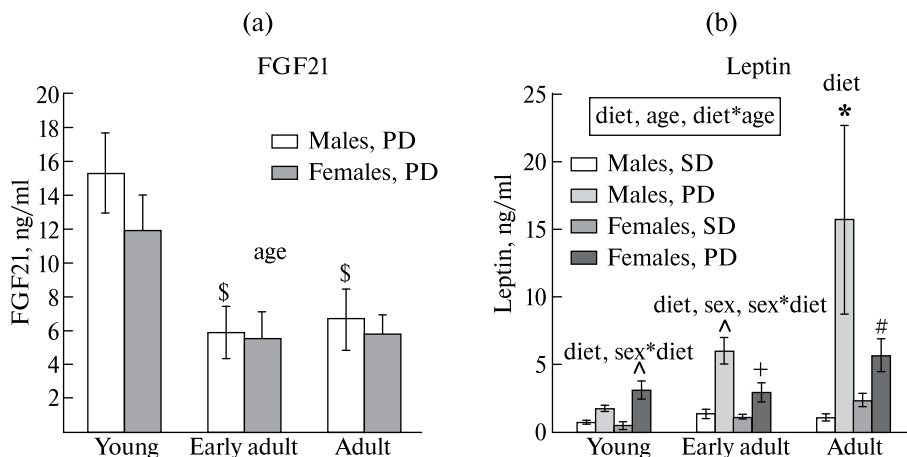


Рис. 6. Влияние ВД на концентрации FGF21 (а) и лептина (б) в плазме у самцов и самок мышей в юном (young), молодом (early adult) и зрелом (adult) возрастах. Данные по FGF21 анализировали только у животных, потреблявших ВД, с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” (sex) и “возраст” (age), факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на графике, $^{\$}$ – $p < 0.05$ против возраста 9 недель, Tukey HSD; данные по лептину анализировали с помощью 3-way ANOVA с факторами “пол”, “диета” (diet) и “возраст”, факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на плашке с тенью. Кроме того, данные анализировали по отдельности для каждого возраста с помощью 2-way ANOVA с факторами “пол” и “диета”, факторы, обладающие достоверным влиянием, указаны на рисунке для каждого возраста. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SE. SD – стандартная диета (СД), PD – “вкусная” диета (ВД). * – $p < 0.05$, ВД против СД, # – $p < 0.05$, самцы против самок, Tukey HSD, ^ – $p < 0.05$, ВД против СД, + – $p < 0.05$, самки против самцов, Tukey HSD для 2-way ANOVA в разных возрастах.

у мышей в трех возрастах – юном (период пубертации), молодом и зрелом по морфометрическим показателям и биохимическим параметрам крови, а также оценили выбор пищи в этих возрастах. Результаты показали, что возраст влияет на все исследованные показатели, причем влияние возраста по-разному проявляется у самцов и самок. Молекулярно-физиологические механизмы, лежащие в основе возрастных изменений метаболической реакции на потребление высококалорийной пищи, исследованы мало. На самцах мышей линии C57Bl/6J было показано, что микробиота кишечника на стандартной диете и изменение ее состава при потреблении ВЖД меняются от молодого (16 недель) к зрелому (26 недель) возрасту [29]. Такие изменения могут быть одной из причин влияния возраста на исследованные метаболические показатели, поскольку состав кишечной флоры оказывает значительное воздействие на обмен веществ и склонность к развитию ожирения [30]. Изучение кишечной флоры и ее влияния на адаптацию к высококалорийной пище в зависимости от пола и возраста особей является перспективной задачей в рамках исследуемой проблемы.

В представленной работе впервые показано, что устойчивость к возмущающему воздействию высококалорийной “вкусной” диеты на метаболизм зависит от возраста, но по-разному у самцов и самок. Самцы демонстрируют большую, чем самки, устойчивость в юном возрасте и меньшую – в зрелом возрасте. Молодой возраст и у самцов, и у самок характеризуется наибольшей устойчивостью по сравнению с более ранним и более поздним возрастом. Кратковременное потребление “вкусной” пищи сопровождалось увеличением массы белого и бурого жира, повышением уровней холестерина, лептина, инсулина и глюкозы в крови, снижением уровня триглицеридов в крови и нарушением толерантности к глюкозе. Молодой возраст характеризовался минимальным относительным потреблением энергии, наибольшим увеличением бурой жировой ткани, отсутствием роста уровня глюкозы в сытом состоянии, минимальным увеличением

уровня глюкозы натощак и отсутствием влияния диеты на толерантность к глюкозе. Интересно, что у молодых мышей самцы и самки не различались по толерантности к глюкозе, в отличие от юных и взрослых мышей. Предыдущие исследования показали, что у молодых животных метаболизм глюкозы сохраняется в пределах нормы даже при длительном потреблении высокожирной диеты [7, 12, 31].

В нашем исследовании способность поддерживать нормогликемию и толерантность к глюкозе у мышей на ВД в молодом возрасте (17–19 недель) была связана с максимальным приростом бурого жира. McGregor с соавт. [31] показали, что относительная масса бурой жировой ткани у самцов линии C57BL/6 значительно увеличивается к 17 неделям жизни как в контроле, так и при потреблении высокожирной диеты и после этого остается неизменной, что согласуется с нашими результатами. Активация бурого жира играет решающую роль в поддержании чувствительности к инсулину и снижении уровня глюкозы в крови [32]. Можно предположить, что выраженное увеличение массы бурой жировой ткани в ответ на потребление высококалорийной сладкой пищи в молодом возрасте способствует поддержанию нормального метаболизма глюкозы и предотвращает снижение чувствительности к инсулину.

Кроме того, у молодых мышей по сравнению с юными доля жира в потребляемой пище снизилась, а потребление углеводов увеличилось. Сравнение двух диет с различным содержанием жиров и углеводов показало, что диета с меньшим содержанием жиров и большим содержанием углеводов имела меньшее негативное влияние на чувствительность к инсулину у самцов, чем диета с большим содержанием жиров и меньшим содержанием углеводов [13]. Возможно, снижение доли жира и увеличение доли сладкого в потребляемой пище у молодых по сравнению с юными животных вносит вклад в большую устойчивость молодых животных по сравнению с юными к повреждающему действию ВД на метаболизм глюкозы. Однако роль возрастных изменений вкусовых предпочтений в метаболическом ответе на ВД требует дальнейшего изучения.

При длительном потреблении ВД самцы мышей [13–16, 33] и крысы [12] проявляют большую, чем самки, чувствительность к негативным эффектам диеты на метаболизм, но половые различия становятся очевидными только с возрастом. Наши результаты показывают, что краткосрочное содержание на ВД вызывает резистентность к инсулину (о чем свидетельствуют гипергликемия, гиперинсулинемия и снижение толерантности к глюкозе) только у взрослых самцов. Повышенная склонность к развитию алиментарного ожирения у взрослых самцов, по-видимому, связана с возрастными изменениями в регуляции метаболизма. Ранее мы показали, что у самцов, потреблявших стандартную диету, от молодого (15 недель) к зрелому (30 недель) возрасту снижается экспрессия гена *Cpt1* в мышцах, гена *Lipec* в белом жире и гена *Ucp1* в буром жире [34], что может отражать снижение темпов окисления жиров в мышцах, липолиза в белом жире и термогенеза в буром жире. У самок ВД не влияла на чувствительность к инсулину в молодом и зрелом возрастах. Устойчивость к неблагоприятным эффектам высококалорийной пищи у самок, вероятно, связана с действием эстрогенов [35–37]. Негативное влияние ВД на метаболизм глюкозы у самок наблюдалось только в период полового созревания, возможно, из-за незрелости систем, которые вырабатывают эстрогены и реагируют на эстрогенную стимуляцию в пубертатный период.

Изменение с возрастом половых различий в адаптации к кратковременному потреблению “вкусной” пищи, возможно, объясняет влияние возраста начала потребления ВД на половые различия в темпах развития алиментарного ожирения, описанные нами ранее [38]. В данной работе самки в юном возрасте демонстрировали меньшую резистентность к краткосрочному потреблению ВД по сравнению с самцами – в отличие от самцов, ВД вызывала у них прибавку в массе тела, увеличивала жировую массу и снижала толерантность к глюкозе. При ожирении, вызванном длительным потреблением ВД, начиная с юного возраста, самки демонстрировали менее адаптивный фенотип, чем самцы: у них было больше жира, была снижена экспрессия генов окисления

жирных кислот в мышцах и генов термогенеза в белом жире [38]. В молодом возрасте, напротив, краткосрочное потребление ВД вызывало прибавку в массе тела и прирост жировой массы только у самцов, а долгосрочное потребление ВД, начиная с молодого возраста, у самцов сопровождалось более выраженной инсулинорезистентностью, чем у самок. Совместно эти результаты подтверждают предположение о том, что начальный ответ на потребление ВД определяет ход развития алиментарного ожирения и связанных с ним метаболических нарушений в дальнейшем.

Важным аспектом адаптивной реакции на потребление высококалорийной диеты является гормональный ответ, определяющий пищевое поведение. Повышение уровня лептина, строго коррелирующее с количеством белого жира, подавляет аппетит. У самцов удельное потребление энергии с ВД было ниже, чем у самок. Возможно, это связано с тем, что масса жира и уровень лептина в крови при потреблении ВД у самцов увеличивались с возрастом в большей степени, чем у самок.

На мышах показано, что макронутриентный состав потребляемой высококалорийной пищи оказывает влияние на темпы развития ожирения и метаболический фенотип особей [7, 8], и это влияние может зависеть от пола [13]. Мы обнаружили, что самки потребляют больше сладкого печенья и меньше стандартного гранулированного корма, чем самцы. Эти данные согласуются с результатами других авторов, показавших, что самки больше тяготеют к сладкому, чем самцы [10]. Кроме того, мы выяснили, что вкусовые предпочтения меняются с возрастом, и потребление сладкого печенья повышается от юного к молодому и зрелому возрасту. Повышение тяги к сладкому у мышей от юного к зрелому возрасту наблюдали и другие авторы [10]. Молекулярно-физиологические механизмы, лежащие в основе возрастных изменений во вкусовых предпочтениях, могут быть связаны с возрастным изменением экспрессии FGF21 в ответ на потребление сладкой пищи. FGF21 снижает тягу к сладкому, и его уровень в крови возрастает в ответ на поступление сахаров [24]. При содержании на ВД в юном возрасте уровень FGF21 в крови у мышей обоего пола был максимальным, а потребление сладкого печенья – минимальным по сравнению с другими возрастными группами. В дальнейшем уровень FGF21 снижался, а потребление сладкого печенья возрастало. Эти данные указывают на взаимосвязь между уровнем FGF21 в крови и тягой к потреблению сладкого печенья. Они также подразумевают, что активация экспрессии FGF21, вызванная диетой, изменяется с возрастом и что эти возрастные изменения могут способствовать сдвигам в выборе пищи и влиять на адаптацию к сладкой и жирной диете.

Модель, использованная в этом исследовании, имеет ряд ограничений. Хотя она позволяет оценить выбор пищи, трудно подсчитать количество потребляемых макронутриентов. Результаты, полученные в этой модели, нельзя напрямую экстраполировать на людей. Мы предполагаем, что у мышей выбор пищи осуществляется исключительно на основе вкусовых предпочтений, тогда как у людей на выбор пищи влияют многие факторы, включая экономические [39], социальные [40] и семейные [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У мышей при потреблении сладкой и жирной пищи тяга к сладкому меняется с возрастом и коррелирует с возрастными колебаниями уровня FGF21 в крови. Метаболический ответ на кратковременное потребление такой пищи зависит как от возраста, так и от пола животных. Молодой возраст характеризуется наибольшей устойчивостью к неблагоприятным воздействиям высококалорийной диеты на метаболизм глюкозы по сравнению с юным и старшим возрастом. Только в зрелом возрасте самцы проявляют меньшую, чем самки, устойчивость к высококалорийной диете. Эти результаты свидетельствуют о том, что при изучении патофизиологии ожирения необходимо учитывать как пол особей, так и возраст, в котором начинается применение диеты, индуцирующей ожирение.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Н. М., Н. М. Б.), сбор данных (П. Е. О., Т. В. Я., А. Ю. К.), обработка данных (П. Е. О., Е. Н. М.), написание и редактирование манускрипта (Е. Н. М., Н. М. Б.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00093).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям независимой биоэтической комиссии Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 76 от 07.04.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moody A, Neave A* (2020) Health Survey for England 2019: Overweight and obesity in adults and children. NHS Digit – Natl Stat.
2. *Nam GE, Kim Y-H, Han K, Jung J-H, Rhee E-J, Lee W-Y* (2021) Obesity Fact Sheet in Korea, 2020: Prevalence of Obesity by Obesity Class from 2009 to 2018. *J Obes Metab Syndr* 30: 141–148. <https://doi.org/10.7570/jomes21056>
3. *Yang YS, Han B-D, Han K, Jung J-H, Son JW* (2022) Obesity Fact Sheet in Korea, 2021: Trends in Obesity Prevalence and Obesity-Related Comorbidity Incidence Stratified by Age from 2009 to 2019. *J Obes Metab Syndr* 31: 169–177. <https://doi.org/10.7570/jomes22024>
4. *Choi HH, Choi G, Yoon H, Ha KH, Kim DJ* (2022) Rising Incidence of Diabetes in Young Adults in South Korea: A National Cohort Study. *Diabetes Metab J* 46: 803–807. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0236>
5. *Spinelli S, Monteleone E* (2021) Food Preferences and Obesity. *Endocrinol Metab* 36: 209–219. <https://doi.org/10.3803/EnM.2021.105>
6. *Teo PS, van Dam RM, Whitton C, Tan LWL, Forde CG* (2021) Consumption of Foods With Higher Energy Intake Rates is Associated With Greater Energy Intake, Adiposity, and Cardiovascular Risk Factors in Adults. *J Nutr* 151: 370–378. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa344>
7. *Luo Y, Burrington CM, Graff EC, Zhang J, Judd RL, Suksaranjit P, Kaewpoowat Q, Davenport SK, O'Neill AM, Greene MW* (2016) Metabolic phenotype and adipose and liver features in a high-fat Western diet-induced mouse model of obesity-linked NAFLD. *Am J Physiol Metab* 310: E418–E439. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00319.2015>
8. *Kattapuram N, Zhang C, Muryarikkandy MS, Surugihalli C, Muralidaran V, Gregory T, Sunny NE* (2021) Dietary Macronutrient Composition Differentially Modulates the Remodeling of Mitochondrial Oxidative Metabolism during NAFLD. *Metabolites* 11: 272. <https://doi.org/10.3390/metabo11050272>
9. *Wei S, Hertle S, Spanagel R, Bilbao A* (2021) Female mice are more prone to develop an addictive-like phenotype for sugar consumption. *Sci Rep* 11: 7364. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86797-9>

10. *Matas-Navarro P, Carratalá-Ros C, Olivares-García R, Martínez-Verdú A, Salamone JD, Correa M* (2023) Sex and age differences in mice models of effort-based decision-making and anergia in depression: the role of dopamine, and cerebral-dopamine-neurotrophic-factor. *Psychopharmacology (Berl)* 240: 2285–2302.
<https://doi.org/10.1007/s00213-023-06430-7>
11. *Petty S, Salame C, Mennella JA, Pepino MY* (2020) Relationship between Sucrose Taste Detection Thresholds and Preferences in Children, Adolescents, and Adults. *Nutrients* 12: 1918.
<https://doi.org/10.3390/nu12071918>
12. *Warneke W, Klaus S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt J-P* (2014) The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague–Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav* 116: 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.016>
13. *Casimiro I, Stull ND, Tersey SA, Mirmira RG* (2021) Phenotypic sexual dimorphism in response to dietary fat manipulation in C57BL/6J mice. *J Diabet Complicat* 35: 107795.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107795>
14. *MacCannell ADV, Futers TS, Whitehead A, Moran A, Witte KK, Roberts LD* (2021) Sexual dimorphism in adipose tissue mitochondrial function and metabolic flexibility in obesity. *Int J Obes* 45: 1773–1781.
<https://doi.org/10.1038/s41366-021-00843-0>
15. *Becerril S, Rodríguez A, Catalán V, Ramírez B, Mentxaka A, Neira G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G* (2022) Sex- and Age-Dependent Changes in the Adiponectin/Leptin Ratio in Experimental Diet-Induced Obesity in Mice. *Nutrients* 15: 73.
<https://doi.org/10.3390/nu15010073>
16. *Hwang L-L, Wang C-H, Li T-L, Chang S-D, Lin L-C, Chen C-P, Chen C-T, Liang K-C, Ho I-K, Yang W-S, Chiou L-C* (2010) Sex Differences in High-fat Diet-induced Obesity, Metabolic Alterations and Learning, and Synaptic Plasticity Deficits in Mice. *Obesity* 18: 463–469.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.273>
17. *Yang Y, Smith DL, Keating KD, Allison DB, Nagy TR* (2014) Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity* 22: 2147–2155.
<https://doi.org/10.1002/oby.20811>
18. *Medrikova D, Jilkova ZM, Bardova K, Janovska P, Rossmeisl M, Kopecky J* (2012) Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *Int J Obes* 36.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2011.87>
19. *Salinero AE, Anderson BM, Zuloaga KL* (2018) Sex differences in the metabolic effects of diet-induced obesity vary by age of onset. *Int J Obes* 42: 1088–1091.
<https://doi.org/10.1038/s41366-018-0023-3>
20. *Boulangé CL, Claus SP, Chou CJ, Collino S, Montoliu I, Kochhar S, Holmes E, Rezzi S, Nicholson JK, Dumas ME, Martin F-PJ* (2013) Early Metabolic Adaptation in C57BL/6 Mice Resistant to High Fat Diet Induced Weight Gain Involves an Activation of Mitochondrial Oxidative Pathways. *J Proteome Res* 12: 1956–1968.
<https://doi.org/10.1021/pr400051s>
21. *De Fourmestraux V, Neubauer H, Poussin C, Farmer P, Falquet L, Burcelin R, Delorenzi M, Thorens B* (2004) Transcript Profiling Suggests That Differential Metabolic Adaptation of Mice to a High Fat Diet Is Associated with Changes in Liver to Muscle Lipid Fluxes. *J Biol Chem* 279: 50743–50753.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M408014200>
22. *Lundsgaard A-M, Holm JB, Sjøberg KA, Bojsen-Møller KN, Myrmet LS, Fjære E, Jensen BAH, Nicolaisen TS, Hingst JR, Hansen SL, Doll S, Geyer PE, Deshmukh AS, Holst JJ, Madsen L, Kristiansen K, Wojtaszewski JFP, Richter EA, Kiens B* (2019) Mechanisms Preserving Insulin Action during High Dietary Fat Intake. *Cell Metab* 29: 50–63.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.022>
23. *Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML* (2007) The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8: 21–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x>

24. Von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, Naber MC, Yin TC, Claflin KE, Urizar AI, Madsen AN, Ratner C, Holst B, Karstoft K, Vandenbeuch A, Anderson CB, Cassell MD, Thompson AP, Solomon TP, Rahmouni K, Kinnamon SC, Pieper AA, Gillum MP, Potthoff MJ (2016) FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* 23.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.003>
25. Makarova E, Kazantseva A, Dubinina A, Jakovleva T, Balybina N, Baranov K, Bazhan N (2021) The Same Metabolic Response to FGF21 Administration in Male and Female Obese Mice Is Accompanied by Sex-Specific Changes in Adipose Tissue Gene Expression. *Int J Mol Sci* 22: 10561.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910561>
26. Dutta S, Sengupta P (2016) Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 152: 244–248.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
27. Slomp M, Belegri E, Blancas-Velazquez AS, Diepenbroek C, Eggels L, Gumbs MCR, Joshi A, Koekkoek LL, Lamuadni K, Ugur M, Unmehopa UA, la Fleur SE, Mul JD (2019) Stressing the importance of choice: Validity of a preclinical free-choice high-caloric diet paradigm to model behavioural, physiological and molecular adaptations during human diet-induced obesity and metabolic dysfunction. *J Neuroendocrinol* 31.
<https://doi.org/10.1111/jne.12718>
28. Okada T, Mita Y, Sakoda H, Nakazato M (2019) Impaired adaptation of energy intake induces severe obesity in aged mice on a high-fat diet. *Physiol Rep* 7: e13989.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13989>
29. Kim SJ, Kim S-E, Kim A-R, Kang S, Park M-Y, Sung M-K (2019) Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. *BMC Microbiol* 19: 193.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1557-9>
30. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* k2179.
<https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
31. McGregor RA, Kwon E-Y, Shin S-K, Jung UJ, Kim E, Park JHY, Yu R, Yun JW, Choi M-S (2013) Time-course microarrays reveal modulation of developmental, lipid metabolism and immune gene networks in intrascapular brown adipose tissue during the development of diet-induced obesity. *Int J Obes* 37: 1524–1531.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2013.52>
32. Maliszewska K, Kretowski A (2021) Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci* 22: 1530.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041530>
33. Gelineau RR, Arruda NL, Hicks JA, Monteiro De Pina I, Hatzidis A, Seggio JA (2017) The behavioral and physiological effects of high-fat diet and alcohol consumption: Sex differences in C57 <scp>BL</scp> 6/J mice. *Brain Behav* 7.
<https://doi.org/10.1002/brb3.708>
34. Bazhan NM, Baklanov AV, Piskunova JV, Kazantseva AJ, Makarova EN (2017) Expression of genes involved in carbohydrate-lipid metabolism in muscle and fat tissues in the initial stage of adult-age obesity in fed and fasted mice. *Physiol Rep* 5: e13445.
<https://doi.org/10.14814/phy2.13445>
35. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP (2012) Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 14: 58–66.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01488.x>
36. Dakin RS, Walker BR, Seckl JR, Hadoke PWF, Drake AJ (2015) Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism. *Int J Obes* 39: 1539–1547.
<https://doi.org/10.1038/ijo.2015.102>
37. Varlamov O (2017) Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 1863: 1147–1155.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.025>

38. Bazhan N, Kazantseva A, Dubinina A, Balybina N, Jakovleva T, Makarova E (2024) Age of Cafeteria Diet Onset Influences Obesity Phenotype in Mice in a Sex-Specific Manner. *Int J Mol Sci* 25: 12436.
<https://doi.org/10.3390/ijms252212436>
39. Fazzino TL, Bjorlie K, Rohde K, Smith A, Yi R (2022) Choices between money and hyper-palatable food: Choice impulsivity and eating behavior. *Heal Psychol* 41: 538–548.
<https://doi.org/10.1037/hea0001185>
40. Garcia A, Hammami A, Mazellier L, Lagneau J, Darcel N, Higgs S, Davidenko O (2021) Social modeling of food choices in real life conditions concerns specific food categories. *Appetite* 162: 105162.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105162>
41. Savage JS, Fisher JO, Birch LL (2007) Parental Influence on Eating Behavior: Conception to Adolescence. *J Law Med Ethics* 35: 22–34.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-720X.2007.00111.x>

Sex and age affect food choice and metabolic adaptation to short-term high-calorie palatable food eating in mice

**E. N. Makarova^{a,*}, P. E. Orlov^a, A. Yu. Kazantseva^a, T. W. Jakovleva^a,
and N. M. Bazhan^a**

^aThe Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

**e-mail: maken@bionet.nsc.ru*

Incidence of obesity increases among young peoples, but influence of age and sex on adaptation to obesogenic diets in youth is little studied. We aimed to examine the influence of sex and age on short-term adaptation to palatable diet (PD: standard chow, lard and sweet cookies) from youth to adulthood in mice. Male and female C57Bl/6J mice consumed PD for 2 weeks at the age of 7 (young), 17 (early adult) and 27 (adult) weeks. Energy intake, food choice, morphometric and biochemical parameters were assessed. Sex and age influenced food choice and all parameters studied. From young to early adult age, blood Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) levels decreased, and consuming cookies increased. PD increased white fat mass, glucose levels, and decreased glucose tolerance in young females more than in young males. In early adult male and female mice, PD had no effect on glucose tolerance and blood glucose levels. In adult mice, body weight increased, hyperleptinemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia developed and glucose tolerance decreased only in males. Thus, response to high-calorie diet varies with age, and males show greater resistance to PD than females in youth, and less resistance in adulthood. In obesity pathophysiology, both sex and age of diet initiation are important variables.

Keywords: C57Bl mice, high-calorie diet, age, sex, metabolic adaptation, food choice, Fibroblast Growth Factor 21

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ МИГРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ НЕЙТРОФИЛОВ
В ПРОТОЧНОЙ СИСТЕМЕ

© 2025 г. С. Н. Плескова^{1,2,*}, Н. А. Безруков¹, Е. Н. Горшкова¹, Д. В. Новиков^{1,3},
Е. В. Отставнова^{1,2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижегород, Россия

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева,
Нижегород, Россия

³Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижегород, Россия

*E-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2025 г.

После доработки 02.06.2025 г.

Принята к публикации 03.06.2025 г.

Для исследования миграции нейтрофилов создана оригинальная модель проточной системы, имитирующая гемодинамический процесс в капиллярах. При использовании этой модели выявлено, что общие паттерны поведения нейтрофилов (образование агрегатов, формирование “нейтрофильных привязей” и миграция нейтрофилов по межклеточным контактам эндотелиоцитов) воспроизводятся и в контроле (система без хемоаттрактантов), и в опыте (система с низкомолекулярными хемоаттрактантами бактерий). Однако в случае использования в качестве хемоаттрактанта *S. aureus* и *P. mirabilis* количество агрегатов и “нейтрофильных привязей” увеличивается статистически значимо ($p < 0.05$). Агрегаты соответствуют феномену роения в системе трансэндотелиальной миграции и способствуют ограничению зоны бактериального поражения. А “нейтрофильные привязи” замедляют гемодинамическое движение клеток и могут либо вызывать переход к миграции, либо являться предшественниками формирования удлинённых нейтрофил-производных структур, обладающих высоким антибактериальным потенциалом. Таким образом, все наблюдаемые феномены способствуют реализации защитной функции в случае бактериемии.

Ключевые слова: миграция, нейтрофилы, хемоаттрактанты, эндотелиоциты, кровоток, “нейтрофильные привязи”, агрегация

DOI: 10.7868/S2658655X25070112, **EDN:** MVYAWM

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы нейтрофилы перестали рассматривать только в качестве клеток, опосредующих острое воспаление [1], поскольку они могут мигрировать в различные отделы лимфатической системы, где дирижируют активацией или подавлением эффекторных функций лимфоцитов как при текущем поддержании гомеостаза, так

и при хроническом воспалении, которое сопровождает, в частности, аутоиммунные процессы и злокачественные новообразования [2]. Сейчас не оспариваются ни регуляторная роль нейтрофилов, ни существование их функциональных субпопуляций [3]. Нейтрофильные гранулоциты циркулируют в кровяном русле, но при воспалительном процессе они формируют маргинальный пул и прокатываются по поверхности эндотелия (стадия роллинга), после чего следуют арест, переползание и диапедез (рекрутинг в ткани) [4]. Во время трансэндотелиальной миграции нейтрофилы покидают кровяное русло, двигаясь по хемотаксическому градиенту [5]. Сейчас известно, что нейтрофилы могут переползать против кровотока в поисках области, наиболее благоприятной для диапедеза [6]. От эффективности миграционных процессов нейтрофилов зависят и процессы физиологической регуляции, и степень тяжести заболеваний, и вероятность хронизации воспалительных процессов. Дать объективную картину миграционных процессов нейтрофилов довольно сложно, поскольку оптические наблюдения *in vivo* ограничиваются наличием “окна прозрачности биологических тканей” и превалированием эритроцитарной фракции крови, а микроскопические наблюдения традиционно проводятся в стационарных системах. Поэтому целью данной работы было исследование процесса миграции нейтрофилов в проточной динамической системе, имитирующей гемодинамику в капиллярах в присутствии бактериальных хемоаттрактантов.

Задачи исследования:

1. Смоделировать проточную систему с использованием монослоя эндотелиальных клеток, имитирующих *tunica intima*, которая позволит исследовать миграционные процессы нейтрофильных гранулоцитов вдоль сосудистого русла.
2. Смоделировать источник хемоаттракции, обеспечивающий равномерное поступление хемоаттрактанта в систему. Исследовать влияние бактериальных хемоаттрактантов (2 видов грамположительных и 2 видов грамотрицательных бактерий) на миграционные и гемодинамические процессы нейтрофилов в капиллярном кровотоке.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культура клеток EA.hy926 для моделирования поверхности кровеносных сосудов

Для моделирования *tunica intima* использовали культуру клеток EA.hy926, которую высаживали на чашку Петри диаметром 35 мм с адгезионным покрытием (Corning Inc., США) в концентрации 2.5×10^5 клеток/мл. Для создания монослоя эндотелиоциты культивировали в среде DMEM-F12 с добавлением 10% FBS (“ПанЭко”, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”, Россия), 8 мМ глутамина (“ПанЭко”, Россия), ГАТ (100 мкМ гипоксантина, 0.4 мкМ аминоптерина, 16 мкМ тимидина) (Sigma-Aldrich, США) во влажной среде в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч (Portable MiniNB 203M, N-Biotek, Республика Корея, 37 °C, 5% CO₂). Контроль роста монослоя проводили оптически (AxioVert.A1, Carl Zeiss, Германия) [7].

Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы выделяли центрифугированием из цельной венозной крови здоровых доноров на двойном градиенте фиколла-градографа ($\rho = 1.077$ г/мл, $\rho = 1.110$ г/мл, 400 г, 45 мин) (“ПанЭко”, Россия), затем дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (400 г, 3 мин), остаточные эритроциты лизировали 0.9%-ным раствором NH₄Cl (4 °C, 12 мин). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию 1 мкг/мл пропидиума йодида (Sigma-Aldrich, США). В экспериментальных процедурах использовали нейтрофилы, жизнеспособность которых была не менее 98%. Анализ

проводили на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter International S.A., США). Для детекции флуоресценции пропидиума йодида использовали канал 690/50. В эксперимент брали нейтрофилы в концентрации 1×10^6 клеток/мл, ресуспендирование проводили в растворе Хенкса с добавлением 2 мМ L-глутамина и забуференного 10 мМ HEPES (pH 7.3–7.4). Эта среда была выбрана нами ранее как обеспечивающая максимальную жизнеспособность и функциональную активность обоих типов клеток (нейтрофилов и эндотелиоцитов) при проведении длительных наблюдений [7].

Работа с бактериальными клетками

Штаммы бактерий: два вида грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* 2879M и *Enterococcus faecalis* 645-p2) и два вида грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* 321 и *Proteus mirabilis* 649-2) выращивали (37 °C, 20 ч) на ГРМ-агаре (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk), трижды отмывали центрифугированием стерильным ФСБ (450 g, 5 мин), ресуспендировали в ФСБ и на спектрофотометре (СПЕКС ССП 705, Спектроскопические системы, Москва) измеряли оптическую плотность ($\lambda = 670$ нм), доводя ее до 10^9 клеток/мл. В эксперименты брали количество суспензии, соответствовавшее 20 MOI относительно нейтрофилов – концентрации, используемой для загрузки контейнера [8].

Моделирование проточной системы

Принципиальная схема модели проточной системы для исследования процессов циркуляции и миграции нейтрофилов в присутствии бактериальных хемоаттрактантов представлена на рис. 1.

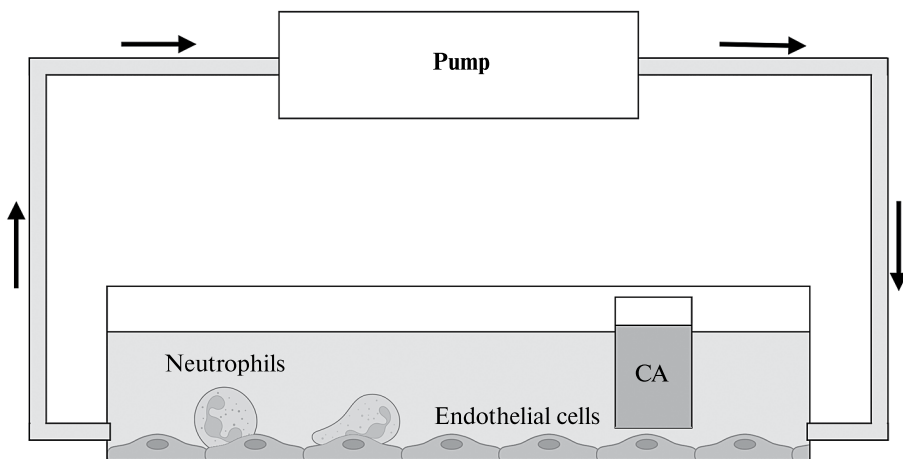


Рис. 1. Принципиальная схема проточной модели. В клеточном отсеке – монослой EA.hy926, на который помещали нейтрофилы. Контейнер с хемоаттрактантом (CA- chemoattractant) располагался у приточной трубки (справа), наблюдения вели со стороны вытяжной трубки (слева). Перистальтический насос создавал ток в замкнутом контуре.

Для создания градиента хемоаттракции использовали контейнер, стенки которого были проницаемы только для низкомолекулярных веществ. Для изготовления контейнеров использовали нижние части полипропиленовых трубок (GenFollower, KHP), что позволяло сохранить постоянный диаметр раструба. Для удержания хемоаттрактантов

раструб закрывали диализными мембранами с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) 14 кДа (Solarbio, КНР).

На чашку Петри с выращенным монослоем эндотелиальных клеток устанавливали сконструированную из полистирола притертую прямоугольную камеру с закрытым верхом и двумя отверстиями для полистироловых трубок, куда крепили контейнер с хемоаттрактантом. В контейнер загружали суспензию одного из четырех штаммов бактериальных клеток (20 MOI). Наблюдения проводили в растворе Хенкса с 2 mM L-глутамина и 10 mM HEPES (pH 7.3–7.4). Контейнер располагали со стороны приточной трубки таким образом, чтобы ток жидкости равномерно распределял хемоаттрактант. В систему вносили нейтрофилы (10^6 клеток/мл), через 10 мин создавали ток жидкости со скоростью 1 мл/ч на 30 мин, что примерно соответствует скорости кровотока в капиллярах сосудов, и устанавливали наблюдение с помощью инвертированного оптического микроскопа Микромед И (“Наблюдательные приборы”, Россия/КНР) через Видеоокуляр Toupcam UA1000CA (Touptek, КНР): объектив ($\times 20$) позиционировали со стороны вытяжной трубки. Затем ток жидкости ускоряли до 20 мл/ч для моделирования кровотока в венах и проводили наблюдение в течение еще 30 мин. Для создания тока жидкости использовали перистальтический насос Microperplex 2132-001 (Pharmacia LKB, Швеция).

Количество агрегатов нейтрофилов (за агрегат принималось скопление 3 и более клеток с непосредственным контактом между ними) оценивали визуально в начале эксперимента и через каждые 10 мин моделирования тока жидкости. Во второй повторности подсчет проводили со смещением времени от начальной точки экспозиции на 5 мин. Результаты исследования выражались в количестве образующихся агрегатов (pieces – pcs).

Для подсчета количества “нейтрофильных привязей” проводился визуальный анализ, в ходе которого за клетку, образующую привязь, принимался нейтрофил, формирующий выпячивание клеточной мембраны, в потоке, соответствующем скорости тока в капиллярах, на протяжении 1 ч 20 мин. Результаты выражали в количестве образующихся агрегатов (pieces – pcs). Учитывались как нейтрофилы, изначально находившиеся в поле зрения, так и клетки, появляющиеся с током жидкости и образующие адгезионные контакты с эндотелиоцитами. Контрольный эксперимент и эксперименты с каждой модельной системой (бактериями в контейнере) были проведены в четырех повторностях.

Статистический анализ

Для обработки данных использовали программу Origin 8.0 (Origin LabCorporation, США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро – Уилка. В случае анализа «нейтрофильных привязей» распределения соответствовали критериям нормальности, поэтому определяли среднее и среднеквадратичное отклонение ($M \pm SD$), а сравнение между двумя выборками проводили с использованием критерия Стьюдента. Для сравнения количества формируемых нейтрофилами агрегатов использовали критерий Фридмана, сравнения проводили попарно с использованием теста Данна. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наблюдения за контрольными (без хемоаттрактанта) и опытными (с одним из видов бактериальных хемоаттрактантов) образцами проводили в течение 20–70 мин с видеofиксацией и частотой кадров не ниже 3 кадров/с, не менее, чем в трех повторностях.

В контроле при создании проточной системы наблюдали образование фибрилл эндотелиальными клетками (рис. 2).

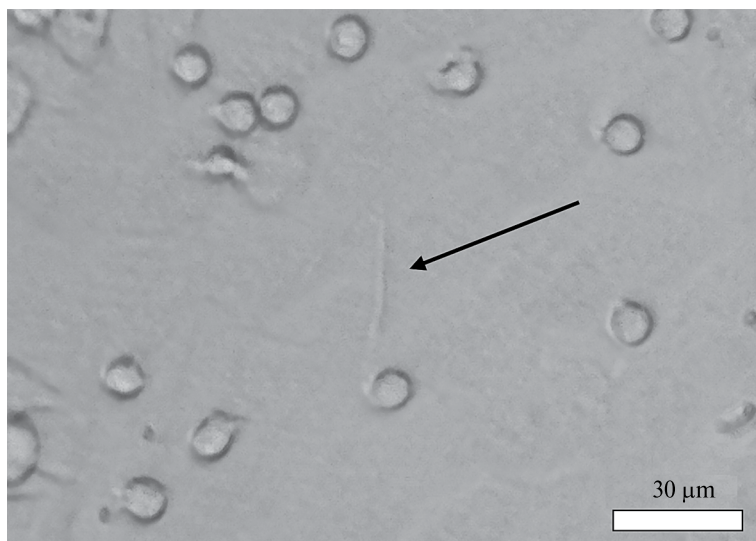


Рис. 2. В камере без хемоаттрактанта при продолжительном наблюдении отмечалось формирование длинных фибрилл эндотелиальными клетками линии EA.hy 926. Местоположение фибриллы отмечено стрелкой.

Для подавляющего числа нейтрофилов отмечена стандартная гемодинамика – движение по направлению потока. Однако наблюдалась и стохастическая миграция клеток, расположенных в маргинальном пуле, как по направлению потока, так и против него. В случае миграционных процессов движение было ассоциировано с поверхностью эндотелиальных клеток: нейтрофилы передвигались преимущественно в зоне контактов между ними (рис. 3а, б). В остальном движение клеток было классическим: нейтрофил формировал ламеллоподию, к которой подтягивалась вся клетка. При миграции нейтрофилы часто формировали агрегаты или кластеры (преимущественно по 2–3 клетки). В агрегатах нейтрофилов наблюдали коммуникацию между клетками (рис. 3с).

Наблюдали также явление, недавно описанное в исследованиях Cugno с соавт., которое называется “нейтрофильные привязи” (Neutrophil Tethers), когда связь “рецептор нейтрофила – лиганд эндотелиоцита” сохраняется достаточно долго [9], микроворсинки лейкоцитов удлинняются и в конечном итоге образуют тонкие “привязи” (рис. 4).

Внесение в контейнер хемоаттрактанта существенно изменяет характер гемодинамики нейтрофилов в потоке и их миграции в маргинальном пуле. В частности, из рис. 5 следует, что формирование агрегатов в контроле (без бактериального хемоаттрактанта) постепенно нарастает со временем, однако это нарастание не выходит за пределы статистической значимости, тогда как в присутствии *S. aureus* 2879М, *E. faecalis* 645-р2 и *P. mirabilis* 649-2 наблюдали пиковые значения формирования агрегатов (максимальная провокация нейтрофилов к агрегации отмечена для *S. aureus* 2879М), после чего вновь начинала превалировать одиночная миграция клеток. При этом показано, что, начиная с 60-й мин, агрегация значимо отличалась от контрольной для *E. faecalis* 645-р2 (60 мин, 70 мин, $p < 0.05$). Таким образом, максимально провоцируют агрегацию нейтрофилов штаммы грамположительных бактерий, преимущественно в диапазоне временных отрезков 10–40 мин.

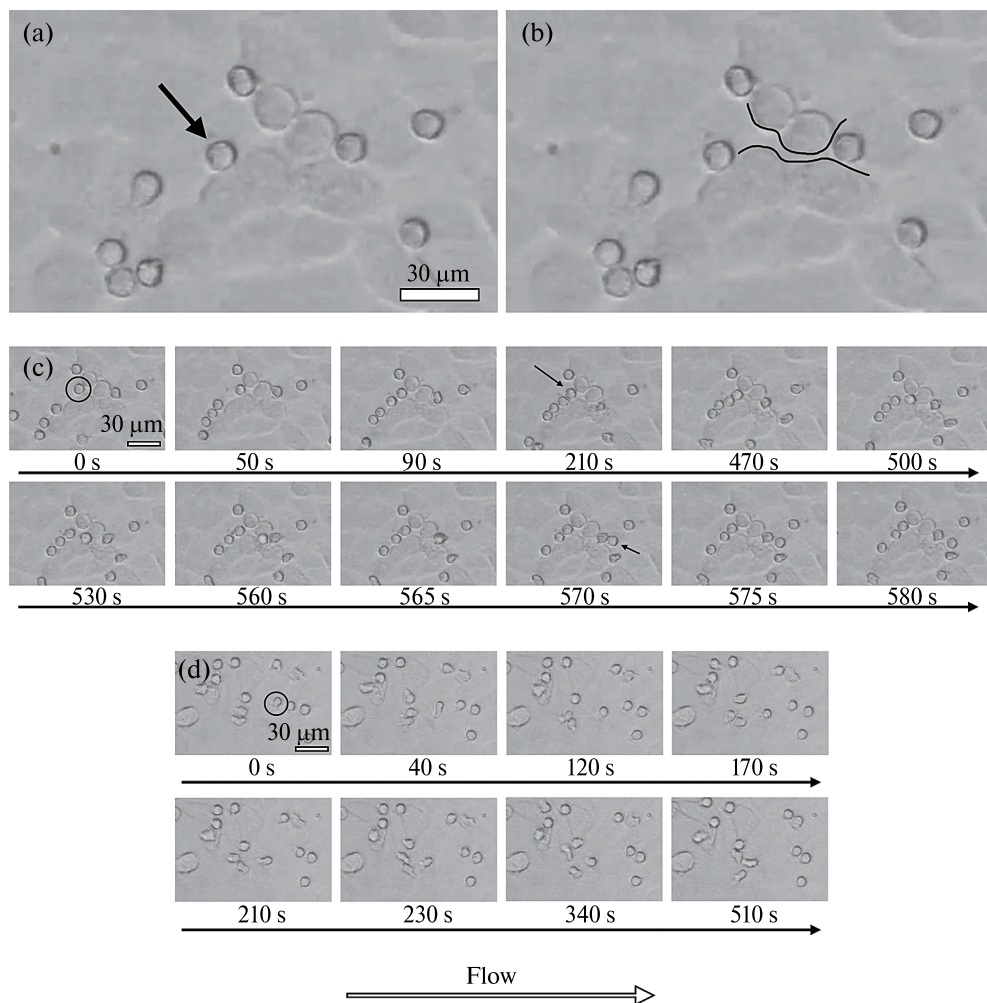


Рис. 3. Характер миграции нейтрофилов в потоке, имитирующем капиллярный. (а) – Переход нейтрофилов в маргинальный пул и их миграция по направлению потока. (б) – Движение нейтрофилов строго по направляющим, сформированным контактами между эндотелиальными клетками (направляющие для двух нейтрофилов выделены на рисунке черным цветом). (с) – Формирование нейтрофилами агрегатов при движении. (д) – Движение нейтрофила против капиллярного тока.

В то же время склонность к агрегации под воздействием *E. coli* 321 выражена в гораздо меньшей степени, динамика формирования агрегатов отличается от контроля только на первых и на финальных минутах наблюдения (рис. 5).

Интересным фактом является и то, что за счет “нейтрофильных привязей” клетки не только сопротивляются смещению током жидкости, но и получают возможность мигрировать против тока жидкости (рис. 6).

Внесение в систему хемоаттрактанта увеличивает образование таких структур, хотя статистически значимые различия с контролем были выявлены только в случае использования в качестве хемоаттрактанта *S. aureus* 2879M и *P. mirabilis* 649-2 (рис. 7).

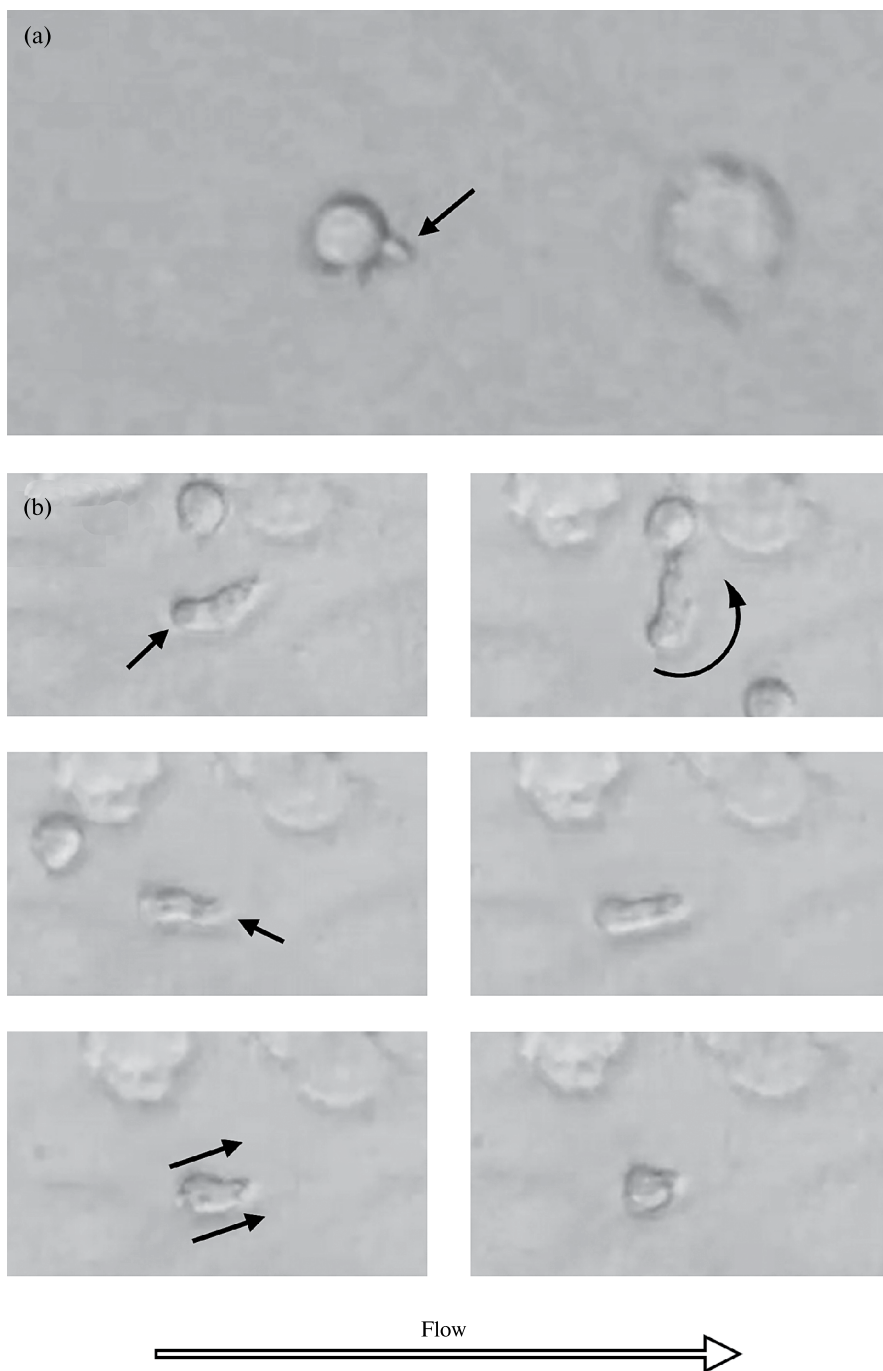


Рис. 4. Образование “нейтрофильных привязей”, удерживающих клетки. (а) – Формирование прочной связи “рецептор нейтрофила – лиганд эндотелиоцита” с вытягиванием клетки и ее удержанием от движения в потоке – стрелка указывает на neutrophil tethers. (б) – Удержание клетки за счет “нейтрофильной привязи” с последующим ее растягиванием из-за потока, в результате чего клетка получает возможность двигаться против потока.

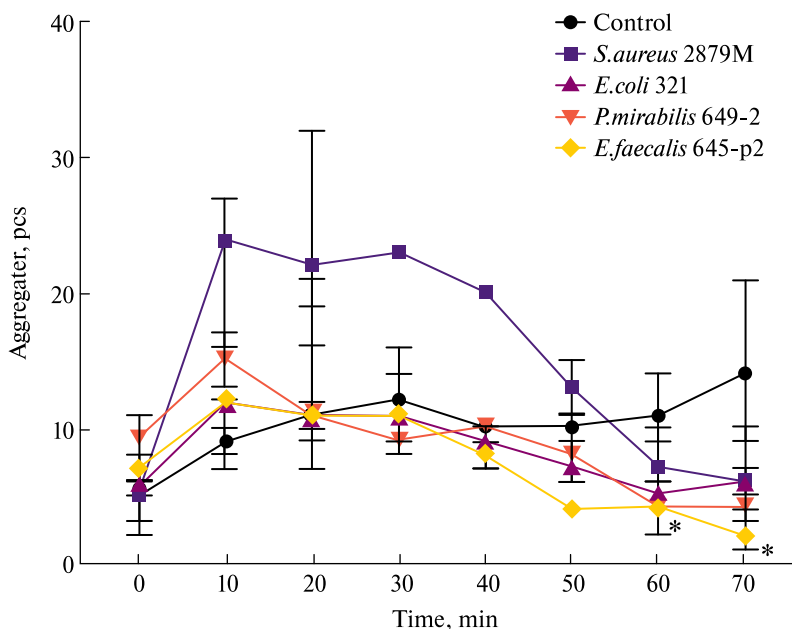


Рис. 5. Динамика формирования агрегатов нейтрофилов (3 и более клетки) в процессе миграции в проточной системе с хемоаттрактантом (штаммом *S. aureus* 2879M, *E. faecalis* 645-p2, *E. coli* 321 или *P. mirabilis* 649-2) и без него (контроль). * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

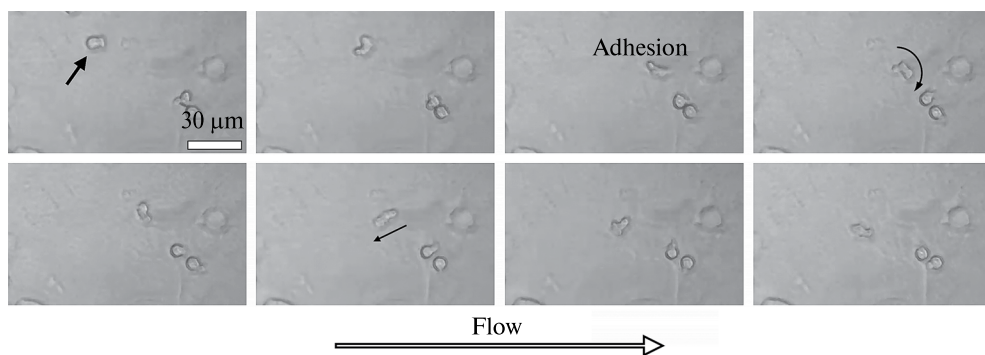


Рис. 6. Динамика формирования “нейтрофильных привязей”: на первых двух кадрах – переход нейтрофилов в маргинальный пул, затем формирование прочных адгезионных контактов с поверхностью эндотелиоцитов и разворот клетки против тока жидкости благодаря “нейтрофильной привязи”, затем целенаправленная миграция против направления потока, по направлению к контейнеру с хемоаттрактантом *E. coli* 321.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При трансэндотелиальной миграции неоднократно описан феномен роения нейтрофилов в случае присутствия в системе хемоаттрактанта [8]. Нейтрофилы способны к самоусилению роения по принципу положительной обратной связи, секретлируя хемоаттрактанты и хемокины, чтобы обеспечить межклеточную коммуникацию и увеличить самоорганизацию в сложной воспалительной среде [10]. Мы полагаем, что склонность к образованию агрегатов в проточной системе в присутствии

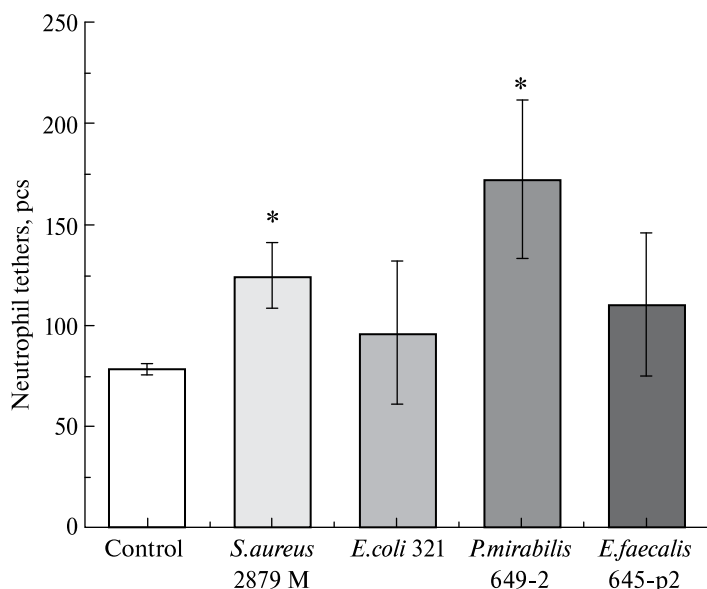


Рис. 7. Количество «нейтрофильных привязей», формируемых клетками в процессе миграции в контроле (в отсутствие хемоаттрактанта) и в опыте (присутствие в контейнере одного из штаммов бактерий), * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$).

хемоаттрактантов является аналогом такого роения. Подобное явление описано в литературе только однократно в системе *in vivo* на мышинной модели и только в отношении *Candida albicans*. В работе Lee с соавт. наблюдали формирование кластеров (роение) нейтрофилов внутри легочного микроциркуляторного русла, при секвестрации дрожжеподобных грибов в просвет сосудов [11]. Авторы показали явление обструкции кластерами нейтрофилов микрососудов легких у мышей и считают роение нейтрофилов в таких условиях уникальным для грибковой инфекции. Однако в наших экспериментах воспроизводится явление септицемии, т.е. нахождения бактериальных хемоаттрактантов в просвете сосудов. Таким образом, агрегаты нейтрофилов (по три и больше) формируются и на бактериальную инфекцию – максимально в случае со *S. aureus*. Ранее нами был описан уникальный феномен, когда нейтрофилы при формировании агрегатов реализовали разделение функций: одни клетки поглощали квантовые точки и упаковывали их в кластеры, после чего передавали “упаковки квантовых точек” другим нейтрофилам [12]. С учетом последних данных о функциональной неоднородности нейтрофилов [13] это явление может быть свидетельством клеточной кооперации внутри сосудистого русла при любой интраваскулярной инфекции. Таким образом, мы считаем, что формирование агрегатов нейтрофилами в системе, моделирующей кровотока, может расцениваться как защитная реакция. Обструкция микрососудов роящимися агрегатами/кластерами нейтрофилов может ограничивать очаг инфекции, когда кровоток перенаправляется по микрососудам, не имеющим градиента хемоаттрактанта. Интересным является и тот факт, что сами бактерии не присутствовали в кровотоке, т.е. формирование агрегатов происходило под воздействием низкомолекулярных бактериальных хемоаттрактантов (до 14 кДа), что обусловлено условиями проведения экспериментов (использованием диализных мембран, препятствующих поступлению бактерий и их высокомолекулярных дериватов в кровоток). Со временем количество агрегатов, сформированных в кровотоке под воздействием бактериальных хемоаттрактантов, уменьшалось. В работе Kienle

с соавт. описан возможный механизм “разборки” агрегатов, возникших в результате роения нейтрофилов [14]. Это самоограничение к формированию роения за счет десенсibilизации G-протеин-связанных рецепторов (G protein-coupled receptors) за счет хемоаттрактантов (LTB4 и CXCL2), которые экспрессируются самими нейтрофилами и первоначально, напротив, вызывают вовлечение в механизм роения новых нейтрофилов. В контрольных экспериментах с начала эксперимента и до 40 мин формирование агрегатов было на уровне плато, однако затем наблюдалось незначительное увеличение склонности к образованию кластеров, которое, однако, не было статистически значимым ($p > 0.05$). Вероятно, это можно связать с феноменом, который не наблюдался в экспериментах с хемоаттрактантами, а именно с формированием фибрилл эндотелиальными клетками, которые задерживали нейтрофилы, способствуя их агрегации. Кроме того, в контроле отмечается не только наличие агрегатов, но и частично адгезия к поверхности эндотелиоцитов, имитирующих *tunica intima*, вероятно, обусловленная отсутствием поляризации и потенциалов к миграции у непраймированных клеток. Замедление движения нейтрофилов и их вращение после наличия первичной адгезии уже были описаны в литературе. В частности, гемодинамика нейтрофилов в посткапиллярных венулах характеризуется скоростью более 1000 мкм/с, тогда как связывание нейтрофилов и их вращение в маргинальном пуле способствуют резкому сбросу скорости до 100–200 или иногда даже до 20 мкм/с [15]. При этом, если сила, действующая на нейтрофил в этот момент, превышает 35–55 пН, то сформируются “нейтрофильные привязи” [16, 17].

Мы наблюдали формирование “нейтрофильных привязей” как в контрольных, так и в опытных экспериментах. Согласно Marki с соавт., длина “нейтрофильных привязей” может варьировать от 16 до 22 мкм [18]. Интересно, что после разрыва связей “молекулярных привязей” формируются *elongated neutrophil-derived structures* (ENDS) – удлиненные нейтрофил-производные структуры, которые могут отсоединяться от эндотелия и поступать в плазму крови. В работе показано, что содержание таких бактерицидных компонентов, как лактоферрин, альбумин, актин, миелопероксидаза, кальций-связывающие гетеродимеры (S100A8, S100A9), α -энолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, аннексин-A3 и каталаза, в ENDS соответствует количеству (в эквивалентных объемах), содержащемуся в цельном нейтрофиле [18]. Таким образом, наряду с бактерицидными эффектами досконально изученных к настоящему времени “нейтрофильных ловушек” (NETs – neutrophil extracellular traps) и эктосом (внеклеточных везикул), формируемых нейтрофилами, ENDS могут рассматриваться также в качестве мощного бактерицидного инструмента. В той же работе приводятся сведения о существенном увеличении числа ENDS в плазме крови мышей с экспериментальным сепсисом. Можно отметить, что наши данные также свидетельствуют об увеличении числа «нейтрофильных привязей» в случае присутствия в системе низкомолекулярных продуктов *S. aureus* и *P. mirabilis*, что свидетельствует о защитной функции этих структур (остановка для адгезии и образования ENDS с бактерицидным содержанием). Однако в наших экспериментах, во-первых, был исключен прямой контакт цельных бактерий с нейтрофилами, а во-вторых, формирование “нейтрофильных привязей” предшествует образованию ENDS, и они могут быть источником нескольких таких структур.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность заведующему отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий проф. С.А. Селькову и заведующему лабораторией межклеточных взаимодействий, д.б.н. Д.И. Соколову НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отто за предоставление клеточной линии EA.hy926.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-00004).

СОБЛЮЖДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено комитетом по биоэтике Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (созданного 11 ноября 2016 г.), протокол № 9 от 17 июля 2017 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kolaczowska E, Kubes P* (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13: 159–175.
<https://doi.org/10.1038/nri3399>
2. *Voisin M-B, Nourshargh S* (2019) Neutrophil trafficking to lymphoid tissues: physiological and pathological implications. *J Pathol* 247: 662–671.
<https://doi.org/10.1002/path.5227>
3. *Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y* (2019) The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun Signal* 17: 147.
<https://doi.org/10.1186/s12964-019-0471-y>
4. *Ley K, Hoffman HM, Kubes P, Cassatella MA, Zychlinsky A, Hedrick CC, Catz SD* (2018) Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol* 3: eaat4579.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579>
5. *Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S* (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689.
<https://doi.org/10.1038/nri2156>
6. *Buffone A, Hammer DA, Kim SHJ, Anderson NR, Mochida A, Lee DH, Guin S* (2023) Not All (Cells) Who Wander Are Lost: Upstream Migration as a Pervasive Mode of Amoeboid Cell Motility. *Front Cell Dev Biol* 11: 1291201.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1291201>
7. *Pleskova SN, Bezrukov NA, Gorshkova EN, Bobyk SZ, Lazarenko EV* (2024) A Study of EA.hy926 Endothelial Cells Using Atomic Force and Scanning Ion Conductance Microscopy. *Cell Tiss Biol* 18: 36–44.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X24010073>
8. *Pleskova SN, Bezrukov NA, Gorshkova EN, Bobyk SZ, Lazarenko EV* (2023) Exploring the Process of Neutrophil Transendothelial Migration Using Scanning Ion-Conductance Microscopy. *Cells* 12: 1806.
<https://doi.org/10.3390/cells12131806>

9. *Cugno A, Marki A, Ley K* (2021) Biomechanics of Neutrophil Tethers. *Life* (Basel) 11: 515.
<https://doi.org/10.3390/life11060515>
10. *Lammermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmüller W, Parent CA, Germain RN* (2013) Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 498: 371–375.
<https://doi.org/10.1038/nature12175>
11. *Lee EKS, Gillrie MR, Li L, Arnason JW, Kim JH, Babes L, Lou Y, Sanati-Nezhad A, Kyei SK, Kelly MM, Mody CH, Ho M, Yipp BG* (2018) Leukotriene B4-Mediated Neutrophil Recruitment Causes Pulmonary Capillaritis during Lethal Fungal Sepsis. *Cell Host Microbe* 23: 121–133.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.009>
12. *Pleskova SN, Kriukov RN, Gorshkova EN, Boryakov AV* (2019) Characteristics of quantum dots phagocytosis by neutrophil granulocytes. *Heliyon* 5: e01439.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01439>
13. *Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y* (2019) Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *J Immunol Res* 2019: 8016254.
<https://doi.org/10.1155/2019/8016254>
14. *Kienle K, Glaser KM, Eickhoff S, Mihlan M, Knopper K, Reategui E, Epple MW, Gunzer M, Baumeister R, Tarrant TK, Germain RN, Irimia D, Kastenmüller W, Lammermann T* (2021) Neutrophils self-limit swarming to contain bacterial growth in vivo. *Science* 372: eabe7729.
<https://doi.org/10.1126/science.abe7729>
15. *Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K* (2000) Leukocyte Arrest During Cytokine-Dependent Inflammation In Vivo. *J Immunol* 164: 3301–3308.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.6.3301>
16. *Girdhar G, Shao JY* (2007) Simultaneous Tether Extraction from Endothelial Cells and Leukocytes: Observation, Mechanics, and Significance. *Biophys J* 93: 4041–4052.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109298>
17. *Chen Y, Yao DK, Shao JY* (2010) The Constitutive Equation for Membrane Tether Extraction. *Ann Biomed Eng* 38: 3756–3765.
<https://doi.org/10.1007/s10439-010-0117-0>
18. *Marki A, Gutierrez E, Mikulski Z, Groisman A, Ley K* (2016) Microfluidics-based side view flow chamber reveals tether-to-sling transition in rolling neutrophils. *Sci Rep* 6: 28870.
<https://doi.org/10.1038/srep28870>

The peculiarities of neutrophils migration processes in the flow system

**S. N. Pleskova^{a, b, *}, N. A. Bezrukov^a, E. N. Gorshkova^a, D. V. Novikov^{a, c},
and E. V. Otstavnova^{a, b}**

^aLobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russia

^bNizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev, Nizhny Novgorod, Russia

*^cNizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology
named after Academician I.N. Blokhina", Nizhny Novgorod, Russia*

e-mail: pleskova@mail.ru

A flow system model simulating the hemodynamic process in capillaries was created to study neutrophil migration. It was found that the general patterns of neutrophil behavior (aggregate formation, formation of neutrophil tethers and migration of neutrophils along intercellular contacts of endothelial cells) are reproduced both in the control (system without chemoattractants) and in the experiment (system with low-molecular chemoattractants of bacteria), however, in the case of *S. aureus* and *P. mirabilis* using as a chemoattractant, the number of aggregates and neutrophil tethers increases statistically significantly ($p < 0.05$). Aggregates correspond to the swarming phenomenon in the transendothelial migration system and help limit the zone of bacterial damage. And neutrophil tethers cause a stop in hemodynamic movement and can cause either a transition to migration or be precursors to the formation of elongated neutrophil-derived structures with high antibacterial potential. Thus, all the observed phenomena contribute to the implementation of the protective function in case of bacteremia.

Keywords: migration, neutrophils, chemoattractants, endothelial cells, blood flow, neutrophil tethers, aggregation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ,
НОКАУТИРОВАННЫХ ПО РЕЦЕПТОРУ TAAR1, В ТЕСТАХ,
ОЦЕНИВАЮЩИХ ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОЕ СОСТОЯНИЕ**

© 2025 г. Е. П. Виноградова¹, А. Ю. Александров¹, Д. В. Беляков¹,
Е. С. Дмитриева¹, Л. Н. Станкевич¹, А. А. Александров¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
*E-mail: e.vinogradova@spbu.ru

Поступила в редакцию 12.05.2025 г.

После доработки 05.06.2025 г.

Принята к публикации 06.06.2025 г.

Целью исследования было изучение функциональной роли рецептора TAAR1 в формировании поведенческого компонента стрессорного ответа. Поведение мышей с нокаутом по TAAR1 и мышей дикого типа (WT) изучали в тестах, отражающих депрессивно подобное состояние до и после окончания действия хронического стресса (модель стресса “запах хищника” (predator stress)), а также отсроченные изменения в поведении спустя 6 недель. В тесте подвешивания за хвост и тесте принудительного плавания по Порсолту между группами TAAR1–KO и WT нет отличий по показателям депрессивно подобного поведения как в норме, так и после хронического стрессорного воздействия. Однако мыши TAAR1–KO, попадая в начале тестирования в стрессорную ситуацию, демонстрируют двигательную гиперактивность, что приводит к резкому увеличению латентных периодов первой иммобилизации в обоих тестах. Нокаут рецептора TAAR1 не влияет на признаки депрессивно подобного поведения, однако приводит к характерному повышению уровня двигательной активности. Мыши TAAR1–KO продемонстрировали более выраженную реакцию на хроническое стрессорное воздействие, набор массы тела после окончания действия стрессора у них происходил значительно медленнее, чем у мышей WT, так что в течение 5 последних недель масса тела животных TAAR1–KO была достоверно меньше, чем у мышей дикого типа. Обнаружено, что через 6 недель после окончания стрессорного воздействия показатели депрессивно подобного состояния у мышей TAAR1–KO и WT продолжают увеличиваться.

Ключевые слова: нокауты TAAR1–KO, тест подвешивания за хвост, тест Порсолта, хронический стресс “запах хищника”, депрессивноподобное состояние, стресс-индуцированная гипертермия

DOI: 10.7868/S2658655X25070122, **EDN:** MVYRLA

ВВЕДЕНИЕ

Хронический стресс – один из важнейших факторов, вызывающих депрессивноподобные расстройства, сопровождающиеся нарушением эмоциональных, когнитивных и моторных функций как сразу после окончания действия негативных факторов внешней среды, так и впоследствии, спустя определенное время.

Дисбаланс нейромедиаторных систем, таких как дофамин, серотонин и норадреналин, может способствовать развитию депрессивных симптомов [1]. Следовые амины, группа аминов, присутствующих в мозге млекопитающих в наномолярных количествах, могут модулировать передачу моноаминов. Открытие и функциональные исследования рецепторов, связанных со следовыми аминами (TAAR), особенно наиболее изученного TAAR1, во многом способствовали пониманию функций системы следовых аминов в мозге [2]. TAAR1 экспрессируется в мозге млекопитающих на низком уровне и широко распространен в моноаминергической системе, в том числе в вентральной области покрышки и черной субстанции, где в мозге млекопитающих находятся дофаминергические нейроны, особенно широко в лимбических и моноаминергических областях, предположительно участвующих в формировании настроения, внимания, памяти, страха и зависимости [3]. Растущее количество данных, полученных *in vitro* и *in vivo*, свидетельствует о том, что TAAR1 может модулировать моноаминергическую передачу и, как следствие, играть важную роль в формировании многих психических расстройств, включая шизофрению, расстройства, связанные с употреблением психоактивных веществ, нарушения сна, депрессию и тревожность [4]. Рецепторы TAAR1, влияя на активность моноаминергических нейромедиаторных систем и соответственно на психоэмоциональные состояния, могут существенно влиять на динамику и уровень данных нейромедиаторов, способствующих изменению эмоционального состояния пациентов с депрессией.

Ранее нами было показано, что у мышей TAAR1 и мышей WT после действия неконтролируемого острого стресса иммобилизации поведенческий компонент стрессорного ответа существенным образом отличается: у мышей TAAR1-KO было обнаружено отсутствие раннего (через 30 мин после стресса) поведенческого ответа на данное стрессорное воздействие, в то время как через 3 недели после стресса животные обеих групп демонстрировали сходные существенные изменения по уровню тревожности и депрессивно подобного поведения [5]. В связи с этим представляется важным сравнить у мышей TAAR1-KO и WT особенности поведенческого стрессорного ответа и возможного развития депрессивно подобных состояний в модели хронического стрессорного воздействия.

Модели депрессии на животных служат основой для исследования как биологических, так и психологических аспектов данного расстройства, а также для тестирования фармакологических и немедикаментозных подходов к лечению. При этом моделирование депрессии человека на животных моделях является сложной задачей, учитывая разнообразную природу многочисленных физиологических и психологических симптомов [6]. Несмотря на то что полногеномные ассоциативные исследования на людях не выявили аллели риска [7], связанные с большим депрессивным расстройством, очевидно, что существуют генетические факторы, которые влияют на чувствительность к стрессу [8]. Изучение депрессии на животных моделях представляет собой важную область в психиатрии и нейробиологии, направленную на понимание патогенеза этого состояния и разработку новых методов терапии.

В настоящее время существует несколько моделей формирования депрессивноподобных состояний у грызунов: хронический иммобилизационный стресс [9], хронический умеренный неконтролируемый стресс [10], хронический стресс социальных поражений [11] и др. Все существующие модели обладают разными достоинствами и недостатками.

Использование хищников и/или запаха хищников в качестве стрессорных факторов является распространенной моделью для изучения развития стрессорного ответа [12]. Известно, что экспозиция мочи хищника приводит к повышению уровня гормонов стресса [13]. Показано, что данная модель стрессорного воздействия может приводить к формированию депрессивноподобного состояния [14]. Известно, что запах хищника (кошки) вызывает у грызунов не только первичные реакции (борьба, бегство,

затаивание), но и вторичные индуцированные изменения [15, 16], в частности, показано, что экспонирование мочи домашней кошки оказывает существенное влияние на репродуктивную функцию грызунов [17], на долговременную пространственную память и плотность шипиков на базальных дендритах нейронов CA1 [18] и вызывает ряд других долгосрочных изменений поведения, физиологии и нейрофизиологии. Поведенческие эксперименты показывают, что мыши, подвергшиеся воздействию запаха хищника, могут демонстрировать уменьшение активности, снижение интереса к исследованию окружающей среды [19] и развитие ангедонии, что является ключевым компонентом депрессивных состояний.

Целью данной работы было изучение влияния хронического стрессорного воздействия на развитие поведенческого компонента стрессорного ответа у мышей TAAR1-KO и мышей WT через 5 дней после окончания процедуры стрессирования и через 6 недель после ее окончания в тестах, оценивающих депрессивноподобное состояние.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследование проводили на самцах мышей TAAR1-KO ($n = 10$), в качестве контроля использовались самцы дикого типа WT ($n = 10$). Исходными для линий WT и TAAR1-KO являлись мыши линий 129S1/Sv и C57BL/6. Животные были получены из Ресурсного центра вивария Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета в возрасте 3.5 месяца. Средняя масса тела животных в начале эксперимента составляла 26.7 ± 0.3 г для TAAR1-KO и 27.2 ± 0.5 г для мышей WT. Процедуру взвешивания проводили раз в неделю с 12:00 до 13:00. Все животные содержались в стандартных условиях при доступе к пище и воде *ad libitum*, в помещении поддерживался 12-часовой цикл “свет – темнота”. Животные размещались в одиночных пластиковых прозрачных боксах с перфорированными стенками ($30 \times 15 \times 17$ см). До начала проведения работ животные находились в лаборатории 20 дней и подвергались процедуре хэндлинга, чтобы предотвратить возникновение стрессорной реакции на взятие в руки во время проведения эксперимента.

Тест подвешивания за хвост (Tail suspension test) проводили в установке, стенки которой были выполнены из красного органического стекла, размер установки составлял $20 \times 40 \times 60$ см по общепринятой методике [20]. Мышь находилась на расстоянии 150 мм от стенок камеры. Каждую мышь подвешивали за хвост на высоте 60 см над полом камеры с помощью клейкой ленты, расположенной на расстоянии менее 1 см от кончика хвоста. Длительность теста составляла 5 мин. На хвост надевали пластиковый цилиндр длиной 2.5 см для предотвращения попыток вылезти по собственному хвосту. Регистрация поведения осуществлялась с помощью системы видеозаписи. Поведение мышей было проанализировано двумя независимыми наблюдателями по видеозаписи для определения следующих параметров: количество эпизодов неподвижности, общая продолжительность неподвижности, латентный период (ЛП) первой иммобилизации, количество болюсов.

Тест Порсолта. В качестве модели депрессивноподобного поведения использовался тест принудительного плавания в соответствии с существующими протоколами [21, 22]. Установка представляла собой стеклянный цилиндр диаметром 20 см при высоте 45 см. Цилиндр заполняли водой (температура $23\text{--}25$ °C) на высоту 20 см так, чтобы помещенное в него животное плавало и при этом не имело возможности выбраться из цилиндра. Длительность тестирования составляла 6 мин. Регистрировали общую длительность неподвижности животного, количество актов иммобилизации, ЛП первой иммобилизации, количество болюсов.

Каждый поведенческий тест проводили в течение одного дня на всех животных с 13:00 до 17:00 ч. Исследуемое поведение во всех опытах фиксировалось на видеокамеру.

Процедура стрессорного воздействия. В качестве хронического стрессорного воздействия использовали модель стресса “запах хищника” (predator stress). В нашем исследовании в качестве запаха хищника использовали свежую кошачью мочу от кота, находящегося на белковой диете. Было проведено 10 сеансов экспозиции запаха хищника. Установка для экспозиции запаха представляла из себя камеру с основанием размером 42 x 42 см и высотой 70 см. Все 4 угла камеры были отделены прозрачными перегородками, куда помещали мышей, перегородка не доходила до основания камеры на 2 мм для свободной циркуляции воздуха и запаха хищника. В каждый угол камеры помещали одну мышь, всего за одну сессию в камеру высаживали четырех животных. Животные могли видеть и слышать друг друга, но не имели возможности физического контакта. В середину установки помещалась емкость с опилками с запахом хищника. Экспозиция “запах хищника” длилась 15 мин, затем животных вынимали и возвращали в их индивидуальные клетки.

Оценка “стресс-индуцированной гипертермии”. В течение всего периода проведения экспериментов у животных каждый день с 12:00 до 13:00 ч измеряли температуру бесконтактным методом с помощью инфракрасного термометра для измерения температуры у грызунов (RAK F103) в области шеи с вентральной поверхности. В период хронического стрессирования измерение температуры осуществляли ежедневно до и после воздействия стрессора.

Порядок тестирования. После окончания процедуры хэндлирования (20 дней) проводили оценку поведения мышей в тесте подвешивания за хвост, а на следующий день в тесте Порсолта. После этого все животные подвергались процедуре хронического стрессорного воздействия. Через 5 дней после окончания процедуры стрессирования (1-й тест после стресса) животных тестировали в поведенческих тестах в том же порядке. Через 6 недель проводили еще раз тест подвешивания за хвост и тест Порсолта (2-й тест после стресса).

Статистика. В связи с тем, что распределения исследуемых величин имеют ряд особенностей, исключающих их нормальность, статистический анализ полученных данных и оценку достоверности различий осуществляли с помощью непараметрических методов. При межгрупповых сравнениях использовался U-критерий Манна – Уитни. Для оценки эффективности применяемого стрессорного воздействия применялся парный T-критерий Вилкоксона для связанных выборок (в программе Graph Pad Prism 8). В качестве критического уровня значимости принималось $\alpha = 0.05$. Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения температуры

Достоверных различий между мышами TAAR1 – KO и WT по величине фоновой температуры (вне периода экспериментальных сессий) до и после хронического стрессирования не обнаружено.

Стресс-вызванная гипертермия. Измерение температуры в период хронического стрессирования до и через 20 мин после окончания сеанса стрессирования (всего было 10 сеансов экспозиции запаха хищника) показало, что в обеих группах наблюдалась стресс-вызванная гипертермия. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы: тип животного TAAR1–KO и WT, стресс “до и после стресса”) показал, что фактор “стресс” имеет достоверные значения $F(1) = 9.425$, $p = 0.018$. Попарные сравнения

показали статистически значимое увеличение температуры: для мышей TAAR1-KO с 36.0 ± 0.09 до 36.2 ± 0.06 ($p = 0.037$) и для мышей WT с 35.9 ± 0.07 до 36.1 ± 0.1 ($p = 0.027$), (рис. 1).

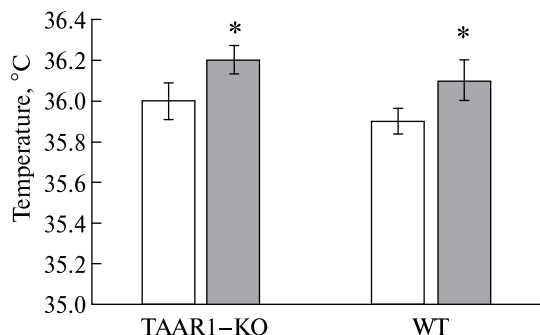


Рис. 1. Изменение температуры в ходе сеансов стрессирования. Суммарные данные по 10 сеансам действия стрессора. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Светлые столбики – температура мышей до процедуры стрессирования, темные столбики – температура мышей через 20 мин после сеанса стрессирования. По вертикали – температура в градусах Цельсия. * – Статистически значимые отличия $p < 0.05$.

Измерение массы и температуры животных показало высокую эффективность процедуры стрессирования. В течение всего времени воздействия масса тела животных падала, и наблюдалась хорошо выраженная стресс-вызванная гипертермия.

Оценка прироста массы тела. Известно, что у грызунов в течение жизни наблюдается постепенный прирост массы тела. До начала стрессорного воздействия мыши TAAR1-KO и мыши WT не различались по массе тела (26.7 ± 0.3 г и 27.2 ± 0.5 г соответственно). После начала стрессорного воздействия масса тела начала снижаться у мышей в обеих группах, и к последнему дню стрессорного воздействия масса тела животных в обеих группах уменьшилась статистически значимо ($p < 0.01$) и составила 26.5 ± 0.2 г для TAAR1-KO и 26.9 ± 0.3 г для WT (рис. 2).

После окончания стрессорного воздействия масса тела начала немедленно восстанавливаться у всех животных. Однако набор массы у мышей WT происходил быстрее, чем у мышей TAAR1-KO (рис. 2). Эти различия в дальнейшем прогрессировали, и через 3 недели после окончания стрессирования появились достоверные различия массы тела у мышей TAAR1-KO по сравнению с диким типом (27.4 ± 0.2 г и 28.8 ± 0.2 г соответственно ($p < 0.01$)). Эти различия сохранялись в течение последующих 5 недель (27.4 ± 0.3 г и 29.1 ± 0.2 г), (рис. 2).

Мыши TAAR1-KO продемонстрировали более выраженную долгосрочную реакцию на хроническое стрессорное воздействие, и набор массы тела у них происходил значительно медленнее, чем у мышей WT, так что в течение всех 5 последних недель масса TAAR1-KO была достоверно меньше, чем у мышей дикого типа, это может указывать на выраженные отдаленные последствия хронического стресса у мышей TAAR1-KO.

В тесте подвешивания за хвост до начала стрессорного воздействия в поведении мышей TAAR1-KO и мышей WT не наблюдалось различий по показателям общей длительности иммобилизации, количеству иммобилизаций за весь период тестирования, количеству болюсов у животных обеих групп. Статистически значимые различия наблюдались только по величине латентного периода (ЛП) первой иммобилизации, который был достоверно длиннее у мышей нокауты ($p < 0.05$) (рис. 3а).

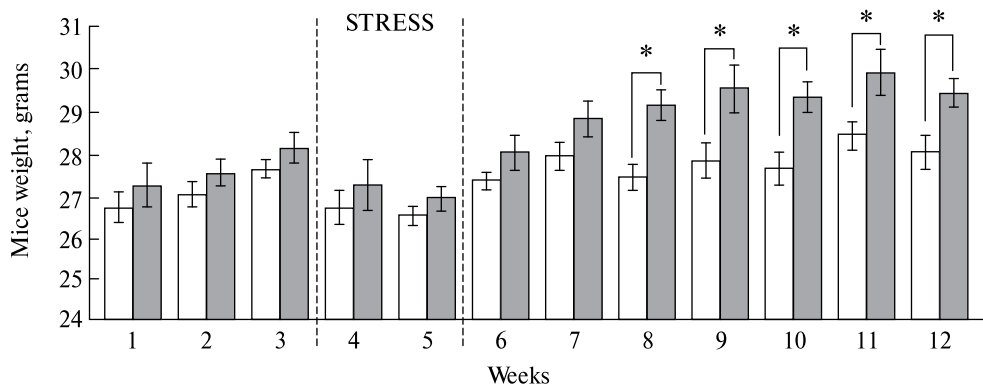


Рис. 2. Изменения массы тела у мышей TAAR1-KO и мышей WT.

Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). По горизонтали – недели, по вертикали – масса тела в граммах (г). Белые столбики – мыши TAAR1-KO, темные столбики – мыши WT. * $p < 0.01$, межгрупповые сравнения.

В первом тестировании через 5 дней после окончания действия хронического стрессора в обеих группах произошло существенное увеличение длительности иммобилизации за первую минуту тестирования, которая увеличилась у TAAR1-KO с 3.1 ± 1.2 до 14.2 ± 2.8 с ($p < 0.01$), у мышей WT с 5.8 ± 1.8 до 18.0 ± 3.9 с ($p < 0.01$). Статистически значимо возросла общая длительность иммобилизации за весь период тестирования: у мышей TAAR1-KO с 117.7 ± 20.1 до 179.4 ± 9.2 с ($p < 0.01$), у мышей дикого типа длительность увеличилась недостоверно и составила 185.5 ± 13.9 с ($p = 0.054$) (рис. 3b). Было показано статистически значимое снижение ЛП первой иммобилизации в обеих группах (рис. 3a). У мышей TAAR1-KO ЛП снизился с 80.8 ± 25.0 до 24.5 ± 4.7 с, у мышей WT – с 36.3 ± 6.7 до 17.3 ± 4.3 с ($p < 0.05$). Существенное уменьшение ЛП первой иммобилизации у мышей TAAR1-KO нивелировало различие между мышами обеих групп в величине ЛП, которое регистрировалось до начала стрессорного воздействия. Из-за того что у мышей TAAR1-KO под влиянием действия стрессора ЛП уменьшился значительно сильнее по сравнению с диким типом, достоверные отличия между группами исчезли. Таким образом, через 5 дней после стрессорного воздействия у мышей TAAR1-KO изменились показатели депрессивно подобного поведения (уменьшился ЛП иммобилизации, увеличилась длительность иммобилизаций за первую минуту и увеличилась общая длительность иммобилизации). Такое изменение этих показателей трактуется как усиление депрессивноподобного поведения под влиянием хронического стресса. При втором тестировании после окончания стрессорного воздействия (спустя 6 недель после стресса) у мышей TAAR1-KO наблюдалось дальнейшее увеличение общей длительности неподвижности, которая составила 213.0 ± 10.9 с ($p < 0.001$ по сравнению с данными до стресса) и сократился ЛП первой неподвижности до 14.2 ± 2.1 с ($p < 0.0001$ по сравнению с данными до стресса). У мышей WT снизился ЛП первой неподвижности до 11.5 ± 1.8 с ($p < 0.01$) и статистически значимо ($p < 0.001$) увеличилась длительность неподвижности, которая составила 203.4 ± 7.3 с (рис. 3).

В тесте Порсолта до начала стрессорного воздействия общая длительность иммобилизации (92.0 ± 15.5 с для группы TAAR1-KO, 106.0 ± 13.1 с для группы WT) и количество актов иммобилизации (19.3 ± 1.5 для группы TAAR1-KO и 18.1 ± 1.9 для группы WT) статистически значимо не отличались. Различие в поведении мышей TAAR1-KO и мышей WT наблюдалось по величине ЛП первой иммобилизации (рис. 4a), который был достоверно длиннее у мышей TAAR1-KO (60.0 ± 6.0 с) по сравнению с мышами

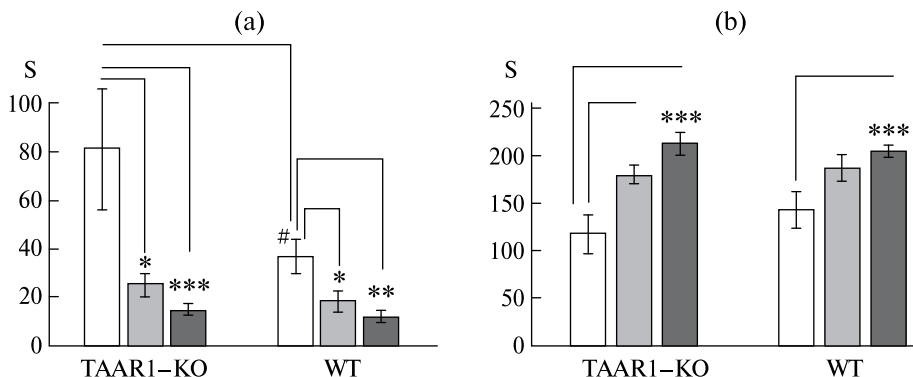


Рис. 3. Поведение мышей TAAR1-KO и мышей WT в тесте подвешивания за хвост. (а) – Латентный период первой иммобилизации в секундах (s). (б) – Длительность иммобилизации за весь тест в секундах (s). Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Белые столбики – данные до стресса, серые столбики – через 5 дней после стресса, черные столбики – через 6 недель после стресса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ внутригрупповые сравнения до и после стресса, # $p < 0.05$, межгрупповые сравнения TAAR1-KO и мышей WT.

WT (42.4 ± 5.8 с) ($p < 0.05$), и длительности иммобилизации на первой минуте тестирования, которая была выше у мышей дикого типа (2.2 ± 0.8 и 4.8 ± 1.2 с соответственно, $p < 0.01$).

В первом тестировании через 6 дней после окончания действия стрессора не наблюдалось изменений количества актов иммобилизации у животных обеих групп. Было показано статистически значимое снижение ЛП первой иммобилизации в обеих группах. У TAAR1-KO ЛП снизился до 10.6 ± 1.9 с ($p < 0.01$), у мышей WT до 5.2 ± 1.6 с ($p < 0.01$) (рис. 4а). Общая длительность иммобилизации увеличилась у мышей-нокаутов до 127.2 ± 14.9 с ($p < 0.01$) и у мышей дикого типа до 154.8 ± 16.2 с ($p < 0.01$) (рис. 4б). Значительно более существенное уменьшение ЛП первой иммобилизации у мышей TAAR1-KO нивелировало различие в величине ЛП, которое регистрировалось до начала стрессорного воздействия.

Также в обеих группах произошло существенное увеличение длительности иммобилизации за первую минуту тестирования, которая увеличилась у TAAR1-KO с 2.2 ± 0.8 до 12.9 ± 3.9 с ($p < 0.01$), у мышей WT – с 4.8 ± 1.2 до 32.2 ± 4.2 с ($p = 0.01$) по сравнению с данными, полученными до стресса.

При втором тестировании (спустя 6 недель) после окончания хронического стрессорного воздействия у мышей TAAR1-KO и мышей WT наблюдалось статистически значимое увеличение общей длительности иммобилизаций по сравнению с данными до стресса (142.4 ± 29.9 и 193.0 ± 13.3 с соответственно ($p < 0.01$)). Изменение ЛП первой иммобилизации было различным. У мышей WT этот показатель статистически значимо не изменился (11.1 ± 2.0 с) по сравнению с данными, полученными в первом тесте после стресса, и оставался статистически значимо ниже, чем до стресса ($p < 0.001$), в то время как у мышей TAAR1-KO ЛП достоверно увеличился до 38.6 ± 12.4 с по сравнению с данными, полученными через 6 дней после окончания стрессорного воздействия ($p < 0.01$), но оставался статистически значимо меньше, чем до начала стресса ($p < 0.01$). При этом восстановились межгрупповые различия, которые наблюдались до начала стресса ($p < 0.01$). Кроме того, у мышей дикого типа увеличилось общее количество актов иммобилизаций (26.4 ± 1.5) по сравнению с данными, полученными до стресса (18.1 ± 1.9 , $p < 0.01$).

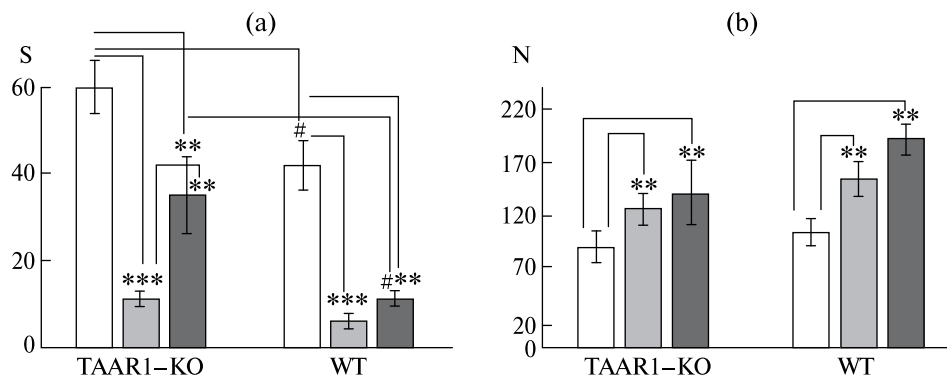


Рис. 4. Поведение мышей TAAR1-KO и мышей WT в тесте Порсолта. (a) – Латентный период первой иммобилизации в секундах (s). (b) – Длительность иммобилизации за весь тест в секундах (s). Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Белые столбики – данные до стресса, серые столбики через 6 дней после стресса, черные столбики – через 6 недель после стресса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – внутригрупповые сравнения до и после стресса, # $p < 0.05$ – межгрупповые сравнения TAAR1-KO и мышей WT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для оценки эффективности использования модели “запах хищника” в качестве способа создания хронического неконтролируемого стресса большое значение имеет регулярное измерение массы тела и температуры животных. Измерение температуры животных показало высокую эффективность процедуры стрессирования в равной мере в обеих группах мышей, стресс-вызванная гипертермия наблюдалась и у мышей TAAR1-KO, и у мышей WT, что согласуется с данными литературы по стресс-индуцированной гипертермии у грызунов [23, 24].

Изменение массы тела в течение всего времени стрессорного воздействия было сходным: масса тела падала у всех животных. Однако мыши TAAR1-KO продемонстрировали более выраженную реакцию на хроническое стрессорное воздействие, и набор массы тела после окончания действия стрессора у них происходил значительно медленнее, чем у мышей WT, так что в течение 5 последних недель масса тела мышей TAAR1-KO была достоверно меньше, чем у мышей дикого типа, это указывает на более выраженные отдаленные последствия хронического стресса у мышей TAAR1-KO.

В целом измерение массы тела и температуры животных показало высокую эффективность процедуры стрессирования, в течение всего времени воздействия масса тела животных падала и наблюдалась хорошо выраженная стресс-вызванная гипертермия. Важно, что у мышей TAAR1-KO была обнаружена более выраженная потеря массы под влиянием стресса по сравнению с группой WT.

Основной показатель для оценки депрессивноподобного поведения в тесте подвешивания за хвост – длительность иммобилизации в норме до стресса – не отличался у мышей TAAR1-KO и мышей WT, в то время как ЛП первой реакции иммобилизации у нокауты был значительно длиннее. Это согласуется с результатами, показанными нами ранее [25]. Таким образом, нокаут рецептора TAAR1 не влияет на признаки депрессивно подобного поведения, однако приводит к характерному повышению уровня двигательной активности.

После окончания действия хронического стресса в тесте подвешивания за хвост было показано статистически значимое снижение ЛП первой иммобилизации в обеих группах, причем в группе TAAR1-KO это снижение было настолько выраженным,

что в результате полностью снимало изначальные межгрупповые различия, связанные с повышением двигательной активности в результате нокаутирования рецептора TAAR1.

У мышей TAAR1-KO произошло увеличение общей длительности иммобилизации, что указывает на усиление признаков депрессивноподобного поведения в результате воздействия хронического стресса. У мышей WT также наблюдалось увеличение общей длительности иммобилизации, статистически маргинальное ($p = 0.054$). При тестировании через 6 недель после окончания стрессорного воздействия отмечено дальнейшее усиление признаков депрессивноподобного поведения (увеличение общей длительности иммобилизации и укорочение ЛП первой иммобилизации) и у мышей TAAR1-KO, и у мышей WT. Усиление отсроченных эффектов стрессорного воздействия для этих групп продемонстрировано впервые.

Исходно в тесте Порсолта длительность иммобилизации не отличалась у мышей TAAR1-KO и WT, в то же время наблюдались достоверные отличия по ЛП иммобилизации. В целом эти различия практически воспроизводят картину, полученную при экспериментах в тесте подвешивания за хвост: при одинаково выраженных признаках депрессивного состояния мыши TAAR1-KO демонстрируют повышенный уровень двигательной активности в начале эксперимента. После стресса в обеих группах происходят заметное увеличение длительности иммобилизации и укорочение ЛП иммобилизации, причем у мышей TAAR1-KO последний показатель падает настолько сильно, что исходные межгрупповые различия исчезают. При проверке отдаленных эффектов стрессирования спустя 6 недель, так же как и в тесте подвешивания за хвост, обнаружено дальнейшее повышение длительности иммобилизации. В то же время показатель ЛП первой иммобилизации явно начинает восстанавливаться и увеличивается в обеих группах, приближаясь к исходным значениям. При этом увеличение для TAAR1-KO настолько выражено, что снова появляются достоверные отличия по этому параметру между группами TAAR1-KO и WT.

В целом, по результатам обоих тестов, можно сделать вывод, что между группами TAAR1-KO и WT нет отличий по показателям депрессивно подобного поведения – как в норме, так и после хронического стрессорного воздействия. Однако мыши TAAR1-KO, попадая в начале тестирования в стрессорную ситуацию, демонстрируют характерное повышение двигательной активности, что приводит к резкому увеличению ЛП иммобилизации в обоих тестах по сравнению с мышами WT.

О влиянии рецепторов TAAR1 на уровень двигательной активности животных имеются сведения в литературе. Линия спонтанно гипертензивных крыс (линия SHR) считается одной из наиболее валидных моделей синдрома дефицита внимания и гиперактивности. Для поведения этих крыс характерны гиперактивность, импульсивность и нарушения внимания [26]. Обнаружено, что у крыс SHR значительно снижен уровень рецепторов TAAR1 в префронтальной коре, стриатуме и гиппокампе. Внутривенное введение агониста TAAR1 спонтанно гипертензивным крысам приводило к снижению двигательной гиперактивности (тест открытое поле) [27]. Похожие результаты были получены на мышах на другой модели синдрома дефицита внимания и гиперактивности – с нокаутированием дофаминового транспортера [28]. Было обнаружено, что введение селективных агонистов TAAR1 снижает на этой модели локомоторную активность, а дополнительное нокаутирование рецепторов TAAR1, наоборот, приводит к усилению двигательной активности [29]. Наши результаты указывают, что нокаутирование рецепторов TAAR1 приводит к выраженной гиперактивности при попадании животных в стрессорную ситуацию.

В данной работе впервые показано, что у мышей TAAR1-KO и WT наблюдаются отсроченные эффекты хронического стрессорного воздействия – показатели депрессивноподобного поведения продолжают усиливаться в течение 6 недель после окончания стрессорного воздействия. Несмотря на некоторые общие черты стрессорного

ответа в двух группах, можно наблюдать специфику развития реакции на хронический стресс у мышей, нокаутированных по TAAR1: через 5–6 дней после стресса показатели депрессивноподобного состояния изменяются более выражено, чем у мышей WT, в обоих тестах, также у них влияние стресса на физиологические показатели (масса тела) оказывается более сильным в течение длительного времени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим виварий Ресурсного центра Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета за предоставление генно-модифицированных животных.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00057).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проводимые процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, международным нормам по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [30] и рекомендациям Этического комитета биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 131-03-2 от 13 марта 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kemp J, Lickel J, Deacon B* (2014) Effects of a chemical imbalance causal explanation on individuals' perceptions of their depressive symptoms. *Behav Res Ther* 56: 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2014.02.009>
2. *Gainetdinov R, Hoener M, Berry M* (2018) Trace Amines and Their Receptors. *Pharmacol Rev* 70(3): 549–620. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015305>
3. *Rutigliano G, Accorroni A, Zucchi R* (2018) The case for TAAR1 as a modulator of central nervous system function. *Front Pharmacol* 8: 987. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00987>
4. *Rutigliano G, Zucchi R* (2020) Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders. *Cell Mol Neurobiol* 40(2): 239–255. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00743-y>
5. *Виноградова ЕП, Симон ЮА, Александров АЮ, Князева ВМ, Станкевич ЛН, Козырева АВ, Александров АА* (2023) У самок мышей нокаутов по гену TAAR1 отсутствует ранний поведенческий ответ на острый иммобилизационный стресс. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 109(11): 1650–1664. [*Vinogradova E, Simon Yu, Aleksandrov A, Stankevich L, Knyazeva V, Aleksandrov A* (2023) Mice Lacking TAAR1 Show No Early Behavioral Response to Acute Restraint Stress 109(11): 1650–1664. (In Russ)] / <https://doi.org/10.31857/S0869813923110122>

6. Nestler E, Hyman S (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13(10): 1161–1169.
<https://doi.org/10.1038/nn.2647>
7. Ménard C, Hodes G, Russo S (2016) Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience* 321: 138–162.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.053>
8. Flint J, Kendler K (2014) The genetics of major depression. *Neuron* 81(3): 484–503.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.027>
9. Cheng Y, Rodriguiz R, Murthy S, Senatorov V, Thouenon E, Cawley N, Aryal D, Ahn S, Lecka-Czernik B, Wetsel W, Loh Y (2015) Neurotrophic factor- $\alpha 1$ prevents stress-induced depression through enhancement of neurogenesis and is activated by rosiglitazone. *Mol Psychiatry* 20: 744–754.
<https://doi.org/10.1038/mp.2014.136>
10. Jung Y, Hong S, Ma S, Hwang J, Kim J, Lee J, Seo J, Lee S, Jang C (2014) Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression and anxiety in mice. *Biomol Ther (Seoul)* 22(5): 453–459.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.058>
11. Kudryavtseva N, Bakshtanovskaya I, Koryakina L (1991) Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav* 38(2): 315–320.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90284-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90284-9)
12. Kigar S, Cuarenta A, Zuniga C, Chang L, Auger A, Bakshi V (2024) Brain, behavior, and physiological changes associated with predator stress-An animal model for trauma exposure in adult and neonatal rats. *Front Mol Neurosci* 29(17): 1322273.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1322273>
13. Rajbhandari A, Baldo B, Bakshi V (2015) Predator stress-induced CRF release causes enduring sensitization of basolateral amygdala norepinephrine systems that promote PTSD-like startle abnormalities. *J Neurosci* 35: 14270–14285.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-14.2015>
14. Tseng Y, Zhao B, Ding H, Liang L, Schaefer B, Wang L (2023) Systematic evaluation of a predator stress model of depression in mice using a hierarchical 3D-motion learning framework. *Transl Psychiatry* 13(1): 178.
<https://doi.org/10.1038/s41398-023-02481-8>
15. Figueiredo H, Bodie B, Tauchi M, Dolgas C, Herman J (2003) Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* 144: 5249–5258.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0713>
16. Belzung C, El Hage W, Moindrot N, Griebel G (2001) Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 41: 400–408.
[https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00072-7](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00072-7)
17. Маланьина Т (2013) Химические сигналы хищника провоцируют хронический эмоциональный стресс у домашних мышей. *Совр пробл науки образов* 1: 337. [Malanina T (2013) Predator chemical signals induced chronic emotional stress in house mouse. *Modern Probl Sci Educ*: 337. (In Russ)].
18. Diamond D, Campbell A, Park C, Woodson J, Conrad C, Bachstetter A, Mervis R (2006) Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus* 16: 571–576.
<https://doi.org/10.1002/hipo.20188>
19. Morrow B, Redmond A, Roth R, Elsworth J (2000) The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Res* 864(1): 146–151.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02174-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02174-0)
20. Cryan J, Mombereau C, Vassout A (2005) The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 571–625.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>
21. Can A, Dao D, Arad M, Terrillion C, Piantadosi S, Gould T (2012) The mouse forced swim test. *J Vis Exp* 59: e3638.
<https://doi.org/10.3791/3638>

22. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R (2015) The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J Vis Exp* 97: e52587.
<https://doi.org/10.3791/52587>
23. Oka T, Oka K, Hori T (2001) Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. *Psychosom Med* 63(3): 476–486.
<https://doi.org/10.1097/00006842-200105000-00018>
24. Herborn K, Graves J, Jerem P, Evans N, Nager R, McCafferty D, McKeegan D (2015) Skin Temperature Reveals the Intensity of Acute Stress. *Physiol Behav* 152: 225–230.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.032>
25. Симон Ю, Виноградова Е, Козырева А, Александров А, Князева В, Станкевич Л, Маркина А, Иоффе В, Александров А (2024) Влияние нокаута гена TAAR1 на характеристики поведения мышей в тесте Порсолта и в приподнятом крестообразном лабиринте. *Вестн Томск гос уни-вер Биология* 68: 157–172. [Simon Y, Vinogradova E, Kozyreva A, Aleksandrov A, Knyazeva V, Stankevich L, Markina A, Ioffe V, Aleksandrov A (2024) Effect of TAAR1 knockout on behavioural characteristics of mice in the forced swim test and in the elevated plus maze test. *Tomsk State Univer J Biol* 68: 157–172. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17223/19988591/6819>
26. Rahi V, Kumar P (2021) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Int J Dev Neurosci* 81 (2): 107–124.
<https://doi.org/10.1002/jdn.10089>
27. Raony Í, Domith I, Lourenco M, Paes-de-Carvalho R, Pandolfo P (2022) Trace amine-associated receptor 1 modulates motor hyperactivity, cognition, and anxiety-like behavior in an animal model of ADHD. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 13(1): 178.
<https://doi.org/10.1038/s41398-023-02481-8>
28. Leo D, Gainetdinov R (2013) Transgenic mouse models for ADHD. *Cell Tissue Res* 354 (1): 259–271.
<https://doi.org/10.1007/s00441-013-1639-1>
29. Revel F, Moreau J, Gainetdinov R, Ferragud A, Vel'azquez-S'anchez C, Sotnikova T, Hoener M (2012) Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics. *Biol Psychiatry* 72(11): 934–942.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.05.014>
30. Eur Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes 1986.

**The effect of chronic stress and TAAR1 knockout on behavior characteristics of mice
in tests assessing depressive-like behavior**

**E. P. Vinogradova^{a,*}, A. Y. Aleksandrov^a, D. V. Belyakov^a, E. S. Dmitrieva^a,
L. N. Stankevich^a, and A. A. Aleksandrov^a**

^aSaint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

**e-mail: e.vinogradova@spbu.ru*

The aim of the study was to study the functional role of the TAAR1 receptor in the formation of the behavioral component of the stress response. The behavior of TAAR1–KO knockout mice and wild type (WT) mice was studied in tests reflecting a depressive-like state before and after the end of chronic stress (predator stress model), as well as delayed behavioral changes after 6 weeks. In the "hanging by the tail" test and the forced swimming Porsolt test, there were no differences between the TAAR1–KO and WT groups in terms of depressive-like behavior both during normal and after chronic stress exposure. However, TAAR1–KO mice, when placed in a stressful situation at the beginning of testing, demonstrate motor hyperactivity, which leads to a sharp increase in the latency periods of the first immobilization in both tests. Knockout of the TAAR1 receptor does not affect the signs of depressive-like behavior; however, it leads to a characteristic increase in the level of motor activity.

Keywords: TAAR1–KO knockouts, tail suspension test, Porsolt test, chronic predator odor stress, depressive-like behavior, stress-induced hyperthermia

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ДЕФИЦИТ ВИТАМИНА D ПРИВОДИТ К УХУДШЕНИЮ
ПОСТИНФАРКТНОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА
У КРЫС**

© 2025 г. Ж. И. Ионова^{1,*}, А. А. Карпов², О. А. Беркович¹, С. Г. Чефу¹,
Л. А. Шиленко², М. Г. Буцких³, А.-Х. А. Черваев², Д. С. Чепурная¹,
Д. Ю. Ивкин⁴, Т. Д. Власов¹

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

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

³Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: zhanna@ncmed.me

Поступила в редакцию 08.04.2025 г.

После доработки 21.05.2025 г.

Принята к публикации 02.06.2025 г.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой многофакторную патологию, прогрессирование которой связано с развитием хронической сердечной недостаточности (ХСН) после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ). Исследования последних лет показали, что дефицит витамина D является независимым фактором риска ИБС и тяжести ее течения. В связи с отсутствием единого представления о патогенетической роли дефицита витамина D является актуальным изучение связи дефицита витамина D с ремоделированием миокарда после перенесенного ИМ у крыс. Цель исследования – изучить эхокардиографические и морфологические показатели постинфарктного ремоделирования миокарда у крыс с дефицитом витамина D. Дефицит витамина D смоделирован у крыс-самцов стока Wistar ($n = 41$) посредством их кормления в течение двух месяцев кормом “Дельта Фидс” с нулевым содержанием витамина D с последующим моделированием ИМ. Животные были разделены на 3 группы: 1-я – группа сравнения, 2-я – крысы, не получавшие холекальциферол после ИМ, 3-я – получавшие холекальциферол после ИМ. Эхокардиография проводилась на ультразвуковой установке высокого разрешения MyLabTouchSL 3116 на 30-й и 60-й день эксперимента после моделирования ИМ. Содержание 25(OH)D в сыворотке крови определено у 5 особей из каждой группы иммуноферментным методом (ELISA). При гистологическом исследовании определяли размер рубца и оценивали выраженность ремоделирования миокарда. Уровень 25(OH)D у крыс из группы 3 был выше, чем у животных, составивших группу 1 сравнения и группу 2 [59.70 (50.50–64.80), 9.00 (8.12–9.54) и 8.20 (7.60–8.31) нмоль/л соответственно; $p = 0.04$]. Терапия холекальциферолом сопровождалась уменьшением ЧСС в группе 3 по сравнению с данным показателем в группе 2 ($p = 0.0004$) на 30-й день после ИМ. По сравнению с группой 3 животные из группы 2 имели больший конечно-диастолический размер (КДР) ($p = 0.002$), конечно-систолический размер (КСР)

($p = 0.002$) и меньшую фракцию укорочения (ФУ) ($p = 0.002$) и фракцию выброса (ФВ) ($p = 0.002$) левого желудочка (ЛЖ) на 30-й и 60-й дни после ишемического повреждения миокарда. Площадь рубца в процентах от площади стенок ЛЖ, толщина стенки ЛЖ в области рубца и межжелудочковой перегородки (МЖП), индексы гипертрофии и дилатации с учетом толщины стенок ЛЖ были выше в группе 2, чем в группе 3 ($p < 0.05$). Выводы: в экспериментальной модели ИМ у крыс на фоне дефицита витамина D, не получавших терапию холекальциферолом после ИМ, наблюдалось значимое развитие гипертрофии миокарда, снижение функции левого желудочка и большая площадь постинфарктного рубца по сравнению с животными, получавшими холекальциферол.

Ключевые слова: дефицит витамина D, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность

DOI: 10.7868/S2658655X25070132, **EDN:** MWCUUR

ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одним из ведущих заболеваний, определяющих высокий уровень смертности (20.7%), несмотря на все профилактические меры [1]. В 30% случаев не удастся установить связь ИБС с традиционными факторами риска, что обуславливает необходимость непрерывного поиска новых факторов риска для оптимизации стратегий первичной и вторичной профилактики ИБС и инфаркта миокарда (ИМ) [2].

В дополнение к традиционным факторам риска ИБС дефицит витамина D представляет собой независимый предиктор тяжести ИБС [3]. В настоящее время распространенность дефицита витамина D в Российской Федерации составляет 43–63%, в Европе – 57–64%, в США – 36% [4].

Несмотря на накопленный клинический опыт применения витамина D в разных областях медицинской науки и практическом здравоохранении, проблема широкого распространения дефицита витамина D остается крайне актуальной [5].

Доказано, что дефицит витамина D (25(OH)D) отмечается у 75% больных ИБС с развитием ИМ в возрасте до 45 лет. При этом ИМ отмечался только у 21% больных ИБС без дефицита витамина D [6]. Значение дефицита 25(OH)D в увеличении риска ИБС подтверждено результатами нелинейной менделевской рандомизации [7, 8].

ИБС представляет собой многофакторную патологию, прогрессирование которой связано с развитием хронической сердечной недостаточности (ХСН) после перенесенного ИМ. Milazzo с соавт. в 2017 г. в своем обзоре обосновали связь между дефицитом 25(OH)D и ИМ. Во-первых, результаты эпидемиологических исследований показали, что встречаемость дефицита 25(OH)D и смерть от ИБС наиболее высоки в зимний период времени в связи со сниженной инсоляцией, при этом частота гиповитаминоза D, ИБС, артериальной гипертензии и сахарного диабета увеличивается пропорционально удалению от экватора. Во-вторых, рецепторы витамина D (VDR) обнаружены в миокарде и в эндотелии сосудов. В-третьих, установлено, что дефицит витамина D играет роль в развитии факторов риска ИБС, в частности метаболического синдрома, артериальной гипертензии и сахарного диабета [9].

ХСН представляет собой наиболее распространенное осложнение ИБС, которое является ведущей причиной госпитализации и смертности среди больных во всех возрастных группах по результатам крупных многоцентровых исследований [10]. Основным пусковым механизмом развития ХСН у больных ИБС является появление зон ишемического некроза при ИМ, что сопровождается последующим ремоделированием

непораженного миокарда с изменением функции и конфигурации предсердий и желудочков [11].

Mancuso с соавт. в экспериментальном исследовании, проведенном в 2008 г., показали, что у крыс с дефицитом 25(OH)D и у мышей с нокаутированным геном *VDR* отмечались накопление коллагена и гипертрофия миокарда [12]. Авторы объясняют это тем, что отсутствие опосредованной 25(OH)D передачи сигнала и активации генома приводит к чрезмерной стимуляции кардиомиоцитов, включая усиление сократительной способности, что в конечном итоге приводит к гипертрофии кардиомиоцитов [12].

Морфофункциональные и молекулярно-генетические особенности течения ИБС оказывают влияние на развитие и прогрессирование ХСН, а также влияют на выбор тактики лечения и прогноз пациентов [13], что определяет необходимость проведения дальнейших исследований. В связи с отсутствием единого представления о патогенетической роли дефицита 25(OH)D является актуальным изучение связи дефицита витамина D с ремоделированием миокарда после перенесенного ИМ у крыс. Таким образом, целью нашего исследования является изучение эхокардиографических и морфологических показателей постинфарктного ремоделирования миокарда у крыс с дефицитом витамина D.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для создания экспериментальной модели были использованы крысы-самцы стока Wistar ($n = 50$) (питомник «Рапполово» РАН). Животные имели неограниченный доступ к корму и воде и содержались в помещении, защищенном от попадания ультрафиолетового излучения, в стандартных условиях с температурой 22–24 °С, влажностью 50–60% и с 12-часовым циклом «свет – темнота» (свет включали в 8:00 утра). На момент поступления возраст крыс составлял 1.5–2 месяца, средняя масса тела 170.1 ± 16.8 г.

Дизайн исследования. Моделирование дефицита 25(OH)D ($n = 50$) производилось посредством кормления крыс в течение двух месяцев кормом «Дельта Фидс» (АО «Биопро», Россия) – комбикормом для лабораторных крыс и мышей с нулевым содержанием витамина D.

После наблюдения в течение 2 месяцев животные с помощью метода случайных чисел были разделены на следующие группы: группа 1 – группа сравнения ($n = 10$) – выведены из эксперимента для получения контрольных образцов плазмы крови; группа 2 – крысы с моделью ИМ, не получавшие терапию холекальциферолом ($n = 14$); группа 3 – животные с моделью ишемического повреждения миокарда (ИМ), получавшие терапию масляным раствором холекальциферола (Vigantol, Португалия) в дозировке 300 МЕ *per os* в течение 21 дня с первого дня после оперативного вмешательства ($n = 17$), что соответствовало дизайну ранее проведенных исследований [14]. В качестве контроля к пероральному приему холекальциферола животным из группы 2 вводилась дистиллированная вода *per os* в аналогичном объеме. После моделирования ИМ животные из группы 2 продолжали получать корм с нулевым содержанием витамина D, а животные из группы 3 – стандартный корм («Дельта Фидс» (АО «Биопро», Россия)) со сбалансированным составом витаминов.

Методика выполнения моделирования ишемического повреждения миокарда в хроническом эксперименте. Моделирование ИМ на 60-й день наблюдения выполнялось на основе ранее описанных методик [15].

Методика выполнения эхокардиографического исследования у крыс. Эхокардиография (ЭХО-КГ) у животных проводилась на ультразвуковой установке высокого разрешения MyLabTouchSL 3116 (Essaot, Италия) на 30-й и 60-й дни эксперимента после моделирования ИМ под анестезией 1.5%-ным изофлураном (Isoflurane Baxter, Baxter A/S Allerød, Дания) через маску. Параметры ЭХО-КГ измерялись с помощью

трассировки в М-режиме для получения изображений в парастернальной позиции по длинной и короткой осям. Регистрировали конечно-диастолический размер (КДР) левого желудочка (ЛЖ), конечно-систолический размер (КСР) ЛЖ, фракцию укорочения (ФУ) ЛЖ, фракцию выброса (ФВ) ЛЖ и частоту сердечных сокращений (ЧСС).

Содержание 25(OH)D в сыворотке крови животных было определено иммуноферментным методом (ELISA) у 5 особей, отобранных методом случайных чисел, из каждой группы.

Пять крыс группы 2 имели летальный исход при моделировании ишемического ИМ: две — при инициации анестезии, две — во время оперативного вмешательства, одна — в первые сутки после перенесенного ИМ. Таким образом, на 30-й день после моделирования ИМ в группе 2 в последующий анализ включались данные по 15 крысам. Во время выполнения ЭХО-КГ через месяц после моделирования ИМ при инициации и во время проведения анестезии погибло пять крыс, и в течение трех суток после проведенного исследования летальный исход развился еще у одного животного, таким образом, анализ данных на 60-й день наблюдения производился по девяти животным.

В группе 3 у трех крыс развился летальный исход во время моделирования ишемического повреждения миокарда: у двух животных при инициации анестезии, у одного — во время моделирования ИМ. Таким образом, в данной группе в анализ на 30-й день исследования включались данные по 17 крысам. Во время эхокардиографии на 30-й день у трех животных при инициации анестезии развился летальный исход, и на 60-й день исследования анализ данных производился по 14 крысам.

По окончании эксперимента (на 60-й день) доступ до сердца производился с помощью широкого чрездиафрагмального билатерального вскрытия грудной клетки крыс. Сердце извлекали из перикардиальной полости и промывали физиологическим раствором с целью удаления крови из камер. Затем ЛЖ пересекали на уровне базальных, средних и верхушечных сегментов на три поперечных среза равной толщины ниже места наложения лигатуры (рис. 1).

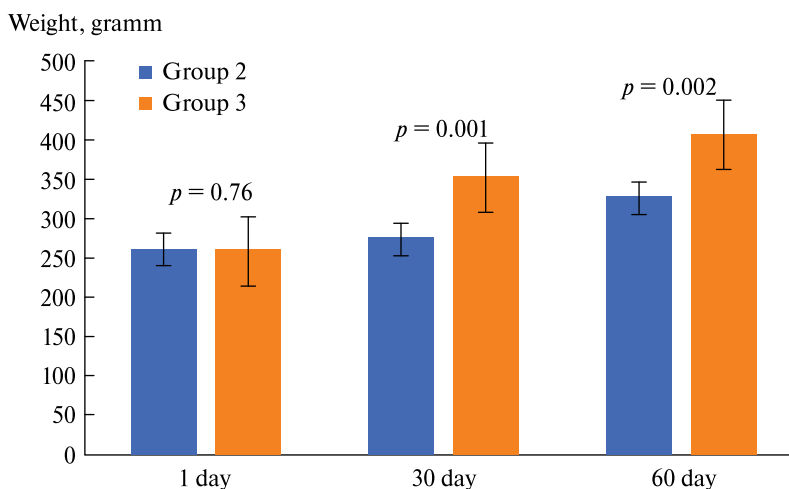


Рис. 1. Схема вырезки срезов сердца.

Полученные гистологические препараты окрашивали пикросириусом красным (Picro Sirius Red, Abcam, Великобритания – США) для выявления соединительной ткани и исследовали при помощи светового микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss,

Германия) с увеличением от $\times 5$ до $\times 40$. Результаты микроскопии оценивались при помощи программного обеспечения Image J (National Institutes of Health, США).

Морфометрическая оценка ремоделирования сердца после ИМ. Размеры рубца оценивали при помощи следующих параметров: отношение площади рубца к площади стенок ЛЖ в %, толщина стенки ЛЖ в рубцовой зоне, длина рубца в % от эпикардиальной и эндокардиальной окружности ЛЖ (рис. 2). Оценка выраженности ремоделирования миокарда производилась при помощи измерения толщины межжелудочковой перегородки (МЖП), расчета индекса гипертрофии и индекса дилатации ЛЖ (%) с и без учета толщины стенок ЛЖ [16].

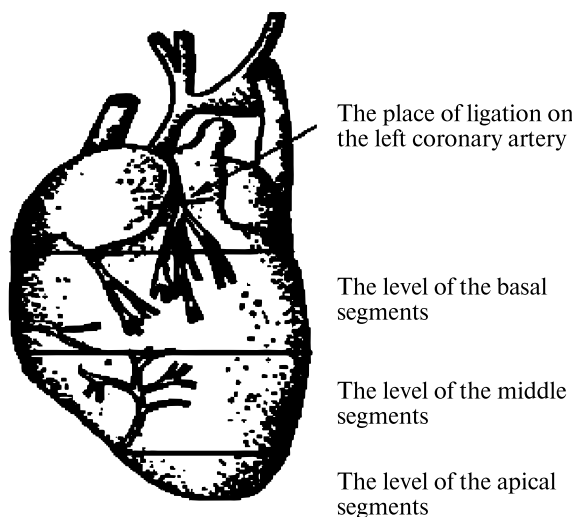


Рис. 2. Гистологические препараты сердца. (а) – Срез на уровне базальных сегментов. (б) – Срез на уровне средних сегментов. (с) – Срез на уровне верхушечных сегментов. LV – левый желудочек; IVS – межжелудочковая перегородка.

Статистический анализ полученных данных выполнялся с помощью программного пакета Statistica v10.0 (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей (Ме [Q1; Q3]). Учитывая небольшие размеры выборки и ненормальное распределение, различия проанализированы с использованием непараметрических тестов. Критерий Краскела – Уоллиса использован для определения общих различий между группами по всем протестированным конечным точкам. Парные сравнения между группами проанализированы с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела животных. Средняя исходная масса тела животных на момент включения в исследование составила 170.1 ± 16.8 г, через 2 месяца, на первый день после моделирования ишемического повреждения миокарда была 259.3 ± 31.8 г, на 30-й день – 315.8 ± 49.5 г, на 60-й день – 384.7 ± 47.5 г. Таким образом, ко второму месяцу эксперимента масса тела крыс во всех группах значительно увеличилась по сравнению с ее исходным уровнем ($p = 0.01$).

Средняя масса тела крыс из группы 2 на первые сутки после моделирования ишемического повреждения миокарда составила 261.3 ± 36.4 г, из группы 3 – 257.6 ± 28.2 г,

что значимо не различалось ($p = 0.76$) (рис. 3). При этом средняя масса тела животных, составивших группу 2, была ниже на 30-е и 60-е сутки наблюдения, по сравнению с группой 3 (273.8 ± 25.5 г и 352.9 ± 32.7 г, $p = 0.001$; 326.7 ± 18.0 г и 407.9 ± 33.0 г, $p = 0.002$ соответственно) (рис. 3).

Смертность. К 60-му дню наблюдения погибли от проявлений тяжелой сердечной недостаточности пять животных из группы 2 и три крысы из группы 3, и на 60-й день исследования анализ данных производился по 9 и 14 животным соответственно.

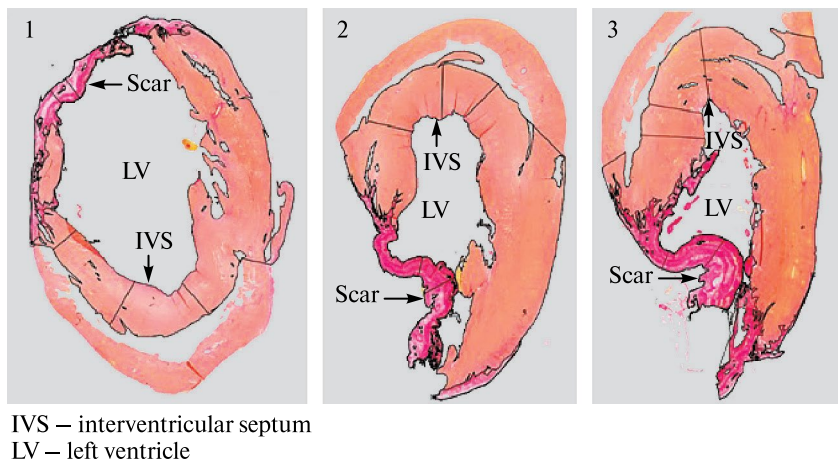


Рис. 3. Средняя масса тела крыс на 1-й, 30-й и 60-й день эксперимента.

Содержание 25(OH)D в сыворотке крови животных группы 1 сравнения ($n = 5$) составило 9.00 ($8.12-9.54$) нмоль/л. Значения 25(OH)D сыворотки крови животных со смоделированным ишемическим повреждением миокарда оценивались на 22-й день эксперимента. Медиана уровня 25(OH)D в сыворотке крови у крыс из группы 2 ($n = 5$), которые не получали терапию холекальциферолом, составила 8.20 ($7.60-8.31$) нмоль/л, при этом концентрация 25(OH)D в сыворотке крови у животных из группы 3 ($n = 5$), получавших с первого дня после смоделированного ишемического повреждения миокарда масляный раствор холекальциферола в дозировке 300 МЕ в течение 21 дня, составила 59.70 ($50.50-64.80$) нмоль/л. Таким образом, уровень 25(OH)D в сыворотке крови у крыс из группы 3 был выше, чем его содержание в сыворотке крови у животных, составивших группу 1 сравнения ($p = 0.04$) и группу 2 ($p = 0.04$).

Частота сердечных сокращений. Терапия холекальциферолом сопровождалась уменьшением ЧСС в группе 3 по сравнению с данным показателем в группе 2 ($p = 0.0004$) на 30-й день после ишемического повреждения миокарда (табл. 1), но при этом значения ЧСС не различались в исследуемых группах на 60-й день наблюдения ($p = 0.54$) (табл. 1).

Анализ эхокардиографических параметров на 30-й и 60-й дни экспериментального исследования выявил более значимое развитие гипертрофии миокарда, значительное снижение функции левого желудочка и его дилатацию у крыс из группы 2 по сравнению с группой 3 (табл. 1). По сравнению с группой 3 животные из группы 2 имели больший КДР ($p = 0.002$), КСР ($p = 0.002$), меньшую ФУ ($p = 0.002$) и ФВ ($p = 0.002$) левого желудочка на 30-й день после ишемического повреждения миокарда. Вышеуказанные различия КДР, КСР и ФУ отмечались и на 60-й день эксперимента. Различия ФВ в исследуемых группах не выявлены на 60-й день после ишемического повреждения миокарда ($p = 0.54$).

Таблица 1. Эхокардиографические показатели и ЧСС в исследуемых группах крыс с ишемическим повреждением миокарда при моделировании гиповитаминоза 25(ОН)D на 30-й и 60-й дни наблюдения

Группы животных	Показатель	Параметры				
		КДР	КСР	ФУ	ФВ	ЧСС
30-й день после ишемического повреждения миокарда						
Группа 2 (n = 14)	$M \pm SD$	10.81 ± 1.76	9.79 ± 1.90	10.70 ± 3.78	24.76 ± 8.81	385.8 ± 33.14
	Me (LQ; UQ)	11.6 (9.81–12.20)	10.2 (8.43–11.29)	8.96 (8.10–13.04)	20.61 (18.71–29.99)	397 (380.5–406)
Группа 3 (n = 17)	$M \pm SD$	8.50 ± 1.23	6.72 ± 1.75	22.79 ± 13.06	53.75 ± 30.37	335.12 ± 37.38
	Me (LQ; UQ)	8.24 (7.94–8.91)	7.02 (5.69–8.08)	21.85 (10.76–0.91)	52.44 (25.82–71.09)	347 (316–354)
p		0.002	0.002	0.002	0.002	0.0004
60-й день после ишемического повреждения миокарда						
Группа 2 (n = 9)	$M \pm SD$	9.23 ± 1.65	7.33 ± 2.22	19.41 ± 13.71	44.64 ± 31.53	372.50 ± 58.37
	Me (LQ; UQ)	9.23 (7.98–9.92)	7.01 (6.28–8.34)	13.56 (9.1–29.59)	31.19 (21.07–68.06)	349 (328.25–402.75)
Группа 3 (n = 15)	$M \pm SD$	8.86 ± 1.38	6.94 ± 2.28	25.31 ± 17.47	47.52 ± 24.95	350.57 ± 35.86
	Me (LQ; UQ)	8.88 (7.76–9.78)	7.04 (5.73–8.38)	21.30 (15.94–30.08)	44.31 (31.84–64.5)	360 (318.75–383.75)
p		0.0004	0.0004	0.0004	0.56	0.54

p – доверительный уровень вероятности при проверке однородности сравниваемых эхокардиографических показателей и ЧСС в различных группах исследуемых животных, КДР – конечно-диастолический размер, КСР – конечно-систолический размер, ФУ – фракция укорочения, ФВ – фракция выброса, ЧСС – частота сердечных сокращений; M – среднее значение; SD – стандартное отклонение; Me – медиана; LQ – нижний квартиль; UQ – верхний квартиль.

Гистологическое исследование. Анализ морфометрических показателей в исследуемых группах животных показал, что площадь рубца в процентах от площади стенок ЛЖ, толщина стенки ЛЖ в области рубца и МЖП, индексы гипертрофии и дилатации с учетом толщины стенок ЛЖ были выше в группе 2, чем в группе 3 ($p < 0.05$) (табл. 2). Отмечалась тенденция к увеличению индекса дилатации без учета толщины стенок ЛЖ в группе 2 по сравнению со значением данного показателя в группе 3 ($p = 0.05$) (табл. 2). Длина рубца от эндо- и эпикардиальной окружности ЛЖ, выраженная в процентах, не различалась в исследуемых группах ($p = 0.13$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования, посвященные ремоделированию сердца после ИМ и постинфарктной ХСН, не теряют актуальности, поскольку ИМ продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения во всем мире и вносит значительный вклад в статистику смертности [17]. В настоящем исследовании у лабораторных животных было смоделировано развитие ИМ. Это сложный феномен, влияющий на механические, электрические, структурные и биохимические показатели деятельности миокарда. После перенесенного инфаркта в миокарде происходят структурные изменения, обусловленные как формированием соединительнотканного рубца, так и ремоделированием миокарда. Доказано, что чем крупнее зона некроза миокарда при развитии инфаркта, тем более выражено снижение его сократительной способности и хуже прогноз [18].

Увеличение функционального класса ХСН связано с целым рядом механизмов. К основным относятся ИМ, представляющий острое повреждение миокарда с нарушением его сократительной способности вследствие сокращения числа функционирующих кардиомиоцитов, что и послужило причиной выбора данной экспериментальной модели для исследования течения ХСН. К другим механизмам относится диастолическая дисфункция миокарда (например, при тахикардиях или ремоделировании миокарда), повышение постнагрузки или перегрузка миокарда давлением вследствие тромбоэмболии легочной артерии или гипертонического криза, увеличение преднагрузки на миокард при пороках сердца или нарушениях водно-солевого баланса [19].

Связь низкого уровня витамина D в крови с риском развития ИБС была обнаружена еще в 1975 г. в Фраммингемском исследовании (Framingham Offspring), в которое было включено 1739 пациентов [20]. В связи с актуальностью темы исследования в данной работе произведена оценка эхокардиографических и морфологических показателей постинфарктного ремоделирования, связанных с развитием ХСН у крыс со смоделированным дефицитом витамина D.

По нашим данным, уровень 25(ОН)D в сыворотке крови у крыс из группы 3 составил 59.70 (50.50–64.80) нмоль/л и был выше, чем его содержание в сыворотке крови у животных, составивших группу 1 сравнения и группу 2 – 9.00 (8.12–9.54) и 8.20 (7.60–8.31) нмоль/л соответственно. По данным литературы, содержание 25(ОН)D в сыворотке крови колеблется в пределах 84–88 нмоль/л у крыс линии Wistar, это было выше, чем у животных, получавших терапию холекальциферолом, что обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований с большей длительностью терапии холекальциферолом [21].

В данном исследовании показано, что средняя масса тела животных со смоделированным дефицитом витамина D, получавших терапию холекальциферолом, выше на 30-е и 60-е сутки наблюдения, чем в группе, не получавшей терапии после моделирования ИМ. В этой же группе, не получавшей холекальциферол, более высокий уровень смертности животных косвенно свидетельствует о более низких компенсаторных возможностях животных в условиях гиповитаминоза D.

Таблица 2. Морфометрические показатели в исследуемых группах крыс с ишемическим повреждением миокарда при моделировании гиповитаминоза 25(ОН)D

Группы животных	Показатель	Параметры						
		Площадь рубца, %	Длина рубца, %	Толщина рубцовой стенки ЛЖ	МЖП	Индекс гипертрофии, %	Индекс дилатации (1)	Индекс дилатации (2)
Группа 2 (<i>n</i> = 8)	<i>M</i> ± <i>SD</i>	26.23 ± 5.16	47.82 ± 5.72	1.02 ± 0.22	1.90 ± 0.11	1.94 ± 0.46	37.66 ± 7.49	91.99 ± 22.46
	<i>Me</i> (LQ; UQ)	25.37 (22.38–28.30)	47.77 (44.25–50.26)	0.98 (0.90–1.13)	1.90 (1.84–1.92)	1.95 (1.63–2.30)	37.69 (30.89–41.65)	87.53 (76.58–100.61)
Группа 3 (<i>n</i> = 8)	<i>M</i> ± <i>SD</i>	18.81 ± 6.75	38.89 ± 10.87	1.27 ± 0.13	1.67 ± 0.18	1.33 ± 0.22	29.98 ± 4.47	49.84 ± 8.30
	<i>Me</i> (LQ; UQ)	18.30 (13.87–22.38)	40.67 (32.51–46.96)	1.26 (1.17–1.37)	1.63 (1.53–1.81)	1.23 (1.19–1.40)	29.90 (28.03–31.14)	47.23 (45.17–52.41)
<i>p</i>		0.04	0.13	0.02	0.02	0.01	0.05	0.009

p – доверительный уровень вероятности при проверке однородности сравнимых морфометрических показателей в различных группах исследуемых животных; ЛЖ – левый желудочек; МЖП – межжелудочковая перегородка; M – среднее значение; s.d. – стандартное отклонение; Me – медиана; LQ – нижний квартиль; UQ – верхний квартиль.

По нашим данным, терапия холекальциферолом сопровождалась снижением, то есть нормализацией ЧСС в группе 3 по сравнению с данным показателем в группе 2, не получавшей терапии, в данной группе ЧСС была повышенной на 30-й день после ишемического повреждения миокарда, но при этом значения ЧСС не различались в исследуемых группах на 60-й день наблюдения, что может быть связано с краткосрочностью терапии холекальциферолом в течение 21 дня и обуславливать необходимость проведения дальнейших исследований с более долгосрочной терапией холекальциферолом.

Анализ эхокардиографических параметров на 30-й и 60-й дни экспериментального исследования выявил выраженное развитие гипертрофии миокарда, значительное снижение функции ЛЖ и его дилатацию у крыс из группы, не получавшей терапии холекальциферолом, по сравнению с группой, получавшей терапию данным препаратом. Отсутствие различий показателей ФВ и ЧСС на 60-й день после ишемического повреждения миокарда в группах животных, получавших и не получавших терапию холекальциферолом, может быть связано с высокой смертностью животных из группы 2, не получавших терапии, с выраженным постинфарктным ремоделированием миокарда, что привело к уменьшению выборки в данной группе и уменьшению статистически значимых различий. Подобные результаты были получены Mancuso с соавт. в экспериментальном исследовании 2008 г. Авторы показали, что у крыс со спонтанной гипертонической ХСН, получавших диету с высоким содержанием соли, лечение $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ приводило к снижению массы миокарда, уровня миокардиального коллагена, диаметра левого желудочка и сердечного выброса [12]. Эти исследования показывают, что лечение $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ может предотвратить развитие гипертрофии миокарда – важного фактора прогрессирования застойной СН [12].

Przybylski с соавт. в 2010 г. также показали, что у крыс со спонтанной гипертонической ХСН дефицит витамина D связан с прогрессированием и конечной терминальной фазой ХСН, а не с начальной гипертрофией сердца, при этом лечение $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ обеспечивало защиту от прогрессирования ХСН [21]. Это может быть связано с тем, что дефицит витамина D нарушает метаболизм Ca^{2+} в миокарде, что приводит к повышению чувствительности сердца к инотропным стимулам и увеличивает содержание коллагена в миокарде [22].

Действительно, дефицит $25(\text{OH})\text{D}$ часто наблюдается у пациентов с застойной ХСН. В последние годы обсуждается несколько механизмов, которые объясняют связь дефицита витамина D с тяжелым течением ИБС. К данным механизмам относят активацию ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), аномальную регуляцию оксида азота, влияние на воспалительные реакции и окислительный стресс [6, 23].

Mancuso с соавт. показали, что лечение $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ снижает активность ренина в плазме, уровни ангиотензина II, АД и гипертрофию миокарда. Более того, описано прямое действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на кардиомиоциты через экспрессируемые ими VDR, предотвращающее их гипертрофию [12]. Показано, что у мышей с нокаутом гена *VDR* и у крыс с дефицитом витамина D наблюдается повышенная сократимость и дезадаптивное ремоделирование сердца, приводящее к гипертрофии кардиомиоцитов и накоплению миокардиального коллагена [12]. По нашим данным, терапия холекальциферолом сопровождалась уменьшением ЧСС у крыс.

Описаны антиатеросклеротические, антитромботические и противовоспалительные эффекты витамина D, которые потенциально могут предотвращать острые сердечно-сосудистые события. Adamczak в 2017 г. в обзоре, посвященном роли дефицита витамина D в развитии ИБС и ее осложнений, на основании анализа большого количества исследований сделал вывод о связи дефицита витамина D с основными факторами атерогенеза [24]. Этим и могут быть объяснены полученные нами результаты. Так, по нашим данным, анализ морфометрических показателей в исследуемых группах животных показал, что размеры рубца и показатели ремоделирования ЛЖ после ИМ выше в группе животных, не получавших терапию холекальциферолом после

смоделированного ИМ, чем в группе, получавшей терапию данным препаратом при дефиците витамина D.

Доказано, что чем крупнее зона некроза миокарда при развитии ИМ, тем выраженнее снижение его сократительной способности и хуже прогноз [18], при этом после перенесенного инфаркта в миокарде возникают структурные изменения, связанные с формированием соединительнотканного рубца и с ремоделированием камер сердца и неповрежденного ишемией миокарда, что может усугубляться дефицитом витамина D.

Результаты, подобные полученным нами, получены EL-Gohary с соавт. Авторы в экспериментальном исследовании показали, что введение витамина D крысам в течение 7 дней до индукции инфарктоподобного поражения уменьшало ишемическое повреждение миокарда, индуцированное изопrenalином за счет перекрестного взаимодействия с рецепторами активаторов пролиферации пероксисом гамма-типа. В частности, наблюдалось улучшение параметров ЭКГ и снижение уровня маркеров повреждения миокарда [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментальной модели ИМ у крыс на фоне дефицита витамина D животные, не получавшие терапию холекальциферолом после ишемического повреждения миокарда, имели более высокий уровень смертности, более низкую массу тела и более значимое развитие гипертрофии миокарда, значительное снижение функции левого желудочка и его дилатацию и большую площадь постинфарктного рубца, чем животные, получавшие холекальциферол в дозировке 300 МЕ в течение 21 дня после смоделированного ИМ.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента, разработка концепции и дизайна работы (Ж. И. И., О. А. Б., Т. Д. В.), выполнение экспериментальной части работы, сбор данных (А. А. К., С. Г. Ч., Л. А. Ш., М. Г. Б., А.-Х. А. Ч., Д. С. Ч., Д. Ю. И.), обработка и интерпретация данных (Ж. И. И., А. А. К.), написание и редактирование манускрипта (Ж. И. И., О. А. Б.). Все авторы одобрили финальную версию статьи, подлежащую публикации, дают согласие нести ответственность за все аспекты работы, а также гарантию того, что все вопросы по достоверности и надежности любой части работы надлежащим образом проанализированы и решены.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках приоритетного государственного задания 720000Ф.99.1.БН62АБ22000 «Разработка универсального метода мультиорганной консервации донорских органов».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, и принципам Базельской декларации. Протоколы экспериментов на крысах одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Минздрава России (протокол комитета по биоэтике № Rats-MI-01-2022 от 12 мая 2022 года). Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsen T, Escaned J, Gersh BJ, Svitil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J, Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ* (2020) 2019 ESC guidelines on the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: the task force for diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European society of cardiology (ESC). *Eur Heart J* 41(3): 407–477.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz825>
2. *Pencina MJ, Navar AM, Wojdyla D* (2019) Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Circulation* 139(13): 1603–1611.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031855>
3. *Mokadem ME, Boshra H, Hady YAE, Hameed AS* (2021) Relationship of serum vitamin D deficiency with coronary artery disease severity using multislice CT coronary angiography. *Clin Investig Arterioscler* 33(6): 282–288.
<https://doi.org/10.1016/j.arteri.2021.02.008>
4. *Полуэктова АЮ, Мартынова ЕЮ, Фатхутдинов ИР, Демидова ТЮ, Потешкин ЮЕ* (2018) Генетические особенности чувствительности к витамину D и распространенность дефицита витамина D среди пациентов поликлиники. *РМЖ Мать и дитя* 1: 11–17. [*Poluektova AYU, Martynova EYu, Fatkhutdinov IR, Demidova TYu* (2018) Genetic features of vitamin D sensitivity and the prevalence of vitamin D deficiency among polyclinic patients. *Mother and child* 1:11–17. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.32364/2618-8430-2018-1-1-11-17>
5. *Суплотова ЛА, Авдеева ВА, Пигарова ЕА, Рожинская ЛЯ, Трошина ЕА* (2021) Дефицит витамина D в России: первые результаты регистрового неинтервенционного исследования частоты дефицита и недостаточности витамина D в различных географических регионах страны. *Пробл эндокринол* 67(2): 84–92. [*Suplotova LA, Avdeeva VA, Pigarova EA, Rozhinskaya LYa, Troshina EA* (2021) Vitamin D deficiency in Russia: The first results of a register-based non-interventional study of the frequency of vitamin D deficiency and insufficiency in various geographical regions of the country. *Probl Endocrinol* 67(2): 84–92. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.14341/probl12736>
6. *De la Guía-Galipienso F, Martínez-Ferran M, Vallecillo N, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H* (2021) Vitamin D and cardiovascular health. *Clin Nutr* 40(5): 2946–2957.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.025>
7. *Crea F* (2022) The risk of ‘hidden’ sodium and of low vitamin D levels. *Eur Heart J* 43: 1687–1690.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac203>
8. *Беркович ОА, Ионова ЖИ, Пчелина СН, Ду Ц, Мирошникова ВВ, Боткина АА, Драчева КВ, Беляева ОД* (2022) Особенности клинического течения ишемической болезни сердца у больных с различной обеспеченностью витамином D, жителей Санкт-Петербурга: ассоциация с комплексом генотипов рецептора витамина D. *Трансляц мед* 9(2): 6–14. [*Berkovich OA, Ionova Zhi, Pchelina SN, Du Ts, Miroshnikova VV, Botkina AA, Dracheva KV, Belyaeva OD* (2022) Features of the clinical course of coronary heart disease in patients with varying vitamin D levels, residents of St. Petersburg: association with a complex of vitamin D receptor genotypes. *Translat med* 9(2): 6–14. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2022-9-2-6-14>
9. *Milazzo V, De Metrio M, Cosentino N, Marenzi G, Tremoli E* (2017) Vitamin D and AMI. *World J Cardiol* 9(1): 14–20.
<https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i1.14>
10. *Roger VL* (2021) Epidemiology of Heart Failure: A Contemporary Perspective. *Circ Res* 128(10): 1421–1434.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318172>
11. *Andersson C, Liu C, Cheng S, Wang TJ, Gerszten RE, Larson MG, Vasan RS* (2020) Metabolomic signatures of cardiac remodelling and heart failure risk in the community. *ESC Heart Failure* 7(6): 3707–3715.
<https://doi.org/10.1002/ehf2.12923>
12. *Mancuso P, Rahman A, Hershey SD, Dandu L, Nibbelink KA, Simpson RU* (2008) 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Treatment Reduces Cardiac Hypertrophy and Left Ventricular Diameter in Spontaneously Hypertensive Heart Failure-prone (cp/+) Rats Independent of Changes in Serum Leptin. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 559–564.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181761906>

13. *Malik A, Brito D, Vaqar S* (2022) Congestive Heart Failure. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing PMID: 28613623
14. *Ali SS* (2018) The Effects of Hypervitaminosis D in Rats on Histology and Weights of Some Immune System Organs and Organs Prone to Calcification. *Int J Pharmac Phytopharmacol Res* 8(6): 59–71.
<https://doi.org/10.31185/wjps.617>
15. *Карпов АА, Ивкин ДЮ, Драчева АВ, Питухина НН, Успенская ЮК, Ваулина ДД, Усков ИС, Эйвазова ШД, Минасян СМ, Власов ТД, Бурякина АВ, Галагудза ММ* (2014) Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина* 3: 32–48. [*Karpov AA, Ivkin DYU, Dracheva AV, Pitukhina NN, Uspenskaya SC, Vaulina DD, Uskov IS, Eyvazova SD, Minasyan SM, Vlasov TD, Buryakina AB, Galagudza MM* (2014) Modeling of postinfarction heart failure by occlusion of the left coronary artery in rats: techniques and methods of morphofunctional assessment. *Biomedicine* 3: 32–48. (In Russ.)].
<https://cyberleninka.ru/article/n/modelirovanie-postinfarktnoy-serdechnoy-nedostatochnosti-putem-okklyuzii-levoy-koronarnoy-arterii-u-krys-tehnika-i-metody>
16. *Эйвазова ШД, Карпов АА, Мухаметдинова ДВ, Ломакина АМ, Черепанов ДЕ, Ивкин ДЮ, Ваулина ДД, Чефу СГ, Галагудза ММ* (2016) Подходы к морфометрической оценке ремоделирования сердца после инфаркта миокарда. *Трансляц мед* 3(6): 62–72. [*Eyvazova ShD, Karpov AA, Mukhametdinova DV, Lomakina AM, Cherepanov DE, Ivkin DU, Vaulina DD, Cefu SG, Galagudza MM* (2016) Approaches to morphometric assessment of cardiac remodeling after myocardial infarction. *Translat med* 3(6): 62–72. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2016-3-6-62-72>
17. *Полякова ЕА* (2022) Низкий уровень адипонектина в крови как фактор риска тяжелого течения ишемической болезни сердца. *Атеросклероз и дислипидемии* 1(46): 47–56. [*Polyakova EA* (2022) Low blood adiponectin levels as a risk factor for severe coronary heart disease. *Atherosclerosis and dyslipidemia* 1(46): 47–56. (In Russ.)].
<https://cyberleninka.ru/article/n/nizkiy-uroven-adiponektina-v-krovi-kak-faktor-riska-tyazhelogo-techeniya-ishemicheskoy-bolezni-serdtsa>
18. *Ojha N, Dhamoon AS* (2021) Myocardial Infarction. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publ PMID: 30725761.
19. *Hsu S, Fang JC, Borlaug BA* (2022) Hemodynamics for the Heart Failure Clinician: A State-of-the-Art Review. *J Card Fail* 28(1): 133–148.
<https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2021.07.012>
20. *Feinleib M, Kannel WB, Garrison RJ, McNamara PM, Castelli WP* (1975) The Framingham Offspring Study. Design and preliminary data. *Prev Med* 4(4): 518–525.
[https://doi.org/10.1016/0091-7435\(75\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0091-7435(75)90037-7)
21. *Mahjoub SK, Sattar Ahmad MAA, Kamel FO, Alseini M, Khan LM* (2022) Preclinical study of vitamin D deficiency in the pathogenesis of metabolic syndrome in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26(23): 9001–9014.
https://doi.org/10.26355/eurrev_202212_30575. PMID: 36524519
22. *Przybylski R, Mccune S, Hollis B, Simpson RU* (2010) Vitamin D Deficiency In The Spontaneously Hypertensive Heart Failure [SHHF] Prone Rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20(9): 641–646.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.07.009>
23. *Косматова ОВ, Мяжкова МА, Скрипникова ИА* (2020) Влияние витамина D и кальция на сердечно-сосудистую систему: вопросы безопасности. *Профилактик мед* 23(3): 140–148. [*Kosmatova OV, Myagkova MA, Skripnikova IA* (2020) The effect of vitamin D and calcium on the cardiovascular system: safety issues. *Prevent Med* 23(3): 140–148. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.17116/profmed202023031140>
24. *Adameczak DM* (2017) The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 18(11): 2252.
<https://doi.org/10.3390/ijms18112252>
25. *El-Gohary OA, Allam MM* (2017) Effect of vitamin D on isoprenaline induced myocardial infarction in rats; possible role of Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ (PPAR-γ). *Canad J Physiol Pharmacol* 95(6): 641–646.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0150>

Vitamin D Deficiency Leads to Deterioration of Post-Infarction Remodeling of the Left Ventricle in Rats

**Zh. I. Ionova^a, A. A. Karpov^b, O. A. Berkovich^a, S. G. Cefu^a, L. A. Shilenko^b,
M. G. Butskikh^c, A.-Kh. A. Chervaev^b, D. S. Chepurnaya^a, D. Yu. Ivkin^d,
and T. D. Vlasov^a**

^a*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^b*Almazov National Research Medical Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^c*St. Petersburg Research Institute of ENT, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^d*St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
e-mail: zhanna@ncmed.me*

Coronary heart disease (CHD) is a multifactorial pathology, the progression of which is associated with the development of chronic heart failure (CHF) after a myocardial infarction (MI). Recent studies have shown that vitamin D deficiency is an independent risk factor for coronary heart disease and the severity of its course. Due to the lack of a unified understanding of the pathogenetic role of vitamin D deficiency, it is relevant to study the relationship of vitamin D deficiency with myocardial remodeling after myocardial infarction in rats. The purpose of the study. To study echocardiographic and morphological parameters of postinfarction myocardial remodeling in rats with vitamin D deficiency. Vitamin D deficiency was modeled in male Wistar stock rats ($n = 41$) by feeding them for two months with Delta Feeds with zero vitamin D content, followed by IM modeling. The animals were divided into 3 groups: 1st – the comparison group, 2nd – rats that did not receive cholecalciferol after MI, 3rd – those who received cholecalciferol after MI. Echocardiography was performed on a high-resolution ultrasound machine MyLabTouchSL 3116 on the 30th and 60th days of the experiment after IM modeling. Content 25(OH)D in blood serum D was determined in 5 individuals from each group by the enzyme immunoassay (ELISA). Histological examination determined the size of the scar and assessed the severity of myocardial remodeling. Level of 25(OH)D in rats from group 3 was higher than in animals from comparison group 1 and group 2 (59.70 (50.50–64.80) nmol/L, 9.00 (8.12–9.54) nmol/l and 8.20 (7.60–8.31) nmol/l, respectively; $p = 0.04$). Cholecalciferol therapy was accompanied by a decrease in heart rate in group 3 compared with this indicator in group 2 ($p = 0.0004$) on day 30 after MI. Compared with group 3, animals from group 2 had a higher end diastolic size (EDS) ($p = 0.002$), end systolic size (ESS) ($p = 0.002$) and lower left ventricular shortness fraction (SF) ($p = 0.002$) and ejection fraction (EF) ($p = 0.002$) on days 30 and 60 after ischemic myocardial injury. The scar area as a percentage of the LV wall area, LV wall thickness in the area of the scar and interventricular septum (IVS), hypertrophy and dilation indices, taking into account the thickness of the LV walls, were higher in group 2 than in group 3 ($p < 0.05$). In an experimental MI model in rats with vitamin D deficiency, those who did not receive cholecalciferol therapy after MI had a significant development of myocardial hypertrophy, decreased left ventricular function, and a larger postinfarction scar area than those who received cholecalciferol.

Keywords: vitamin D deficiency, coronary heart disease, myocardial infarction, chronic heart failure

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ РОСТЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ
ГЕПАТОМЫ 22А: РОЛЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА**

© 2025 г. Е. А. Зеленский¹, К. В. Рутто², А. С. Трулев¹, Н. П. Горбунов³,
А. В. Соколов⁴, Е. П. Киселева^{1,*}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

⁴Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ekissele@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2025 г.

После доработки 29.05.2025 г.

Принята к публикации 16.06.2025 г.

Церулоплазмин (Ср) играет ключевую роль в обмене двух жизненно важных микроэлементов – железа и меди, метаболические пути которых тесно связаны между собой, а также с обменом цинка. Опухолевый рост часто сопровождается повышением концентрации Ср в крови, однако его роль в опухолевой прогрессии не вполне ясна. Цель исследования – сопоставление изменений концентрации Ср в сыворотке крови с концентрациями железа и цинка, а также провоспалительных цитокинов и липидов в динамике опухолевого роста. Кроме того, изучали, как влияет на содержание Ср сульфат цинка, принимаемый с питьевой водой. Работу проводили на мышцах СЗНА, которым подкожно инокулировали клетки гепатомы 22а. Подъем Ср начинался с 14-х суток синхронно с появлением центральных некрозов и повышением уровня триглицеридов в циркуляции. Повышение концентрации IL-6 в крови началось на 7-е сутки и могло служить триггером для развития острофазной реакции, выражающейся в повышении синтеза Ср, развитии гипоферремии, гипоцинкемии и гипертриглицеридемии. Снижение содержания негемового железа в крови и печени развивалось позже, чем подъем Ср, это указывает на то, что дефицит железа не мог быть причиной повышения концентрации Ср на 14-е сутки, однако мог способствовать его поддержанию на поздних сроках роста гепатомы. Прием сульфата цинка нормализовал содержание железа и частично цинка в крови у животных с опухолями на 21-е сутки, но не влиял на концентрацию Ср. Обсуждается возможная протуморогенная роль Ср, которая связана не столько с его участием в обмене железа, сколько со способностью транспортировать медь в ткани. Мы предполагаем, что Ср является важным патогенетическим фактором, участвующим в обеспечении опухолей необходимыми липидными метаболитами, поскольку Ср совместно с IL-6 может поддерживать процесс липолиза в жировой ткани, доставляя туда ионы меди.

Ключевые слова: церулоплазмин, гепатома 22а, IL-6, гипоферремия, триглицериды, опухолевые некрозы, сульфат цинка

ВВЕДЕНИЕ

Церулоплазмин (Ср) является белком, сопровождающим опухолевый рост, и может использоваться для диагностики и прогноза при разных видах новообразований у человека, хотя его роль в опухолевой прогрессии не вполне ясна [1, 2]. Повышение его концентрации в крови можно рассматривать по-разному: как реакцию белка острой фазы, как ответ на гипоксию и окислительный стресс, а возможно, и как следствие изменения содержания железа и меди в организме.

Некоторые специалисты считают, что основной функцией растворимой формы Ср, находящейся в плазме крови, является его антиоксидативное действие, связанное со способностью удалять образующиеся при воспалении свободные радикалы кислорода [3]. Того же мнения придерживаются ученые и в отношении роли Ср при опухолевом росте, поскольку этот процесс также сопровождается развитием системного окислительного стресса [4].

Однако не менее важным является участие Ср в обмене меди и железа. Ср является одним из основных белков – переносчиков меди и доставляет этот важный микроэлемент не только нормальным, но и опухолевым тканям, способствуя опухолевой прогрессии [5]. Ср также обладает феррооксидазной активностью, переводя железо из Fe(II) в Fe(III), что необходимо для связывания с трансферрином, основным железотранспортным белком, и ферритином, выполняющим роль основного внутриклеточного депо [3]. Ср активно участвует в мобилизации железа из систем внутриклеточного хранения и играет важную роль в поддержании баланса железа в организме. Известно, что пищевой дефицит железа у нормальных животных повышает синтез Ср через активацию HIF-1 α сигнального пути [6].

Обмен железа и меди в организме тесно взаимосвязан с еще одним микроэлементом – цинком. Эти металлы могут проявлять конкурентные взаимоотношения на уровне всасывания, транспорта и встраивания в различные ферменты и транскрипционные факторы [7, 8]. Содержание животных на диете с повышенным содержанием цинка [9], так же как и избыточное употребление цинка пациентами [10], вызывает резкое снижение активности Ср в крови, которое является следствием развития дефицита меди из-за подавления ее всасывания в кишечнике. В противоположном случае дефицит цинка в организме может также оказывать значимое влияние на содержание меди и активность Ср у животных [11]. О взаимосвязи цинка и Ср свидетельствуют данные о том, что цинк может замещать ионы меди в лабильных сайтах связывания молекулы Ср [12]. Присутствие ионов цинка необходимо для осуществления одной из важнейших функций этого белка – переноса Fe(II), окисляемого Ср, на трансферрин [13].

Данные литературы указывают, что между тремя микроэлементами (Fe, Zn, Cu) и Ср существуют довольно сложные непрямолинейные взаимоотношения, и изменения в содержании железа, меди или цинка в организме могут оказывать существенное влияние если не на синтез Ср, то на его ферментативную активность.

Ср является белком острой фазы, который синтезируется в печени под влиянием провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6 [3, 14]. Известно, что в ходе острой воспалительной реакции эти цитокины вызывают развитие гипоферремии [15] и гипоцинкемии [16, 17], которые могут оказывать влияние на функционирование Ср.

Частью острофазного ответа является также гиперлипидемия, связанная со способностью провоспалительных цитокинов ингибировать липопротеинлипазу жировой ткани, подавлять липогенез и способствовать липолизу [18], а также увеличивать секрецию триглицеридов в печени [19, 20]. Имеются данные о том, что Ср связан с регуляцией метаболических процессов в жировой ткани. Он синтезируется не только в печени, но и в жировой ткани, где контролирует синтез других адипокинов и оказывает противовоспалительное действие [21]. Показано, что при метаболическом синдроме

повышенная концентрация Ср в образцах сыворотки крови ассоциирована с уровнем липидов и особенно триглицеридов [22].

Реакция острой фазы является ответом организма на повреждение тканей и развивается обычно в течение первых 24–48 ч [23]. При опухолевом росте острое состояние может переходить в хроническое воспаление вследствие циклического течения неопластического процесса, при котором гипоксия и некроз сменяются новыми фазами пролиферации и ангиогенеза [24]. В результате рост многих опухолей сопровождается развитием системной воспалительной реакции с повышением в крови концентрации провоспалительных цитокинов и белков острой фазы [25], гиперлипидемией [26, 27], а также развитием дефицита железа и цинка [28, 29].

Целью настоящего исследования послужило сопоставление изменений концентрации Ср, активного по отношению к пара-фенилендиамину, в сыворотке крови животных с рядом показателей, характеризующих метаболические нарушения и воспалительную реакцию, в динамике роста перевиваемой опухоли, а именно с концентрацией в крови железа и цинка, провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-6), а также холестерина и триглицеридов. Кроме того, содержание Ср было сопоставлено с концентрациями железа и цинка в сыворотке крови в условиях дополнительного приема цинка с питьевой водой.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работу проводили на мышах-самцах СЗНА массой тела 16–18 г, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (Санкт-Петербург, РФ). Животные находились на стандартной диете и получали сухой комбикорм ПК-120 (“Лабораткорм”, Москва, РФ), содержащий 22.5 мг цинка и 18 мг железа на кг корма. Мыши имели свободный доступ к еде и питьевой воде *ad libitum*. Световой режим день/ночь был установлен по 12 ч, температура в помещении – 22 °С.

Клеточные культуры. Культура клеток гепатомы 22а (МН-22а/МГ-22а) была получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM (“Биолот”, РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 0.1 мг/мл гентамицина (“Биолот”, Россия) и 0.6 мг/мл glutамин (“Биолот”, РФ) при 5% CO₂ и 37 °С.

Опухолевая модель. Для получения солидных опухолей животным подкожно инокулировали в область спины 2×10^5 живых клеток гепатомы 22а в 0.2 мл забуференного физиологического раствора (PBS, “Биолот”, РФ). Контрольные животные получали инъекцию только PBS. Для изучения действия цинка животные с опухолями получали *ad libitum* питьевую воду с добавлением сульфата цинка (Sigma, США) в концентрации 22 мкг/мл с первого дня после инокуляции клеток гепатомы 22а в течение всего периода эксперимента.

На 3-и, 7-е, 14-е и 35-е сутки опухолевого роста анестезированных животных обескровливали и в образцах сыворотки крови определяли содержание ряда факторов для каждой мыши индивидуально. Опухолевые узлы измеряли циркулем в двух взаимно перпендикулярных направлениях и вычисляли объем опухоли по формуле $v = 0.4ab^2$, где a и b – наибольший и наименьший размеры опухоли соответственно. Кроме того, извлекали опухоль для гистологического анализа и печень для определения содержания железа.

Для гистологического исследования опухолевые узлы фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и азур-II-эозином. Подсчет площади, занимаемой на срезе некротизированной и интактной тканью, проводили с помощью сетки Вейбеля на 50 точек при увеличении $\times 200$ в 10 полях зрения с вычислением

средней арифметической на одно поле зрения [30]. Поскольку соотношение площадей на срезе прямо пропорционально соотношению объемов, на рисунке указано соотношение объемов.

Определение содержания негемового железа в сыворотке крови и печени. Концентрацию железа определяли колориметрическим методом [31] с использованием хромогенного агента феррозина (Sigma-Aldrich, США). Гомогенаты печени приготавливали в деионизированной воде 1 : 10 (масса/объем) и смешивали с равным объемом раствора, преципитирующего белки, состоящего из 1 М HCl ("Реахим", РФ) и 10%-ной трихлоруксусной кислоты ("Реахим", РФ). Пробы нагревали при 95 °С в течение 1 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 8200 g в течение 10 мин. После этого 30 мкл супернатанта смешивали с 30 мкл хромогенного субстрата, состоящего из 0.508 мМ феррозина, 1.5 М ацетата натрия (Amresco, США) и 1.5%-ной тиогликолевой кислоты (Sigma-Aldrich, США); в контрольные пробы феррозин не добавляли. Через 30 мин оптическую плотность раствора измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра (ClarioStar, BMG Labtech, Германия) при длине волны 562 нм. Построение калибровочных кривых проводили в день эксперимента с использованием в качестве стандарта 0–20 мкг/мл железа в виде раствора $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, США) в 0.4 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.5.

Содержание общего цинка в образцах сыворотки крови определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии. Образцы растворяли в двух объемах азотной кислоты ("Реахим", РФ) и проводили измерение по отношению к стандартным растворам цинка (Центр стандартных образцов и высокочистых веществ, Санкт-Петербург, Россия) с помощью спектрометра ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия).

Содержание липидов в сыворотке крови – общего холестерина и триглицеридов проводили на аутоанализаторе Keysys (Boehringer Mannheim).

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием коммерческих наборов для определения TNF- α и IL-6 мыши (Titerzyme, Advanced Magnetics; R&D Systems, Великобритания).

Концентрацию Ср в сыворотке крови определяли путем измерения его оксидазной активности с пара-фенилендиамином в микропланшетах [32]. Десять микролитров образца сыворотки или калибровочного Ср (0.005–1.4 мг/мл) вносили в лунки 96-луночного планшета, а затем добавляли 0.24 мл свежеприготовленного 0.2%-ного раствора дигидрохлорида пара-фенилендиамина в 0.4 М натрий-ацетатном буфере (pH 5.5). Измерение при длине волны A_{530} проводилось немедленно с помощью микропланшетного ридера ClarioStar (BMG Labtech, Ортенберг, Германия). Через 30 мин инкубации при 37 °С снова измеряли при длине волны 530 нм. Расчет содержания Ср в тестируемых образцах сыворотки крови проводили по калибровочному графику с использованием очищенного Ср, полученного из сыворотки крови мыши [33].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 13.0 с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика опухолевого роста. Гепатома 22а – слабоиммунотогенная нематастазирующая опухоль с умеренной степенью дифференцировки [34]. На 7-е сутки после подкожной инокуляции появлялось пальпируемое через кожу образование диаметром 2–3 мм. На 14-е сутки диаметр опухоли составлял приблизительно 10 мм. С этого времени наблюдался период быстрого роста (14–21-е сутки), к концу которого опухоль достигала в размере 20 мм, после чего наступал период замедления ее роста (28–35-е сутки).

При гистологическом исследовании ткань гепатомы 22а на 7-е сутки характеризовалась максимально выраженной лимфоидной инфильтрацией по периферии опухолевого узла и началом неоваскуляризации. На 14-е сутки ткань гепатомы окончательно формировалась – опухоль состояла из более однородных, чем на предыдущих сроках исследования, плотно расположенных клеток, имеющих сходство с печеночными. В центральных отделах опухоли впервые на этом сроке появлялись небольшие множественные рассеянные очаги некроза, часто располагающиеся вблизи сосудов. На этом сроке исследования площадь некрозов на срезах составляла 3% (рис. 1а).

На 21-е сутки площадь, занимаемая некрозами, существенно увеличивалась и занимала уже около 10% площади среза. Встречались мелкие и более крупные сливные очаги некроза, часто с кровоизлияниями. Более старые очаги некроза были гомогенны, в сосудах отмечались тромбы, встречались ксантомные клетки. На 28-е и 35-е сутки площадь некрозов прогрессивно увеличивалась и составляла соответственно 44 и 68% от площади среза. Выявлялись все фазы некроза, однако преобладали крупные гомогенные очаги мертвой ткани с фестончатыми краями. Среди участков некроза вокруг сосудов можно было видеть небольшие островки сохранившейся опухолевой ткани. Несмотря на распространенность некроза, в сохранившейся паренхиме отмечалось значительное количество митозов. Лимфоидная инфильтрация в окружающей ткани не выявлялась, но сохранялось значительное количество тучных клеток на периферии опухолевого узла.

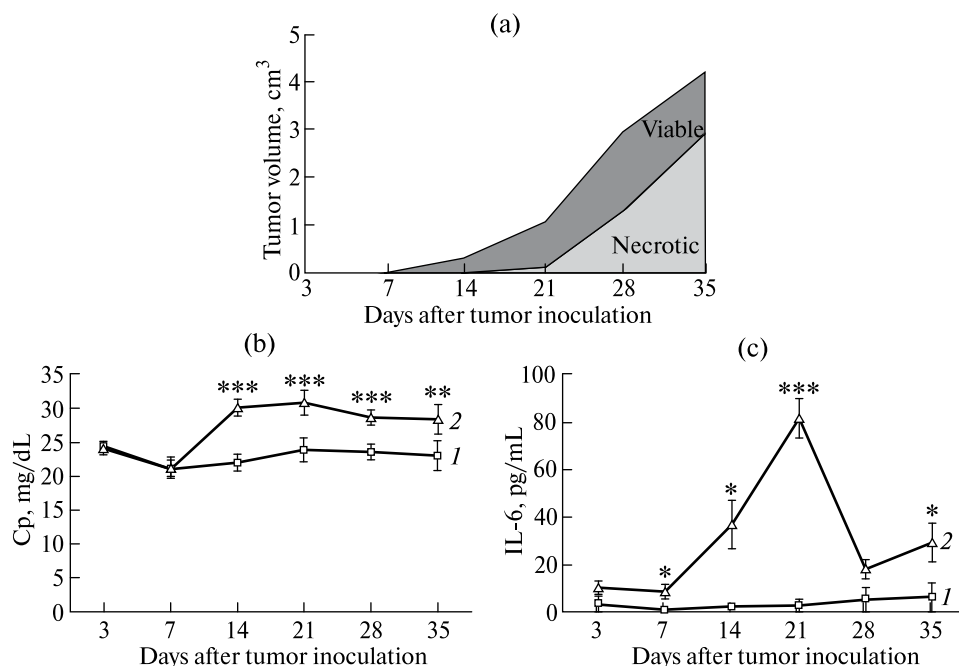


Рис. 1. Динамика развития центральных некрозов в опухоли (а) и влияние опухолевого роста на концентрацию церулоплазмينا (б) и IL-6 (в) в сыворотке крови. По оси ординат: (а) – объем опухоли, cm^3 ; кривыми обозначены площади, занимаемые жизнеспособной (светло-серый) и некротизированной (темно-серый) тканью опухоли на гистологических срезах в процентах от общего объема (в 10 полях зрения с вычислением средней для каждой мыши, $n = 4$); (б) – концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови, mg/dL , $n = 6-15$; (в) – концентрация IL-6 в сыворотке крови, pg/mL , $n = 5-11$. По оси абсцисс – дни после инокуляции опухоли, сутки. Обозначения: 1 – контрольные животные, 2 – мыши с гепатомой 22а. Здесь и далее данные представлены в виде средней величины и ошибки среднего ($M \pm SEM$), звездочками обозначены достоверные различия между опухолевой (2) и контрольной (1) группами животных: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Влияние роста гепатомы 22a на концентрацию Ср и цитокинов в сыворотке крови. Концентрация Ср в образцах сыворотки крови мышей с гепатомой 22a была повышена, начиная с 14-х суток после инокуляции клеток опухоли (рис. 1b), что совпадало во времени с появлением некрозов в опухоли (рис. 1a).

Поскольку известно, что опухолевые клетки сами могут синтезировать Ср [1, 2], исследовали его присутствие в 48-часовых надосадках культур клеток гепатомы 22a. Результаты анализа показали, что клетки опухоли в культуре Ср не продуцируют. Следовательно, подъем уровня этого фактора в крови обусловлен его синтезом нормальными клетками организма.

При исследовании содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей с гепатомой 22a оказалось, что TNF- α на всех сроках исследования с 3-х по 35-е сутки не выявлялся. Концентрация IL-6 повышалась, начиная с 7-х суток, достигая пика на 21-е сутки, и затем снижалась на более поздних сроках исследования (рис. 1с). Если сравнивать динамику изменений IL-6 и Ср, то они во времени не совпадали. Так, содержание IL-6 начинало повышаться на неделю раньше, чем Ср, а на 28–35-е сутки концентрация цитокина значительно снижалась, в то время как содержание церулоплазмينا оставалось повышенным приблизительно на том же уровне.

Поскольку известно, что опухолевые клетки могут сами синтезировать провоспалительные цитокины, в частности IL-6 [35], исследовали их присутствие в 48-часовых надосадках культур клеток гепатомы 22a. Результаты анализа показали, что клетки опухоли в культуре не продуцируют ни IL-6, ни TNF- α .

Влияние роста гепатомы 22a на содержание липидов в сыворотке крови. Поскольку известно, что IL-6 повышает синтез жирных кислот и холестерина в печени, а также концентрацию триглицеридов в сыворотке крови животных с перевиваемой фибросаркомой [36], нами была исследована динамика содержания триглицеридов и холестерина в сыворотке крови мышей с гепатомой 22a. Результаты представлены на рис. 2a, b. Уровень триглицеридов повышался, начиная с 14-х суток, а холестерина – с 21-х суток после инокуляции опухолевых клеток. Динамика изменений содержания триглицеридов в крови была аналогична изменениям концентрации Ср.

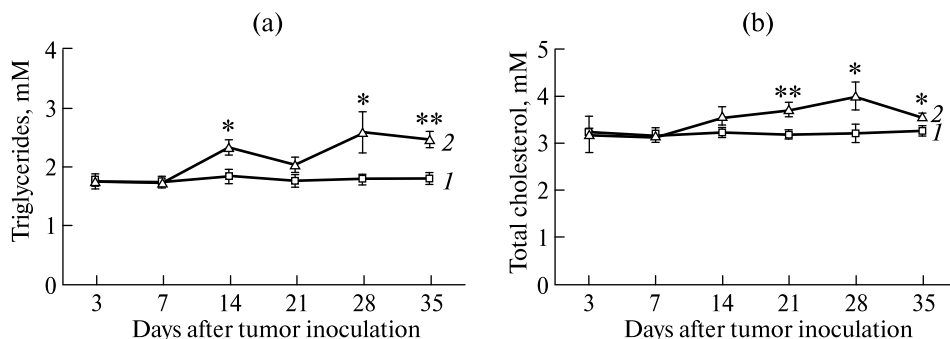


Рис. 2. Влияние опухолевого роста на концентрацию липидов в сыворотке крови. По оси ординат: (a) – содержание триглицеридов, mM; (b) – содержание общего холестерина, mM, 1 – у контрольных животных, 2 – у мышей с гепатомой 22a. В каждой группе 8–10 мышей. По оси абсцисс – время после инокуляции гепатомы 22a, сутки.

Влияние роста гепатомы 22a на содержание микроэлементов. Снижение концентрации негемового железа в сыворотке крови мышей-опухоленосителей наблюдали, начиная с 21-х суток после инокуляции клеток опухоли (рис. 3a), т.е. на неделю позже, чем регистрировали повышение концентрации Ср.

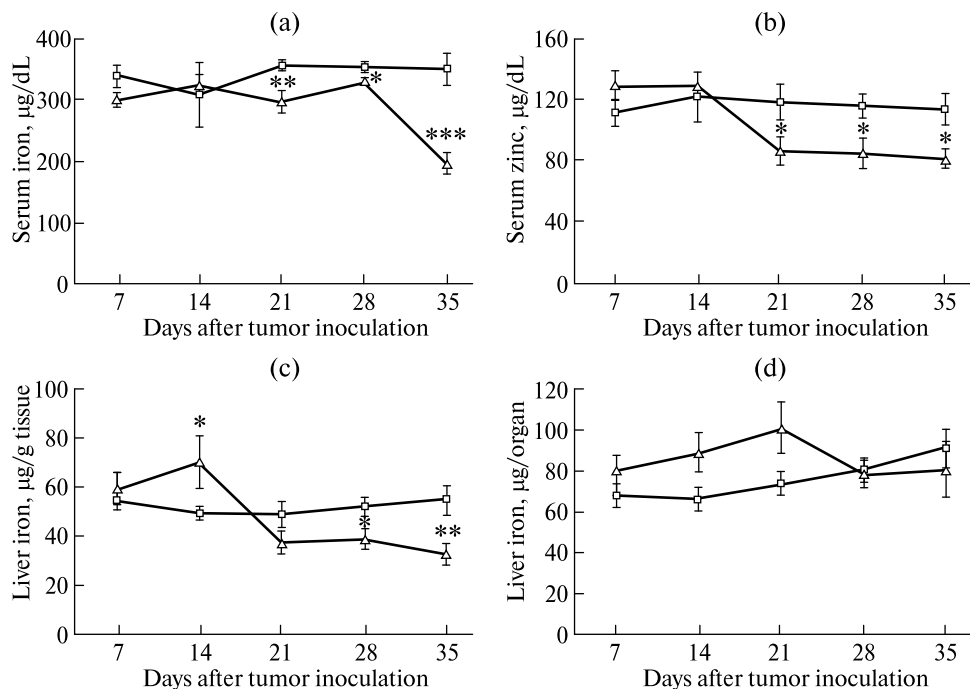


Рис. 3. Влияние опухолевого роста на содержание цинка и негемового железа в сыворотке крови, а также железа в печени. По оси ординат: концентрация железа (а) и цинка (б) в сыворотке крови, $\mu\text{g/dL}$; (с) – содержание железа в печени, $\mu\text{g/g}$ сырой ткани; (д) – содержание железа в печени в расчете на орган, $\mu\text{g/organ}$, 1 – у контрольных мышей и 2 – у мышей с гепатомой 22а. В каждой группе 15–20 мышей. По оси абсцисс – время после инокуляции гепатомы 22а, сутки.

Поскольку известно, что Ср способствует выходу железа из депо [3], а основным депо является печень, была изучена динамика изменений содержания железа в печени. Было показано, что при расчете содержания негемового железа на единицу массы печени на 14-е сутки наблюдали незначительное повышение, а начиная с 21-х суток – снижение этого показателя (рис. 3с). При расчете содержания негемового железа на весь орган содержание железа в печени существенно не изменялось по сравнению с этими же показателями у контрольных мышей (рис. 3д).

Таким образом, начало повышения концентрации Ср в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а не совпадало во времени с изменениями содержания железа в сыворотке крови и печени.

Концентрация цинка в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а, так же как и концентрация железа, снижалась, начиная с 21-х суток (рис. 3б).

Влияние дополнительного приема сульфата цинка на концентрацию металлов и Ср в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а. Для того чтобы ответить на вопрос, могут ли изменения концентрации цинка и железа в крови повлиять на концентрацию Ср, были поставлены модельные эксперименты, в которых в качестве воздействия на содержание микроэлементов был использован дополнительный прием соли цинка. В литературе описано, что таким способом в сыворотке крови можно существенно изменить уровень содержания цинка, железа [37], меди [38], а также активности Ср [9, 38].

Как показано на рис. 4а, концентрация эндогенного цинка у животных, получавших сульфат цинка, повышалась по сравнению с мышами-опухоленосителями, цинка не получавшими, но не достигала контрольного уровня (рис. 4а). В то же время сниженная

концентрация негемового железа в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а полностью восстанавливалась до контрольного уровня (рис. 4b). При этом дополнительный прием цинка в концентрации 22 мкг/мл с питьевой водой не влиял на содержание Ср, которое оставалось повышенным (рис. 4с).

Концентрация сульфата цинка, добавляемого к питьевой воде (22 мкг/мл), была подобрана нами ранее [39]. Она соответствует нормальному содержанию цинка в корме и принятым международным стандартам [40]. Тем самым животные получали дозу цинка, в два раза большую, чем физиологическая (с кормом и дополнительно с питьевой водой). При увеличении концентрации до 66 мкг/мл (в 3 раза больше, чем в контроле) также не было получено существенного влияния принимаемого цинка на активность Ср, которая стала даже выше по сравнению с показателями у мышей с гепатомой, принимавших сульфат цинка в концентрации 22 мкг/мл (рис. 4с).

Таким образом, повышенный уровень концентрации Ср в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а не был связан с концентрациями железа и цинка в крови как у мышей, получавших сульфат цинка в диапазоне 11–66 мкг/мл с питьевой водой, так и у животных с опухолями без приема цинка.

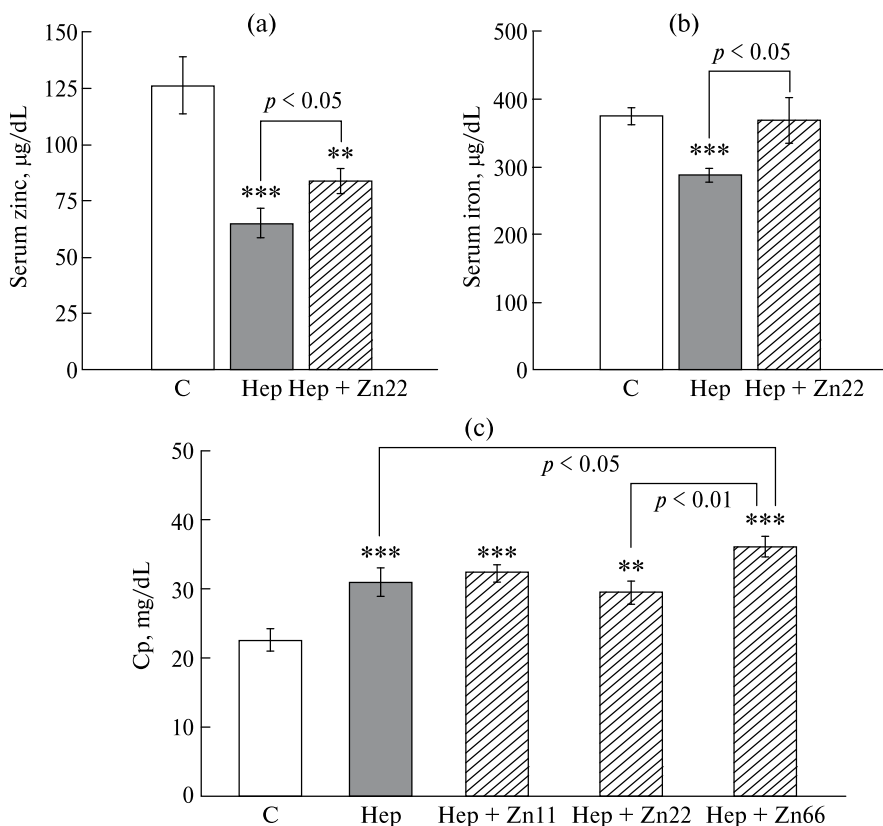


Рис. 4. Влияние опухолевого роста и приема сульфата цинка в течение 21-х суток на концентрацию эндогенного цинка, негемового железа и церулоплазмينا в сыворотке крови. По оси ординат: концентрация (а) – цинка, µg/dL, (б) – железа, µg/dL и (с) – церулоплазмينا, mg/dL, в сыворотке крови животных. По оси абсцисс – группы животных. Обозначения: С (Control) – контрольные животные; Hep (Hepatoma) – мыши с гепатомой 22а; Hep+Zn11, Hep+Zn22 и Hep+Zn66 – мыши с гепатомой 22а, получавшие сульфат цинка в концентрациях 11, 22 или 66 мкг/мл с питьевой водой соответственно. В каждой группе 15–20 мышей. Звездочками обозначены достоверные различия каждой из опытных групп по отношению к группе контрольных животных (С).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ср, как и другой белок острой фазы, С-реактивный белок, принадлежит к числу патологических маркеров прогрессии опухолевого роста [41, 42]. Концентрация Ср в крови повышена при росте многих опухолей [2, 4], и в ряде случаев эти показатели коррелируют с плохим прогнозом и неэффективным ответом на лучевую [43] и химиотерапию [42].

Хотя это не характерно для гепатомы 22а, многие опухолевые клетки могут сами синтезировать Ср, что является нежелательным фактором. Так, показано, что у больных раком почки и легкого выраженность экспрессии Ср в опухолевой ткани коррелирует с неблагоприятным прогнозом, смертельным исходом и раковой прогрессией [1, 2]. Установлена связь между высокой экспрессией Ср в опухолях легкого и активацией неоангиогенеза [44], а также выявлена способность Ср стимулировать инвазию клеток рака почки *in vitro* [1].

Приведенные данные литературы позволили нам предположить, что Ср является не просто индикатором воспаления – белком, сопровождающим опухолевый рост, а патогенетическим фактором, участвующим в метаболической перестройке организма, способствующей прогрессированию заболевания. В связи с этим мы сопоставили изменения концентрации Ср в сыворотке крови с рядом других системных метаболических показателей в динамике роста перевиваемой опухоли гепатомы 22а.

Известно, что концентрация Ср в сыворотке крови значительно возрастает не только при опухолевом росте, но и при любых инфекционных и неинфекционных воспалительных процессах, сопровождающихся деструктивными и некротическими изменениями в тканях [4]. Поскольку для роста солидных опухолей характерно развитие центральных некрозов, нами были изучены время их появления и дальнейшее развитие при помощи гистологического исследования срезов гепатомы 22а. Оказалось, что появление некрозов совпадало во времени с повышением концентрации активного Ср, которое отражало их дальнейшую прогрессию в динамике роста опухоли. Синхронно с этими двумя показателями регистрировали увеличение содержания триглицеридов в сыворотке крови.

Поскольку дефицит железа [6] у нормальных животных может существенным образом влиять на активность Ср в сыворотке крови, мы сопоставили динамику содержания Ср с содержанием этого микроэлемента в крови и печени. Повышение Ср начиналось на неделю раньше, чем развивалось снижение концентрации железа в крови и печени, это свидетельствует о том, что дефицит этого металла не мог служить причиной повышения содержания Ср на раннем этапе (14 суток). Прием сульфата цинка нормализовал сниженное содержание негемового железа в крови и, как показано было ранее, также и в печени на 21-е сутки роста гепатомы 22а [45], что никак не повлияло на концентрацию Ср в циркуляции. Полученные результаты указывают на отсутствие прямой связи между концентрацией железа и содержанием Ср в сыворотке крови у животных с опухолями, что согласуется с данными других авторов. Так, было показано, что повышение содержания Ср при росте опухолей печени у мышей может происходить на фоне нормальной концентрации железа в сыворотке крови [46, 47].

Однако развитие гепатомегалии на 28-е, 35-е сутки [45], сопровождающееся дальнейшим снижением содержания железа в печени, можно рассматривать как возможную причину поддержания повышенного синтеза Ср в печени вследствие развития гипоксии и активации HIF-1 α сигнального пути. Активация последнего происходит при дефиците железа, который определяет стабилизацию HIF-1 α .

Следовательно, дефицит железа не мог быть причиной повышения концентрации Ср в крови на раннем этапе опухолевого роста, однако, возможно, имел отношение к поддержанию синтеза Ср в печени на более поздних сроках исследования.

Кроме того, были проведены эксперименты, приводившие к подъему сниженной концентрации цинка в крови животных с гепатомой 22а при помощи дополнительного приема сульфата цинка. Мы предположили, что это может повлиять на содержание Ср в сыворотке крови, чего, однако, не произошло. Даже трехкратное увеличение концентрации принимаемого сульфата цинка по сравнению с физиологической дозой не привело к существенным изменениям показателя Ср. Для сравнения: в работе Labbe с соавт. приводятся данные о влиянии повышающихся концентраций цинка в диете животных на активность Ср в образцах сыворотки крови. Было показано, что, начиная с концентрации соли цинка, в 4 раза превышающей его стандартное содержание, у крыс наблюдается снижение активности Ср [9]. В другой работе было показано, что у крыс, также содержащихся на диете с повышенным содержанием цинка, снижение активности Ср было следствием развития дефицита меди в организме, а внутрибрюшинное введение сульфата меди восстанавливало активность сывороточного Ср [38].

Можно предположить, что мы не наблюдали снижения содержания Ср вследствие недостаточной концентрации принимаемого сульфата цинка. Возможно, поэтому, как показано нами ранее, сульфат цинка в этих концентрациях не тормозил роста самой опухоли гепатомы 22а [39]. Однако следует учесть и тот факт, что авторы вышеприведенных работ изучали влияние цинка в организме нормальных неопухолевых животных, что существенно отличается от наших исследований. Кроме того, у мышей и крыс имеются видоспецифические различия, касающиеся как содержания Ср в циркуляции, так и его участия в транспорте меди [48]. Для оценки эффективности применения сульфата цинка в больших дозировках у мышей с опухолями необходимы дополнительные исследования.

При выяснении возможной связи подъема Ср с содержанием провоспалительных цитокинов у мышей с гепатомой 22а (без приема сульфата цинка) оказалось, что рост опухоли сопровождался существенным возрастанием концентрации IL-6 в сыворотке крови. Из данных литературы известно, что этот цитокин вызывает активацию синтеза Ср в печени [14] и способствует снижению содержания железа [15] и цинка [16].

Гипертриглицеридемия также может быть следствием повышенного уровня IL-6, который усиливает секрецию триглицеридов в печени и стимулирует в ней синтез жирных кислот и холестерина [19, 20]. IL-6 стимулирует липолиз в жировой ткани, в результате чего триглицериды жировой ткани гидролизуются на свободные жирные кислоты и глицерин [19]. При этом часть свободных жирных кислот будет поступать в печень и реэстерифицироваться обратно в триглицериды, продукция которых увеличится [49].

Поскольку изменения концентрации IL-6 в сыворотке крови мышей с гепатомой 22а были самыми ранними, можно предположить, что именно этот цитокин являлся триггером всех последующих изменений: повышения концентрации Ср и триглицеридов, а также развития гипохромии и гипохромии.

При этом следует отметить, что динамические профили Ср и IL-6 при росте гепатомы 22а не совпадают: уровень Ср выходит на плато, а концентрация IL-6 достигает максимума на 21-е сутки и затем снижается. Можно предположить, что на поздних сроках роста опухоли повышенный синтез Ср поддерживается за счет активации других провоспалительных цитокинов (например, IL-1 β), развития гипоксии и дефицита железа в печени или участия еще неидентифицированных гуморальных факторов, связанных с некрозами, тромбозами и другими проявлениями аномального роста солидных опухолей.

По данным литературы, метаболические изменения, вызванные цитокином IL-6, включая повышение его собственного уровня, неблагоприятно сказываются на течении процесса у онкологических больных. Так, подъем IL-6 в крови коррелирует с плохим прогнозом, агрессивным течением [50], снижением выживаемости и резистентностью к проводимой химио- и рентгенотерапии [51]. IL-6 не только оказывает

негативное влияние на обменные процессы, но также может являться непосредственно ростовым фактором для опухолей и активатором неоангиогенеза [35]. Связанные с воспалительной реакцией дефициты железа [26] и цинка [27, 52] у больных раком могут оказывать неблагоприятное влияние на проводимую терапию и выживаемость. Показано, что дефицит этих двух жизненно важных микроэлементов может приводить к нарушениям иммунной защиты и снижению способности организма сопротивляться инфекциям [17, 53].

Гипертриглицеридемия и гиперхолестеринемия также являются неблагоприятными прогностическими факторами у онкологических больных [54–56]. Триглицериды, как и холестерин, необходимы для размножения раковых клеток и аккумулируются в опухолевой ткани [57]. Повышение концентрации свободных жирных кислот в плазме крови может оказывать протуморогенный эффект, поскольку они являются источником энергии для пролиферирующих клеток в результате β -окисления [58].

Известно, что Ср является одним из основных транспортных белков, доставляющих медь в различные органы и ткани, в том числе и в жировую ткань [59], а повышенное содержание меди в жировой ткани способствует процессу липолиза [56]. Исходя из этого, можно предположить, что Ср принимает непосредственное участие в поддержании процесса липолиза в жировой ткани и связанного с ним обеспечения опухолей необходимыми для их роста липидными метаболитами.

Полученные результаты и данные литературы позволяют сформулировать следующую гипотезу. Циркулирующий Ср является важным патогенетическим фактором при росте гепатомы 22a и участвует в метаболическом перепрограммировании организма, вызванном ее ростом. Ср обеспечивает метаболические запросы растущего новообразования по крайней мере двумя путями – прямо, доставляя медь непосредственно в опухоль, и косвенно – активируя процесс липолиза в жировой ткани (рис. 5). Синтез Ср индуцируется в печени под влиянием IL-6 в ответ на появление центральных некрозов в опухоли. IL-6 активирует процесс липолиза в жировой ткани и способствует развитию гиперлипидемии. IL-6 также вызывает развитие гипoferремии и гипоцинкемии, которые, однако, не имеют существенного влияния на Ср. Его протуморогенная роль при росте гепатомы 22a связана не столько с его участием в обмене железа и проявлением ферроксидазной активности, сколько с его способностью транспортировать медь в ткани. Доставляя этот микроэлемент в жировую ткань, циркулирующий Ср совместно с IL-6 участвует в поддержании процесса липолиза.

Из литературы известно, что Ср играет важную роль в обеспечении медью также и опухолевых клеток [5, 60]. Этот микроэлемент является критическим лимитирующим нутриентом для опухолевой прогрессии. Раковые клетки требуют повышенного уровня меди, чтобы покрыть свои энергетические потребности для быстрого роста и метастазирования. Кроме того, медь играет ключевую роль в стимуляции опухолевого неоангиогенеза на различных уровнях, включая синтез многих ангиогенных факторов и их взаимодействие с эндотелиальными клетками [60]. Концентрация меди в крови увеличена при росте многих опухолей, и в некоторых случаях ее повышение может являться неблагоприятным прогностическим признаком [61, 62].

На этом основании для лечения опухолей разрабатываются различные стратегии по созданию медикаментозного дефицита меди в организме. Проводятся экспериментальные и клинические исследования по применению различных хелаторов меди, таких как тетраиомолибдат, пеницилламин и триентин [60, 63]. Имеются положительные результаты по применению в качестве антагониста меди наночастиц серебра у мышей с карциномой Эрлиха [64].

Во всех этих исследованиях для подбора доз хелаторов и длительности проводимой терапии в качестве суррогатного маркера уровня содержания меди в организме используют Ср крови. Его синтез и ферментативная активность очень чувствительны к изменениям содержания меди в организме: повышение резервов меди в печени

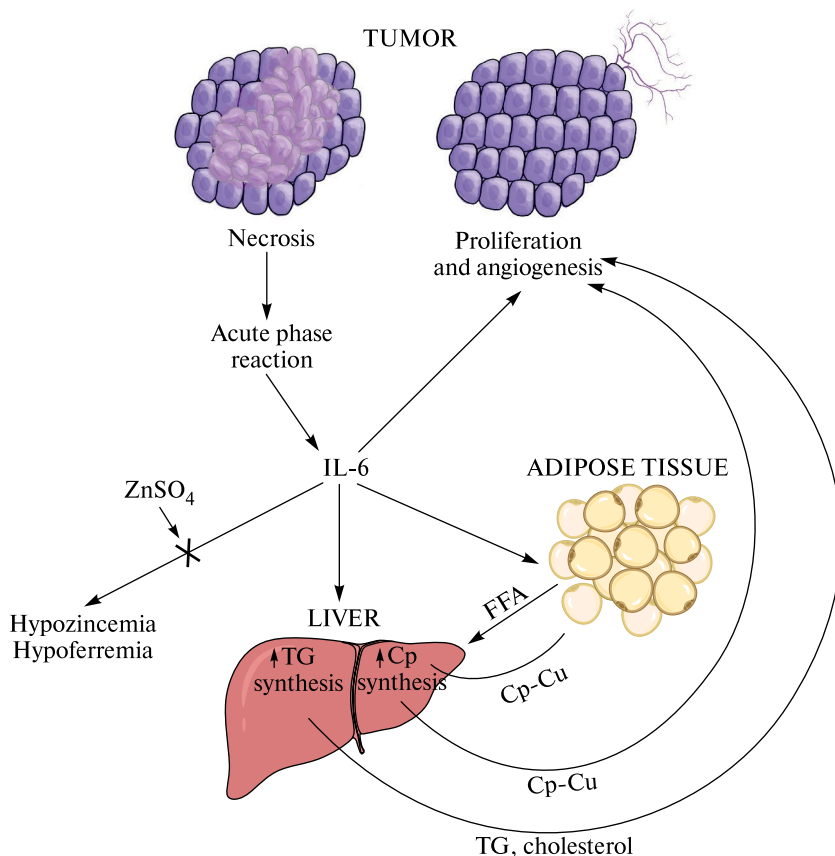


Рис. 5. Гипотетическая схема системных метаболических изменений при росте гепатомы 22а у мышей. Циркулирующий Ср является важным патогенетическим фактором опухолевого роста и вносит существенный вклад в обеспечение метаболических запросов растущей опухоли. Ср участвует в этом напрямую – путем доставки в опухоль меди и косвенно – через мобилизацию липидов. Появление центральных некрозов в опухоли стимулирует синтез провоспалительного цитокина IL-6, который инициирует синтез Ср в печени, развитие гипозинкемии и гипоферремии, а также усиливает пролиферацию и ангиогенез в самой опухоли. Кроме того, IL-6 стимулирует липолиз в жировой ткани, синтез жирных кислот и холестерина в печени, секрецию триглицеридов. Ср транспортирует медь в жировую ткань, способствуя липолизу. Гиперлипидемия оказывает протуморогенный эффект, поскольку холестерин и жирные кислоты являются важными метаболитами, обеспечивающими опухолевый рост. Ср доставляет в опухоль медь, которая необходима для пролиферации и новообразования сосудов. Обозначения: Ср – церулоплазмин, TG – триглицериды, FFA – свободные жирные кислоты, ↑ – повышение.

приводит к увеличению концентрации Ср, а дефицит меди вызывает сначала снижение его ферментативной активности, а затем и синтеза [65]. Поэтому считается, что снижение содержания Ср в циркуляции служит биологическим маркером системного дефицита меди и хорошо отражает степень биодоступности меди для опухоли [60]. Учитывая, что в нашем исследовании измерялась концентрация ферментативно активного Ср (окисление пара-фенилендиамина зависит от связывания Ср с медью), можно с осторожностью предположить, что увеличение концентрации активного Ср при росте гепатомы 22а будет способствовать доставке меди в опухоль.

Для снижения содержания меди при росте опухолей можно также использовать и препараты цинка [63], причем они, в отличие от хелаторов, не обладают токсичностью

и имеют минимальные побочные эффекты [66]. Прием солей цинка уже более 30 лет используется в разных странах в качестве антимицетного агента для лечения болезни Вильсона – Коновалова, характеризующейся избыточным содержанием меди в организме [66]. Механизм действия цинка хорошо известен и заключается в активации металлотионеинов, которые блокируют всасывание меди, поступающей из пищи, в кишечном эпителии и тем самым снижают содержание свободной, не связанной с Cu , меди в крови и способствуют уменьшению запасов меди в органах.

Было показано, что внутрибрюшинное введение сульфата цинка крысам с канцероген-индуцированными опухолями молочных желез нормализует повышенную концентрацию меди в крови. При этом в организме животных достигается еще целый ряд положительных эффектов, таких как устранение гипоцинкемии и гипоферремии, уменьшение синтеза IL-6 и показателей окислительного стресса [37], что делает этот способ лечения весьма перспективным в качестве дополнения к основной противоопухолевой терапии.

Кроме того, важной особенностью солей цинка является их способность влиять на состояние гипоксии в опухолях, которое характерно для быстрорастущих солидных неоплазм и обуславливает их резистентность к проводимой химио- и рентгенотерапии. Было показано, что пероральное применение хлорида цинка у мышей с глиобластомой вызывает подавление $\text{HIF-1}\alpha$ и ангиогенеза в опухолевой ткани [67]. Поскольку и сам Cu также может выступать в роли активатора $\text{HIF-1}\alpha$ и $\text{HIF-2}\alpha$ в нормальных [68] и опухолевых тканях [44, 69], можно предположить, что применение солей цинка будет проявлять антагонистический эффект по отношению к Cu и нивелировать его негативное влияние на опухолевый рост. Дальнейшие исследования помогут выявить новые особенности действия солей цинка и их применения в качестве дополнительных противоопухолевых препаратов для нормализации метаболических нарушений, способствующих опухолевому росту.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность Д.Н. Магазенковой и доктору биологических наук, профессору Л.В. Пучковой за методические рекомендации и помощь в определении цинка.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. П. К.), сбор данных (Е. А. З., А. С. Т., Н. П. Г.), обработка данных (Е. А. З., К. В. Р.), написание и редактирование рукописи (Е. П. К., А. В. С., Е. А. З.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины № FGWG-2025-0004 (рег. № 1022041101001-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в “Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных”, и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики”, а также были одобрены Комиссией по этике Института экспериментальной медицины, протокол № 1/21 от 28.01.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Y, Chen Z, Chen JG, Chen XF, Gu DH, Liu ZM, Gao YD, Zheng B (2021) Ceruloplasmin overexpression is associated with oncogenic pathways and poorer survival rates in clear-cell renal cell carcinoma. *FEBS Open Bio* 11(11): 2988–3004.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13283>
2. Matsuoka R, Shiba-Ishii A, Nakano N, Togayachi A, Sakashita S, Sato Y, Minami Y, Noguchi M (2018) Heterotopic production of ceruloplasmin by lung adenocarcinoma is significantly correlated with prognosis. *Lung Cancer* 118: 97–104.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.01.012>
3. Bonaccorsi di Patti MC, Cutone A, Polticelli F, Rosa L, Lepanto MS, Valenti P, Musci G (2018) The ferroportin-ceruloplasmin system and the mammalian iron homeostasis machine: regulatory pathways and the role of lactoferrin. *Biometals* 31(3): 399–414.
<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0087-5>
4. Вавилова ТП, Гусарова ЮН, Королева ОВ, Медведев АЕ (2005) Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов. *Биомед химия* 51(3): 263–275 [Vavilova TP, Goussarova YuN, Koroleva OV, Medvedev AE (2005) The role of ceruloplasmin in neoplastic processes. *Biomed Khimiya* 51(3): 263–275. (In Russ)].
5. Campbell CH, Brown R, Linder MC (1981) Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells. *Biochim Biophys Acta* 678(1): 27–38.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90044-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90044-1)
6. Ranganathan PN, Lu Y, Jiang L, Kim C, Collins JF (2011) Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood* 118(11): 3146–3153.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352112>
7. Bjørklund G, Aaseth J, Skalny AV, Suliburska J, Skalnaya MG, Nikonorov AA, Tinkov AA (2017) Interactions of iron with manganese, zinc, chromium, and selenium as related to prophylaxis and treatment of iron deficiency. *J Trace Elem Med Biol* 41: 41–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.005>
8. Malavolta M, Piacenza F, Basso A, Giacconi R, Costarelli L, Mocchegiani E (2015) Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mech Ageing Dev* 151: 93–100.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.01.004>
9. L'Abbe MR, Fischer PWF (1984) The Effects of Dietary Zinc on the Activity of Copper-Requiring Metalloenzymes in the Rat. *J Nutr* 114(5): 823–828.
<https://doi.org/10.1093/jn/114.5.823>
10. Broun ER, Greist A, Tricot C, Hoffman R (1990) Excessive zinc ingestion. A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression. *JAMA* 264(11): 1441–1443.
<https://doi.org/10.1001/jama.264.11.1441>
11. Cox DH, Chu RC, Schlicker SA (1969) Zinc deficiency in the maternal rat during gestation, and zinc, iron, copper, and calcium content and enzyme activity in maternal and fetal tissues. *J Nutr* 98(4): 449–458.
<https://doi.org/10.1093/jn/98.4.449>
12. Samygina VR, Sokolov AV, Bourenkov G, Schneider TR, Anashkin VA, Kozlov SO, Kolmakov NN, Vasilyev VB (2017) Rat ceruloplasmin: a new labile copper binding site and zinc/copper mosaic. *Metallomics* 9(12): 1828–1838.
<https://doi.org/10.1039/c7mt00157f>
13. Sakajiri T, Nakatsuji M, Teraoka Y, Furuta K, Ikuta K, Shibusa K, Sugano E, Tomita H, Inui T, Yamamura T (2021) Zinc mediates the interaction between ceruloplasmin and apo-transferrin for the efficient transfer of Fe(III) ions. *Metallomics* 13(12): mfab065.
<https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab065>
14. Sintusek P, Kyrana E, Dhawan A (2019) Chapter 11—Diagnosis of Hepatic Wilson Disease, in: *Wilson Disease* Weiss RH, Schilsky M (eds) Acad Press. 125–138.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811077-5.00011-6>
15. Ganz T, Nemeth E (2024) Hypoferremia of inflammation: Innate host defense against infections. *Blood Cells Mol Dis* 104: 102777.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2023.102777>

16. Foster M, Samman S (2012) Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. *Nutrients* 4(7): 676–694.
<https://doi.org/10.3390/nu4070676>
17. Haase H, Rink L (2014) Zinc signals and immune function. *Biofactors* 40(1): 27–40.
<https://doi.org/10.1002/biof.1114>
18. Das SK, Hoefler G (2013) The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol Med* 19 (5): 292–301.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.02.006>
19. Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR (1995) Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136(5): 2143–2149.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.5.7720663>
20. Chen Y, Yu C-Y, Deng W-M (2019) The role of pro-inflammatory cytokines in lipid metabolism of metabolic diseases. *Int Rev Immunol* 38(6): 249–266.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1645138>
21. Raia S, Conti A, Zanardi A, Ferrini B, Scotti GM, Gilberti E, De Palma G, David S, Alessio M (2023) Ceruloplasmin-deficient mice show dysregulation of lipid metabolism in liver and adipose tissue reduced by a protein replacement. *Int J Mol Sci* 24: 1150.
<https://doi.org/10.3390/ijms24021150>
22. Kim CH, Park JY, Kim JY, Choi CS, Kim YI, Chung YE, Lee MS, Hong SK, Lee KU (2002) Elevated serum ceruloplasmin levels in subjects with metabolic syndrome: a population-based study. *Metabolism* 51(7): 838–842.
<https://doi.org/10.1053/meta.2002.33348>
23. Schmidt-Arras D, Rose-John S (2016) IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* 64(6): 1403–1415.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.004>
24. Kwee JK (2014) A paradoxical chemoresistance and tumor suppressive role of antioxidant in solid cancer cells: a strange case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Biomed Res Int* 2014: 209845.
<https://doi.org/10.1155/2014/209845>
25. Robinson TP, Hamidi T, Counts B, Guttridge DC, Ostrowski MC, Zimmers TA, Koniaris LG (2023) The impact of inflammation and acute phase activation in cancer cachexia. *Front Immunol* 14: 1207746.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1207746>
26. Aksan A, Farrag K, Aksan S, Schroeder O, Stein J (2021) Flipside of the coin: iron deficiency and colorectal cancer. *Front Immunol* 12: 635899.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635899>
27. Gelbard A (2022) Zinc in cancer therapy revisited. *Isr Med Assoc J* 24(4): 258–262.
28. Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Lili D (2003) Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res* 94(2): 113–122.
<https://doi.org/10.1385/BTER:94:2:113>
29. Idriss ME, Modawe GA, Shrif NE (2015) Assessment of serum zinc and iron among Sudanese women with breast cancer in Khartoum State. *Int J Appl Sci Res Rev* 2(2): 074–078.
30. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30(1): 23–38.
31. Rebouche CJ, Wilcox CL, Widness JA (2004) Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J Biochem Biophys Methods* 58(3): 239–251.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.11.003>
32. Varfolomeeva EY, Semenova EV, Sokolov AV, Aplin KD, Timofeeva KE, Vasilyev VB, Filatov MV (2016) Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res* 50(8): 909–919.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1197395>
33. Sokolov AV, Kostevich VA, Romanico DN, Zakharova ET, Vasilyev VB (2012) Two-stage method for purification of ceruloplasmin based on its interaction with neomycin. *Biochemistry (Moscow)* 77(6): 631–638.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912060107>

34. Kisseleva EP, Krylov AV, Stepanova OI, Lioudyno VI (2011) Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *Int J Cell Biol* 2011: 793034.
<https://doi.org/10.1155/2011/793034>
35. Mohamed AH, Ahmed AT, Al Abdulmonem W, Bokov DO, Shafie A, Al-Hetty HRAK, Hsu CY, Alissa M, Nazir S, Jamali MC, Mudhafar M (2024) Interleukin-6 serves as a critical factor in various cancer progression and therapy. *Med Oncol* 41(7): 182.
<https://doi.org/10.1007/s12032-024-02422-5>
36. Metzger S, Hassin T, Barash V, Pappo O, Chajek-Shaul T (2001) Reduced body fat and increased hepatic lipid synthesis in mice bearing interleukin-6-secreting tumor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(5): E957–E965.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.5.E957>
37. Gulbahce-Mutlu E, Baltaci SB, Menevse E, Mogulkoc R, Baltaci AK (2021) The effect of zinc and melatonin administration on lipid peroxidation, IL-6 Levels, and element metabolism in DMBAinduced breast cancer in rats. *Biol Trace Elem Res* 199(3): 1044–1051.
<https://doi.org/10.1007/s12011-020-02238-0>
38. Lee D Jr, Matrone G (1969) Iron and copper effects on serum ceruloplasmin activity of rats with zinc-induced copper deficiency. *Proc Soc Exp Biol Med* 130(4): 1190–1194.
<https://doi.org/10.3181/00379727-130-33751>
39. Зеленский ЕА, Рутто КВ, Соколов АВ, Киселева ЕП (2021) Прием цинка тормозит развитие инволюции тимуса при опухолевом росте у мышей. *Вопр онкол* 67(3): 436–441. [Zelenskiy EA, Rutto KV, Sokolov AV, Kisseleva EP (2021) Zinc supplementation prevents the development of thymic involution induced by tumor growth in mice. *Vopr onkol* 67(3): 436–441. (In Russ)].
<https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-3-436-441>
40. Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Fabris N (1995) Reversibility of the thymus involution and of age-related peripheral immune dysfunction by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmacol* 17(9): 703–718.
[https://doi.org/10.1016/0192-0561\(95\)00059-b](https://doi.org/10.1016/0192-0561(95)00059-b)
41. Sattar N, Scott HR, McMillan DC, Talwar D, O'Reilly DS, Fell GS (1997) Acute-phase reactants and plasma trace element concentrations in non-small cell lung cancer patients and controls. *Nutr Cancer* 28(3): 308–312.
<https://doi.org/10.1080/01635589709514592>
42. Lukanović D, Polajžer S, Matjašič M, Kobal B, Černe K (2024) Analysis of ATP7A expression and ceruloplasmin levels as biomarkers in patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for advanced high-grade serous ovarian carcinoma. *Int J Mol Sci* 25(18): 10195.
<https://doi.org/10.3390/ijms251810195>
43. Onizuka K, Migita S, Yamada H, Matsumoto I (1999) Serum protein fractions in patients with laryngeal cancer undergoing radiation therapy. Possibility as a prognostic factor. *Fukuoka Igaku Zasshi (Japanese)* 90(2): 46–58.
44. Tsai YM, Wu KL, Chang YY, Chang WA, Huang YC, Jian SF, Tsai PH, Lin YS, Chong IW, Hung JY, Hsu YL (2020) Loss of miR-145-5p causes ceruloplasmin interference with PHD-iron axis and HIF-2α stabilization in lung adenocarcinoma-mediated angiogenesis. *Int J Mol Sci* 21(14): 5081.
<https://doi.org/10.3390/ijms21145081>
45. Zelenskiy EA, Rutto KV, Trulioff AS, Magazenkova DN, Sokolov AV, Kisseleva EP (2024) Impaired tissue content of iron and zinc in mice with growing hepatoma 22A and its correction with zinc sulfate supplementation. *Russ Physiol J* 110(7): 1128–1146 (In Russ).
<https://doi.org/10.31857/S0869813924070057>
46. Younes RN, Vydelingum NA, Noguchi Y, Brennan MF (1990) Lipid kinetic alterations in tumor-bearing rats: Reversal by tumor excision. *J Surg Res* 48(4): 324–328.
[https://doi.org/10.1016/0022-4804\(90\)90067-C](https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90067-C)
47. Deng T, Lyon CJ, Bergin S, Caligiuri MA, Hsueh WA (2016) Obesity, inflammation, and cancer. *Annu Rev Pathol* 11: 421–449.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>
48. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR (2018) Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 15(4): 234–248.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>

49. Hoang BX, Han B, Shaw DG, Nimni M (2016) Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer. *Eur J Cancer Prevent* 25(5): 457–461.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>
50. Zohora F, Bidad K, Pourpak Z, Moin M (2018) Biological and immunological aspects of iron deficiency anemia in cancer development: a narrative review. *Nutr Cancer* 70(4): 546–556.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1460685>
51. Khine L, Benmoussa J, Thorp JRA, Chandrasekaran N, Forlenza T, Bloomfield D (2016) Hypertriglyceridemia: An Open Door for Cancer Treatment? *J Endocrinol Metab* 6(2): 33–34.
<https://doi.org/10.14740/jem342w>
52. Loftsrød T, Mortensen ES, Nahwoga H, Wilsgaard T, Frydenberg H, Risberg T, Eggen AE, McTiernan A, Aziz S, Wist EA, Stensvold A, Reitan JB, Akslen LA, Thune I (2018) Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC Cancer* 18(1): 654.
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4568-2>
53. Chen XQ, Wu PW, Liu DH, Yan SJ, Shen XM, Yang LY (2020) Prognostic significance of high triglyceride and apolipoprotein B levels in patients with stage III and high-risk stage II colorectal cancer undergoing curative surgery. *Oncol Lett* 20(1): 705–714.
<https://doi.org/10.3892/ol.2020.11617>
54. Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Höring M, Krautbauer S, Liebisch G, Buechler C (2021) Accumulation of cholesterol, triglycerides and ceramides in hepatocellular carcinomas of diethylnitrosamine injected mice. *Lipids Health Dis* 20(1): 135.
<https://doi.org/10.1186/s12944-021-01567-w>
55. Saavedra-García P, Nichols K, Mahmud Z, Fan LY, Lam EW (2018) Unravelling the role of fatty acid metabolism in cancer through the FOXO3-FOXM1 axis. *Mol Cell Endocrinol* 462(Pt B): 82–92.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.012>
56. Fu Y, Yang J, Chen J, Li Y (2024) The role and molecular mechanisms of copper in regulating animal lipid metabolism. *J Anim Feed Sci* 33(4): 401–415.
<https://doi.org/10.22358/jafs/188788/2024>
57. Pousset D, Piller V, Bureaud N, Piller F (2001) High levels of ceruloplasmin in the serum of transgenic mice developing hepatocellular carcinoma. *Eur J Biochem* 268(5): 1491–1499.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02015.x>
58. Youn P, Kim S, Ahn JH, Kim Y, Park JD, Ryu DY (2009) Regulation of iron metabolism-related genes in diethylnitrosamine-induced mouse liver tumors. *Toxicol Lett* 184(3): 151–158.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.002>
59. Linder MC (2016) Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics* 8(9): 887–905.
<https://doi.org/10.1039/c6mt00103c>
60. Tang X, Yan Z, Miao Y, Ha W, Li Z, Yang L, Mi D (2023) Copper in cancer: from limiting nutrient to therapeutic target. *Front Oncol* 13: 1209156.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1209156>
61. Lener MR, Wiechowska-Kozłowska A, Scott RJ, Muszynska M, Kladny J, Waloszczyk P, Rutkowska A, Sukiennicki G, Gromowski T, Jaworska-Bieniek K, van de Wetering T, Kaczmarek K, Jakubowska A, Lubinski J (2015) Serum concentrations of Cu, Se, Fe and Zn in patients diagnosed with pancreatic cancer. *Heredit Cancer Clin Pract* 13(Suppl 1): A14.
62. Fang AP, Chen PY, Wang XY, Liu ZY, Zhang DM, Luo Y, Liao GC, Long JA, Zhong RH, Zhou ZG, Xu YJ, Xu XJ, Ling WH, Chen MS, Zhang YJ, Zhu HL (2019) Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort. *Int J Cancer* 144(11): 2823–2832.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31991>
63. Brewer GJ, Merajver SD (2002) Cancer therapy with tetrathiomolybdate: antiangiogenesis by lowering body copper – a review. *Integr Cancer Ther* 1(4): 327–337.
<https://doi.org/10.1177/1534735402238185>
64. Magazenkova DN, Skomorokhova EA, Farroukh MA, Zharkova MS, Jassem ZM, Rekina VE, Shamova OV, Puchkova LV, Ilyechova EY (2023) Influence of silver nanoparticles on the growth of ascitic and solid Ehrlich adenocarcinoma: focus on copper metabolism. *Pharmaceutics* 15: 1099.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041099>

65. Liu Z, Wang M, Zhang C, Zhou S, Ji G (2022) Molecular functions of ceruloplasmin in metabolic disease pathology. *Diabetes Metab Syndr Obes* 15: 695–711.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S346648>
66. Avan A, Czlonkowska A, Gaskin S, Granzotto A, Sensi SL, Hoogenraad TU (2022) The role of zinc in the treatment of Wilson's disease. *Int J Mol Sci* 23: 9316.
<https://doi.org/10.3390/ijms23169316>
67. Nardinocchi L, Pantisano V, Puca R, Porru M, Aiello A, Grasselli A, Leonetti C, Safran M, Rechavi G, Givol D, Farsetti A, D'Orazi G (2010) Zinc downregulates HIF-1 α and inhibits its activity in tumor cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 5(12): e15048.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015048>
68. Kostevich VA, Sokolov AV, Kozlov SO, Vlasenko AY, Kolmakov NN, Zakharova ET, Vasilyev VB (2016) Functional link between ferroxidase activity of ceruloplasmin and protective effect of apo-lactoferrin: studying rats kept on a silver chloride diet. *Biometals* 29(4): 691–704.
<https://doi.org/10.1007/s10534-016-9944-2>
69. Dai L, Cui X, Zhang X, Cheng L, Liu Y, Yang Y, Fan P, Wang Q, Lin Y, Zhang J, Li C, Mao Y, Wang Q, Su X, Zhang S, Peng Y, Yang H, Hu X, Yang J, Huang M, Xiang R, Yu D, Zhou Z, Wei Y, Deng H (2016) SARI inhibits angiogenesis and tumour growth of human colon cancer through directly targeting ceruloplasmin. *Nat Commun* 7: 11996.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11996>. Retraction in: *Nat Commun* (2023) 14(1): 4377.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-40067-6>

Metabolic Alterations in Mice Bearing Hepatoma 22a: Focus on Ceruloplasmin

E. A. Zelenskiy^a, K. V. Rutto^b, A. S. Trulioff^a, N. P. Gorbunov^c, A. V. Sokolov^d,
and E. P. Kisseleva^{a,*}

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

^b*St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint Petersburg, Russia*

^c*Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia*

^d*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia*

*e-mail: ekissele@yandex.ru

Ceruloplasmin (Cp), plays a key role in metabolism of two vital trace elements – iron and copper, whose metabolic pathways are closely related to each other as well as to zinc uptake. Increased concentration of Cp usually follows tumor growth, but its role in tumor progression is not clear. The aim of the study was to compare the changes of Cp concentration in blood serum with iron and zinc content as well as with concentrations of proinflammatory cytokines and lipids in the dynamics of tumor growth. Additionally, Cp concentration was studied in mice supplemented with zinc sulphate in drinking water. The study was performed in C3HA mice, which were subcutaneously inoculated with hepatoma 22a cells. Serum Cp increased from 14th day after tumor inoculation simultaneously with the appearance of central necrosis in the tumor and elevation of serum triglycerides. The growth of blood IL-6 concentration began from 7th day and could possibly trigger the acute phase reaction expressed in increase in Cp synthesis and the development of hypoferrremia, hypozincemia and hypertriglyceridemia. The content of non-heme iron in blood and liver decreased later than Cp up-regulation. This indicates that iron deficiency was not the cause of Cp increase on 14th day, but could support it at later stages of tumor growth. Zinc sulphate supplementation returned non-heme iron content and partly returned zinc concentration in the blood of mice on 21st day, but did not influence the concentration of Cp. It is discussed that the possible protumoral role of Cp is related not as much to iron metabolism as to its ability to transport copper to tissues. We hypothesize that serum Cp is an important pathogenetic factor that participates in supplementation of tumors with necessary lipid metabolites since Cp, together with IL-6, can possibly support lipolysis in adipose tissue, delivering copper ions there.

Keywords: ceruloplasmin, hepatoma 22a, IL-6, hypoferrremia, triglycerides, tumor necrosis, zinc sulphate