

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 1
январь
2023



СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

Эволюционное приобретение мультифункциональности гликолитическими ферментами <i>О. П. Шатова, П. В. Шегай, А. А. Заболотнева, А. В. Шестопалов, А. Д. Каприн</i>	3
Болезнь Альцгеймера: поиск лучших экспериментальных моделей для расшифровки клеточно-молекулярных механизмов развития заболевания <i>Я. В. Горина, О. Л. Власова, А. В. Большакова, А. Б. Салмина</i>	18

Экспериментальные статьи

Участие дигидропиримидиназа-подобного белка 2 в регуляции тревожности у человека <i>Ш. М. Гулиева, А. А. Мехтиева</i>	34
Цитокин 14-3-3 η как новый биомаркер в оценке активности ревматоидного артрита <i>А. А. Королькова, В. В. Хижа, Д. И. Козлова, Д. С. Васильев, А. Л. Маслянский, Т. В. Вавилова, М. Ф. Балюзек, А. В. Рыбаков, М. Е. Шевалдина, К. А. Юрьева</i>	46
Реактивность брыжеечных артерий при развитии метаболического синдрома у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров <i>Г. Т. Иванова</i>	61
Метилбогаченная диета матери нормализует характеристики цикла сон–бодрствование и сонных веретен у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией <i>А. В. Габова, К. Ю. Саркисова</i>	75
Динамика экспрессии генов костного гомеостаза при развитии асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте <i>Н. А. Шабалдин, А. В. Синицкая, А. В. Шабалдин, Р. А. Мухамадияров</i>	94
Оптимизация структуры α -гарпинина, блокирующего калиевые каналы $K_v1.3$ <i>А. М. Гиголаев, В. М. Табакмахер, С. Пеньёр, Я. Титгат, А. А. Василевский</i>	109
Эффекты семакса в моделях острого стрессогенного воздействия <i>Н. Ю. Глазова, Д. М. Манченко, Д. А. Виленский, Е. А. Себенцова, Л. А. Андреева, А. А. Каменский, Л. В. Дергунова, С. А. Лимборская, Н. Ф. Мясоедов, Н. Г. Левицкая</i>	119

Поправка

Поправка	136
----------	-----

CONTENTS

Reviews

- Evolutionary Acquisition of Multifunctionality by Glycolytic Enzymes
*O. P. Shatova, P. V. Shegay, A. A. Zabolotneva,
A. V. Shestopalov, and A. D. Kaprin* 3
- Alzheimer's Disease: A Search for the Best Experimental Models for the Decoding
of the Cellular and Molecular Mechanisms of the Development of the Disease
Y. V. Gorina, O. L. Vlasova, A. V. Bolshakova, and A. B. Salmina 18
-

Experimental Articles

- Involvement of Dihydropyrimidinase-Related Protein 2 in Regulation of Anxiety
in Humans
Sh. M. Guliyeva and A. A. Mekhtiev 34
- 14-3-3 η Cytokine as a New Rheumatoid Arthritis Activity Assessing Biomarker
*A. A. Korolkova, V. V. Khizha, D. I. Kozlova, D. S. Vasiliev, A. L. Maslyansky,
T. V. Vavilova, M. F. Ballyzek, A. V. Rybakov, M. E. Shevaldina, and K. A. Yurieva* 46
- Mesenteric Artery Reactivity in the Development of Metabolic Syndrome
in Rats Fed on a High-Fat Diet
G. T. Ivanova 61
- Maternal Methyl-Enriched Diet Normalizes Characteristics of the Sleep–Wake Cycle
and Sleep Spindles in Adult Offspring of WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy
A. V. Gabova and K. Yu. Sarkisova 75
- Dynamics of the Expression of Bone Homeostasis Genes in the Developmet
of Aseptic Necrosis of the Femoral Head in the Experiment
N. A. Shabaldin, A. V. Sinitskaya, A. V. Shabaldin, and R. A. Mukhamadiyarov 94
- Structural Optimization of an α -Hairpinin Blocking Potassium Channels K $_{V}$ 1.3
A. M. Gigolaev, V. M. Tabakmakher, S. Peigneur, J. Tytgat, and A. A. Vassilevski 109
- Effects of Semax in the Models of Acute Stress
*N. Yu. Glazova, D. M. Manchenko, D. A. Vilensky, E. A. Sebentsova,
L. A. Andreeva, A. A. Kamensky, L. V. Dergunova, S. A. Limborska,
N. F. Myasoedov, and N. G. Levitskaya* 119
-

Errata

- Erratum 136
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРИОБРЕТЕНИЕ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ
ГЛИКОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

© 2023 г. О. П. Шатова^{1, 4, *}, П. В. Шегай², А. А. Заболотнева¹,
А. В. Шестопапов^{1, 3}, А. Д. Каприн^{2, 4}

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

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

³Национальный медицинский исследовательский центр Детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия

⁴Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

*E-mail: shatova.op@gmail.com

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 05.11.2022 г.

Решение вопроса о происхождении жизни на Земле невозможно без понимания того, как возникли химические, функциональные и регуляторные принципы, определяющие клеточный метаболизм, каким образом клетки приобрели свойства, определяющие их эволюцию, и как биологические системы функционируют и развиваются. Настоящий обзор посвящен рассмотрению многогранности функций гликолитических ферментов, экспрессия которых значительно повышена в некоторых типах клеток, например, клетках, обладающих стволовыми свойствами, или клетках злокачественных опухолей. Практически для всех ферментов гликолиза были установлены некаталитические функции, которые необходимы для поддержания высокой скорости пролиферации клеток, их активной миграции и формирования стволового фенотипа. Гликолитические ферменты возникли очень рано в процессе эволюции. Поскольку геномы древних форм жизни имели ограниченное число генов для кодирования всего множества необходимых функций, ферменты гликолиза или продукты катализируемых ими реакций можно было использовать в качестве древних регуляторов межклеточной и внутриклеточной коммуникации. Впоследствии многофункциональность основных метаболических ферментов стала использоваться опухолевыми клетками для обеспечения их выживания и роста. В настоящем обзоре мы обсуждаем некоторые некаталитические функции гликолитических ферментов, а также возможное эволюционное значение приобретения такой мультифункциональности.

Ключевые слова: гликолиз, гликолитические ферменты, мультифункциональные белки, метаболическое перепрограммирование, злокачественные опухоли

DOI: 10.31857/S0869813923010119, EDN: IZOB0X

Гликолиз является универсальным и самым древним метаболическим процессом [1]. Однако гликолитические ферменты не являются консервативными по последовательности между царствами [2]. Следовательно, реконструкция на основе последовательности не может сказать, возникали ли различные ферменты глико-

лиза в процессе эволюции *de novo*, параллельно или уже после появления LUCA (Last Universal Common Ancestor) [2]. Более того, пока невозможным является представление всего пути эволюции метаболизма и понимание, каким образом компартиментализовались соответствующие белки в стройный путь окисления глюкозы [2]. Было выдвинуто предположение, что эволюционно древний метаболизм глюкозы обеспечивался изменениями pH [1]. Также недавние исследования показывают, что концентрация ионов Fe^{2+} в водах океана в архейскую эру могла повышаться до миллимолярных значений [1, 2]. Следовательно, для протекания гликолиза в клетках было достаточно $Fe(II)$, а ионы Fe^{2+} , вероятно, могли проходить через ранние мембранные структуры, которые были менее герметичными по сравнению с современными мембранами [1]. Кроме того, можно предположить, что в растворе богатом железом фосфорсодержащие производные сахаров неизбежно будут подвергаться реакциям гликолиза и пентозофосфатного пути (ПФП). Следовательно, промежуточные продукты гликолиза и ПФП образуют неферментативную сеть взаимопревращений, которая топологически напоминает пути центрального метаболизма. Однако не менее важным – и именно в этом неферментативный гликолиз и ПФП отличались от других неферментативных процессов, которые ранее ассоциировались с происхождением метаболизма, – является то, что сеть соответствует дарвиновскому требованию: для того, чтобы обеспечить избирательное преимущество в любом эволюционном процессе, метаболические пути должны образовывать единое целое, что обеспечивается протеканием всех реакций гликолиза в одних и тех же условиях [2].

Согласно теории репримитивизации злокачественно трансформированные клетки в ходе своего формирования возвращаются к более примитивному наследственному фенотипу [3]. Принимая во внимание эту теорию, следует отметить, что опухолевые клетки и их микроокружение находятся в условиях кислого pH [4] и обогащаются двухвалентным железом [5]. При этом многочисленные исследователи подчеркивают, что именно ацидоз обеспечивает перепрограммирование метаболизма в опухолевых клетках [4]. Существуют данные эволюционных биологов, которые подтверждают, что эволюционно древние гликолиз и ПФП происходили неферментативно [1]. Однако сложно ответить, возможно ли неферментативное окисление глюкозы в опухолевых клетках или нет. Различные исследования демонстрируют, что в опухоли происходит гиперэкспрессия [6] и гиперактивация ферментов гликолиза [7] и ПФП [8]. При этом именно гликолитическое окисление глюкозы обеспечивает энергией быстрорастущие ткани, а также тотипотентные, уни- и плюрипотентные клетки. Более того, в процессе эволюции многоклеточные организмы стали использовать гликолитические ферменты не только как катализаторы соответствующих реакций, но и “добавили” им работу “по совместительству” [9]. Установлено, что мультифункциональность ферментов гликолиза очень сильно зависит от их компартиментализации [10]. Кроме того, белки-ферменты гликолиза являются сигнальными молекулами, равно как и их продукты/субстраты [11, 12], выполняющие важнейшую регуляторную роль в жизни клетки [9].

Безусловно, интенсификация гликолиза – это самая характерная черта в метаболическом перепрограммировании, происходящем при опухолевом росте [13]. Также установлено, что чем больше опухолевых стволовых клеток (ОСК) в ткани опухоли, тем выше экспрессия ферментов гликолиза [14], что подчеркивает роль гликолиза в формировании стволового фенотипа ОСК. На данном этапе остается неизученным, как регулируется компартиментализация и соответственно мультифункциональность гликолитических ферментов, а также существуют ли какие-либо аллостерические эффекторы “включения” и “выключения” работы гликолитических ферментов “по совместительству”. Также остается неизвестным, на каком этапе эволюции гликолитические ферменты приобрели дополнительные функции.

Удивительным примером феномена “Gain of Function (GoF)” (дословно: добавление функции) для белков, которые работают “по совместительству” является то, что 25% дополнительных функций в базе данных многозадачных белков (Multitask-ProtDB-II) ассоциированы с вирулентной активностью патогенов. Более того, канонические функции таких белков, как правило, связаны с ключевыми высококонсервативными клеточными процессами, а их “подрабатывающие” функции часто необходимы для индукции белков ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ). Ферменты гликолиза также являются факторами вирулентности многих патогенов и паразитов [15, 16]. В настоящее время установлено, что гликолитические ферменты участвуют в регуляции транскрипции (гексокиназа-II, лактатдегидрогеназа А, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, енолаза-1); в регуляции апоптоза (глюкокиназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа); в стимуляции клеточной подвижности (глюкозо-6-фосфатизомеразы) [17, 18].

В настоящем обзоре мы постарались представить различные некаталитические функции гликолитических ферментов и оценить эволюционное значение приобретения такой мультифункциональности.

1. ГЕКСОКИНАЗА ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В АПОПТОЗЕ

Первый фермент гликолитического превращения глюкозы – гексокиназа (ГК) – представлена изоферментом ГК2 и более чем в 50% случаев имеет митохондриальную локализацию в опухолевых клетках. Митохондриальная форма этого фермента принимает участие в реализации программы апоптоза [19]. ГК2 экспрессируется в основном в эмбриональных тканях, а также в жировой и мышечных тканях и почти не представлена в других тканях. Важно отметить, что данный изофермент ГК гиперэкспрессирован в опухолях самых различных локализаций [20]. Более того, было установлено, что подавление экспрессии ГК2 приводит к снижению пролиферации опухолевых клеток в моделях ксенотрансплантантов [20].

Также было показано, что ингибирование фосфорилирования протеинкиназы В (Akt) в фоторецепторах приводит к перемещению митохондриальной ГК2 в цитоплазму, повышению активности каспаз и снижению жизнеспособности клеток. Интересно, что для фоторецепторов характерен эффект Варбурга в отличие от других терминально дифференцированных нейронов. Три фермента являются ключевыми для осуществления данного эффекта (аэробного гликолиза): ГК2, пируваткиназа мышечного изофермента 2 (ПКМ2) и лактатдегидрогеназа А (ЛДГ-А) [21]. Так, ГК-2 обычно находится в митохондриях и связана с потенциальным ананионным каналом (VDAC), где она получает предпочтительный доступ к АТФ для фосфорилирования глюкозы. Будучи связанным с VDAC, ГК2 может также предотвращать связывание проапоптотических факторов с митохондриями и открытие митохондриальной переходной поры проницаемости (mPTP), которая блокирует высвобождение цитохрома с [22]. Было показано, что Akt модулирует способность ГК2 связываться с VDAC посредством его прямого фосфорилирования [23]. Установлено, что палочки-фоторецепторы, лишённые ГК2, активируют ГК1. Интересно, что ГК2-дефицитные фоторецепторы более восприимчивы к острому дефициту питательных веществ в экспериментальной модели отслойки сетчатки, а ГК2 важна для сохранения фоторецепторов во время старения [21].

2. ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТИЗОМЕРАЗА РЕГУЛИРУЕТ КЛЕТОЧНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ

Второй фермент гликолиза, превращающий глюкозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат – фосфоглюкоизомеразы (глюкозо-6-фосфатизомеразы, Г6ФИ) также выполняет “по совместительству” ряд важных функций. Этот белок известен как

аутокринный фактор подвижности (AMF), нейролейкин, нейротрофный фактор роста, фактор зрелости, определяющий дифференцировку человеческих миелоидных клеток и способность опухолевых клеток к метастазированию [18, 24–26]. У онкологических больных в крови существенно возрастает активность этого фермента гликолиза (пути Эмбдена–Меергофа), позволяющего использовать показатель активности этого фермента (цитокина) как раннего маркера наличия в организме злокачественной опухоли [27]. Интересно, что ГбФИ обладает и антиапоптотическими свойствами [27]. Выраженность последних – характерный признак злокачественных опухолей. Высокая активность ГбФИ обеспечивает выживаемость, но не пролиферацию эмбриональных спинальных и чувствительных нейронов [18]. Доказано, что точечные мутации этого фермента связаны с развитием олигофрении [17]. ГбФИ также является фактором созревания: стимулирует созревание моноцитов, индуцирующее секрецию иммуноглобулинов, влияет на дифференцировку остеобластов, провоцирует артриты у мышей [17]. Обращает внимание тот факт, что специфический ингибитор ферментативной активности – манноза-6-фосфат – ингибирует и цитокиновые функции этого фермента (регуляцию подвижности клеток, ингибирование апоптоза, пролиферацию и т.п.) [17].

ГбФИ действует как цитокин и фактор роста в самых разнообразных внеклеточных процессах [28]. AMF/ГбФИ представляет собой многофункциональный цитокин, который проявляет активность, подобную полифункциональному фактору роста, и действующий через уникальный семиспиральный гликопротеиновый рецептор 78 кДа (гликопротеин 78, gp78) (рецептор фактора аутокринной подвижности, AMFR) [29]. Многие исследования показали, что AMF обладает не только аутокринными эффектами, стимулируя подвижность продуцирующих AMF опухолевых клеток, но также выступает в роли паракринного фактора, воздействующего на эндотелиальные клетки вен. Так, AMF индуцирует ангиогенез за счет стимуляции подвижности клеток и повышения экспрессии рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) [30]. Гиперэкспрессия AMF/ГбФИ и AMFR была обнаружена во многих злокачественных новообразованиях и связана с прогрессирующим опухолем, их метастазированием и ангиогенезом [31].

3. ФОСФОФРУКТОКИНАЗА-1 РЕГУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Фосфофруктокиназа 1 (ФФК-1) катализирует третью реакцию гликолиза и является вторым регуляторным ферментом после гексокиназы. ФФК-1 лимитирует скорость окисления глюкозы и выполняет “по совместительству” антиоксидантную функцию [32]. Примечательно, что не только сами гликолитические ферменты, но и продукты их реакций, такие как, например, пируват и НАДН, также могут выполнять антиоксидантную функцию – улучшать защиту клеток от активных форм кислорода (АФК), как было показано на культуре клеток нейробластомы [33]. Существуют литературные данные, что пируват является сигнальной молекулой – предотвращает аэробную деградацию индуцируемого гипоксией фактора 1 α (HIF-1 α) и усиливает экспрессию генов, активируемых HIF1- α , включая эритропоэтин, эндотелиальный фактор роста, глюкозный транспортер 3-го типа (ГЛЮТ-3) и альдолазу-А [34].

Кроме того, было показано, что ФФК-1 связывает кофакторы транскрипции TEAD (Transcriptional enhanced associate domain), что способствует их взаимодействию с факторами транскрипции YAP/TAZ в клеточных линиях рака молочной железы человека. YAP/TAZ являются ключевыми транскрипционными факторами, регулирующими пролиферацию опухолевых клеток и агрессивность опухолей; следовательно, их активация приводит к транскрипции генов, способствующих опухолевой прогрессии [35].

В клетках многоклеточных организмов гликолитические белки не просто диффузно распределены в цитозоле: существуют регуляторные механизмы, организующие гликолитические белки *in vivo*. Предполагаемая организация гликолитических белков *in vivo* может иметь важные последствия для субклеточной регуляции этого метаболического пути и его ферментативной активности [36]. Так, ФФК-1 диффузно локализована в цитозоле клеток; при гипоксии и, как следствие, энергетическом стрессе фермент может динамически перемещаться с образованием биомолекулярных конденсатов. При возвращении в нормоксические условия ФФК-1 вновь диспергируется в цитозоле. Установлено, что конденсаты ФФК-1 обладают жидкостными свойствами и что их молекулярная динамика, в том числе вязкость и биофизические свойства, изменяются при длительных гипоксических состояниях. Также установлено, что ФФК-1 и альдолаза-1 взаимодействуют, рекрутируя друг друга в конденсаты, что указывает на событие самоассоциации, которое запускает петлю прямой связи для рекрутирования гликолитических белков в конденсаты [36].

4. АЛЬДОЛАЗА ОБРАЗУЕТ КОМПЛЕКСЫ С РАЗЛИЧНЫМИ БЕЛКАМИ И РЕГУЛИРУЕТ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД

Главной особенностью работы альдолазы “по совместительству” является ее способность связываться с широким спектром различных по функциям белков. Например, в клетках некоторых млекопитающих альдолаза может вносить вклад в формирование внутриклеточного цитоскелета, например, взаимодействуя с F-актином и H^+ -АТФазой вакуолярного типа (V-АТФаза) или путем ингибирования зависимой от белка синдрома Вискотта–Олдрича (WASP) полимеризации актина [37]. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* альдолаза помогает контролировать транскрипцию, направленную РНК-полимеразой III, посредством физического взаимодействия с ней [38]. Также альдолаза необходима для регуляции эндоцитоза, которая осуществляется путем связывания альдолазы с внутриклеточным транспортным белком, сортирующим нексин 9 (SNX9) [39]. Есть работы, показывающие, что альдолаза взаимодействует с фосфолипазой D₂, гепарином и γ -тубулином [37], но функциональная роль этих взаимодействий пока неизвестна.

Одной из важных функций альдолазы является ее способность служить датчиком доступности глюкозы. Было обнаружено, что при низкой внутриклеточной концентрации субстрата альдолазы (фруктозо-1,6-дифосфата), данный гликолитический фермент взаимодействует с V-АТФазой. Это способствует активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК), и именно этот белок затем стимулирует выработку АТФ за счет повышения активности или экспрессии белков, участвующих в катаболических путях [40]. В опухолевых клетках альдолаза может способствовать активации ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) путем связывания с ее каталитической субъединицей. В свою очередь ДНК-ПК фосфорилирует белок-супрессор опухолевого роста p53, повышая его активность [41]. Альдолаза также может активировать онкогенный сигнальный путь Wingless/Int-1 (Wnt) в клетках млекопитающих путем подавления элиминации сигнальной молекулы β -катенина [42]. С другой стороны, альдолаза может влиять на эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) за счет снижения экспрессии E-кадгерина и β -катенина и одновременного повышения уровня фибронектина и виментина, что способствует злокачественной трансформации клеток [42].

Кроме того, альдолаза-А может [43] действовать как онкоген при раке мочевого пузыря, регулируя передачу сигналов через путь “E-кадгерин—эпидермальный фактор роста (EGFR)”, что приводит к метастазированию. Таким образом, у альдолазы имеются как проонкогенные (посредством передачи сигналов Wnt/E-кадгерин-

EGFR), так и антионкогенные (*через* активацию p53) функции при опухолях различной локализации.

5. ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ В МЕМБРАННОМ ТРАНСПОРТЕ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАЗФДГ) катализирует пятую реакцию гликолиза — окисление глицеральдегид-3-фосфата. Этот фермент обладает множеством различных активностей, не связанных с участием в гликолизе. Например, доказано, что ГАЗФДГ имеет урацил-ДНК-гликозилазную активность [44, 45]. Более того, роль, которую выполняет этот белок, зависит от его состояния (растворенный или фиксированный на мембране) и локализации (в цитоплазме или в ядре клетки) [46]. Этот фермент участвует в слиянии мембран, образовании микротрубочек, построении теломер [47]; имеет киназную активность, осуществляет экспорт РНК из клеточных ядер, участвует в репликации и репарации, апоптозе, в развитии возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний и, в конечном счете, в злокачественной трансформации клеток [47, 48]. Важно, что этот фермент является одной из наиболее чувствительных мишеней для оксида азота (NO) [46, 48]. Каждый из вышеперечисленных жизненно важных внутриклеточных процессов требует включения ГАЗФДГ в серию мультиферментных комплексов, при этом фермент сохраняет свою структуру. Интересно, что ГАЗФДГ стехиометрически и специфически взаимодействует с мышечной и сердечной изоформами ЛДГ. Комплекс этих ферментов становится малорастворимым. Взаимодействия этих ферментов могут влиять на баланс НАД⁺/НАДН и на весь гликолитический путь окисления глюкозы [49]. Кроме того, установлено, что данный фермент является фактором патогенности и вирулентности [16].

6. ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗА ВОВЛЕЧЕНА В ИНГИБИРОВАНИЕ АПОПТОЗА

Установлено, что фосфоглицератмутаза-1 (ФГМ-1) гиперэкспрессируется в глиобластомах, где увеличивает эффективность пути ответа на повреждение ДНК (DDR) за счет цитоплазматического связывания фосфатазы WIP1 (протеинфосфатаза 2С дельта), тем самым предотвращая ее ядерную транслокацию и последующее дефосфорилирование сигнального пути ATM (белок с мутацией атаксии-телеангиэктазии). Подавление экспрессии ФГМ-1 в клетках глиомы снижает образование γ -H2AX (фосфорилированной формы H2A), увеличивает апоптоз и снижает клоногенность после облучения и лечения темозоломидом [50].

7. ЕНОЛАЗА ЯВЛЯЕТСЯ РЕЦЕПТОРОМ ПЛАЗМИНОГЕНА

Структура фермента, катализирующего девятую реакцию гликолиза — енолазы- α (фосфопируватгидратазы), определяется геном *ENO1*. Альтернативная трансляция этого гена приводит к образованию Мус-связывающего белка-1 (Мус-binding protein 1, MBP1), не участвующего в гликолизе, но подавляющего экспрессию протоонкогена *c-Myc* [51]. Установлено, что енолаза- α способствует подвижности и инвазивности опухолевых клеток за счет неферментативной белковой функции связывания плазминогена и образования плазмина [52]. Было показано, что воздействие эпидермального фактора роста (EGF) и липополисахарида (LPS), способствует экспрессии енолазы- α [52]. Енолаза- α экспрессируется на поверхности нескольких типов клеток, где она действует как рецептор плазминогена, концентрируя протеолитическую активность плазмина на клеточной поверхности [52], таким образом, енолаза- α вовлечена в ремоделирование ВКМ и индукцию ангиогенеза.

неза и опухолевого роста [6]. Более того, было установлено, что в злокачественных опухолях енолаза гиперэкспрессирована или гиперактивирована [6]. Енолаза- α , один из важнейших ферментов гликолитического пути, представляет собой многофункциональный белок с онкогенными свойствами: он способствует пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток, что приводит к ускоренному пролиферированию различных опухолей [6].

8. ПИРУВАТКИНАЗА ОТВЕЧАЕТ ЗА ПРОЛИФЕРАЦИЮ

Пируваткиназа (ПК) катализирует десятую реакцию гликолиза и необратимо превращает фосфоенолпируват в пируват: это третья регуляторная реакция процесса. Кроме ферментативной функции, этот белок внутри ядра регулирует процесс пролиферации [53]. В опухолевых клетках, особенно в метастатических, активность ПК повышена, а также повышено соотношение активностей ПК к ФФК-1 [54].

Изоформа М2 (ПКМ2) экспрессируется в клетках и тканях с высокой скоростью пролиферации, включая эмбриональные и опухолевые клетки [55]. Было показано, что ПКМ2 может существовать в димерной и тетрамерной формах: димерная ПКМ2 проявляет протеинкиназную активность (фосфоенолпируват используется в качестве донора фосфата), тогда как тетрамер ПКМ2 катализирует пируваткиназную реакцию гликолиза. Именно экспрессия димерной изоформы (а значит протеинкиназная активность фермента) способствует клеточной пролиферации [56]. Во время канцерогенеза ПКМ2 действует как важный фактор для поддержания фенотипа ОСК благодаря своей способности взаимодействовать с октамер-связывающим фактором транскрипции 4 (Ост-4) и усиливать его трансактивацию [56]. Известно, что белок Ост-4 является важным фактором в поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток. Кроме того, в различных работах было показано, что ядерная изоформа ПКМ2 взаимодействует с HIF-1 α , что способствует повышению экспрессии его генов-мишеней (например, генов, кодирующих глюкозный транспортер 1 типа (ГЛЮТ-1) и ЛДГ-А) и обеспечивает метаболическое перепрограммирование в опухолях [56].

9. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ОБЕСПЕЧИВАЕТ ПОДДЕРЖАНИЕ СТВОЛОВОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК И ИНГИБИРУЕТ АПОПТОЗ

В литературе есть косвенные указания на возможность работы “по совместительству” и последнего ключевого фермента гликолиза — лактатдегидрогеназы. Многочисленные исследования показывают, что ЛДГ-А (изоформа фермента, преимущественно катализирующая превращение пирувата в лактат) имеет аберрантно высокий уровень экспрессии при многих опухолевых заболеваниях и зачастую является маркером неблагоприятного прогноза течения заболевания [57]. Существует несколько объяснений молекулярных механизмов действия ЛДГ-А, обеспечивающих деление и выживание опухолевых клеток. Во-первых, роль ЛДГ-А заключается в обеспечении злокачественных клеток достаточным количеством энергии. Хорошо известен эффект Варбурга, представляющий собой значительную интенсификацию гликолиза и образование лактата в клетках злокачественных опухолей как в условиях гипоксии, так и нормоксии [58, 59]. Известно, что в нормоксических условиях скорость пролиферации клеток снижалась после подавления ЛДГ-А, а в условиях гипоксии (0.5% кислорода) также серьезно нарушался рост опухолевых клеток с дефицитом ЛДГ-А: опухолевые клетки со сниженной активностью ЛДГ-А не могли поддерживать высокие уровни АТФ, что, вероятно, способствовало замедлению пролиферации клеток в нормоксических или гипоксических условиях. Во-вторых, ЛДГ-А участвует в поддержании стволовых свойств опухолевых клеток. Экспрессия ЛДГ-А в значительной степени связана с

экспрессией Oct-4, который играет важную роль в самообновлении эмбриональных стволовых клеток. При этом нокдаун ЛДГ-А может снижать экспрессию Oct-4 и онкогенные свойства клеток *in vitro* и *in vivo* [59].

Кроме того, ЛДГ-А косвенно способствует выживанию опухоли, защищая ее от повреждения АФК, а также ЛДГ-А может напрямую ингибировать апоптоз. Иммуногистохимическое исследование меланомы, проведенное Zhuang и соавт. [59], показало, что экспрессия ЛДГ-А сильно коррелирует с экспрессией антиапоптотических белков Mcl-1 и Bcl-XL, а нокдаун ЛДГ-А увеличивает расщепление поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) и снижает экспрессию X-сцепленного ингибитора белка апоптоза (XIAP), Bcl-2 и Bcl-XL, что приводило к снижению онкогенности линии клеток поджелудочной железы ВхРС-3 [60]. Было также обнаружено, что в ксенотрансплантатах клеточных линий рака молочной железы нокаут ЛДГ-А повышает уровни Bcl-2-ассоциированного белка X (Bax), PARP, каспазы-9, цитоплазматического цитохрома C и супероксидного аниона, в то время как экспрессия Bcl-2 и потенциал митохондриальной мембраны были снижены [61]. Наконец, гиперэкспрессия ЛДГ-А также может способствовать росту опухоли, предотвращая некроз в условиях гипоксии. Lewis и соавт. [62] указали, что опухоли, гиперэкспрессирующие ЛДГ-А и Rcl, имеют небольшую область некроза по сравнению с опухолями, гиперэкспрессирующими Rcl и VEGF. Это указывает на то, что повышенная экспрессия ЛДГ-А защищает центральные опухолевые клетки от некроза, вызванного гипоксией. ЛДГ-А существенно влияет на инвазию и миграцию злокачественных клеток посредством регуляции ключевых участников этих клеточных процессов, например, вызывая деградацию ВКМ посредством стимуляции продукции металлопротеиназы-2 (ММП-2), способствуя метастатическому васкулогенезу путем активации VEGF и ингибируя адгезию клеток за счет подавления экспрессии E-кадгерина. Кроме того, активация ЭМТ также лежит в основе вклада ЛДГ-А в метастазирование злокачественных опухолей [63]. Так, недавно было обнаружено, что нокдаун ЛДГ-А предотвращает инвазию опухолевых клеток, что сопровождается снижением экспрессии Snail, N-кадгерина, фибронектина и виментина, но повышением экспрессии E-кадгерина при раке мочевого пузыря [63]. Различные исследования показали, что ЛДГ-А может регулировать и ангиогенез опухоли [64]. Регуляция ангиогенеза с помощью ЛДГ-А в основном зависит от продукции лактата [65, 66]. Подкисление микроокружения способствует продукции интерлейкина-8 (IL-8) и VEGF, а поглощение лактата сосудистыми эндотелиальными клетками запускает фосфорилирование/деградацию IκBα, активирует ядерный фактор-каппа В (NF-κB), способствует экспрессии IL-8 и впоследствии ускоряет ангиогенез и рост опухоли [67]. Лактат является одной из наиболее древних и важнейшей сигнальной молекулой, обеспечивающей функционирование клеток как в норме, так и при различных патологиях, включая злокачественные опухоли [66]. Действие лактата опосредовано специфическими рецепторами GPR81, активация которых приводит к индукции репарации ДНК, стимуляции ангиогенеза, подавлению воспаления, синтезу и секреции ряда цитокинов, и многим другим эффектам [66].

На наш взгляд, описанные выше результаты свидетельствуют о том, что факторами промоции канцерогенеза являются именно наличие в клетке функционально активной ЛДГ (которая обладает мультифункциональностью и выступает в качестве регулятора транскрипции многих генов [68]) и высокий внутриклеточный уровень продукта ЛДГ – лактата, важнейшего метаболита с сигнальной функцией [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Явление белковой мультифункциональности широко распространено среди представителей всех царств живой природы и характерно, в том числе, для очень

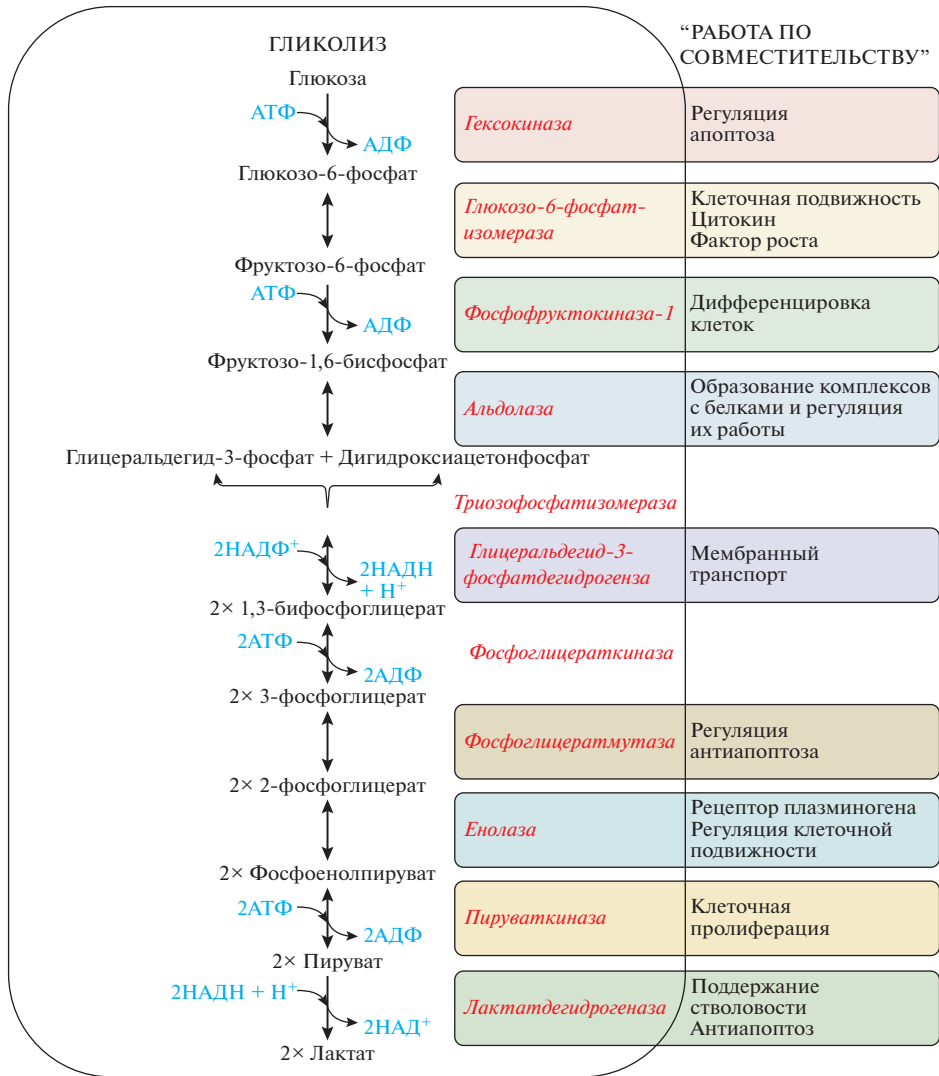


Рис. 1. Мультифункциональность ферментов гликолиза.

древних организмов – бактерий и архей. Геномы древних прокариот имели ограниченную способность кодировать все разнообразие функций, необходимых для взаимодействия с окружающей средой и другими организмами. Поэтому по мере изменения условий среды и усложнения организмов, ее населяющих, требовались новые посредники в такой коммуникации. Гликолиз является универсальным и ключевым метаболическим процессом для всех живых организмов. Поскольку гликолитические ферменты возникли очень рано в процессе эволюции, когда репертуар белков и небелковых сигнальных молекул был намного меньше современного, представляется возможным, что ферменты гликолиза как универсальные молекулы стали использоваться для межклеточной и внутриклеточной коммуникации. Например, многие инфекционные бактерии [69, 70] или паразиты [71] используют

гликолитические ферменты в качестве факторов вирулентности или инструментов для адгезии, инвазии, модуляции гемостатической и иммунной систем, стимулирования ангиогенеза или получения нутриентов от клеток хозяина [16].

Другим преимуществом гликолитических ферментов является их локализация в цитозоле: это позволяет им взаимодействовать со многими другими молекулами, получать химические модификации или быть рекрутированными для транспорта в другие клеточные компартменты или экспорта в межклеточный матрикс [72]. Таким образом, ферменты гликолиза стали очень удобной точкой приложения действия сил эволюции, направленных на сохранение злокачественно трансформированных клеток. Тот факт, что неканонические функции гликолитических ферментов особенно ярко выражены в опухолевых клетках, указывает на исключительную роль этих ферментов в процессе канцерогенеза [73]. Более того, метаболическое перепрограммирование, реализуемое опухолевыми клетками, может быть направлено на “переключение” функций гликолитических ферментов с целью обеспечения прогрессивного опухолевого роста.

В этой связи можно посмотреть под другим углом на значение эффекта Варбурга, наблюдаемого во многих опухолях и проявляющегося в интенсификации гликолиза и гиперэкспрессии гликолитических ферментов [66]. Повышенная продукция лактата, а также закисление микроокружения и другие метаболические изменения, происходящие во время роста опухоли [66] и являющиеся результатом реализации эффекта Варбурга, возможно, необходимы для создания таких условий, в которых происходит функциональная “трансформация” гликолитических ферментов. Изменение их функций и локализации способствует индукции собственной экспрессии, а также приобретению опухолевыми клетками фенотипа стволовых клеток, стимуляции пролиферации злокачественных клеток, их инвазии, миграции и устойчивости к терапевтическим агентам. Так, ГК-2, ГбФИ и ГАЗФДГ подавляют апоптоз, ГбФИ стимулирует подвижность опухолевых клеток и ангиогенез, ФФК-1 защищает от АФК и предотвращает аэробную деградацию HIF-1 α , альдолаза активирует путь АМРК, ГАЗФДГ принимает участие в построении теломера, енолаза- α способствует подвижности и инвазивности опухолевых клеток за счет функции связывания плазминогена и образования плазмина, ПК и ЛДГ способствуют пролиферации опухолевых клеток и их миграции (рис. 1).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

О.П.Ш. написание разделов статьи; П.В.Ш. идея статьи и написание разделов статьи; А.А.З. написание разделов статьи и подготовка рисунка; А.В.Ш. научное консультирование и коррекция текста; А.Д.К. идея статьи, научное консультирование и финальная правка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ralsler M* (2018) An appeal to magic? The discovery of a non-enzymatic metabolism and its role in the origins of life. *Biochem J* 475(16): 2577–2592.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160866>

2. *Bräsen C, Esser D, Rauch B, Siebers B* (2014) Carbohydrate metabolism in archaea: Current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 78(1): 89–175. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-13>
3. *Chen H, Lin F, Xing K, He X* (2015) The reverse evolution from multicellularity to unicellularity during carcinogenesis. *Nat Commun* 6: 6367. <https://doi.org/10.1038/ncomms7367>
4. *Corbet C, Pinto A, Martherus R, Santiago de Jesus JP, Polet F, Feron O* (2016) Acidosis Drives the Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer Cells through Changes in Mitochondrial and Histone Acetylation. *Cell Metab* 24 (2): 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.003>
5. *Toyokuni S, Yanatori I, Kong Y, Zheng H, Motooka Y, Jiang L* (2020) Ferroptosis at the crossroads of infection, aging and cancer. *Cancer Sci* 111(8): 2665–2671. <https://doi.org/10.1111/cas.14496>
6. *Huang CK, Sun Y, Lv L, Ping Y* (2022) ENO1 and Cancer. *Mol Ther Oncolytics* 24: 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.12.026>
7. *Cerella C, Diederich M* (2014) Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death. *Biochem Pharmacol* 92: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.005>
8. *Munemoto M, Mukaisho K ichi, Miyashita T, Oyama K, Haba Y, Okamoto K, Kinoshita J, Ninomiya I, Fushida S, Taniura N, Sugihara H, Fujimura T* (2019) Roles of the hexosamine biosynthetic pathway and pentose phosphate pathway in bile acid-induced cancer development. *Cancer Sci* 110: 2408–2420. <https://doi.org/10.1111/cas.14105>
9. *Kim JW, Dang CV* (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 30 (3): 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.01.005>
10. *Jang SR, Xuan Z, Lagoy RC, Jawerth LM, Gonzalez IJ, Singh M, Prashad S, Kim HS, Patel A, Albrecht DR, Hyman AA, Colón-Ramos DA* (2021) Phosphofructokinase relocalizes into subcellular compartments with liquid-like properties in vivo. *Biophys J* 120 (7): 1170–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.002>
11. *Mu X, Shi W, Xu Y, Xu C, Zhao T, Geng B, Yang J, Pan J, Hu S, Zhang C, Zhang J, Wang C, Shen J, Che Y, Liu Z, Lv Y, Wen H, You Q* (2018) Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Cycle* 17(4): 428–438. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1444305>
12. *Shatova O, Khomutov E, Zynkovich I, Skorobogatova Z, Bogaturova O* (2009) Does lactate have an impact on enzyme activity? *Eur J Cancer Sup* 7: 1046. [https://doi.org/10.1016/s1359-6349\(09\)70339-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6349(09)70339-8)
13. *Yang H, Zhong JT, Zhou SH, Han HM* (2019) Review roles of GLUT-1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget* 10(32): 3066–30833. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24684>
14. *Sancho P, Barneda D, Heeschen C* (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* 114(12): 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
15. *Kopeckova M, Pavkova I, Stulik J* (2020) Diverse Localization and Protein Binding Abilities of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Pathogenic Bacteria: The Key to its Multifunctionality? *Front Cell Infect Microbiol* 10: 89. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00089>
16. *Franco-Serrano L, Sánchez-Redondo D, Nájjar-García A, Hernández S, Amela I, Perez-Pons JA, Piñol J, Mozo-Villarias A, Cedano J, Querol E* (2021) Pathogen moonlighting proteins: From ancestral key metabolic enzymes to virulence factors. *Microorganisms* 9(6): 1300. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061300>
17. *Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, Watanabe H, Raz A* (2004) Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocr Relat Cancer* 11(4): 749–759. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00811>
18. *Yanagawa T, Watanabe H, Takeuchi T, Fujimoto S, Kurihara H, Takagishi K* (2004) Overexpression of autocrine motility factor in metastatic tumor cells: Possible association with augmented expression of KIF3A and GDI- β . *Lab Invest* 84(4): 513–522. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700057>
19. *Bustamante E, Pedersen PL* (1977) High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(9): 3735–3739. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3735>
20. *Wang W, Liu Z, Zhao L, Sun J, He Q, Yan W, Lu Z, Wang A* (2017) Hexokinase 2 enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma via the SOD2-H2O2 pathway. *Onco-*

- target 8 (2): 3344–3354.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13763>
21. *Weh E, Lutrzykowska Z, Smith A, Hager H, Pawar M, Wubben TJ, Besirli CG* (2020) Hexokinase 2 is dispensable for photoreceptor development but is required for survival during aging and outer retinal stress. *Cell Death Dis* 11(6): 422.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2638-2>
 22. *Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N* (2004) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 16(5): 819–830.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.014>
 23. *Rajala A, Gupta VK, Anderson RE, Rajala RVS* (2013) Light activation of the insulin receptor regulates mitochondrial hexokinase. A possible mechanism of retinal neuroprotection. *Mitochondrion* 13(6): 566–576.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.08.005>
 24. *Masumura S, Hashimoto M, Hashimoto Y, Sarō T, Kihara I, Watanabe Y* (1982) Glycolytic activity of rat aorta after exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 48(2): 157–161.
<https://doi.org/10.1007/BF00422977>
 25. *Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV*. (2000) Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275(29): 21797–21800.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>
 26. *Sato J, Yanagawa T, Dobashi Y, Yamaji T, Takagishi K, Watanabe H* (2008) Prognostic significance of 18F-FDG uptake in primary osteosarcoma after but not before chemotherapy: A possible association with autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase expression. *Clin Exp Metastasis* 25(4): 427–435.
<https://doi.org/10.1007/s10585-008-9147-5>
 27. *Chiao JW, Xu W, Yang YM, Kancherla R, Seiter K, Ahmed T, Mittelman A* (1999) Regulation of growth and apoptosis of breast cancer cells by a 54 kDa lymphokine. *Int J Oncol* 15(4): 835–838.
<https://doi.org/10.3892/ijo.15.4.835>
 28. *Zong M, Lu T, Fan S, Zhang H, Gong R, Sun L, Fu Z, Fan L* (2015) Glucose-6-phosphate isomerase promotes the proliferation and inhibits the apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 17(1): 100.
<https://doi.org/10.1186/s13075-015-0619-0>
 29. *Shimizu K, Tani M, Watanabe H, Nagamachi Y, Niinaka Y, Shiroishi T, Ohwada S, Raz A, Yokota J* (1999) The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett* 456(2): 295–300.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00966-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00966-7)
 30. *Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H* (2001) Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 285(1): 118–128.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5135>
 31. *Kaynak K, Kara M, Oz B, Akgoz B, Sar M, Raz A* (2005) Autocrine motility factor receptor expression implies an unfavourable prognosis in resected stage I pulmonary adenocarcinomas. *Acta Chir Belg* 105(4): 378–382.
<https://doi.org/10.1080/00015458.2005.11679740>
 32. *Mazzio E, Soliman KFA* (2003) The role of glycolysis and gluconeogenesis in the cytoprotection of neuroblastoma cells against 1-methyl 4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neurotoxicology* 24(1): 137–147.
[https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(02\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(02)00110-9)
 33. *Mazzio EA, Soliman KFA* (2003) Cytoprotection of pyruvic acid and reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 28(5): 733–741.
<https://doi.org/10.1023/A:1022813817743>
 34. *Forbes RA, Verma A* (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277(26): 23111–23115.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M202487200>
 35. *Enzo E, Santinon G, Pocaterra A, Aragona M, Bresolin S, Forcato M, Grifoni D, Pession A, Zanonato F, Guzzo G, Bicciato S, Dupont S* (2015) Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J* 34(10): 1349–1370.
<https://doi.org/10.15252/emj.201490379>
 36. *Zecchin A, Stapor PC, Goveia J, Carmeliet P* (2015) Metabolic pathway compartmentalization: An underappreciated opportunity? *Curr Opin Biotechnol* 34: 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.022>
 37. *Pirovich DB, Da'dara AA, Skelly PJ* (2021) Multifunctional Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase as a Therapeutic Target. *Front Mol Biosci* 8: 719678.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.719678>

38. Cieśla M, Mierzejewska J, Adamczyk M, Farrants AKÖ, Boguta M (2014) Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1843(6): 11103–11110.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.007>
39. Rangarajan ES, Park H, Fortin E, Sygusch J, Izard T (2010) Mechanism of aldolase control of sorting nexin 9 function in endocytosis. *J Biol Chem* 285(16):11983–11990.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092049>
40. Li M, Zhang CS, Zong Y, Feng JW, Ma T, Hu M, Lin Z, Li X, Xie C, Wu Y, Jiang D, Li Y, Zhang C, Tian X, Wang W, Yang Y, Chen J, Cui J, Wu YQ, Chen X, Liu QF, Wu J, Lin SY, Ye Z, Liu Y, Piao HL, Yu L, Zhou Z, Xie XS, Hardie DG, Lin SC (2019) Transient Receptor Potential V Channels Are Essential for Glucose Sensing by Aldolase and AMPK. *Cell Metab* 30(3): 508–524.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.018>
41. Ma D, Chen X, Zhang PY, Zhang H, Wei LJ, Hu S, Tang JZ, Zhou MT, Xie C, Ou R, Xu Y, Tang KF (2018) Upregulation of the ALDOA/DNA-PK/p53 pathway by dietary restriction suppresses tumor growth. *Oncogene* 37(8): 1041–1048.
<https://doi.org/10.1038/onc.2017.398>
42. Caspi M, Perry G, Skalka N, Meisel S, Firsov A, Amit M, Rosin-Arbesfeld R (2014) Aldolase positively regulates of the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cancer* 13: 164.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-164>
43. Li J, Wang F, Gao H, Huang S, Cai F, Sun J (2019) ALDOLASE A regulates invasion of bladder cancer cells via E-cadherin-EGFR signaling. *J Cell Biochem* 120(8): 13694–13705.
<https://doi.org/10.1002/jcb.28642>
44. Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Harvey Millar A, Fernie AR, Leaver CJ, Sweetlove LJ (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in arabidopsis cells. *Plant Cell* 15(9): 2140–2151.
<https://doi.org/10.1105/tpc.012500>
45. Wang X, Sirover MA, Anderson LE (1999) Pea chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has uracil glycosylase activity. *Arch Biochem Biophys* 367(2): 348–353.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1261>
46. Mazzola JL, Sirover MA (2002) Alteration of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure in Huntington’s disease fibroblasts. *Mol Brain Res* 100: 95–101.
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00160-2)
47. Sirover MA (2005) New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95: 45–52.
<https://doi.org/10.1002/jcb.20399>
48. Sirover MA (1999) New insights into an old protein: The functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta – Protein Struct Mol Enzymol* 1432(2): 159–184.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00119-3)
49. Svedružić ŽM, Spivey HO (2006) Interaction between mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from heart and muscle. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 63(3): 501–511.
<https://doi.org/10.1002/prot.20862>
50. Ohba S, Johannessen TCA, Chatla K, Yang X, Pieper RO, Mukherjee J (2020) Phosphoglycerate Mutase 1 Activates DNA Damage Repair via Regulation of WIP1 Activity. *Cell Rep* 31(2): 107518.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.082>
51. Subramanian A, Miller DM (2000) Structural analysis of α -enolase: Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 275(8): 5958–5965.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5958>
52. Perconti G, Maranto C, Romancino DP, Rubino P, Feo S, Bongiovanni A, Giallongo A (2017) Pro-invasive stimuli and the interacting protein Hsp70 favour the route of alpha-enolase to the cell surface. *Sci Rep* 7(1): 3841.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04185-8>
53. Hoshino A, Hirst JA, Fujii H (2007) Regulation of cell proliferation by interleukin-3-induced nuclear translocation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 282(24): 11706–11711.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700094200>
54. Newsholme EA, Board M (1991) Application of metabolic-control logic to fuel utilization and its significance in tumor cells. *Adv Enzyme Regul* 31: 225–246.
[https://doi.org/10.1016/0065-2571\(91\)90015-E](https://doi.org/10.1016/0065-2571(91)90015-E)
55. Harris RA, Fenton AW (2019) A critical review of the role of M 2 PYK in the Warburg effect. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1871(2): 225–239.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.004>

56. Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J (2008) Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40(5): 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.009>
57. Urbańska K, Orzechowski A (2019) Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells. *Int J Mol Sci* 20(9): 2085. <https://doi.org/10.3390/ijms20092085>
58. Brooks GA (2018) The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 27(4): 757–785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>
59. Zhang Y, Zhang X, Wang X, Gan L, Yu G, Chen Y, Liu K, Li P, Pan J, Wang J, Qin S (2012) Inhibition of LDH-A by lentivirus-mediated small interfering RNA suppresses intestinal-type gastric cancer tumorigenicity through the downregulation of Oct4. *Cancer Lett* 321(1): 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.013>
60. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W (2013) Lactate dehydrogenase A is over-expressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumor Biol* 34(3): 1523–1530. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0679-1>
61. Wang ZY, Loo TY, Shen JG, Wang N, Wang DM, Yang DP, Mo SL, Guan XY, Chen JP (2012) LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 131(3): 791–800. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1466-6>
62. Lewis BC, Prescott JE, Campbell SE, Shim H, Orlowski RZ, Dang CV (2000) Tumor induction by the c-Myc target genes *rcl* and lactate dehydrogenase A. *Cancer Res* 60(21): 6178–6183.
63. Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, Zhang Y (2016) LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 469(4): 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.078>
64. Lin H, Muramatsu R, Maedera N, Tsunematsu H, Hamaguchi M, Koyama Y, Kuroda M, Ono K, Sawada M, Yamashita T (2018) Extracellular Lactate Dehydrogenase A Release From Damaged Neurons Drives Central Nervous System Angiogenesis. *EBioMed* 27: 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.033>
65. Graziano F, Ruzzo A, Giacomini E, Ricciardi T, Aprile G, Loupakis F, Lorenzini P, Ongaro E, Zoratto F, Catalano V, Sarti D, Rulli E, Cremolini C, de Maglio G, Falcone A, Fiorentini G, Magnani M (2017) Glycolysis gene expression analysis and selective metabolic advantage in the clinical progression of colorectal cancer. *Pharmacogenomics J* 17(3): 258–264. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.13>
66. Shegay PV, Zabolotneva AA, Shatova OP, Shestopalov AV, Kaprin AD (2022) Evolutionary View on Lactate-Dependent Mechanisms of Maintaining Cancer Cell Stemness and Reprimitivization. *Cancers (Basel)* 14: 4552. <https://doi.org/10.3390/cancers14194552>
67. Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y, Xie K (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 20(28): 3751–3756. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204500>
68. Liu Y, Guo JZ, Liu Y, Wang K, Ding W, Wang H, Liu X, Zhou S, Lu XC, Yang H bin, Xu C, Gao W, Zhou L, Wang YP, Hu W, Wei Y, Huang C, Lei QY (2018) Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth. *Nat Commun* 9(1): 4429. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06841-7>
69. Hemmadi V, Biswas M (2021) An overview of moonlighting proteins in *Staphylococcus aureus* infection. *Arch Microbiol* 203(2): 481–498. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02071-y>
70. Henderson B (2014) An overview of protein moonlighting in bacterial infection. *Biochem Soc Trans* 42(6): 1720–1727. <https://doi.org/10.1042/BST20140236>
71. Gómez-Arreaza A, Acosta H, Quiñones W, Concepción JL, Michels PAM, Avilán L (2014) Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: Unpredicted use of ancient proteins. *Mol Biochem Parasitol* 193(2): 75–81.
72. Gancedo C, Flores C-L (2008) Moonlighting Proteins in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(1): 197–210. <https://doi.org/10.1128/mmb.00036-07>
73. Chang YC, Yang YC, Tien CP, Yang CJ, Hsiao M (2018) Roles of Aldolase Family Genes in Human Cancers and Diseases. *Trends Endocrinol Metabol* 29(8): 549–559. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.003>

Evolutionary Acquisition of Multifunctionality by Glycolytic Enzymes**O. P. Shatova^{a, d, *}, P. V. Shegay^b, A. A. Zabolotneva^a,
A. V. Shestopalov^{a, c}, and A. D. Kaprin^{b, d}**^a *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*^b *Institution National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia*^c *Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*^d *RUDN University, Moscow, Russia***e-mail: shatova.op@gmail.com*

Solving the question of the origin of life on Earth is impossible without understanding how the chemical, functional, and regulatory principles that determine cellular metabolism arose, how cells acquired the properties that determine their evolution, and how biological systems function and develop. This review is devoted to the consideration of the versatility of the functions of glycolytic enzymes, the expression of which is significantly increased in some types of cells, for example, cells with stem properties or malignant tumor cells. Almost all glycolysis enzymes have been found to have non-catalytic functions that are necessary to maintain a high rate of cell proliferation, their active migration, and the formation of a stem-like phenotype. Glycolytic enzymes arose very early during the evolution. Since the genomes of ancient life forms had a limited number of genes to encode the entire set of necessary functions, glycolytic enzymes or the products of the reactions they catalyzed could be used as ancient regulators of intercellular and intracellular communication. Subsequently, the multifunctionality of the main metabolic enzymes began to be used by tumor cells to ensure their survival and growth. In this review, we discuss some of the noncatalytic functions of glycolytic enzymes, as well as the possible evolutionary significance of acquiring such multifunctionality.

Keywords: glycolysis, glycolytic enzymes, multifunctional proteins, metabolic reprogramming, malignant tumors

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА: ПОИСК ЛУЧШИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
МОДЕЛЕЙ ДЛЯ РАСШИФРОВКИ КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

© 2023 г. Я. В. Горина^{1, 2, *}, О. Л. Власова¹, А. В. Большакова¹, А. Б. Салмина^{1, 2, 3}

¹Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

²НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

³Лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии, Институт мозга, Научный центр неврологии, Москва, Россия

*E-mail: yana_20@bk.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 02.12.2022 г.

Принята к публикации 02.12.2022 г.

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным типом деменции, связанным со снижением когнитивных способностей, таких как память и зрительно-пространственные навыки. Недостаточно эффективные методы лечения побудили к созданию экспериментальных моделей на животных, способных воспроизвести патологию болезни Альцгеймера, особенно на предсимптоматической стадии, с целью разработки и изучения превентивных и терапевтических стратегий. На сегодняшний день ни одна из разработанных моделей на животных полностью не отражает весь спектр нейропатологических и когнитивных нарушений, наблюдаемых при развитии болезни Альцгеймера у человека. Тем не менее, каждая созданная модель позволяет в той или иной степени изучить различные аспекты патогенеза заболевания, обеспечивая важное понимание ключевых патологических изменений, которые могут происходить при его развитии. В этом обзоре мы представляем обобщенные данные о нейропатологических признаках развития болезни Альцгеймера и их взаимосвязи с когнитивными нарушениями в рамках тех экспериментальных моделей на животных, которые используются в настоящее время. Также мы приводим в сравнительном аспекте особенности развития нейродегенерации альцгеймеровского типа на примере 2 моделей – генетической и инъекционной, что даст возможность определить оптимальный подход при выборе модели для реализации исследовательских задач.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, генетическая модель, инъекционная модель, когнитивные функции

DOI: 10.31857/S0869813923010065, **EDN:** IZNLWB

За последние несколько десятилетий знания ученых о клеточно-молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенеза болезни Альцгеймера, в значительной мере расширились. Однако несмотря на довольно внушительное количество раз-
ноплановых доклинических и клинических исследований, болезнь Альцгеймера по-прежнему является ведущей причиной деменции у взрослых, и в настоящее время не существует эффективных и безопасных методов лечения данного заболе-

вания. Это может быть связано с наличием специфических патологических особенностей, которые включают в себя обширную локализацию внеклеточных амилоидных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, что обуславливает последующую потерю нейронов и синапсов. Столь критический нейроэффект начинает проявляться за несколько лет до появления первых клинических симптомов – потери памяти, а повреждение носит уже необратимый характер на этапе постановки клинического диагноза. Для разработки эффективных методов лечения необходимо более подробное и глубокое исследование ключевых механизмов, которые лежат в основе как психических, так и когнитивных нарушений, с применением современных экспериментальных моделей болезни Альцгеймера на животных, которые позволяют более четко отразить патогенез заболевания, а также изучить возможное влияние наследственных факторов. Наиболее часто используются экспериментальными моделями на животных являются трансгенные мыши, у которых сверхэкспрессируются гены человека, связанные с развитием семейной формы болезни Альцгеймера (наследственная, с ранним началом), что приводит к образованию амилоидных бляшек как ключевого нейропатологического признака заболевания.

Однако имеющиеся в настоящее время экспериментальные модели животных не лишены недостатков, и ни одна из существующих моделей не воспроизводит все аспекты патогенеза заболевания. Кроме того, необходимо учитывать, в какой степени успешные результаты, полученные на животных моделях, могут быть применены в клинических испытаниях.

Таким образом, важно иметь четкое представление о конкретных нейропатологических особенностях, присущих каждой животной модели, особенно в отношении того, насколько тесно это коррелирует с патогенетическими особенностями развития нейродегенерации альцгеймеровского типа у человека с целью более точной интерпретации полученных результатов, а также их последующей трансляции в контексте клинических исследований. Кроме того, лучшее понимание сильных и слабых сторон каждой из животных моделей и использование более чем одной модели (например, модель с интрагиппокампальным введением бета-амилоида A β 1-42) в рамках конкретного исследования, даст возможность расширить наши знания о фундаментальных механизмах, лежащих в основе патогенеза заболевания.

В этом обзоре мы кратко обобщаем данные о нейропатологических признаках развития заболевания в рамках экспериментальных моделей болезни Альцгеймера, которые используются в настоящее время, уделяя особое внимание их взаимосвязи с когнитивными нарушениями, а также представляем особенности развития нейродегенерации альцгеймеровского типа в 2 моделях – генетической и инъекционной – в сравнительном аспекте с целью определения оптимального подхода при выборе модели(ей) для реализации исследовательских задач.

ТРАНСГЕННЫЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

С момента открытия генов, определяющих развитие болезни Альцгеймера, был создан ряд моделей трансгенных животных путем введения мутантных генов в существующую генетическую структуру или модификации представляющих интерес генов с использованием технологии нацеливания на определенные гены, чтобы смоделировать некоторые особенности болезни Альцгеймера человека [1].

Грызуны являются наиболее широко используемыми животными для всестороннего изучения болезни Альцгеймера за счет сходства их генома с геномом человека, короткого жизненного цикла и существующих на сегодняшний момент инструментов для индукции мутаций. Важным преимуществом моделирования болезни Альцгеймера на животных является возможность варьирования мутацией

генов — от точечной мутации для изучения конкретных патологических особенностей до комбинированных мутаций с целью создания модели, наиболее приближенной к патологии у человека [2, 3].

Для исследования патогенеза нейродегенерации альцгеймеровского типа и выявления когнитивных нарушений на всех этапах развития заболевания, были разработаны различные модели на животных (в частности грызунах).

Так, открытие мутаций гена белка-предшественника Аβ1-42 (APP), пресенилина 1 (PSEN1) и пресенилина 2 (PSEN2), обуславливающих развитие семейной формы болезни Альцгеймера [4, 5], дало исключительную возможность для создания значительного количества моделей с бета-амилоидной патологией на трансгенных мышах, что сделало их ценным инструментом как для изучения патогенеза заболевания, так и поиска специфических биомаркеров для ранней диагностики развития заболевания [6, 7]. Представляет интерес то, что мутации тау-белка как второго ключевого фактора развития дегенерации были использованы в качестве триггера для развития таупатии у грызунов [8]. Несмотря на полученные Adams и соавт. доказательства того, что повышенная экспрессия тау-белка у грызунов способствует активации гиперфосфорилирования тау-белка в зависимости от возраста [9], при создании генетических моделей предпочтительно использование человеческих генетических конструкций. При этом сочетание мутаций нескольких генов при разработке трансгенной модели дает возможность создания модели с ускоренным развитием болезни Альцгеймера [10].

В наибольшей степени используемый способ создания генетических моделей мышей с патологиями альцгеймеровского типа основан на гиперэкспрессии человеческого APP, тем самым воспроизводя развитие семейной формы болезни (табл. 1).

На сегодняшний день в различных экспериментальных исследованиях находят широкое использование около 50 генетических мышиных моделей, значительная часть которых характеризуется гиперэкспрессией APP человеческого дикого типа, являющегося родственным белку семейной формы нейродегенерации альцгеймеровского типа [34].

Ценным преимуществом данной генетической модели является активное церебральное отложение Аβ1-42 и наличие специфических симптомов заболевания. Например, у подавляющего большинства генетических моделей мышей, которые экспрессируют мутантный человеческий тип APP, наблюдается возраст-зависимое выраженное развитие когнитивной дисфункции, аналогичное пациентам с болезнью Альцгеймера [35]. В дополнение к этому, отмечается наличие дистрофических отростков нейронов, активации микроглии, реактивного астроглиоза и развития нейровоспаления, а также синаптической дисфункции и деструктивных изменений межклеточной коммуникации [36]. При этом только у незначительной части трансгенных животных выявлено образование нейрофибриллярных клубков, тем самым давая возможность выдвинуть гипотезу, согласно которой гиперэкспрессии APP у мышей недостаточно для более полного и точного воссоздания молекулярного патогенеза болезни Альцгеймера, как у человека [37].

Важно подчеркнуть еще и то, что активное отложение бляшек Аβ1-42 у данных трансгенных мышей в большей степени находится в зависимости не только от экспрессии одного или другого трансгена, но и от церебрального образования определенных вариантов Аβ1-42. Вследствие этого появляется необходимость использования иной стратегии, которая нацелена на повышение накопления бляшек Аβ1-42, которое заключается в объединении ряда мутаций, обуславливающих развитие семейной формы болезни Альцгеймера [38].

Кроме мутаций APP, ряд экспериментальных исследований свидетельствует о том, что мутации PSEN, из которых на данный момент определено около двух сотен, несомненно вносят существенный вклад в развитие семейной формы хрони-

Таблица 1. Трансгенные мышинные модели амилоидной патологии болезни Альцгеймера

Модель животных	Трансген	Амилоидоз	Другие патологические характеристики	Нарушение поведения в поведенческих тестах
Tg2576	Человеческий APP695 (тип мутации – шведский)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 10–12 мес, образование олигомеров A β 1-42	Синаптическая дисфункция в возрасте 15–18 мес.	Нарушение поведения в тестах “Распознавание новых объектов” в возрасте 12–15 мес., “Водном лабиринте Морриса” в возрасте 6 мес. и “У-лабиринте” в возрасте 10 мес. [11–13]
TgAPP23	Человеческий APP751 (тип мутации – шведский)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 6 мес.	Повышенный уровень гиперфосфорилированного таубелка в возрасте 6 мес., отложение нейрофибрилярных клубков вокруг бляшек A β 1-42 в возрасте 12 мес., потеря нейронов в CA1 области гиппокампа в возрасте 14–18 мес.	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 3–4 мес., в тесте “Водный лабиринт Морриса” в возрасте 3 мес. [14–16]
PDAPP	Человеческий APP (тип мутации – Индиана)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 6–9 мес.	Синаптическая дисфункция	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 6 мес., в тесте “Водный лабиринт Морриса” в возрасте 3 мес. [17, 18]
J20	Человеческий APP (тип мутации – шведский и штат Индиана)	Диффузные отложения A β 1-42 в возрасте 5–6 мес. и более крупные нейритные бляшки A β 1-42 в возрасте 9 мес.	Фосфонейрофиламенты	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 4 мес., в тесте “Водный лабиринт Морриса” в возрасте 6–9 мес. [19–22]
TgCRND8	Человеческий APP695 (тип мутации – шведский и Индиана)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 3 мес., плотные ядра бляшек A β 1-42 в возрасте 5 мес., формируются в мозжечке и стволе мозга к 8–9 мес.	Астроцитарный глиоз и активация микроглии в областях головного мозга вокруг бляшек	Нарушение поведения при распознавании новых объектов в возрасте 3–5 мес., в тесте “Водный лабиринт Морриса” в возрасте 3 мес. [23–25]
5XFAD (Tg6799)	Человеческий APP (тип мутации – шведский, Флорида, Лондон); человеческий PSEN1 (M146L, L286V)	Нейрональное накопление A β 1-42 в возрасте 1.5 мес., отложение бляшек A β 1-42, глиоз в возрасте 2 мес.	Значительная нейродегенерация, и потеря нейронов	Нарушение поведения в У-лабиринте в возрасте 4–5 мес., в тесте “Водный лабиринт Морриса” в возрасте 4 мес., снижение интереса к социальному взаимодействию в возрасте 3–12 мес. [26–28]

Таблица 1. Окончание

Модель животных	Трансген	Амилоидоз	Другие патологические характеристики	Нарушение поведения в поведенческих тестах
APP23 x PS1-R278I	Человеческий APP23 (тип мутации – шведский K651N, M652L); человеческий PSEN1 (R278I)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 6 мес.	Астроцитоз	Нарушение поведения в Y-лабиринте в возрасте 3–4мес.; отсутствие значимых нарушений в тесте “Водный лабиринт Морриса” [29]
TREM2-BAC x 5XFAD	Человеческий APP (тип мутации – шведский, Флорида, Лондон); человеческий PSEN1 (M146L, L286V)	Образуется меньше кортикальных бляшек в возрасте 7 мес. по сравнению с линией 5XFAD	Повышенное разветвление отростков и экспрессия фагоцитарных маркеров в микроглии, ассоциированной с амилоидными бляшками; снижение дистрофических изменений нейритов	Отсутствие когнитивных нарушений в контекстном тесте “Fear conditioning” на оценку эмоционального обучения и памяти [30]
3xTg-AD	Человеческий APP (тип мутации – шведский); человеческий PSEN1 (M146V); человеческий tau (P301L)	Бляшки A β 1-42 в возрасте 6 мес.	Синаптическая дисфункция и повышенная активация микроглии в возрасте 6 мес; деструкция tau-белка в возрасте 12–15 мес.	Нарушение поведения в тесте “Водный лабиринт Морриса” и эмоциональной памяти в тесте “Fear conditioning” [31–33]

ческой нейродегенерации альцгеймеровского типа [39]. Так, установлено, что мутации PSEN способствуют развитию деструктивных изменений протеолиза APP с участием γ -секретазы, тем самым провоцируя образования большого количества амилоидогенных пептидов A β 1-42. Примечательно, что у генетической мышинной модели с мутацией PSEN1 или PSEN2 на фоне ярко выраженной когнитивной дисфункции и нарушения поведения не обнаружено агрегации бляшек A β 1-42 в головном мозге. Это может быть связано с отличием в строении A β 1-42 у грызунов и человека [40]. Однако у нескольких мышинных моделей с мутацией PSEN1 была выявлена возрастная хроническая нейродегенерация, а также заметная дисфункция синапсов в гиппокампе [41, 42].

Также важно обозначить, что так широко используемые для исследования амилоидной патологии и оценки эффективности лечения двойные трансгенные модели на мышах были разработаны с помощью скрещивания PSEN человека и трансгенных линий APP. Ценным качеством данной модели является наличие высокого уровня A β 1-42 и интенсивное образование амилоидных бляшек уже на ранней стадии развития заболевания [43].

Другим важным примером двойной трансгенной модели на мышах APP/PSEN1 являются мыши линии 5xFAD (Tg6799), которые коэкспрессируют пять генных мутаций – три мутации APP и две мутации PSEN1 (APP K670N/M671L (Swedish) I716V + (Florida) + V717I (London) and PS1 M146L + L286V), связанных с ранним началом семейной формы болезни Альцгеймера [27]. Такая комбинация мутаций дает линии 5xFAD существенные преимущества по сравнению с другими мыши-

ными моделями, такими как Tg2576, TgAPP23, PDAPP, 3xTg-AD и т.д., а именно, возможность практически исключительно образовывать A β 1-42 и ярко выраженное активное церебральное накопление A β 1-42 [27].

Интересно и то, что у мышей линии 5xFAD также выявлены дистрофические изменения в миелинизации аксонов в ряде структур головного мозга (гиппокампе, энторинальной коре). При этом накопление A β 1-42 в нейронах наблюдается уже в возрасте 1.5 мес., а дальнейшее отложение амилоидных бляшек и глиоз в неокортексе и гиппокампе фиксируется в возрасте 2 мес. [44].

Более того, у данной линии мышей в возрасте 3 мес. был выявлен выраженный церебральный дисметаболизм глюкозы, особенно в обонятельной луковице, а в возрасте 4 мес. снижение экспрессии синаптофизина, причем в большинстве отделов головного мозга, тем самым приводя к гибели нейронов и прогрессированию нейродегенерации [45].

Интересно, что линия 5xFAD явилась фундаментом для создания таких генетических моделей болезни Альцгеймера, как линия 5xFAD/Tg30 и 5xFAD/PS19, которые несут в себе довольно широкий набор мутаций, связанных с гиперэкспрессией мутантного тау-белка (APPK670N/M671L,I716V,V717I, PS1M146L, L286V, Tau(1N4R)P301S,G272V; APPK670N/M671L,I716V,V717I, PS1M146L, L286V, MAPTP301S соответственно) [46].

Использование данных более сложных генетических моделей позволяет в значительной мере повысить степень проявления нейродегенеративных изменений, в частности потери пирамидальных нейронов гиппокампа в отличие от базовой мышиной линии 5xFAD [46, 47].

Принципиально подчеркнуть, что использование генетических моделей на мышах позволяет как получить важные и ценные данные о новых методах терапии [48, 49], так и дает возможность более детально исследовать нейропатологические и когнитивные деструктивные изменения, присущие хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа [50].

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У ЖИВОТНЫХ С ИНТРАГИППОКАМПАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ A β 1-42 И ЖИВОТНЫХ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА (ЛИНИЯ 5xFAD (TG6799))

Болезнь Альцгеймера клинически характеризуется развитием когнитивных нарушений, в частности дисфункцией памяти [51], а также необратимым снижением количества холинергических нейронов в переднем мозге и потерей синапсов, главным образом в гиппокампе и коре головного мозга [52].

Многочисленные исследования болезни Альцгеймера в основном сосредоточены на гипотезе амилоидного каскада, которая постулирует, что характерное повреждение нейронов при прогрессировании заболевания частично объясняется изменениями метаболизма A β 1-42 [53]. Исследования показали, что A β 1-42 становится токсичным за счет образования олигомеров, что в конечном итоге приводит к отложению амилоидных бляшек, нейродегенерации и, как следствие, когнитивным нарушениям [54].

Однако по результатам исследований, проведенных за последнее десятилетие, было сформулировано предположение, согласно которому высокая продукция и интенсивное отложение A β 1-42 не является магистральным событием, запускающим каскад патологических реакций, приводящих к развитию болезни Альцгеймера, тогда как на первый план выходят нарушение “синаптической устойчивости”, агрегация тау-клубков, нейровоспаление, активация микроглии и дисрегуляция Ca²⁺ в нейронах. При этом каждая из представленных “неамилоидных гипотез”

может вносить весомый вклад в развитие и прогрессирование нейрональной и когнитивной дисфункции [55].

Мутации в генах, связанных с процессингом APP, приводят к развитию генетической формы болезни Альцгеймера (с ранним началом) [56], которая составляет лишь небольшую часть случаев заболевания. При этом спорадическая форма (с поздним началом) имеет место в 99% случаев [57], являясь многофакторной и сложной нейродегенеративной патологией, возникающей в результате взаимодействия генетических и экологических факторов риска.

Существует несколько экспериментальных моделей болезни Альцгеймера, которые включают генетические модели с использованием трансгенных мышей, а также моделирование посредством интрагиппокампальной инъекции A β 1-42 [58].

Важно понимать, что ни одна из существующих генетических моделей полностью не воспроизводит полный спектр симптомов заболевания, однако конкретные критические аспекты патологии могут быть экспериментально воссозданы на экспериментальных моделях грызунов [59]. Стоит отметить, что в результате генетической модификации APP трансгенные мыши имеют ряд общих нейропатологических признаков, наблюдаемых и у человека, но, тем не менее, существуют и важные различия [60]. В подавляющем большинстве у трансгенных мышей развиваются диффузные и фибриллярные отложения A β 1-42, которые можно выявить путем окрашивания тиофлавином-S. При этом фибриллярные амилоидные бляшки часто окружены реактивными астроцитами и микроглией, а также дистрофическими нейритами. Более того, снижение синаптической плотности может наблюдаться в области, непосредственно примыкающей к фибриллярным отложениям. В некоторых случаях у трансгенных мышей с возрастом наблюдается умеренная гибель нейронов, но в то же время не развивается тяжелая атрофия, которая присутствует у человека. Кроме того, у трансгенных мышей при прогрессировании заболевания имеет место повышение уровня гиперфосфорилированного тау-белка, однако не происходит формирование нейрофибриллярных клубков, что, в свою очередь, наблюдается у человека [60].

Более того, наиболее очевидным отличием трансгенных моделей на животных от болезни Альцгеймера у человека является искусственный характер трансгенной технологии. У грызунов болезнь Альцгеймера не развивается. Это обусловлено тем, что концентрация A β 1-42 *in vivo*, как правило, находится в пикомолярном диапазоне, тогда как в мозге человека с болезнью Альцгеймера его концентрация выражена в наномолях. Кроме того, A β 1-42 грызунов отличается от человеческого наличием трех других аминокислот (R5G, Y10F и H13R), что, в свою очередь, может предотвращать агрегацию амилоида. Поэтому введение одного из основных человеческих генов, обуславливающих развитие болезни Альцгеймера – APP, PSEN1, PSEN2 и ApoE является обязательным для моделирования патологии у грызунов [61].

Одной из последних и, возможно, наиболее широко используемых моделей на основе модификации APP является трансгенная линия 5xFAD, у которой выявлено формирование амилоидных бляшек уже в возрасте 2 мес. [27]. Гибель нейронов в гиппокампе выражено наблюдается к 9-месячному возрасту, тогда как в неокортексе данный показатель варьирует в пределах 25–40% в возрасте от 9 до 12 мес. [44, 62], что согласуется с отсутствием явной атрофии головной мозга.

Интересно, что у данной линии мышей накопление интранейронального A β 1-42 наблюдается еще до образования амилоидных бляшек, что, по-видимому, оказывает прямое влияние на последующее формирование амилоидных бляшек.

Кроме того, выраженные нарушения пространственного обучения и памяти наблюдаются уже в возрасте 2 мес. в Y-лабиринте [27].

Интрагиппокампальная инфузия А β 1-42 представляет собой метод, включающий прямую инфузию олигомерных форм А β 1-42 в паренхиму головного мозга с использованием стереотаксической установки [63].

Выделяют ряд критериев, которые отражают обоснованность использования модели животных с инъекцией А β 1-42. Во-первых, А β 1-42 следует вводить в относительно низких концентрациях (низкий диапазон нМ), чтобы максимально приблизиться к концентрации его в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера. При этом тип А β 1-42 также имеет значение, поскольку растворимые виды пептида, применяемые *in vivo*, могут быть менее эффективными по сравнению с агрегированным пептидом [64, 65]. Во-вторых, инъекцию пептида следует производить в четко определенную область головного мозга, отдельную от области анализа жизнеспособности нейронов, для того чтобы минимизировать возможное прямое повреждение нейронов от воздействия введенного пептида. В-третьих, степень астроглиоза в ответ на инъекцию А β 1-42 должна быть определена в непосредственной близости от нейрональной экспрессии, чтобы установить возможную корреляцию между астроглиальной и нейрональной активностью в условиях нейротоксического действия А β 1-42.

Как правило, областью введения является СА1 субрегион гиппокампа [66], поскольку данная область головного мозга наиболее подвержена нейродегенеративным изменениям при развитии болезни Альцгеймера [67]. При этом стоит отметить, что фокус внимания также сосредоточен и на зубчатой извилине гиппокампа, которая, как считается, играет решающую роль в формировании ассоциативной памяти [68] и особенно уязвима для повреждений на ранних стадиях развития нейродегенерации альцгеймеровского типа [69]. Инфузия олигомерного А β 1-42 в головной мозг животного является моделью *in vivo*, которая воспроизводит амилоидопатию и, как следствие, гибель нейрональных клеток [70–72].

Данный метод позволяет реплицировать увеличение пептида А β 1-42 в пространстве и во времени, предотвращая любые компенсаторные или побочные эффекты, которые могут возникнуть у трансгенных животных [63]. Однако несмотря на выше указанные преимущества, метод инъекции А β 1-42 имеет свои ограничения, а именно, модель может воспроизвести эффекты А β 1-42 только в определенной области мозга, и более того, во время процедуры сама игла, используемая для введения А β 1-42, вызывает повреждение в месте инъекции, приводя к дополнительной гибели клеток и глиозу [63].

В ряде исследований продемонстрировано развитие дефицита пространственного обучения и памяти, вызванного интрагиппокампальным введением агрегированного А β 1-40 или А β 1-42 у грызунов уже после нескольких дней или одной недели оперативного вмешательства [73–77], что обусловлено снижением синаптической плотности и гибелью нервных клеток в гиппокампе и префронтальной коре [74, 78–80], а также увеличением концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β [81] и активацией микроглии в гиппокампе [82].

Другой подход к моделированию нейродегенерации – это интрагиппокампальная инъекция растворимых олигомеров А β 1-42, являющихся мощными нейротоксинами, которые, как было продемонстрировано, вызывают у мышей снижение синаптической плотности, активацию микроглии и астроцитов, увеличение уровня TNF- α , интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 в гиппокампе, что сопровождается ухудшением памяти [82, 83].

В целом, это указывает на то, что инъекционная модель на грызунах может не только демонстрировать нарушения в поведении, которые фиксируются и у пациентов с болезнью Альцгеймера, но также в некоторой степени воспроизводить бета-амилоид-индуцированные патологические особенности заболевания (рис. 1).

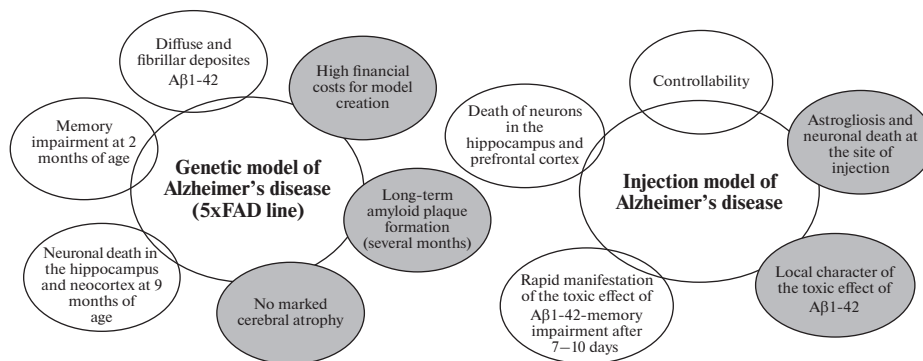


Рис. 1. Преимущества и недостатки инъекционной и генетической модели болезни Альцгеймера.

Важно отметить и то, что в отличие от моделирования болезни Альцгеймера путем инъекции Аβ1-42, трансгенная модель подразумевает большие затраты на ее создание, более длительное формирование амилоидных бляшек (до нескольких месяцев), и, как следствие, более позднее выявление бета-амилоид-индуцированных синаптических и поведенческих нарушений [84].

Напротив, при моделировании нейродегенерации путем интрагиппокампадно-го введения Аβ1-42 у мышей выявлено не только скопление амилоидных бляшек — общего признака, присущего семейной и спорадической форме, но и связанное с этим развитие когнитивных нарушений. Более того, важным преимуществом данной модели является ее управляемость, что позволяет исследователям контролировать концентрацию Аβ1-42, одновременное развитие нейродегенерации у подавляющего большинства экспериментальных животных, проявляющееся, в частности в нарушении поведения, что, в свою очередь, обеспечивает свободу в отношении экспериментального дизайна и широкий спектр возможностей для исследователей (рис. 1) [85].

Основная проблема, связанная с моделированием болезни Альцгеймера, заключается в том, что имеющиеся на сегодняшний день трансгенные модели имитируют только редкую генетическую форму с ранним началом развития заболевания, тогда как мышьяная модель спорадической формы болезни Альцгеймера пока отсутствует. При этом у трансгенных мышей помимо развития только бета-амилоидной патологии, либо только тау-патологии, не проявляются в полной мере в сочетании варианте другие патологические особенности нейродегенерации альцгеймеровского типа, в частности церебральные сосудистые нарушения, воспаление, гибель холинергических нейронов, сахарный диабет 2-го типа, реактивный астроглиоз. Наличие только одного патогенетического фактора не может отражать всю сложность и многогранность патогенеза спорадической формы болезни Альцгеймера, характеризующейся поздним началом, и как следствие, имеет место отсутствие полной информации об инициации и прогрессировании заболевания.

Таким образом, для реализации задач исследования необходимо использовать несколько моделей, а именно инъекционную, воспроизводящую острое токсическое действие Аβ1-42, и трансгенную модель, которая учитывает, что патогенез болезни Альцгеймера более тесно связан с хроническим воздействием, а не с внезапным возрастанием концентрации Аβ1-42 в головном мозге, что в совокупности позволит более детально изучить потенциальные основные механизмы развития нейродегенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние несколько десятилетий был достигнут существенный прогресс в понимании патофизиологии болезни Альцгеймера и лежащих в ее основе генетических и биохимических нарушений. Это сопровождалось разработкой различных экспериментальных моделей болезни Альцгеймера на животных, которые позволяют изучить патологические и поведенческие изменения, происходящие при развитии заболевания, что необходимо для расшифровки патогенеза, последующего проведения доклинических испытаний новых лекарственных средств, а также оценки потенциальных методов лечения. Важно понимать, что каждая модель имеет как неоспоримые преимущества, так и определенные ограничения. Выбор той или иной экспериментальной модели зависит от целей и основных задач исследования. В целом обсуждаемые в этом обзоре экспериментальные модели болезни Альцгеймера внесли весомый вклад в понимание фундаментальных механизмов развития заболевания. Тем не менее, ни одна из представленных моделей не способна воспроизвести все аспекты прогрессирования заболевания и учесть существующие факторы риска – сахарный диабет 2-го типа, гипергликемию, нейровоспаление и нарушение церебральной микроциркуляции. Таким образом, современные модели болезни Альцгеймера требуют дополнительных модификаций, чтобы максимально полно проиллюстрировать уникальные аспекты патогенеза заболевания. Несомненно, экспериментальные модели болезни Альцгеймера на животных будут продолжать играть первостепенную роль в будущих исследованиях нейродегенерации альцгеймеровского типа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 20-65-46004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция (А.Б.С., О.Л.В.), написание текста (Я.В.Г.), оформление рисунков (А.В.Б.), редактирование рукописи (Я.В.Г.), критический пересмотр на предмет интеллектуального содержания (А.Б.С., О.Л.В.), утверждение окончательного варианта статьи для публикации (А.Б.С., О.Л.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez-Varo R, Mejias-Ortega M, Fernandez-Valenzuela JJ, Nuñez-Díaz C, Caceres-Palomo L, Vegas-Gomez L, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Garcia-Leon JA, Moreno-Gonzalez I, Vizuite M, Vitorica J, Baglietto-Vargas D, Gutierrez A (2022) Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *Int J Mol Sci* 23: 5404. <https://doi.org/10.3390/ijms23105404>:45-54
2. Lithner CU, Hedberg MM, Nordberg A (2011) Transgenic mice as a model for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8: 818–831. <https://doi.org/10.2174/156720511798192736>
3. Интышев АМ, Горина ЯВ, Лопатина ОЛ, Комлева ЮК, Салмина АВ (2016) Экспериментальные модели болезни Альцгеймера: преимущества и недостатки. *Сибирск мед обозр* 4: 5–21. [Iptyshev AM, Gorina YAV, Lopatina OL, Komleva YUK, Salmina AB (2016) Experimental models of Alzheimer's disease: advantages and disadvantages. *Siber Med Rev* 4: 5–21. (In Russ)].
4. Cruchaga C, Del-Aguila JL, Saef B, Black K, Fernandez MV, Budde J, Ibanez L, Deming Y, Kapoor M, Tosto G, Mayeux RP, Holtzman DM, Fagan AM, Morris JC, Bateman RJ, Goate AM, Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN), Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), NIA-LOAD family study, Harari O (2018) Polygenic risk score of sporadic late-onset Alzheimer's

- disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms. *Alzheimer's & Dementia* 14: 205–214.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.08.013>
5. *Giau VV, Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim SY* (2019) APP, PSEN1, and PSEN2 Mutations in Asian Patients with Early-Onset Alzheimer Disease. *Int J Mol Sci* 20: 4757.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194757>
 6. *Geijselaers SLC, Aalten P, Ramakers IHGB, De Deyn PP, Heijboer AC, Koek HL, OldeRikkert MGM, Pappa JM, Reesink FE, Smits LL, Stehouwer CDA, Teunissen CE, Verhey FRJ, van der Flier WM, Biessels GJ, Parelsnoer Institute Neurodegenerative Diseases study group* (2017) Association of Cerebrospinal Fluid (CSF) Insulin with Cognitive Performance and CSF Biomarkers of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Disease* 61: 309–320.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170522>
 7. *Zhang F, Wei J, Li X, Ma C, Gao Y* (2018) Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer's Disease Before Amyloid- β Plaque Deposition in an APP (swE)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model. *J Alzheimer's Disease* 66: 613–637.
<https://doi.org/10.3233/JAD-180412>
 8. *Forrest SL, Kril JJ, Stevens CH, Kwok JB, Hallupp M, Kim WS, Huang Y, McGinley CV, Werka H, Kiernan MC, Götz J, Spillantini MG, Hodges JR, Ittner LM, Halliday GM* (2018) Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies. *Brain* 141: 521–534.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx328>
 9. *Adams SJ, Crook RJP, Deture M, Randle SJ, Innes AE, Yu XZ, Lin WL, Dugger BN, McBride M, Hutton M, Dickson DW, McGowan E* (2009) Overexpression of Wild-Type Murine Tau Results in Progressive Tauopathy and Neurodegeneration. *Am J Pathol* 175: 1598–1609.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090462>
 10. *Johnson ECB, Ho K, Yu GQ, Das M, Sanchez PE, Djukic B, Lopez I, Yu X, Gill M, Zhang W, Paz JT, Palop JJ, Mucke L* (2020) Behavioral and neural network abnormalities in human APP transgenic mice resemble those of App knock-in mice and are modulated by familial Alzheimer's disease mutations but not by inhibition of BACE1. *Mol Neurodegenerat* 15: 53.
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00393-5>
 11. *Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G* (1996) Correlative Memory Deficits, A Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* 274: 99–103.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5284.99>
 12. *Oulès B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, Lauritzen I, Sevalle J, Moreno S, Paterlini-Bréchet P, Trebak M, Checler F, Benfenati F, Chami M* (2012) Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Neurosci* 32: 11820–11834.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0875-12.2012>
 13. *Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH* (2002) The Relationship between A β and Memory in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 22: 1858–1867.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01858.2002>
 14. *Lefterov I, Fitz NF, Cronican A, Lefterov P, Staufenbiel M, Koldamova R* (2009) Memory deficits in APP23/Abca1 +/- mice correlate with the level of A β oligomers. *ASN Neuro* 1: e00006.
<https://doi.org/10.1042/AN20090015>
 15. *Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B* (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13287–13292.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13287>
 16. *Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP* (2003) Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition: Behavioral testing of the APP23 model. *Eur J Neurosci* 17: 388–396.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02444.x>
 17. *Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG* (2000) A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 975–979.
<https://doi.org/10.1038/35050103>
 18. *Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthellette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penhiman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J* (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523–527.
<https://doi.org/10.1038/373523a0>

19. Ameen–Ali KE, Wharton SB, Simpson JE, Heath PR, Sharp P, Berwick J (2017) Review: Neuro-pathology and behavioural features of transgenic murine models of Alzheimer’s disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 43: 553–570. <https://doi.org/10.1111/nan.12440>
20. Escribano L, Simón AM, Pérez-Mediavilla A, Salazar-Colocho P, Del Río J, Frechilla D (2009) Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer’s disease mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.071>
21. Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-Level Neuronal Expression of A β 1–42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *J Neurosci* 20: 4050–4058. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000>
22. Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer’s disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9572–9577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133381100>
23. Ambrée O, Richter H, Sachser N, Lewejohann L, Dere E, de Souza Silva MA, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Schübitz WR (2009) Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 30: 1192–1204. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.010>
24. Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D (2001) Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695. *J Biol Chem* 276: 21562–21570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100710200>
25. Kobayashi DT, Chen KS (2005) Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer’s disease. *Genes, Brain and Behav* 4: 173–196. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00124>
26. Kosel F, Torres Munoz P, Yang JR, Wong AA, Franklin TB (2019) Age-related changes in social behaviours in the 5xFAD mouse model of Alzheimer’s disease. *Behav Brain Res* 362: 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.029>
27. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer’s Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 26: 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
28. Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF (2006) Temporal memory deficits in Alzheimer’s mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci* 23: 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04551.x>
29. Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC (2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nature Neurosci* 14: 1023–1032. <https://doi.org/10.1038/nn.2858>
30. Lee CYD, Daggett A, Gu X, Jiang LL, Langfelder P, Li X, Wang N, Zhao Y, Park CS, Cooper Y, Ferando I, Mody I, Coppola G, Xu H, Yang XW (2018) Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer’s Disease Models. *Neuron* 97: 1032–1048.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.002>
31. Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, Oddo S (2019) Temporal and regional progression of Alzheimer’s disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* 18: e12873. <https://doi.org/10.1111/acel.12873>
32. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Affiliations expand Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer’s Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron* 45: 675–688. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>
33. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39: 409–421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3)
34. Volloch V, Olsen B, Rits S (2019) Alzheimer’s Disease is Driven by Intraneuronally Retained Beta-Amyloid Produced in the AD-Specific, β APP-Independent Pathway: Current Perspective and Experimental Models for Tomorrow. *Ann Integrat Mol Med* 2: 90–114. <https://doi.org/10.33597/aimm.02-1007>

35. *Creighton SD, Mendell AL, Palmer D, Kalisch BE, MacLusky NJ, Prado VF, Prado MAM, Winters BD* (2019) Dissociable cognitive impairments in two strains of transgenic Alzheimer's disease mice revealed by a battery of object-based tests. *Sci Rep* 9: 57.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37312-0>
36. *Kitazawa M, Medeiros R, LaFerla FM* (2012) Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions. *Current Pharm Design* 18: 1131–1147.
<https://doi.org/10.2174/138161212799315786>
37. *Poon CH, Wang Y, Fung ML, Zhang C, Lim LW* (2020) Rodent Models of Amyloid-Beta Feature of Alzheimer's Disease: Development and Potential Treatment Implications. *Aging and Disease* 11: 1235–1259.
<https://doi.org/10.14336/AD.2019.1026>
38. *Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, Westaway D* (2001) Early-onset Amyloid Deposition and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Expressing a Double Mutant Form of Amyloid Precursor Protein 695. *J Biol Chem* 276: 21562–21570.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M100710200>
39. *Bagyinszky E, Park SA, Kim HJ, Choi SH, An SS, Kim SY* (2016) PSEN1 L226F mutation in a patient with early-onset Alzheimer's disease in Korea. *Clin Intervent Aging* 11: 1433–1440.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S111821>
40. *Otvos LJ, Szendrei GI, Lee VM, Mantsch HH* (1993) Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents. *Eur J Biochem* 211: 249–257.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb19893.x>
41. *Jaffar S, Counts SE, Ma SY, Dadko E, Gordon MN, Morgan D, Mufson EJ* (2001) Neuropathology of Mice Carrying Mutant APPswe and/or PS1M146L Transgenes: Alterations in the p75NTR Cholinergic Basal Forebrain Septohippocampal Pathway. *Exp Neurol* 170: 227–243.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7710>
42. *Li XY, Men WW, Zhu H, Lei JF, Zuo FX, Wang ZJ, Zhu ZH, Bao XJ, Wang RZ* (2016) Age- and Brain Region-Specific Changes of Glucose Metabolic Disorder, Learning, and Memory Dysfunction in Early Alzheimer's Disease Assessed in APP/PS1 Transgenic Mice Using 18F-FDG-PET. *Int J Mol Sci* 17: 1707.
<https://doi.org/10.3390/ijms17101707>
43. *Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K* (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Med* 4: 97–100.
<https://doi.org/10.1038/nm10198-097>
44. *Eimer WA, Vassar R* (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegen* 8: 2.
<https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-2>
45. *Xiao NA, Zhang J, Zhou M, Wei Z, Wu XL, Dai XM, Zhu YG, Chen XC* (2015) Reduction of Glucose Metabolism in Olfactory Bulb is an Earlier Alzheimer's Disease-related Biomarker in 5XFAD Mice. *Chin Med J* 128: 2220–2227.
<https://doi.org/10.4103/0366-6999.162507>
46. *Wirhth O, Zampar S* (2020) Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models. *Int J Mol Sci* 21: 8144.
<https://doi.org/10.3390/ijms21218144>
47. *Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Authélet M, Laporte V, Octave JN, Brion JP* (2014) Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Disease* 62: 100–112.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.010>
48. *DeBay DR, Reid GA, Macdonald IR, Mawko G, Burrell S, Martin E, Bowen CV, Darvesh S* (2017) Butyrylcholinesterase-knockout reduces fibrillar β -amyloid and conserves 18FDG retention in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1671: 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.07.009>
49. *Hüttenrauch M, Baches S, Gerth J, Bayer TA, Weggen S, Wirhth O* (2015) Nephilysin Deficiency Alters the Neuropathological and Behavioral Phenotype in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Disease* 44: 1291–1302.
<https://doi.org/10.3233/JAD-142463>
50. *Jafari Z, Okuma M, Karem H, Mehla J, Kolb BE, Mohajerani MH* (2019) Prenatal noise stress aggravates cognitive decline and the onset and progression of beta amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 77: 66–86.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.01.019>

51. Kelley BJ, Petersen RC (2007) Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neurol Clin* 25: 577–609.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.03.008>
52. Schliebs R, Arendt T (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221: 555–563.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
53. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8: 595–608.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
54. Chen Z, Zhong C (2013) Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progr Neurobiol* 108: 21–43.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.06.004>
55. Bezprozvanny I (2022) Alzheimer's disease – Where do we go from here? *Biochem Biophys Res Commun* 633:72–76.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.075>
56. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's Disease Amyloid Gene in Hereditary Cerebral Hemorrhage, Dutch Type. *Science* 248: 1124–1126.
<https://doi.org/10.1126/science.2111584>
57. Zhang X, Fu Z, Meng L, He M, Zhang Z (2018) The Early Events That Initiate β -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10: 359.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00359>
58. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O (2015) Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 10: 703–711.
<https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1041913>
59. LaFerla FM, Green KN (2012) Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2: a006320.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
60. Drummond E, Wisniewski T (2017) Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133: 155–175.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
61. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S (2017) Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Disease* 57: 1171–1183.
<https://doi.org/10.3233/JAD-170045>
62. Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 196.e29.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027>
63. Jean YY, Baleriola J, Fà M, Hengst U, Troy CM (2015) Stereotaxic Infusion of Oligomeric Amyloid-beta into the Mouse Hippocampus. *J Visual Experim* 100: e52805.
<https://doi.org/10.3791/52805>
64. Frautschy SA., Yang F, Calderón L, Cole GM (1996) Rodent models of Alzheimer's disease: Rat a β infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging* 17: 311–332.
[https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02073-X](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02073-X)
65. O'Hare E, Weldon DT, Mantyh PW, Ghilardi JR, Finke MP, Kuskowski MA, Maggio JE, Shephard RA, Cleary J (1999) Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A β (1–42). *Brain Res* 815: 1–10.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01002-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01002-6)
66. Scuderi C, Stecca C, Valenza M, Ratano P, Bronzuoli MR, Bartoli S, Steardo L, Pompili E, Fumagalli L, Campolongo P, Steardo L (2014) Palmitoylethanolamide controls reactive gliosis and exerts neuroprotective functions in a rat model of Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease* 5: e1419.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2014.376>
67. Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzig MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M (2007) Induction of Tau Pathology by Intracerebral Infusion of Amyloid- β -Containing Brain Extract and by Amyloid- β Deposition in APP \times Tau Transgenic Mice. *Am J Pathol* 171: 2012–2020.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070403>
68. Denny CA, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR (2012) 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22: 1188–1201.
<https://doi.org/10.1002/hipo.20964>
69. Ohm TG (2007) The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Progr Brain Res* 163: 723–740.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63039-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63039-8)

70. *Baleriola J, Walker CA, Jean YY, Crary JF, Troy CM, Nagy PL, Hengst U* (2014) Axonally Synthesized ATF4 Transmits a Neurodegenerative Signal across Brain Regions. *Cell* 158: 1159–1172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.001>
71. *Jean YY, Ribe EM, Pero ME, Moskalenko M, Iqbal Z, Marks LJ, Greene LA, Troy CM* (2013) Caspase-2 is essential for c-Jun transcriptional activation and Bim induction in neuron death. *Biochem J* 455: 15–25. <https://doi.org/10.1042/BJ20130556>
72. *Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ* (2008) Beta-amyloid(1-42) Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor. *J Neurosci* 28: 3941–3946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-08.2008>
73. *Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, Kim W, Kang KS, Jo SA, Woo JI* (2004) β -Amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res* 155: 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.012>
74. *Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL* (2007) Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res* 177: 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.032>
75. *Yamada K, Tanaka T, Mamiya T, Shiotani T, Kameyama T, Nabeshima T* (1999) Improvement by nefiracetam of β -amyloid-(1-42)-induced learning and memory impairments in rats: Nefiracetam and β -amyloid-induced memory deficits. *Br J Pharmacol* 126: 235–244. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702309>
76. *Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, Mouri A, Kim HC, Saito K, Matsuno T, Kawashima S, Nabeshima T* (2006) Effects of a Novel Cognitive Enhancer, Spiro[imidazo-[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3 H)-one (ZSET1446), on Learning Impairments Induced by Amyloid- β 1–40 in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 1079–1087. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.098640>
77. *Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, Suh HW, Kim YH, Song DK* (2001) Protection against β -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid: In vivo protection against β -amyloid toxicity with ferulic acid. *Br J Pharmacol* 133: 89–96. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704047>
78. *Figueiredo CP, Bicca MA, Latini A, Prediger RD, Medeiros R, Calixto JB* (2011) Folic Acid Plus α -Tocopherol Mitigates Amyloid- β -Induced Neurotoxicity through Modulation of Mitochondrial Complexes Activity. *J Alzheimer's Disease* 24: 61–75. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101320>
79. *Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, de Bem AF, Prediger RDS, Tasca CI* (2010) Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 226: 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113840>
80. *Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M* (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp Neurol* 233: 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.036>
81. *Minogue AM, Schmid AW, Fogarty MP, Moore AC, Campbell VA, Herron CE, Lynch MA* (2003) Activation of the c-Jun N-terminal Kinase Signaling Cascade Mediates the Effect of Amyloid- β on Long Term Potentiation and Cell Death in Hippocampus. *J Biol Chem* 278: 27971–27980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302530200>
82. *Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa CV, Melo HM, Mota-Sales AP, Saraiva LM, Klein WL, Sebollela A, De Felice FG, Ferreira ST* (2013) Memantine Rescues Transient Cognitive Impairment Caused by High-Molecular-Weight A Oligomers But Not the Persistent Impairment Induced by Low-Molecular-Weight Oligomers. *J Neurosci* 33: 9626–9634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0482-13.2013>
83. *Ledo JH, Azevedo EP, Clarke JR, Ribeiro FC, Figueiredo CP, Foguel D, De Felice FG, Ferreira ST* (2013) Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry* 18: 1053–1054. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.168>
84. *Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R* (2010) Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mount Sinai J Med* 77(1): 69–81. <https://doi.org/10.1002/msj.20159>
85. *Kim HY, Lee DK, Chung BR, Kim HV, Kim Y* (2016) Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *J Visual Experim* 109: 53308. <https://doi.org/10.3791/53308>

Alzheimer's Disease: A Search for the Best Experimental Models for the Decoding of the Cellular and Molecular Mechanisms of the Development of the Disease**Y. V. Gorina^{a, b, *}, O. L. Vlasova^a, A. V. Bolshakova^a, and A. B. Salmina^{a, b, c}**^a *Laboratory of Molecular Neurodegeneration, the St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great, St. Petersburg, Russia*^b *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Professor Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*^c *Laboratory of Neurobiology and Tissue Engineering, Brain Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia***e-mail: yana_20@bk.ru*

Alzheimer's disease is the most common type of dementia associated with cognitive decline, such as memory and visuospatial skills. Insufficiently effective treatments have prompted the creation of experimental animal models capable of reproducing the pathology of Alzheimer's disease, especially at the presymptomatic stage, in order to develop and study preventive and therapeutic strategies. To date, none of the developed animal models fully reflects the entire spectrum of neuropathological and cognitive impairments observed in the development of Alzheimer's disease in humans. However, each model created allows, to one degree or another, to study various aspects of the pathogenesis of the disease, providing an important understanding of the key pathological changes that may occur during its development. In this review, we present a summary of the neuropathological features of Alzheimer's disease and their relationship to cognitive impairment in the animal models currently in use. We also present in a comparative aspect the features of the development of Alzheimer's type neurodegeneration using the example of 2 models – genetic and injection, which will make it possible to determine optimal approach when choosing a model for implementing research tasks.

Keywords: Alzheimer's disease, genetic model, injection model, cognitive functions

УЧАСТИЕ ДИГИДРОПИРИМИДИНАЗА-ПОДОБНОГО БЕЛКА 2 В РЕГУЛЯЦИИ ТРЕВОЖНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Ш. М. Гулиева¹, А. А. Мехтиев², *

¹Нахичеванский государственный университет, Нахичевань, Азербайджан

²Институт физиологии им. академика Абдуллы Гараева НАН, Баку, Азербайджан

*E-mail: arifmekht@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Целью исследования было изучение роли дигидропиримидиназа-подобного белка 2 (ДПБ2) в регуляции тревожности у человека и животных. Для этого определяли уровень ДПБ2 в тромбоцитах и слюне и уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов, имевших назначение на операцию, а также изучали влияние ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта. Пробы крови у пациентов, испытывавших ощущение тревожности в день операции, забирали из вены в пробирки, содержавшие 5%-ный раствор ЭДТА в качестве антикоагулянта, выделяли тромбоциты и сыворотку, и методом непрямого иммуноферментного анализа в тромбоцитах определяли уровень ДПБ2, а в сыворотке крови – уровень естественных аутоантител к ДПБ2. В слюне у этих больных также определяли уровень ДПБ2. Результаты исследования выявили повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах ($p < 0.05$ по t -критерию Стьюдента) и уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке ($p < 0.001$) у пациентов по сравнению со здоровыми испытуемыми. Также выявлено увеличение уровня стрессорного гормона кортизола в сыворотке крови у пациентов ($p < 0.01$). В то же время в слюне у них было обнаружено снижение уровня ДПБ2 ($p < 0.01$). Внутримозговое введение крысам ДПБ2 вызывало увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта относительно крыс контрольной группы (инактивированный ДПБ2; $p < 0.01$ по U -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни), что свидетельствует о снижении у них уровня тревожности. Основываясь на повышении уровней ДПБ2 в тромбоцитах и аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови, а также снижении его уровня в слюне при параллельном повышении уровня кортизола в сыворотке у пациентов, испытывавших ощущение тревожности, можно сделать заключение о том, что определение уровня ДПБ2 и естественных аутоантител к ДПБ2 в указанных средах организма может служить показателем адаптации к уровню тревожности у человека.

Ключевые слова: пациенты, тромбоциты, сыворотка крови, слюна, дигидропиримидиназа-подобный белок 2, естественные аутоантитела, кортизол, приподнятый крестообразный лабиринт

DOI: 10.31857/S0869813923010077, EDN: IZMQDE

Современная жизнь человека характеризуется высокими скоростями, информационной перегруженностью и чрезвычайным возбуждением. Следует указать, что определенные виды деятельности требуют спокойного и уравновешенного психоэмоционального состояния, правильной и безошибочной оценки часто возникаю-

щих непредвиденных ситуаций и принятия быстрых и адекватных решений в подобных ситуациях. К настоящему времени доказано, что причиной более, чем 80% авиакатастроф является человеческий фактор, т.е. ошибки авиадиспетчеров, обусловленные неверным или несвоевременным принятием решений [1]. В этой связи представляют интерес изучение вырабатываемого навыка подкрепления/наказания у пациентов с патологией генерализованного возбуждения, с генерализованной социальной фобией и у здоровых испытуемых. Использование этого навыка позволяет оценить способность индивидуумов определять значимость объектов и осуществлять выбор между ними с целью усиления подкрепления и ослабления эффекта наказания. При этом было обнаружено, что у пациентов с патологией общего возбуждения наблюдалось нарушение выполнения навыка подкрепления/наказания при сравнении как с пациентами с генерализованной социальной фобией, так и со здоровыми испытуемыми [2]. Аналогичным образом, исследование, выполненное на субклинических индивидуумах, обладавших повышенным уровнем тревожности, показало, что в большинстве случаев такие участники демонстрировали признаки нарушения принятия правильного решения: выбор правильных решений у лиц с высоким уровнем тревожности был значительно ниже в сравнении с индивидуумами с низким уровнем тревожности [3]. При анализе пациентов с генерализованной тревожностью в модели пассивного избегания было обнаружено, что пациенты допускали больше ошибок при выборе пассивного избегания, чем здоровые испытуемые, причем уровень совершаемых ошибочных реакций коррелировал с уровнем их функциональных нарушений [4]. Принимая во внимание приведенные аргументы, становится очевидным, что одной из важных проблем современной жизни является разработка точного, быстрого и неинвазивного метода оценки психоэмоционального состояния и/или переутомления лиц, выполняющих свои профессиональные обязанности в сферах деятельности, несовместимых с принятием ошибочных решений.

Рассматривая возможные молекулярные агенты, которые могли бы быть использованы в качестве надежных индикаторов психоэмоционального состояния человека, следует выделить серотонинергическую систему головного мозга, наиболее быстро и адекватно реагирующую на изменение психоэмоционального состояния индивидуумов. В частности, установлено участие серотонинергической системы в патогенезе депрессий и соответствие изменений уровня серотонина в тромбоцитах степеням тяжести заболевания [5, 6]. В этой связи представляет интерес изучение дигидропиримидиназа подобного белка 2 (ДПБ2), находящегося в прямой зависимости от уровня серотонина в структурах головного мозга [7].

ДПБ2, также называемый в англоязычной литературе “collapsing-response mediator protein (CRMP2)”, экспрессируется на ранней стадии нейронной дифференциации, совпадающей с очень активным периодом развития нейронов, включающим формирование аксонов и синаптических связей [8]. Кроме того, ДПБ2 был обнаружен в растущих аксонах, и была выявлена его способность индуцировать аксональный спраунтинг у нейронов гиппокампа [9]. Методом двумерного дифференциального электрофореза в геле с последующей идентификацией белковых фракций методом масс-спектрометрии было продемонстрировано изменение уровня ДПБ2 в вентральном гиппокампе у крыс под влиянием продолжительного умеренного стресса, а также под влиянием транквилизатора эсциталопрама, нивелирующего его воздействие [10]. Наряду с этим было показано, что отсроченные последствия отнятия крысят от матерей (материнская депривация) проявляются в виде депрессивно-подобного поведения во взрослом состоянии и сопровождаются нарушением функционирования сигнального пути, опосредованного ДПБ2, а также повышенным фосфорилированием ДПБ2 в гиппокампе, снижающим его способность к взаимодействию с тубулином [11]. Уровень метилирования ДНК в области

промотора ДПБ2 в гиппокампе у крыс, подвергнутых воздействию продолжительного непредсказуемого умеренного стресса, также был значительно выше, чем у животных контрольной группы. Кроме того, уровни экспрессии мРНК ДПБ2 и самого ДПБ2 в гиппокампе и префронтальной коре в группе подвергнутых стрессу крыс были значительно ниже, чем у контрольных животных [12].

В задачу проведенного нами исследования входило определение уровня ДПБ2 в тромбоцитах и слюне людей, испытывающих выраженную тревожность, уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке их крови, а также влияние внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта, которая широко применяется в мировой практике для исследования состояния тревожности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на пациентах обоего пола в возрасте до 40 лет, которым было назначено проведение планового оперативного вмешательства в хирургических отделениях Центральной больницы Нахичеванской Автономной Республики (г. Нахичевань, ул. А. Алиева, 1), НИИ Клинической хирургии им. М. Топчубашева (г. Баку, ул. А.М. Шариф-заде, 196) и Премиум клиники (г. Баку, ул. А. Магеррамова, 25В). Предварительно от пациентов было получено письменное согласие на предмет использования проб крови и слюны в проводимом исследовании. Поведенческие эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой тела 160–220 г из вивария Института физиологии им. академика Абдуллы Гараева.

У пациентов из локтевой вены забирали кровь в объеме 5 мл в пробирки, содержавшие 0.5 мл 5%-ного антикоагулянта этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Пробирки с пробами крови центрифугировали со скоростью 1000 g в течение 7 мин, собирали плазму, переносили в пробирки эппендорф и центрифугировали со скоростью 9000 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку собирали в отдельные пробирки эппендорф. Пробирки с осевшими тромбоцитами, плазмой и сывороткой хранили при -70°C . У этих же больных собирали слюну и замораживали. В качестве контроля использовали пробы крови и слюну здоровых испытуемых того же возраста.

ДПБ2 выделяли из головного мозга коров. Основными этапами фракционирования были: 1) дробное осаждение белков из белкового экстракта головного мозга сульфатом аммония в конечной концентрации 40%; 2) гель-хроматография на колонке сефадекс G-150 (3 × 60 см); 3) экспозиция в 40 mM растворе ЭДТА в течение ночи на встряхивателе; 4) препаративное изоэлектрическое фокусирование в геле с использованием амфолинов узкого диапазона (pH 4–6). Фракционирование осуществляли под контролем непрямого иммуноферментного анализа с использованием иммуноглобулинов к ДПБ2. Гомогенность выделенного белка определяли методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в присутствии белков-стандартов с известными значениями молекулярных масс.

Поликлональные иммуноглобулины к ДПБ2 получали в результате 5-месячной иммунизации трех кроликов очищенным белком в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Sigma, Германия) по следующей схеме: первые три инъекции с интервалом 14 сут, далее 1 раз в месяц. Через 10 сут после 3-й и последующих инъекций из краевой ушной вены забирали кровь, отделяли сыворотку и осаждали иммуноглобулины добавлением 100%-ного раствора сульфата аммония до конечной 50%-ной концентрации.

В первой серии исследований из тромбоцитов пациентов ($n = 18$) и здоровых испытуемых ($n = 11$) экстрагировали водорастворимые белки 0.05 M фосфатным бу-

фером, содержащим 0.3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0.1% тритон X-100 (pH 7.3), после чего гомогенат тромбоцитов центрифугировали при 9000 g в течение 10 мин, собирали надосадочную жидкость, которую использовали в качестве антигенов в концентрации 20 мкг/мл в 0.1 М буфере трис-HCl (pH 8.6) в твердофазном непрямом иммуноферментном анализе (ТНИФА) на 96-луночных полистироловых планшетах с умеренным уровнем сорбции (Sigma, Германия). В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные иммуноглобулины к ДПБ2, разведенные в 40 раз буфером для антител, содержащим 0.04 М фосфатный буфер, 0.15 М хлористый натрий, 0.05%-ный Tween-20 и 1%-ный бычий сывороточный альбумин (pH 7.3). В качестве вторичных антител использовали противокроличьи козы иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена, разведенные в 2000 раз буфером для антител (pH 7.3). Визуализацию реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – ортофенилендиамина в концентрации 0.5 мг/мл в 0.05 М цитрат-фосфатном буфере (pH 4.5). Реакцию останавливали заливанием в лунки по 50 мкл 3 М раствора гидроксида натрия. Результаты реакции считывали в фотометре для иммуноферментного анализа “Molecular Devices Spectra Max 250” (MTX Lab Systems, Inc., США) на длине волны 492 нм (длина волны сравнения – 630 нм).

Одновременно проводили ТНИФА с пробами слюны, взятых у этих же пациентов и у здоровых испытуемых. Реакцию осуществляли так же, как и с белковыми экстрактами тромбоцитов.

Во второй серии исследований методом ТНИФА определяли уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови и слюне у этих же пациентов. В качестве антигена использовали очищенный ДПБ2 в концентрации 20 мкг/мл в 0.1 М буфере трис-HCl (pH 8.6). В качестве первичных антител использовали пробы сыворотки крови и слюны, разведенные в 100 раз буфером для антител (pH 7.3). В качестве вторичных антител использовали мышинные иммуноглобулины против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена и разведенные в 1000 раз буфером для антител (pH 7.3). Далее реакцию проводили, как описано выше.

В третьей серии исследований в сыворотке крови этих же пациентов определяли уровень кортизола методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием сенсibilизированных полистироловых планшетов (Хема, РФ). На основании стандартов набора строили калибровочную кривую, по которой определяли концентрацию кортизола в образцах сыворотки больных.

Четвертая серия исследований была выполнена на крысах-самцах линии Вистар в крестообразном лабиринте, приподнятом на высоту 1 м над полом и предназначенном для исследования изменения уровня тревожности у животных под влиянием вводимых препаратов, с целью изучения влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение. Были сформированы 2 группы крыс: 1) контрольная группа ($n = 9$) и 2) опытная группа ($n = 9$). В 1-й день животных помещали в лабиринт на 300 с и регистрировали количество пересеченных ими квадратов в закрытых и открытых рукавах лабиринта в целях определения у них исходного уровня тревожности. Изучение поведения животных в лабиринте осуществляли в затемненной комнате для создания естественных для крыс условий обитания. Через 24 ч животным, наркотизированным этаминалом натрия (40 мг/кг массы тела, внутривенно), вводили препараты: в контрольной группе вводили инактивированный ДПБ2 (35 мин на водяной бане при температуре 60°C), а в опытной группе – нативный ДПБ2. Введение препаратов осуществляли в левый боковой желудочек головного мозга крыс, в концентрации 1.0 мг/мл и объеме 10 мкл в физиологическом растворе на фосфатном буфере (pH 7.3). Через 24 ч после введения препаратов животных

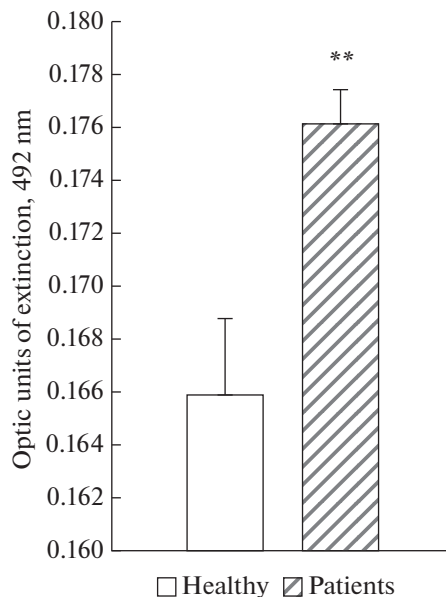


Рис. 1. Изменение уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов. ** – $p < 0.01$ по t -критерию Стьюдента.

обеих групп вновь помещали в лабиринт на 300 с и регистрировали количество пересеченных квадратов в открытом и закрытом рукавах.

По биохимическим показателям уровень достоверности различий между группами пациентов и здоровых испытуемых оценивали по t -критерию Стьюдента. По показателям поведения крыс в ПКЛ межгрупповые различия анализировали по U -критерию Вилкоксона и Манна–Уитни. Значения считались статистически достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов

По итогам первой серии исследований было обнаружено повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов непосредственно перед плановой полостной операцией относительно его уровня у здоровых испытуемых. В частности, если уровень ДПБ2 у здоровых испытуемых в тромбоцитах составлял 0.165 ± 0.004 оптических единиц поглощения, то у пациентов его уровень достигал 0.176 ± 0.001 опт. ед. ($p < 0.01$ по t -критерию Стьюдента; рис. 1).

В то же время в слюне у этих пациентов, напротив, отмечалось заметное снижение уровня ДПБ2 относительно его уровня у здоровых испытуемых: у здоровых испытуемых уровень ДПБ2 составлял 0.199 ± 0.005 опт. ед., тогда как у пациентов – 0.147 ± 0.009 опт. ед. ($p < 0.001$ по t -критерию Стьюдента; рис. 2).

Определение уровня естественных аутоантител к ДПБ2

Во второй серии исследований при определении уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов было обнаружено его резкое повышение (в 2.5 раза) относительно уровня здоровых испытуемых. Так, уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у здоровых испытуемых равнялся $0.0063 \pm$

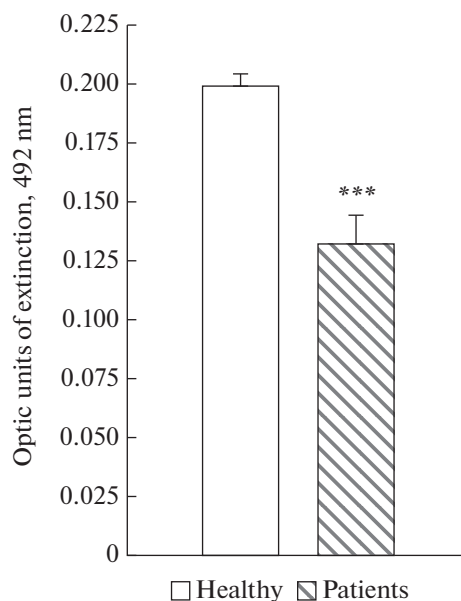


Рис. 2. Изменение уровня ДПБ2 в слюне у пациентов. *** – $p < 0.001$ по t -критерию Стьюдента.

± 0.0005 опт. ед., тогда как в сыворотке у больных их уровень составлял $0.01583 \pm \pm 0.0013$ опт. ед. ($p < 0.001$ по t -критерию Стьюдента; рис. 3а). Параллельно было проведено сравнение уровней естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов, согласно их половой принадлежности. Вследствие того, что разница в уровнях аутоантител к ДПБ2 у мужчин (0.014 ± 0.002) и у женщин (0.017 ± 0.002) была недостоверной ($p > 0.05$; рис. 3б), объединение их значений в одну группу, равно как и других показателей в первой и второй сериях исследований, считалось правомочным.

При определении уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в слюне у пациентов и здоровых испытуемых было обнаружено, что величины оптического поглощения в лунках полистироловой планшеты с пробами слюны, полученными как от пациентов, так и от здоровых испытуемых, не отличались от величины оптического поглощения в “пустых” лунках, в которые вместо антигенов был нанесен 0.1 М трис-НСl (рН 8.6), использовавшийся для разведения проб слюны. Нанесение в лунки только буфера для разведения антигенов (“blank control”) обычно используют при постановке ТНИФА для оценки уровня неспецифической сорбции первичных и вторичных антител: чем ниже значения оптического поглощения в “пустых” лунках в конце реакции, тем ниже уровень неспецифической сорбции обоих видов антител и тем более убедительны получаемые в ТНИФА различия между исследуемыми группами. На основании того, что различий между оптическим поглощением в лунках с пробами слюны от обеих групп испытуемых и в “пустых” лунках не было обнаружено (т.е. в лунках, отведенных для проб слюны пациентов и здоровых испытуемых, антитела отсутствовали), было сделано заключение о том, что антитела не способны проникать через гемато-саливарный барьер.

Определение уровня кортизола

В третьей серии исследований определение уровня стрессорного гормона кортизола в сыворотке у пациентов выявило повышение его уровня относительно уров-

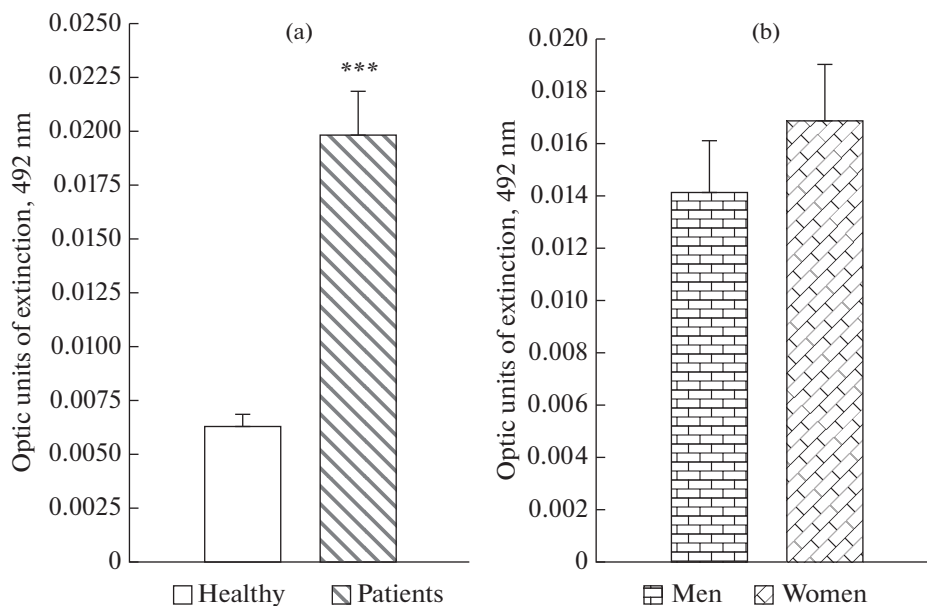


Рис. 3. Изменение уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов. *** – $p < 0.001$ (a) по t -критерию Стьюдента. Сравнение уровней естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов разного пола (b).

ня у здоровых испытуемых. В частности, если у здоровых испытуемых уровень кортизола в сыворотке составил 443.3 ± 26.1 нМ, то у пациентов – 582.9 ± 43.5 нМ ($p < 0.01$; рис. 4a).

В этой серии также проводили сравнение уровней кортизола у пациентов в связи с их половой принадлежностью. Поскольку достоверных различий между группами пациентов разного пола выявлено не было: 511.8 ± 21.6 нМ у мужчин против 607.4 ± 59.2 нМ у женщин ($p > 0.05$; рис. 4b), значения уровней кортизола у пациентов обоего пола также объединили в одну общую группу.

Таким образом, результаты первых трех серий исследований свидетельствуют о повышении уровня ДПБ2 в тромбоцитах и повышении уровня аутоантител в сыворотке наряду со снижением его уровня в слюне у пациентов непосредственно перед запланированным оперативным вмешательством. Наряду с указанными изменениями, в сыворотке у этих пациентов было выявлено повышение уровня кортизола. Для выявления роли ДПБ2 в формировании состояния тревожности в следующей (четвертой) серии изучали влияние его введения на поведение крыс.

Изучение влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс

В этой серии экспериментов было проведено изучение влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта. Было обнаружено заметное увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта у крыс опытной группы после введения ДПБ2 по сравнению с количеством пересеченных квадратов этими животными до введения белка – 5.9 ± 2.4 квадратов после введения ДПБ2 против 1.4 ± 1.4 квадрата до его введения ($p < 0.01$ по U -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни; рис. 5). В группе животных с введением инактивированного ДПБ2 не было выявлено достоверных

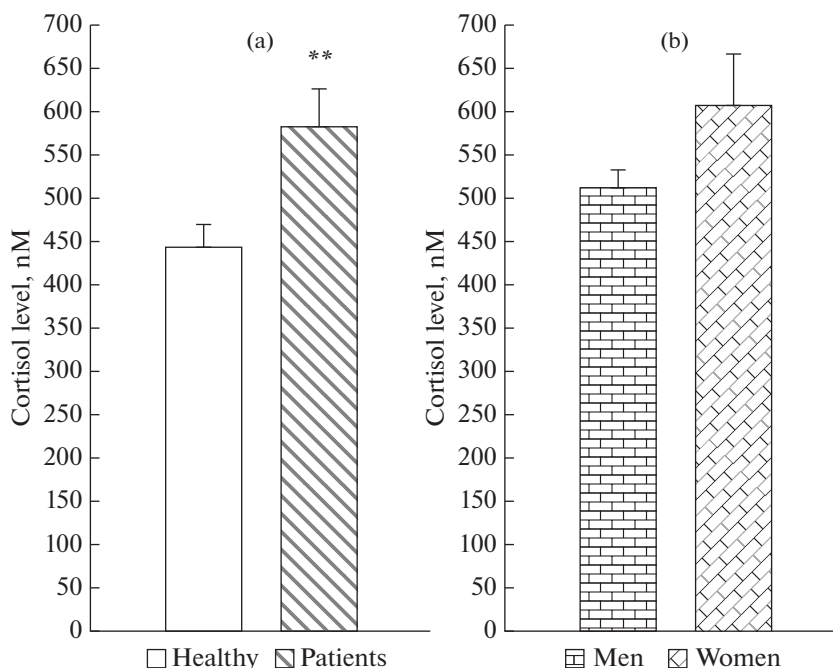


Рис. 4. Изменение уровня кортизола в сыворотке крови у пациентов, ** – $p < 0.01$ по t -критерию Стьюдента (а) и сравнение уровней кортизола в сыворотке у пациентов разного пола (б).

отличий по количеству пересеченных квадратов (1.4 ± 1.1) в открытых рукавах камеры по сравнению с интактными животными. Наконец, следует отметить, что было выявлено значительное увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах камеры крысами опытной группы после введения ДПБ2 по сравнению с животными контрольной группы, получивших инъекции инактивированного ДПБ2 (5.9 ± 2.4 квадратов против 1.4 ± 1.1 , $p < 0.05$ по U -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни; рис. 5).

Таким образом, внутримозговое введение крысам ДПБ2 вызывало повышение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта относительно значений этого показателя до введения ДПБ2 у животных опытной группы и относительно его значений у контрольных крыс, что свидетельствует о снижении их тревожности. Результаты исследований, полученные как на пробах пациентов, так и в экспериментальной модели на животных свидетельствуют о непосредственном участии ДПБ2 в развитии состояния тревожности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день довольно сложно подобрать адекватный показатель для оценки уровня состояния тревожности и беспокойства у человека. В настоящее время большинство используемых иммунохимических методов, ориентированных на выявление этого состояния, по сути, определяют уровень общего стресса. Вместе с тем следует указать, что состояние тревожности имеет характерную нейрорхимическую и поведенческую (на соответствующих моделях животных) специфичность.

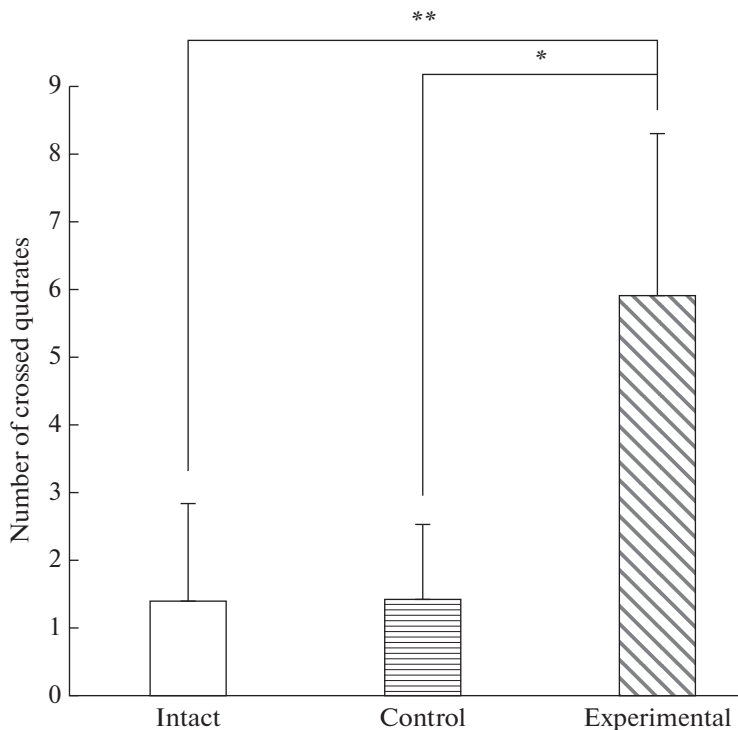


Рис. 5. Изменение количества пересеченных квадратов крысами в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта под влиянием внутримозгового введения ДПБ2 (Experimental) в сравнении с интактными животными (Intact) и контрольной группой (Control), инъекцированных инактивированным ДПБ2. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ по U -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни.

Модель приподнятого крестообразного лабиринта служит адекватной и широко используемой моделью для определения уровня тревожности у крыс под влиянием различных фармакологических препаратов [13, 14].

Выявленное в наших экспериментах повышение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта у животных опытной группы после внутримозгового введения ДПБ2 по сравнению с их количеством у этих животных до введения им белка и относительно количества пересеченных квадратов в открытых рукавах у животных контрольной группы (инактивированный ДПБ2) указывает на снижение уровня тревожности (анксиолитическое влияние) у животных под влиянием искусственного повышения уровня ДПБ2 в головном мозге. Заключение об анксиолитическом влиянии ДПБ2 на поведение животных, сделанное на основании повышения количества пересеченных ими квадратов в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, согласуется с результатами других авторов, продемонстрировавших наличие отрицательной коррелятивной взаимосвязи между нахождением животных в области открытых рукавов лабиринта и уровнем стресса, оцененного по содержанию стрессорного гормона кортикостерона в их плазме [15, 16]. Следовательно, определения уровня этого белка в тромбоцитах и слюне, а также уровня естественных аутоантител к нему в сыворотке крови у человека могут быть использованы в качестве показателей развития состояния тревожности.

Следует отметить, что определенный в данном исследовании повышенный уровень ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов отражает его уровень в коре головного мозга [5, 6], тогда как повышенный уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов – уровень ДПБ2 в подкорковых структурах их головного мозга. Взаимосвязь между уровнем естественных аутоантител к ДПБ2 и его уровнем в подкорковых структурах головного мозга была ранее выявлена методом ТНИФА в экспериментах, выполненных на модели доминантного поведения у крыс [17].

Снижение уровня ДПБ2 в слюне у пациентов, находящихся в состоянии тревожности, видимо, связано с повышенным уровнем естественных аутоантител к этому белку в сыворотке крови, связывающихся с ДПБ2 и препятствующих его прохождению через гемато-саливарный барьер. При этом комплекс белка со связанными с ним антителами не способен проходить через гемато-саливарный барьер, поскольку, как показали наши результаты, гемато-саливарный барьер непроницаем для самих естественных аутоантител к ДПБ2.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали, что повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах и снижение его уровня в слюне, а также повышение уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов, сопровождавшиеся повышением уровня кортизола в сыворотке крови, могут служить маркерами адаптивной и мобилизационной тревожности и отражать изменения уровня ДПБ2 в соответствующих структурах головного мозга. О влиянии ДПБ2 на изменение поведенческих коррелятов тревожности также свидетельствуют данные, полученные на животных после внутримозгового введения им очищенного препарата этого белка.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологии им. академика Абдуллы Гараева НАН, Баку, Азербайджан.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам и принципам Базельской декларации и рекомендациям Национального биоэтического комитета Азербайджана (Протокол заседания № 4 от 10.09.2019 г.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов, руководство экспериментальной работой и редактирование манускрипта – А.А.М. Сбор проб для анализа, проведение иммунохимических и поведенческих экспериментов, обработка данных и написание манускрипта – Ш.М.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shapell S, Detwiler C, Boquet A, Wiegmann D* (2006) Human error and commercial aviation accidents: A comprehensive, fine-grained analysis using HFACS. Federal Aviation Administration. DOT/FAA/AM-06/18. Office of Aerospace Medicine Washington, DC 20591.
2. *Devido G, Jones M, Geraci M, Hollon N, Blair RJ, Pine DS, Blair K* (2009) Stimulus-reinforcement-based decision making and anxiety: impairment in generalized anxiety disorder (GAD) but not in generalized social phobia (GSP). *Psychol Med* 39: 1153–1161.
<https://doi.org/10.1017/S003329170800487X>
3. *Luhman CC, Ishida K, Hajcak G* (2011) Intolerance of uncertainty and decisions about delayed, probabilistic rewards. *Behav Ther* 42: 378–386.
<https://doi.org/10.1016/j.beth.2010.09.002>
4. *Teng C, Otero M, Geraci M, Blair RJR, Pine DS, Grillon Ch, Blair KS* (2016) Abnormal decision-making in generalized anxiety disorder: Aversion of risk or stimulus-reinforcement impairment? *Psych Res* 237: 351–356.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.12.031>
5. *Elliott JM, Kent A* (1989) Comparison of [¹²⁵I]iodolysergic acid diethylamide binding to human frontal cortex and platelet tissue. *J Neurochem* 53: 191–196.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07313.x>
6. *Collins ChM, Kloek J, Elliott JM* (2013) Parallel changes in serotonin levels in brain and blood following acute administration of MDMA. *J Psychopharm* 27: 109–112.
<https://doi.org/10.1177/0269881112463123>
7. *Мехмиев АА* (2000) Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами. Бюл экспер биол мед 129: 147–150. [*Mekhtiev AA* (2000) Revealing in the brain of rats the protein possessing anticonsolidation properties. *Bull Exp Biol Med* 129: 147–150. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1007/BF02766081>
8. *Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM* (1995) Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376: 509–514.
<https://doi.org/10.1038/376509a0>
9. *Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano MN, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K* (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 781–782.
<https://doi.org/10.1038/90476>
10. *Bisgaard ChF, Jayatissa MN, Enghild JJ, Sánchez C, Artemychyn R, Wiborg O* (2007) Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression. *J Mol Neurosci* 32: 132–144.
<https://doi.org/10.1007/s12031-007-0025-4>
11. *Wei Y, Wang G, Chen J, Xiao L, Wu Z, He J, Zhang N* (2021) Maternal deprivation induces cytoskeletal alterations and depressive-like behavior in adult male rats by regulating the AKT/GSK3 β /CRMP2 signaling pathway. *Physiol & Behav* 242: 113625.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113625>
12. *Xiang D, Xiao J, Sun S, Fu L, Yao L, Wang G, Liu Z* (2020) Differential regulation of DNA methylation at the CRMP2 promoter region between the hippocampus and prefrontal cortex in a CUMB depression model. *Front Psychiatr* 11: 141.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00141>
13. *Walf AA, Frye CA* (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2: 322–328.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
14. *Krauter A-K, Guest PC, Sarnyai Z* (2019) The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol* 1916: 69–74.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
15. *File SE, Zangrossi H Jr, Sanders FL, Mabbutt PS* (1994) Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113: 543–546.
<https://doi.org/10.1007/BF02245237>
16. *Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF* (1999) Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 68: 47–53.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00140-7)
17. *Hasanova LF* (2022) The changes of serotonin-modulating anticonsolidation protein and dihydropyrimidinase-related protein 2 in the amygdala and blood of depressive rats. *Azerb J Physiol* 37: 7–12.

Involvement of Dihydropyrimidinase-Related Protein 2 in Regulation of Anxiety in Humans**Sh. M. Guliyeva^a and A. A. Mekhtiev^{b, *}**^a *Nakhchivan State University, Nakhchivan, Azerbaijan*^b *Academician Abdulla Garayev Institute of Physiology, NAS, Baku, Azerbaijan***e-mail: arifmekht@yahoo.com*

The goal of the study was analysis of the role for dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP2) in regulation of anxiety in humans and animals. For this purpose, the levels of DRP2 in the platelets and saliva and the levels of natural autoantibodies to DRP2 in the blood serum of the patients, admitted for a surgical operation, were analyzed alongside with the effects of DRP2 on rat behavior using the model of elevated plus-maze. Blood samples were collected from the veins of the patients, feeling anxiety at the day of surgery, into test tubes containing 5% EDTA as an anticoagulant. Platelets and serum were purified and through indirect ELISA-test the levels of DRP2 were evaluated in the platelets, while the levels of natural anti-DRP2 autoantibodies were measured in the blood serum. Concomitantly, the levels of DRP2 were estimated in the patients' saliva sampled on the same day. The results showed upregulation of DRP2 in the platelets ($p < 0.05$ on Student's t -criterion) and natural anti-DRP2 autoantibodies in the serum of the patients ($p < 0.001$) relative to healthy persons. Evaluation of the level of the stress hormone cortisol in the patients' serum revealed its upregulation ($p < 0.01$). At the same time downregulation of DRP2 in the patients' saliva ($p < 0.01$) was noticed. Intra-cerebral administration of DRP2 to the rats resulted in an increase in the number of crossed squares in the open arms of the maze relative to the control rats injected with inactivated DRP2 ($p < 0.01$, Wilcoxon and Mann–Whitney U -criterion) which indicates their reduced anxiety. Based on the data obtained we conclude that evaluation of DRP2 in the platelets, natural anti-DRP2 autoantibodies in the blood serum and DRP2 in the saliva might serve as an indicator of anxiety levels in humans.

Keywords: patients, platelets, blood serum, saliva, dihydropyrimidinase-related protein 2, natural autoantibodies, cortisol, elevated plus-maze

ЦИТОКИН 14-3-3 η КАК НОВЫЙ БИОМАРКЕР В ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

© 2023 г. А. А. Королькова¹, В. В. Хижа², Д. И. Козлова^{2, *}, Д. С. Васильев²,
А. Л. Маслянский³, Т. В. Вавилова³, М. Ф. Баллюзек⁴, А. В. Рыбаков^{2, 5},
М. Е. Шевалдина⁵, К. А. Юрьева⁶

¹Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина, Сыктывкар, Россия

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

³Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ России,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургская больница РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

⁶Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: di.kozlova.official@gmail.com

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 25.11.2022 г.

Принята к публикации 27.11.2022 г.

В настоящее время рутинная оценка активности ревматоидного артрита заключается в определении показателей суставного синдрома, таких как число болезненных и припухших суставов, а также ряда лабораторных показателей. Наибольший интерес представляют последние, к числу которых относится ревматоидный фактор (РФ), антитела к циклическому цитруллинированному пептиду и ряд острофазовых показателей, однако они имеют низкую чувствительность и специфичность, особенно на ранних стадиях заболевания, когда еще есть возможность привести показатели к возрастной норме и достичь устойчивой ремиссии заболевания. Кроме того, некоторые из них весьма дороги и не покрываются обязательным медицинским страхованием. Несмотря на достижения современной науки до сих пор отсутствуют надежные инструменты оценки развития воспалительных процессов в суставах при ревматоидном артрите (РА) в зависимости от степени выраженности патологии и применяемой стратегии лечения. В статье анализируется возможность использования белка 14-3-3 η как перспективного маркера оценки активности иммуновоспалительного процесса в суставах. Показана более высокая информативность (по характеристикам точности, чувствительности, специфичности) исследуемого показателя по сравнению с традиционными показателями острого воспаления, такими как скорость оседания эритроцитов и С-реактивный белок.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, оценка активности воспаления, биомаркер, белок 14-3-3 η

DOI: 10.31857/S0869813923010090, **EDN:** IZJWJC

Ревматоидный артрит (РА) является наиболее распространенным аутоиммунным заболеванием человека, затрагивающим от 0.5 до 1% населения в мире, при котором основной мишенью воспалительного процесса являются периферические

суставы с развитием эрозивно-деструктивных изменений в них. В настоящее время определение активности РА остается важной клинической задачей и представляет собой трудоемкий и длительный процесс [1]. Ассоциация ревматологов России рекомендует оценивать активность РА с помощью индекса DAS28 (Disease Activity Score) [2]. Эксперты EULAR предлагают использовать один из трех суммарных индексов активности болезни – DAS28, SDAI (Simplified Disease Activity Index) или CDAI (Clinical Disease Activity Index) [3].

Для определения активности РА используется оценка ряда клинических и лабораторных параметров, включающих в себя число болезненных (ЧБС) и припухших суставов (ЧПС), некоторые острофазовые показатели, такие как скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и С-реактивный белок (СРБ), а также субъективные оценки пациента (общая оценка заболевания пациентом (ООЗП), визуальная аналоговая шкала (ВАШ)) и врача (общая оценка заболевания врачом (ООЗВ)) [4–6]. Поскольку по отдельности эти параметры в полной мере не отражают активность воспалительного процесса, экспертами OMERACT были использованы составные индексы на основе клинических показателей (CDAI) и лабораторных данных (DAS28), дающие более объективную оценку тому, насколько активно развивается комплексная воспалительная реакция организма в ответ на атаку иммунной системы на собственную костную и хрящевую ткань [7–9].

Однако используемые в настоящее время композитные индексы недостаточно надежны в оценке активности РА, т. к. имеют определенную долю субъективизма, что подтверждается в многих исследованиях. Так, подсчет числа припухших и болезненных суставов утомителен, требует много времени, плохо воспроизводится [10, 11], а также зависит от навыков и интерпретации врача-исследователя [12]. Традиционные острофазовые маркеры (СОЭ, СРБ) как лабораторные показатели активности РА являются неспецифичными и отражают в большей степени системные эффекты интерлейкина-6, а не собственно активность воспалительного процесса в суставе. Важно отметить, что СОЭ остается повышенной в течение некоторого времени после уменьшения воспаления на фоне терапии у пациентов с РА; также на этот показатель могут влиять анемия, уровень фибриногена в крови и возраст. Известно, что повышение СОЭ и СРБ характерно для многих воспалительных процессов, но эти показатели не повышаются более чем у трети пациентов с РА, в том числе с высокой активностью заболевания. Ввиду относительно низкой чувствительности и специфичности острофазовых маркеров в оценке активности РА, использование только этих показателей может дать ложную информацию об активности иммуновоспалительного процесса в суставах [13, 14]. У части пациентов с РА, которые находятся в ремиссии, согласно индексу DAS28, тем не менее, отмечается рентгенологическое прогрессирование заболевания, что в дальнейшем может привести к инвалидизации.

В 2011 г. ACR и EULAR совместно были разработаны новые критерии ремиссии РА для применения в клинических исследованиях. Согласно рекомендациям, ремиссией считается состояние, при котором ЧБС ≤ 1 , ЧПС ≤ 1 , уровень СРБ ≤ 1 мг/дл, ООЗП ≤ 10 мм по ВАШ или значение SDAI ≤ 3.3 [37]. Однако даже соблюдение более строгих критериев, таких как критерии ремиссии ACR/EULAR не гарантирует полный контроль над воспалением в суставах у пациентов с РА [15]. В статье Kamel с соавт. было показано, что субклиническая активность РА может быть лучше обнаружена с помощью УЗИ суставов, но никак не отражается на параметрах, входящих в композитные индексы активности, в том числе и DAS28 [16]. В статье Oderda с соавт. также приводятся данные о том, что традиционные способы оценки активности заболевания РА могут приводить к переоценке улучшения и недооценки прогрессирования активности болезни, так как они частично основаны на эмпирических и качественных данных. Результат оценки активности может осложнять-

ся сопутствующими заболеваниями и собственным восприятием пациентом болезни, что приводит к дальнейшей неопределенности [17]. В исследовании Vensen с соавт. было обнаружено, что восприятие пациентом активности своего заболевания (ООЗП, ВАШ) очень субъективно и значимо отличается от клинических показателей активности РА [18].

В последнее время были предприняты попытки разработать мультибиомаркерные тесты для оценки активности РА [19–25]. Однако клиническое использование отдельных биомаркеров ограничено, поскольку ни один маркер в полной мере не отражает активность заболевания или ответ на терапию РА [20, 26, 27].

Таким образом, информативность традиционных острофазовых маркеров активности заболевания недостаточна, а все комбинированные индексы трудоемки и имеют определенную долю субъективизма. Между тем, рутинная клиническая практика требует более точной, быстрой и легко воспроизводимой оценки активности РА, что делает актуальным поиск новых биомаркеров, отражающих в полной мере иммуновоспалительный процесс в суставах. В качестве перспективного маркера рассматривается белок 14-3-3η плазмы крови, который продуцируется клетками синовиальной оболочки при активном воспалении. Полученные данные проводимых ранее исследований относительно нового биомаркера позволяют предположить, что он может быть достаточно эффективен при оценке активности РА [28–30].

14-3-3η является одним из членов семейства регуляторных молекул – шаперонов. Многообещающие данные оценки его содержания позволили включить этот белок в исследование в качестве нового биомаркера активности РА, что и являлось предметом нашего исследования. Экспрессия изоформы “η” (eta) ограничена синовиальной тканью и тканями ЦНС. Таким образом, пораженный сустав является вероятным источником изоформы “η” белков 14-3-3 [31]. Внеклеточный белок 14-3-3η индуцирует провоспалительные каскады, такие как MAPK (mitogen-activated protein kinase) и NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) в моноцитарных клетках THP-1 *in vitro*, что сопоставимо с эффектами ФНО-α (фактор некроза опухоли α), и является подобным ему провоспалительными цитокином. Таким образом, данный биомаркер регулирует такие процессы, как клеточная сигнализация, активирует клеточные сигнальные пути и индуцирует факторы, потенцируя воспаление и повреждение тканей, что приводит к индукции провоспалительных молекул, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, а также ММП (матриксными металлопротеиназами) 1 и 9, которые, как известно, участвуют патогенезе РА [28, 31–33].

В настоящее время крупных и многоцентровых исследований по изучению связи белка 14-3-3η и кальпротектина с активностью РА недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод.

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения и информативности белка 14-3-3η плазмы крови в качестве дополнительного маркера оценки активности ревматоидного артрита.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 113 человек, 79 пациентов с диагнозом РА (основная группа) и 34 здоровых добровольца, которые составляли группу контроля. Критерием включения в исследование являлось соответствие симптоматики классификации Американской коллегии ревматологов/Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) от 2010 г. для пациентов с РА любой степени активности заболевания вне зависимости от выбранного режима терапии [34]. Критериями исключения во всех группах являлись: отказ пациента от участия в исследовании; наличие любой активной инфекции в период включения в исследование; наличие

онкологических заболеваний в период включения в исследование; наличие других аутоиммунных заболеваний, кроме вторичного синдрома Шегрена; наличие хронических неинфекционных заболеваний в стадии декомпенсации; беременность и период лактации. При поступлении всем пациентам была проведена клиническая оценка суставного синдрома: подсчет болезненных и припухших суставов, оценка активности своего заболевания пациентом и врачом по шкале ВАШ. Оценка активности РА рассчитывалась по клинико-лабораторному индексу DAS28-СОЭ и по клиническому индексу CDAI. Лабораторная оценка включала в себя определение СОЭ, СРБ, ревматоидного фактора (РФ) и антител к циклическим цитруллинированным пептидам (АЦЦП). Содержание белка 14-3-3η в плазме крови определялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке или плазме человека. Набор реагентов для проведения данного анализа был разработан сотрудниками Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН специально для нужд данного исследования с целью последующей разработки прототипа планшетной тест-системы и готового набора для применения в рамках клинической лабораторной диагностики. В состав набора входили антитела к исследуемому белку, наработанные в организме крыс и конъюгированные с биотином. Исследование ELISA проводилось в соответствии со стандартными протоколами на мультимодальном ридере CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

Статистическая обработка данных

Анализ полученных результатов проводился с помощью программного обеспечения Prism 8.0 (GraphPad Software) и Statistica 12.0. Проводилась оценка распределения на нормальность. При выявлении ненормального характера распределения результаты описывались в виде медианы [25-го; 75-го перцентилей]. Для сравнения количественных значений в нескольких группах использован метод Манна–Уитни; корреляционный анализ выполнен методом ранговой корреляции Спирмена. Для определения диагностической информативности в оценке активности РА с помощью новых биомаркеров проводился ROC-анализ: для него рассчитывались площадь под кривой, чувствительность, специфичность и диагностическая точность. Для определения различий биомаркеров в классификации групп с РА по степени активности применялись дискриминантный и линейный регрессионный анализы. Различия между группами считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 79 пациентов с диагнозом РА и 34 условно здоровых донора. Демографические характеристики групп значимо не различались.

Медиана длительности заболевания в группе пациентов с РА составила 10 [6; 15] лет. В группе пациентов с диагнозом РА у 68 человек (86%) выявлены повышенные титры АЦЦП и у 66 пациентов (83.5%) – РФ. Согласно индексу DAS28-СОЭ пациенты данной группы были распределены по степени активности РА: 5 человек – ремиссия, 4 – низкая степень активности заболевания, 29 – умеренная и 41 пациент – высокая. Согласно индексу CDAI пациенты группы РА по степени активности распределились следующим образом: 4 – ремиссия, 4 – низкая степень активности заболевания, 30 – умеренная и 41 пациент – высокая. Клиническая характеристика пациентов с РА и лабораторные данные обследованных групп представлены в табл. 1 и 2.

У больных РА содержание белка 14-3-3η в плазме крови, а также острофазовых показателей СОЭ и СРБ было значимо повышено по сравнению с группой контроля (рис. 1). Различия уровней биомаркера в обеих группах были высоко статистически значимы по данным теста Манна–Уитни ($p < 0.001$).

Таблица 1. Клинико-лабораторные и демографические данные пациентов РА и контрольной группы

Показатель	Значение
Средний возраст, годы, $M \pm SD$	58 \pm 11
Длительность заболевания, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	10 [6; 15]
Соотношение мужчины/женщины, n	11/68
ЧБС, Ме [25-й; 75-й перцентили]	10 [6; 18]
ЧПС, Ме [25-й; 75-й перцентили]	4 [2; 6]
ВАШ, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5.0 [4.0; 6.5]
Индекс DAS28, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5.10 [4,38; 6.11]
Активность по DAS28-COЭ, n (%):	
Ремиссия	5.0 (6.3)
Низкая	4.0 (5.0)
Умеренная	29.0 (36.8)
Высокая	41.0 (51.9)
Активность по CDAI, n :	
Ремиссия	4
Низкая	4
Умеренная	30
Высокая	41
Рентгенологическая стадия заболевания по Steinbrocker, n :	
I	2
II	33
III	25
IV	19

M – среднее значение; SD – стандартное отклонение; Ме – медиана.

Таблица 2. Сравнение серологических данных, а также содержания белка 14-3-3 η у пациентов исследуемых групп

Показатель	Группа контроля	Пациенты с РА	Достоверность различий в парных выборках (p)
СОЭ (мм/ч)	9.0 [5.5; 12.5]	29 [18; 51]	$p < 0.05$
СРБ (мг/л)	2 [1.2; 2.1]	7.9 [2.5; 17.5]	$p < 0.01$
РФ + (МЕ/мл), n	0	66 [83.5%]	$p < 0.001$
АЦЦП + (Ед/мл), n	0	68 [86%]	$p < 0.001$
14-3-3 η	4.02 [1.14; 15.33]	70.77 [61.78; 76.85]	$p < 0.0001$

Данные представлены в виде медианы и перцентилей (Ме [25-й; 75-й перцентили]).

Чтобы оценить клиническую значимость нового биомаркера, мы исследовали его связь с несколькими параметрами, отражающими активность РА.

Изучалась корреляционная связь между числом припухших/болезненных суставов и каждым из маркеров: 14-3-3 η , СОЭ и СРБ. Оценки коэффициента ранговой корреляции таковы: ЧПС и 14-3-3 η , $r = 0.323$, ЧБС и 14-3-3 η , $r = 0.40$ ($p < 0.001$); для других пар значимой корреляционной зависимости не прослеживается. Таким

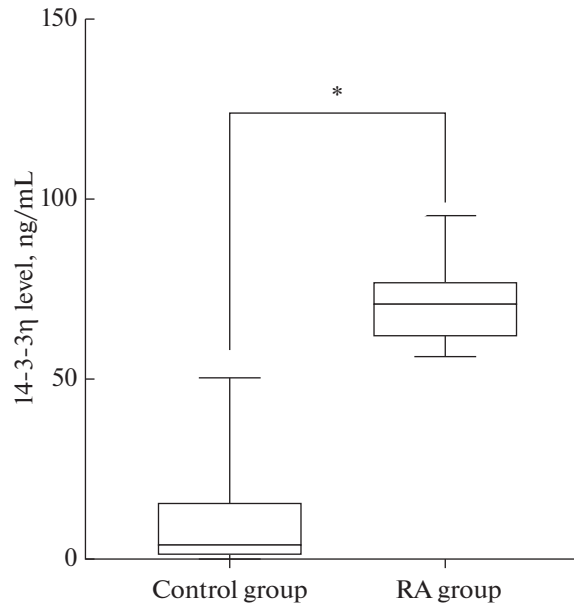


Рис. 1. Сравнение концентрации белка 14-3-3η в крови у пациентов с РА и контрольной группы. Данные представлены в виде Me [25-й; 75-й перцентили], * – обозначены статистически значимые различия содержания 14-3-3η в плазме крови КГ и РА ($p \leq 0.001$).

образом, имеется высоко статистически значимая корреляционная связь между указанными парами (рис. 2а, b).

Дополнительно изучена корреляционная связь между значением ВАШ и каждым из исследуемых маркеров. Оценки коэффициента ранговой корреляции таковы: ВАШ и 14-3-3η, $r = 0.323$ ($p < 0.05$); ВАШ и СОЭ, $r = 0.282$ ($p < 0.05$); для пары ВАШ и СРБ значимой корреляционной зависимости нет.

Оценка коэффициентов ранговой корреляции между клиническим индексом активности РА CDAI и каждой из переменных: СОЭ, 14-3-3η и СРБ показала следующие результаты: CDAI и 14-3-3η, $r = 0.472$ ($p < 0.001$), CDAI и СОЭ, $r = 0.236$ ($p < 0.05$); между парами CDAI и СРБ корреляция статистически не значима ($p > 0.05$). Таким образом, имеется положительная корреляционная связь между указанными парами, которая высоко статистически значима для нового биомаркера (рис. 2b).

Изучалась корреляционная связь между индексом активности РА DAS28-СОЭ и каждым из исследуемых маркеров, отражающих степень выраженности воспалительного процесса. Была показана высокая взаимосвязь между указанными парами (рис. 2). Коэффициенты ранговой корреляции по Спирмену для всех переменных представлены в табл. 3.

В целом, выявлена высоко статистически значимая корреляция содержания белка 14-3-3η в плазме крови со всеми параметрами активности РА по сравнению с традиционными острофазовыми маркерами СОЭ и СРБ, для которых корреляция с суставным синдромом и индексом CDAI была более слабой, либо статистически не значимой. При сравнении нового биомаркера с острофазовыми показателями необходимо ориентироваться не на индекс DAS28, составным компонентом которого является один из маркеров – СОЭ, а на показатели суставного синдрома (ЧПС, ЧБС), а также клинический индекс CDAI.

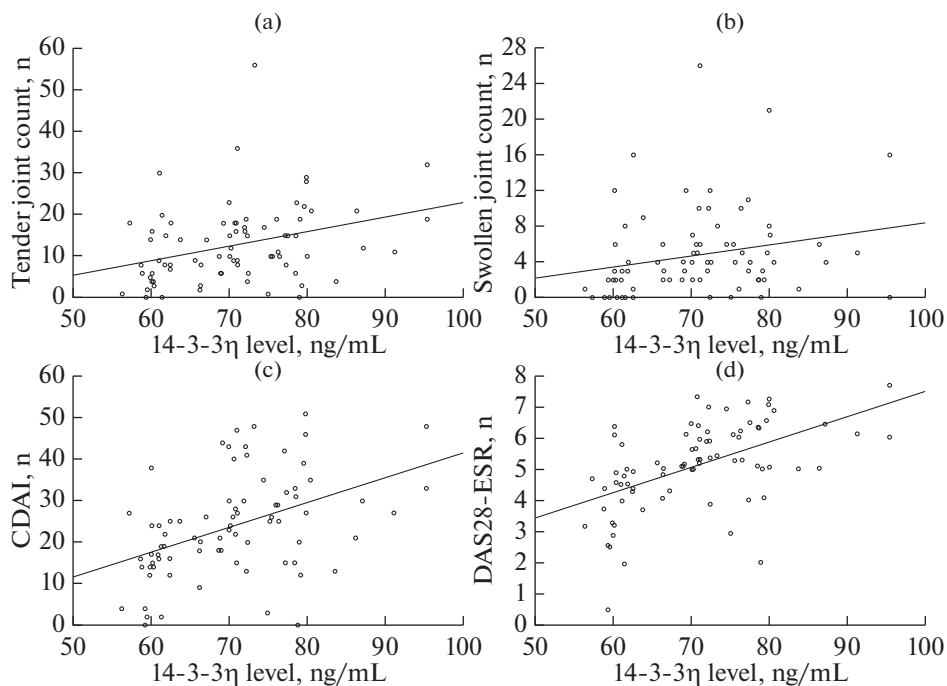


Рис. 2. (a) – Корреляционная связь уровня белка 14-3-3η с числом болезненных суставов; (b) – корреляционная связь уровня белка 14-3-3η с числом припухших суставов, (c) – корреляционная связь уровня белка 14-3-3η с индексом активности РА CDAI; (d) – корреляционная связь уровня белка 14-3-3η с индексом активности РА DAS28-СОЭ.

Изучалась линейная регрессионная связь между клиническим индексом активности РА CDAI и белком 14-3-3η, а также острофазовыми маркерами СОЭ и СРБ. В каждой из регрессий переменные были значимыми, выборка остатков извлечена из генеральной совокупности и не имела грубых ошибок (выбросов) (применялся критерий Граббса). Изучались значения коэффициентов детерминации R^2 и нормированного (скорректированного) коэффициентов детерминации R^2_{adj} . При сравнении изучаемых регрессий наиболее точным маркером представлен белок 14-3-3η ($R^2 = 0.2$; $R^2_{adj} = 0.2$). Однако значение коэффициента детерминации

Таблица 3. Матрица коэффициентов ранговой корреляции Спирмена для уровня белка 14-3-3η, показателей острой фазы, индексов DAS28-СОЭ и CDAI у пациентов с РА

	СОЭ	СРБ	ЧБС	ЧПС	ВАШ	CDAI	DAS28
14-3-3η	0.35*	0.15	0.40*	0.32*	0.33*	0.47*	0.57*
СОЭ		0.65*	0.14	0.12	0.28*	0.24*	0.60*
СРБ			0.08	0.11	0.19	0.16	0.44*
ЧБС				0.56*	0.41*	0.84*	0.70*
ЧПС					0.32*	0.72*	0.64*
ВАШ						0.58*	0.60*
CDAI							0.88*

* Значения достоверны при $p < 0.05$.

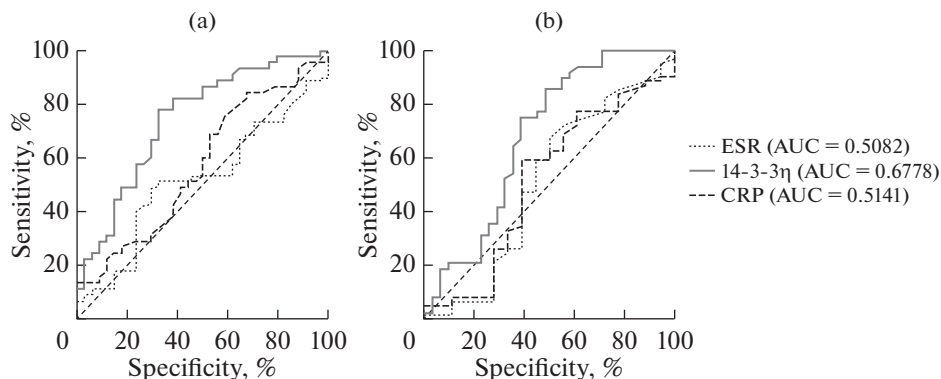


Рис. 3. (а) – ROC – кривые взаимосвязи маркеров активности РА с числом болезненных суставов; (б) – ROC – кривые взаимосвязи маркеров активности РА с числом припухших суставов. ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) – скорость оседания эритроцитов; CRP (C-reactive protein) – С-реактивный белок.

невысоко. Таким образом, по результатам обработки данных статистически значимым в оценке активности РА по индексу CDAI оказался один маркер: белок 14-3-3η ($p < 0.05$). Значения для СОЭ и СРБ не были статистически значимыми ($p > 0.05$), а значит данные показатели не влияли на индекс CDAI.

Проверка биологической вариабельности нового биомаркера активности РА, а именно анализ влияния возраста и пола на уровень белка 14-3-3η во всех группах пациентов производился с помощью линейного регрессионного анализа. По результатам анализа статистически значимого влияния пола и возраста на уровень биомаркера обнаружено не было.

Определение содержания нового биомаркера в сравнении с традиционными острофазовыми показателями в группе РА с разной степенью активности заболевания, а также суставным синдромом позволило провести ROC-анализ, задачами которого были сопоставление диагностической точности, чувствительности и специфичности тестов между собой, определение оптимальных пороговых уровней для разных клинических задач [35]. Графики ROC-кривых приведены на рис. 3–5.

Большей чувствительностью и специфичностью, а также диагностической точностью в оценке числа болезненных суставов обладает белок 14-3-3η (ACC = 71.99), что нельзя сказать про СОЭ (ACC = 58.37) и СРБ (ACC = 59.74), где показатели низкие. При оценке величины площади под кривой обращает на себя внимание то, что только в двух случаях прослеживается хорошая взаимосвязь биомаркера с ЧБС (AUC > 0.7). Максимальная величина площади под кривой у белка 14-3-3η (AUC = 0.74, $p < 0.001$), а показатели для острофазовых маркеров СОЭ (AUC = 0.57, $p = 0.29$) и СРБ (AUC = 0.52, $p = 0.81$) сопоставимы, но их значения статистически не значимы (рис. 3а).

Белок 14-3-3η крови с более высокой диагностической точностью, чувствительностью и специфичностью отражает взаимосвязь с ЧПС (ACC = 68.56) в сравнении с СОЭ и СРБ (ACC = 58.6; ACC = 60.06). Максимальная площадь под кривой была у белка 14-3-3η (AUC = 0.68, $p < 0.01$), показатели для острофазовых маркеров СОЭ (AUC = 0.51, $p = 0.92$) и СРБ (AUC = 0.51, $p = 0.86$) сопоставимы, но их значения описывают слабую взаимосвязь и статистически не значимы (рис. 3б).

При определении взаимосвязи между маркерами и ВАШ различий между показателями для 14-3-3η (AUC = 0.68, $p = 0.06$), СОЭ (AUC = 0.64, $p = 0.14$) и

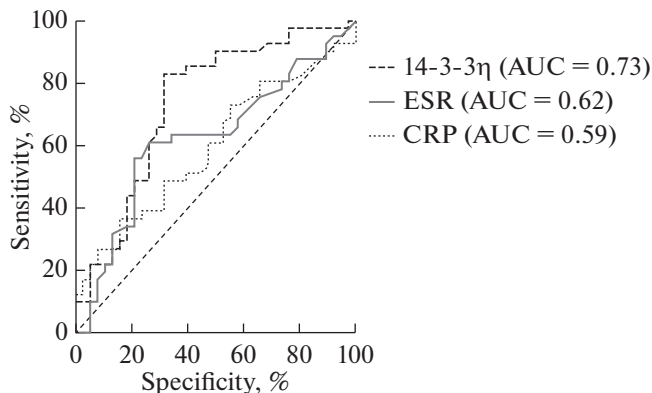


Рис. 4. ROC – кривые для всех маркеров в зависимости от степени активности РА согласно индексу CDAI (>22).

СРБ (AUC = 0.56, $p = 0.57$) не было, но полученные значения оказались статистически не значимыми ($p > 0.05$).

Проведен ROC-анализ для оценки взаимосвязи всех маркеров со степенью активности РА, определенной по клиническому индексу CDAI. Учитывая преобладание пациентов с умеренной и высокой степенями активности заболевания, мы объединили ремиссию, низкую активность и умеренную в одну группу (CDAI < 22) против пациентов с высокой активностью (CDAI > 22). По результатам анализа выявлено, что уровни белка 14-3-3η имеют более высокие значения диагностической точности, чувствительности и специфичности (ACC = 79.10) в сравнении с СОЭ (ACC = 65.82) и СРБ (ACC = 61.32). При оценке площади под кривой только прослеживается хорошая взаимосвязь нового биомаркера с высокой степенью активности РА (AUC > 0.7). Максимальная площадь под кривой была у белка 14-3-3η (AUC = 0.73, $p < 0.001$), где показатели высоко статистически значимы; минимальные значения были у СОЭ (AUC = 0.62, $p = 0.06$) и СРБ (AUC = 0.59, $p = 0.15$), где показатели оказались статистически не значимыми (рис. 4).

Таким образом, по данным ROC-анализа чувствительность, специфичность, а также диагностическая точность для белка 14-3-3η выше в оценке суставного синдрома, а также активности РА по клиническому индексу CDAI, чем для традиционных острофазовых маркеров. Значения, полученные по данным ROC-анализа для СОЭ и СРБ, статистически недостоверны, и имеют маленькую площадь под кривой.

При проведении линейного дискриминантного анализа из всех показателей содержание только двух показателей: белка 14-3-3η и СОЭ образуют информативное сочетание, но вероятность правильной классификации активности РА согласно индексу DAS28-СОЭ получается только для их логарифмов и составила 67.08%. Согласно индексу CDAI самым информативным вариантом оказалось содержание только одного маркера – белка 14-3-3η, для которого вероятность правильной классификации активности заболевания составила 72%. Важно отметить, что стандартный маркер неспецифического воспаления – СРБ не давал возможности произвести оценку активности РА согласно исследуемым индексам.

Таким образом, при многомерном статистическом анализе данных относительно содержания нового биомаркера активности РА доказана его большая информативность по сравнению с традиционно применяемым показателям острой фазы воспаления.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, среди провоспалительных цитокинов, участвующих в развитии иммуновоспалительного процесса при РА, значительную роль играет белок 14-3-3η. Локальная продукция данного белка оказывает значимое влияние на миграцию клеток (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов) в очаг воспаления и течение патологического процесса [28–33]. При изучении локальной и системной продукции белка 14-3-3η было установлено, что у больных РА не только повышено его содержание в сыворотке и плазме крови, а также в синовиальной жидкости, но и отмечается высоко статистически значимая корреляция с интенсивностью локального воспалительного процесса, клиническими параметрами активности РА [28, 30].

Так, в исследовании Maksymowych и соавт. полученные данные свидетельствуют о том, что как при раннем РА, так и при поздней стадии заболевания уровень белка 14-3-3η не коррелировал достоверно с баллами по индексу DAS28 и уровнями СРБ. Однако имела место умеренная корреляция с РФ ($r = 0.43, p < 0.01$) и АЦЦП ($r = 0.31, p < 0.05$) в когорте с ранним РА. В этой же статье также сообщалось о положительной связи между белком 14-3-3η и ММП, что подтверждает роль данного биомаркера в патогенезе РА. Таким образом, предполагается, что белок 14-3-3η играет роль в сохранении воспаления за счет индукции таких цитокинов, как ИЛ-6 и за счет усиления разрушения суставов ввиду активации ММП и RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) [30].

В статье Kilbom и соавт. есть данные о том, что высокий уровень 14-3-3η (>0.19 нг/мл) с чувствительностью 63.3% и специфичностью 92.6% позволял выявить пациентов с РА. Более высокие уровни белка 14-3-3η выявлялись при раннем РА ($p < 0.05$), где пациенты еще не получали лечение, в то время как на более поздних стадиях РА, где пациенты получали достаточно эффективную терапию, не наблюдалось большой разницы по сравнению с контрольной группой. Это может указывать на связь данного биомаркера с активностью заболевания [28].

Имеются данные, что белок 14-3-3η не был связан с острофазовыми показателями такими, как СОЭ и СРБ. В исследованиях также указывается, что исходный уровень белка 14-3-3η был связан с более высокими значениями DAS 28 (6.3 против 5.7, $p = 0.026$). Также сообщалось о значимых ассоциациях биомаркера с исходным уровнем DAS28-СОЭ, CDAI и SDAI ($p < 0.045, p < 0.001$); пациенты, достигшие ремиссии, определенной по индексу DAS28-СОЭ, имели более низкую концентрацию белка 14-3-3η, чем пациенты, имеющие высокую активность заболевания [28, 31]. Хорошая взаимосвязь биомаркера с композитным индексом DAS28, а также отсутствие его корреляции с острофазовыми показателями активности РА, свидетельствует о том, что в данный индекс входит клиническая оценка суставного синдрома (ЧПС, ЧБС), с чем, видимо, достаточно хорошо связан белок 14-3-3η. Это подтверждает связь белка 14-3-3η с локальным воспалением у пациентов с РА.

В рекомендациях OMERACT (Outcome Measures in Rheumatology) белок 14-3-3η рассматривался в качестве прогностического биомаркера, отражающего повреждение суставов. Авторами исследования обнаружено, что уровень белка 14-3-3η в сыворотке крови не коррелировал с активностью заболевания согласно индексу DAS28 и с титрами СРБ. Эти результаты показали, что биомаркер может быть связан с прогнозом заболевания независимо от показателей активности [35]. На основе этих результатов в настоящее время проводится проспективное исследование, целью которого является изучение белка 14-3-3η как независимого предиктора состояния и прогрессирования радиографического повреждения суставов при РА [30, 35]. Использование индекса DAS28 при оценке связи новых биомаркеров с ак-

тивностью РА может также приводить к ложным результатам, так как в состав данного индекса входят один из острофазовых показателей (СОЭ/СРБ) и ВАШ.

В нашем исследовании оценивалась диагностическая точность, чувствительность, специфичность, а также клиническая информативность белка 14-3-3η в оценке активности заболевания у пациентов с РА. В целом мы обнаружили лучшую взаимосвязь между всеми параметрами активности РА и содержанием нового биомаркера в плазме крови. Согласно проводимым клинико – лабораторным сопоставлениям полученных данных и математической обработке результатов, уровень белка 14-3-3η демонстрировал лучшую связь с суставным синдромом, а также имел лучшую площадь под кривой, диагностическую точность, чувствительность и специфичность у пациентов с умеренной и высокой степенью активности РА согласно индексу CDAI. Наши данные сопоставимы с некоторыми результатами, предоставленными зарубежными авторами [28, 30, 31]. Так, в зарубежных статьях было показано, что содержание данного белка существенно повышено у пациентов с РА по сравнению с группой условно здоровых доноров и пациентов с другими заболеваниями, а также данный параметр динамически отражает улучшения при применении эффективной стратегии лечения, что в перспективе позволит ускорить процесс подбора комплексной терапии. Литературные данные также свидетельствуют о том, что 14-3-3η является одним из основных претендентов на включение в перечень диагностических маркеров оценки состояния пациентов с РА.

Таким образом, данные нашего исследования соотносятся с результатами исследований большинства зарубежных авторов и позволяют считать белок 14-3-3η высокоинформативным и рекомендовать проведение исследований на его содержание в плазме крови при комплексной оценке и мониторинге состояния воспалительного процесса у пациентов с РА.

Проведенное исследование продемонстрировало статистически значимое повышение содержания белка 14-3-3η у больных РА в сравнении со здоровыми добровольцами. Анализ взаимосвязи содержания нового биомаркера в плазме крови с параметрами активности РА показал, что наиболее тесная взаимосвязь маркера прослеживается с суставным синдромом, а также с композитным индексом DAS28-СОЭ, ввиду чего возникла необходимость использовать для дальнейшего анализа клинический индекс CDAI. На основании ранговой корреляции Спирмена была выявлена высоко статистически значимая связь содержания белка 14-3-3η со всеми параметрами активности РА в сравнении с традиционными острофазовыми показателями СОЭ и СРБ. По данным линейного регрессионного анализа высоко значимыми в оценке активности РА, согласно индексу CDAI, был уровень белка 14-3-3η. Значения для СОЭ и СРБ были статистически не значимыми ($p > 0.05$), а значит эти показатели при выполнении данного статистического анализа не влияли на индекс CDAI. По данным ROC-анализа показатели чувствительности, специфичности, а также диагностической точности уровня нового биомаркера значительно выше в оценке суставного синдрома и активности РА по клиническому индексу CDAI, чем для традиционных острофазовых маркеров. Значения, полученные по данным ROC-анализа для СОЭ и СРБ, статистически не достоверны, и имеют маленькую площадь под кривой. При проведении линейного дискриминантного анализа наиболее информативным оказалось сочетание десятичных логарифмов содержания белка 14-3-3η и показателями СОЭ, для которых вероятность правильной классификации активности РА согласно индексу DAS28-СОЭ составила 68.08%. Для определения активности РА согласно индексу CDAI самым информативным вариантом оказалось содержание только одного маркера – белка 14-3-3 η, для которого вероятность правильной классификации активности заболевания составила 72%.

Показано, что белок 14-3-3η плазмы крови – новый перспективный лабораторный биомаркер в оценке активности воспалительного процесса при РА, так как яв-

ляется потенциально более информативным, чувствительным и специфичным маркером активности заболевания, чем традиционные острофазовые показатели СОЭ и СРБ. Данный биомаркер можно рассматривать как провоспалительный цитокин. Ввиду этого в дальнейшей перспективе возможно создание более информативного лабораторного индекса активности РА на основе нового биомаркера.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть лабораторных исследований выполнена в соответствии с Госзаданием ААА-А18-118012290427-7. Молекулярно-биологические эксперименты проводились на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

СБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Протокол исследования получил одобрение независимого этического комитета Национального исследовательского медицинского центра им. В.А. Алмазова Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией представленной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (А.А.К., А.Л.М., Д.И.К., Д.С.В., М.Ф.Б., Т.В.В.), обследование пациентов исследуемых групп (А.А.К.), сбор биологического материала пациентов, включенных в исследование (А.А.К.), определение содержания 14-3-3η в плазме крови пациентов исследуемых групп (Д.И.К., В.В.Х., А.В.Р., М.Е.Ш., К.А.Ю.), обработка данных (А.А.К., А.Л.М., Д.И.К., Д.С.В., В.В.Х.), написание и редактирование манускрипта (А.А.К., А.Л.М., Д.И.К., В.В.Х.).

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, Combe B, Cutolo M, de Wit M, Dougados M, Emery P, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Haraoui B, Kalden J, Keystone EC, Kvien TK, McInnes I, Martin-Mola E, Montecucco C, Schoels M, van der Heijde D (2010) Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheumat Disease* 69(4): 631–637. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.123919>
2. Karateev DE, Olunin YA (2008) About classification of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Sci Pract* 5. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2008-848>
3. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, Nam J, Ramiro S, Voshaar M, van Vollenhoven R, Aletaha D, Aringer M, Boers M, Buckley CD, Buttgerit F, Bykerk V, Cardiel M, Combe B, Cutolo M, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gabay C, Gomez-Reino J, Gossec L, Gottenberg J, Hazes JMW, Huizinga T, Jani M, Karateev D, Kouloumas M, Kvien T, Li Z, Mariette X, McInnes I, Mysler E, Nash P, Pavelka K, Poór G, Richez C, van Riel P, Rubbert-Roth A, Saag K, da Silva J, Stamm T, Takeuchi T, Westhovens R, de Wit M, van der Heijde D (2017) Eular recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and

- biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheumat Disease* 76: 960–977.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210715>
4. *Fransen J, Stucki G, van Riel P* (2003) Rheumatoid arthritis measures: Disease activity score (DAS), disease activity score-28 (DAS28), rapid assessment of disease activity in rheumatology (radar), and rheumatoid arthritis disease activity index (Radai). *Arthrit & Rheumat* 49(S5): S214–S224.
<https://doi.org/10.1002/art.11407>
 5. *Prevoo MLL, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LBA, van Riel PLCM* (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthrit & Rheumat* 38(1): 44–48.
<https://doi.org/10.1002/art.1780380107>
 6. *van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB* (1990) Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheumat Disease* 49(11): 916–920.
<https://doi.org/10.1136/ard.49.11.916>
 7. *Inoue E, Yamanaka H, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N* (2007) Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values. *Ann Rheumat Disease* 66(3): 407–409.
<https://doi.org/10.1136/ard.2006.054205>
 8. *Boers M, Tugwell P* (1993) OMERACT conference questionnaire results. OMERACT Committee. *J Rheumat* 20(3): 552–554.
 9. *Boers M, Riel PLCM, Felson DT, Tugwell P* (1995) Assessing the activity of rheumatoid arthritis. *Baillière's Clin Rheumat* 9: 305–317.
[https://doi.org/10.1016/s0950-3579\(05\)80192-x](https://doi.org/10.1016/s0950-3579(05)80192-x)
 10. *Bombardier CPACGW, Tugwell P, Sinclair A, Dok C, Anderson G, Buchanan W* (1982) Preference for endpoint measures in clinical trials: results of structured workshops. *J Rheumat* 9(5): 798–801.
 11. *Pincus T* (2008) Limitations of a quantitative swollen and tender joint count to assess and monitor patients with rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hospital Jt Disease* 66(3).
 12. *Marhadour T, Jousse-Joulin S, Chalès G., Grange L, Hacquard C, Loeuille D, Sellam J, Albert JD, Bentin J, Chary Valckenaere I, D'agostino MA, Etchepare F, Gaudin P, Hudry C, Dougados M, Saraux A* (2010) Reproducibility of Joint Swelling Assessments in Long-lasting Rheumatoid Arthritis: Influence on Disease Activity Score-28 Values (SEA-Repro Study Part I). *J Rheumat* 37(5): 932–937.
<https://doi.org/10.3899/jrheum.090879>
 13. *Wells G, Li T, Maxwell L, Maclean R, Tugwell P* (2008) Responsiveness of patient reported outcomes including fatigue, sleep quality, activity limitation, and quality of life following treatment with abatacept for rheumatoid arthritis. *Ann Rheumat Disease* 67(2): 260–265.
<https://doi.org/10.1136/ard.2007.069690>
 14. *Svedberg CA* (1967) Normal erythrocyte sedimentation rate and age. *Br Med J* 2(5544): 85.
 15. *Ramírez J, Narváez JA, Ruiz-Esquide V, Hernández-Gañán J, Cuervo A, Inciarte-Mundo J, Hernández MV, Sampayo-Cordero M, Pablos JL, Sanmartí R, Cañete JD* (2017) Clinical and sonographic biomarkers of structural damage progression in RA patients in clinical remission: A prospective study with 12 months follow-up. *Seminars Arthrit & Rheumat* 47(3): 303–309.
<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.04.007>
 16. *Kamel SR, Sadek HA, Mohamed FA, Osman HM* (2018) Role of ultrasound disease activity score in assessing inflammatory disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Egypt Rheumat* 40(1): 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ejr.2017.04.002>
 17. *Oderda GM, Lawless GD, Wright GC, Nussbaum SR, Elder R, Kim K, Brixner DI* (2018) The potential impact of monitoring disease activity biomarkers on rheumatoid arthritis outcomes and costs. *Personal Med* 15(4): 291–301.
<https://doi.org/10.2217/pme-2018-0001>
 18. *Bensen WG, Jovaisas A, Thorne C, Baer P, Khraishi M, Dixit S, Choquette D, Starr M, Fortin I, Sholter D, Rampakakis E, Sampalis JS, Lehman AJ, Nantel F, Shawi M, Otawa S* (2013) SAT0035 Variability in the Classification of Remission among Disease Activity Indices and Their Correlation: An Analysis From a Prospective, Observational Registry. *Ann Rheumat Disease* 72(Suppl 3): A591–A592.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-eular.1761>
 19. *Syversen SW, Haavardsholm EA, Boyesen P, Goll GL, Okkenhaug C, Gaarder P I, van der Heijde D, Kvien TK* (2010) Biomarkers in early rheumatoid arthritis: longitudinal associations with inflammation and joint destruction measured by magnetic resonance imaging and conventional

- radiographs. *Ann Rheumat Disease* 69(5): 845–850.
<https://doi.org/10.1136/ard.2009.122325>
20. *Chandra PE, Sokolove J, Hipp BG, Lindstrom TM, Elder JT, Reveille JD, Eberl H, Klause U, Robinson WH* (2011) Novel multiplex technology for diagnostic characterization of rheumatoid arthritis. *Arthrit Res & Therap* 13(3): R102.
<https://doi.org/10.1186/ar3383>
 21. *Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayr B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Soullillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler R* (2010) Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120(6): 1848–1861.
<https://doi.org/10.1172/JCI39922>
 22. *Wener MH* (2011) Multiplex, megaplex, index, and complex: the present and future of laboratory diagnostics in rheumatology. *Arthrit Res & Therapy* 13(6): 134.
<https://doi.org/10.1186/ar3498>
 23. *Novikov A, Aleksandrova E, Gerasimov A, Cherkasova M, Karateev D, Luchikhina E, Nasonov E* (2013) Multiparameter analysis of biomarkers in the laboratory diagnosis of early rheumatoid arthritis. *Rheumat Sci and Practic* 51(2): 111–116.
<https://doi.org/10.14412/1995-4484-2013-636>
 24. *Novikov A, Aleksandrova E, Nasonov E* (2014) Elaboration and application of the diagnostic index based on multivariate analysis of biomarkers to determine the activity of rheumatoid arthritis. *Rheumat Sci and Pract* 52(1): 72–78.
<https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-72-78>
 25. *Maslaynski A, Lapin S, Mazing A, Bulgakova T, Lazareva N, Cheshuina M, Oleinick P, Ilivanova E, Totolyan A, Mazurov V* (2012) Diagnostic value of serological markers of rheumatoid arthritis. *Rheumat Sci and Pract* 50(5): 20–24.
<https://doi.org/10.14412/1995-4484-2012-1175>
 26. *Hueber W, Tomooka BH, Zhao X, Kidd BA, Drijfhout JW, Fries JF, van Venrooij WJ, Metzger AL, Genovese MC, Robinson WH* (2007) Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines. *Ann Rheumat Disease* 66(6): 712–719.
<https://doi.org/10.1136/ard.2006.054924>
 27. *van der Pouw Kraan TCTM, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJM, Kraan MC, Fero M, Tak PP, Huijzinga TWJ, Pieterman E, Breedveld FC, Alizadeh AA, Verweij CL* (2003) Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: Evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues. *Arthrit & Rheumat* 48(8): 2132–2145.
<https://doi.org/10.1002/art.11096>
 28. *Kilborn S, Bukhari M* (2018) AB0302 The role of the biomarker 14-3-3 eta in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumat Arthrit – Prognosis, Predictors and Outcome* 1329.1–1329.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.6614>
 29. *Lee DG, Woo JW, Kwok SK, Cho ML, Park SH* (2013) MRP8 promotes Th17 differentiation via upregulation of IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med* 45(4): e20–e20.
<https://doi.org/10.1038/emm.2013.39>
 30. *Bach M, Moon J, Moore R, Pan T, Nelson J, Lood C* (2020) Neutrophil Activation Biomarker Panel in Prognosis and Monitoring of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthrit & Rheumat* 72(1): 47–56.
<https://doi.org/10.1002/art.41062>
 31. *Maksymowych WP, van der Heijde D, Allaart CF, Landewé R, Boire G, Tak PP, Gui Y, Ghahary A, Kilani R, Marotta A* (2014) 14-3-3η is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage. *Arthrit Res & Therap* 16(2): R99.
<https://doi.org/10.1186/ar4547>
 32. *Zhukov OS, Abolhosn RW, Popov JM, Naides SJ* (2013) FRI0054 Elevated 14-3-3 eta in rheumatoid arthritis and arthritogenic viral infections. *Ann Rheumat Disease* 72(Suppl 3): A386.2–A386.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-eular.1181>
 33. *Kadavath S, Chittalae S, Nidal Shuaib O, Soon Goh K, Tosic M, Giles J, Efthimiou P* (2014) SAT0211 14-3-3 ETA Protein: A Novel Biomarker for the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis: *Ann Rheumat Disease* 73(Suppl 2): 666.1–666.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.5776>
 34. *Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, Howell D, Kaplan D, Koopman W, Longley S, Mankin H, McShane DJ, Medsger T, Meenan R, Mikkelsen W, Murphy W, Rothschild B, Segal M, Sokoloff L, Wolfe F* (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteo-

- arthritis of the knee. *Arthrit & Rheumat* 29(8): 1039–1049.
<https://doi.org/10.1002/art.1780290816>
35. Metz CE (1978) Basic principles of ROC analysis. *Sem Nuc Med* 8: 283–298.
[https://doi.org/10.1016/s0001-2998\(78\)80014-2](https://doi.org/10.1016/s0001-2998(78)80014-2)
36. Maksymowych W, Landewé R, Tak P, Ritchlin C, Ostergaard M, Mease P, El-Gabalawy H, Garnero P, Gladman D, Fitzgerald O, Aletaha D, Bykerk V, Bathon J, Syversen S, Boers M, Geusens P, Inman R, Kraus V, Kvien T, Taylor W, Wells G, Van der Heijde D (2009) Reappraisal of OMERACT 8 draft validation criteria for a soluble biomarker reflecting structural damage endpoints in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and spondyloarthritis: the OMERACT 9 v2 criteria. *J Rheumat* 36 (8): 1785–1791.
<https://doi.org/10.3899/jrheum.090346>
37. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LHD, Funovits J, Aletaha D, Allaart CF, Bathon J, Bombardieri S, Brooks P, Brown A, Matucci-Cerinic M, Choi H, Combe B, de Wit M, Dougados M, Emery P, Furst D, Hawker G, Keystone E, Khanna D, Kirwan J, Kvien TK, Landewé R, Listing J, Michaud K, Martin-Mola E, Montie P, Pincus T, Richards P, Siegel JN, Simon LS, Sokka T, Strand V, Tugwell P, Tyndall A, van der Heijde D, Verstappen S, White B, Wolfe F, Zink A, Boers M (2011) American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthrit & Rheumat* 63(3): 573–586.
<https://doi.org/10.1002/art.30129>

14-3-3 η Cytokine as a New Rheumatoid Arthritis Activity Assessing Biomarker

A. A. Korolkova^a, V. V. Khizha^b, D. I. Kozlova^{b, *}, D. S. Vasiliev^b, A. L. Maslyansky^c,
 T. V. Vavilova^c, M. F. Ballyzek^d, A. V. Rybakov^{b, e}, M. E. Shevaldina^e, and K. A. Yurieva^f

^a Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Komi Republic, Syktyvkar, Russia

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

^c Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

^d St. Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^e Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

^f St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: di.kozlova.official@gmail.com

Currently, rheumatoid arthritis routine diagnosis includes joint syndrome indicator determination such as tender and swollen joints count, as well as a number of laboratory indicators. The most interesting are the second ones, which include rheumatoid factor, antibodies to cyclic citrullinated peptide and a some acute-phase indicators, but they have low sensitivity and specificity, especially in the disease early stages, when it is still possible to normalize bring the age-norm indicators and get stable disease remission. Additionally, some of these medical tests are expensive enough and compulsory health insurance not-included. But, most importantly, there are no reliable rheumatologist modern practice disease activity assessing tools depending on the current-used treatment strategy. The article evaluates 14-3-3 η protein usage possibility as a promising biomarker for rheumatoid arthritis immuno-inflammatory process activity in joints assessment. It was shown a higher studied indicator informative value (in terms of accuracy, sensitivity, specificity) in comparison with traditional acute-phase indicators, such as the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein.

Keywords: rheumatoid arthritis, activity, biomarker, 14-3-3 η protein

**РЕАКТИВНОСТЬ БРЫЖЕЕЧНЫХ АРТЕРИЙ
ПРИ РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У КРЫС,
ПОЛУЧАВШИХ ДИЕТУ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИРОВ**

© 2023 г. Г. Т. Иванова*

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

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

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 29.11.2022 г.

Потребление избыточного количества жиров может приводить к развитию метаболического синдрома (МС). Однако вопрос о механизмах патофизиологических процессов МС изучен недостаточно. Целью работы было изучить влияние высокожировой диеты (HFD) на реактивность брыжеечных артерий крыс Wistar в условиях *in vivo*, а также оценить изменение механизмов эндотелийзависимой дилатации артерий при HFD. HFD-группа крыс ($n = 25$) получала в течение 10 недель HFD, содержащий 50% животного жира, контрольная ($n = 25$) – стандартный пищевой рацион. Оценивали влияние HFD на эндотелийзависимые и не связанные с эндотелием реакции брыжеечных артерий при действии агонистов в отсутствие и при применении блокаторов NO-синтазы (L-NAME), циклооксигеназы (индометацин) и K^+ -каналов (тетраэтиламмоний), используя микрофото- и видеорегистрацию диаметра брыжеечных артерий *in vivo*. Показано, что HFD у крыс приводила к развитию МС, в том числе к дислипидемии, гипергликемии и инсулинорезистентности, росту артериального давления. МС сопровождался нарушением функционального состояния брыжеечных артерий. У крыс HFD-группы, по сравнению с контрольной группой, наблюдалось усиление констрикторной реакции на фенилэфрин на 29%, а также снижение реактивности предварительно сокращенных фенилэфрином сосудов при действии ацетилхолина на 36%. Предварительная инкубация сосудов с блокаторами снижала амплитуду релаксации при действии ацетилхолина, по сравнению с исходной ацетилхолин-индуцированной вазорелаксацией, у крыс HFD-группы: с L-NAME – на 47%, L-NAME и индометацином – на 50%, L-NAME, индометацином и тетраэтиламмонием – на 65%; у контрольной группы – на 69, 72 и 83% соответственно. HFD не оказывала существенного влияния на амплитуду вазодилатации при действии нитропруссид натрия. Таким образом, эндотелиальная дисфункция у крыс, получавших HFD, была опосредована как нарушением NO-зависимых механизмов вазодилатации, в частности уменьшением продукции NO эндотелием, так и снижением эффективности VK_{Ca} . Уменьшение биодоступности NO при HFD частично компенсировалось активацией механизмов эндотелиальной гиперполяризации (опосредованной активностью IK_{Ca} и SK_{Ca}) в ацетилхолин-индуцированной вазодилатации.

Ключевые слова: метаболический синдром, высокожировая диета, брыжеечная артерия, эндотелий, ацетилхолин-индуцированная дилатация, вазоконстрикция, фенилэфрин, нитропруссид, Wistar

DOI: 10.31857/S0869813923010089, EDN: IYTKZR

В настоящее время ожирение, приводящее к развитию метаболического синдрома (МС), приобрело характер эпидемии [1]. Во многом это связано с изменением профиля питания, в частности с увеличением доли продуктов, содержащих избыточное количество жиров [2]. Несмотря на активные исследования в последнее десятилетие, вопрос о механизмах патофизиологических процессов при развитии МС остается неясным, а поиск путей предупреждения или уменьшения патологических нарушений функций органов и тканей при МС является актуальной задачей современной физиологии и медицины.

Решить эту проблему помогает экспериментальное моделирование МС на лабораторных животных, для этого применяют диеты различного состава [3]. Для создания МС выбирают, как правило, сочетание высокожировой (HFD) и высокоуглеводной диеты [4], а HFD при стандартном содержании углеводов в диете у животных с исходно нормальным состоянием обмена веществ используется значительно реже.

Понятие МС включает в себя сложный комплекс процессов, основными из которых считаются развитие дислипидемии, инсулинорезистентности, артериальной гипертензии, эндотелиальной дисфункции, однако о конкретных механизмах таких нарушений пока нет единого мнения [1, 5].

Развитие эндотелиальной дисфункции является одним из факторов риска при высоком потреблении жиров в диете [6–8]. Клинические исследования у людей методом внутривенной плетизмографии на плече показали, что потребление избыточного количества жиров сопровождается уменьшением дилататорной реакции кровотока на введение ацетилхолина (АХ), причем роль NO-опосредованных механизмов вазодилатации при этом также снижается [9]. В экспериментах на животных было показано, что HFD вызывает угнетение эндотелийзависимой релаксации сосудов, оцененных в условиях *in vitro*, что может способствовать развитию артериальной гипертензии [10, 11]. Однако по вопросу конкретных механизмов эндотелиальной дисфункции при избыточном поступлении жиров с диетой нет полной ясности. Результаты экспериментов значительно варьируют вследствие применения диет с различным содержанием жиров и/или углеводов, отличающихся по возрасту животных и длительности диетического воздействия. Целью данной работы было оценить функциональное состояние сосудов у взрослых крыс Wistar, получающих HFD (содержание животных жиров 50%) в течение 10 нед., а также определить участие различных механизмов в АХ-индуцированной дилатации брыжеечных артерий у крыс при HFD, регистрируя динамику диаметра сосудов *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовались взрослые крысы стока Wistar (Центр коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН), самцы, исходной массой 260–280 г. Для проведения исследования 50 животных были случайным образом распределены на 2 равные группы, различающиеся по составу диеты. В первую, высокожировую группу (HFD) вошли 25 животных, получавших в течение 10 недель диету с высоким содержанием животных жиров (50%). В качестве источника жиров использовали говяжий жир. Контролем к ним служила группа крыс, получавших стандартный пищевой рацион, содержащий 4% жиров. Все животные имели свободный доступ к корму и воде.

Перед окончанием эксперимента у крыс собирали мочу и измеряли артериальное давление (АД) манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр (ELEMA, Швеция).

В конце срока наблюдения проводили глюкозотолерантный тест, для этого крысам вводили внутривенно раствор глюкозы из расчета 2 г/кг массы тела и оценивали динамику уровня глюкозы в крови в течение 120 мин, по графику изменения

уровня глюкозы рассчитывали площадь под кривыми “концентрация глюкозы–время”. Для инсулинорезистентного теста крысам вводили инсулин из расчета 0.75 ЕД/кг (Инсуман Рапид ГТ, Sanofi Aventis, Германия) и оценивали динамику уровня глюкозы в крови в течение 120 мин, по графику изменения уровня глюкозы рассчитывали площадь под кривыми “концентрация глюкозы–время”, а также константу скорости утилизации глюкозы (КИТТ): $КИТТ = 0.693/t^{1/2} \times 100$, где $t^{1/2}$ – время снижения уровня глюкозы до 50% от максимального снижения.

По окончании срока наблюдения 10 крыс из каждой группы декапитировали, собирали пробы крови, а также взвешивали миокард, забрюшинный и эпидидимальный жир и рассчитывали индексы массы органов и тканей, равные массе органа/массу крысы (мг/г). В сыворотке крови концентрацию креатинина, мочевины, глюкозы определяли на биохимическом анализаторе FURUNO-90 (Япония), содержание триглицеридов – на анализаторе ARCHITECT с8000 (США). В моче уровень креатинина и общего белка определяли на биохимическом анализаторе FURUNO-90 (Япония).

У 15 крыс из каждой группы проводили исследование эндотелийзависимой вазодилатации брыжеечных артерий *in vivo*. Крыс наркотизировали тилетамин/золазепамом (10 мг/кг массы тела, Zoletil 100, Vibrac, Франция). Для оценки АХ-индуцированной релаксации сосудов *in vivo* у крысы через разрез стенки брюшной полости выводили петлю тонкого кишечника, расправляли и помещали в специальный желоб, который фиксировали в термостабилизированной при температуре 37°C камере с протекающим физиологическим раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl₂ – 2.5; MgCl₂ – 1.2; NaH₂PO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 15.5; глюкоза – 11.5. Физиологический раствор сатурировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂, pH раствора поддерживали на уровне 7.4. Перед тестированием сосуд оставляли на 30 мин для стабилизации, затем проводили исследования согласно выбранному протоколу.

Для оценки эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации использовали введение в омывающий сосуд раствор АХ (Sigma-Aldrich, США) 1×10^{-5} моль/л и нитропрусида натрия (ICN Biomedicals, США) 1×10^{-6} моль/л на фоне предварительного сокращения сосуда фенилэфрином (ФЭ, Sigma-Aldrich, США) 1×10^{-5} моль/л. Амплитуду дилатации выражали в процентах от амплитуды констрикции, вызванной ФЭ. С целью оценки участия отдельных механизмов в сосудистых реакциях на АХ использовали соответствующие блокаторы: блокатор NO-синтазы L-NAME (*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, ICN Biomedicals) 1×10^{-4} моль/л; блокатор циклооксигеназы индометацин (Indomethacin, Sigma-Aldrich), 1×10^{-5} моль/л; неспецифический блокатор K⁺-каналов – тетраэтил-аммоний (ТЭА), (Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich) 1×10^{-3} моль/л. Инкубирование сосуда в растворе с блокаторами проводили в течение 30 мин, после чего в раствор вводили ФЭ с последующим добавлением АХ. Индометацин использовали при одновременном ингибировании NO-зависимых механизмов, ТЭА – при одновременном ингибировании NO-синтазы и циклооксигеназы. Маточные растворы АХ, нитропрусида натрия, L-NAME и ТЭА готовились на основе дистиллированной воды. Индометацин растворяли в диметилсульфоксиде (Вектон, Россия). Полученный раствор добавляли в физиологический раствор до достижения необходимой концентрации индометацина. Диметилсульфоксид, при разведении его физиологическим раствором в соотношении 1 : 1000, не вызывал значимых изменений реактивности брыжеечных артерий.

Для уточнения влияния различных концентраций АХ на величину дилатации брыжеечных артерий у 10 крыс каждой группы проводили оценку кумулятивного

Таблица 1. Биохимические показатели крови крыс, получавших различную по содержанию жиров диету

Показатель	Высокожировая группа <i>n</i> = 10	Контрольная группа <i>n</i> = 10	<i>p</i>
Мочевина, ммоль/л	6.65 ± 0.63	5.57 ± 0.22	<0.001
Креатинин, ммоль/л	86 ± 7	72 ± 3	<0.001
Триглицериды, ммоль/л	1.11 ± 0.11	0.61 ± 0.25	<0.001
Глюкоза, ммоль/л	6.6 ± 0.2	5.3 ± 0.3	<0.001
Максимальный уровень глюкозы при глюкозотолерантном тесте, ммоль/л	22.2 ± 0.9	13.0 ± 0.9	<0.001
Минимальный уровень глюкозы при инсулинрезистентном тесте, ммоль/л	4.9 ± 0.6	3.4 ± 0.5	<0.01

эффекта постепенного повышения концентрации АХ (1×10^{-10} – 1×10^{-5} моль/л) на амплитуду вазодилатации.

Для оценки реактивности сосудов проводили фото- и видеорегистрацию диаметра брыжеечных артерий крыс *in vivo* с использованием с микроскопа Биомед МС-1Т-ZOOM (Россия) и камеры Basler BASLER acA4600-10uc (Германия), результаты обрабатывались программой MultiMedia Catalog (MMC).

При статистической обработке результатов использовали программу Statistica v.12. Полученные данные представляли в виде среднего с его стандартной ошибкой. Для анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что исходная масса тела крыс, а также ее динамика при потреблении HFD значимо не отличалась от показателей контрольных животных, получавших стандартный рацион. Через 10 нед. прирост массы тела животных, получавших HFD диету, составлял в среднем $42 \pm 5\%$, в контрольной группе – $43 \pm 6\%$, $p > 0.05$.

Однако несмотря на отсутствие различий в массе тела, потребление рациона с высоким содержанием жиров приводило к значительному изменению показателей гомеостаза, в частности у животных HFD-группы повышался уровень креатинина, мочевины, триглицеридов, и глюкозы в крови по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). Кроме того, потребление HFD приводило к значительной протеинурии (содержание общего белка в моче животных HFD-группы 2.04 ± 0.34 г/л по сравнению с контрольной группой 1.11 ± 0.15 г/л, $p < 0.001$) и увеличению выведения креатинина почками (концентрация креатинина в моче у HFD-крыс 13.84 ± 2.74 ммоль/л по сравнению с контрольными – 7.83 ± 1.18 ммоль/л, $p < 0.001$).

Для оценки влияния HFD на состояние углеводного обмена крысам были проведены глюкозотолерантный и инсулинорезистентный тесты. Результаты глюкозотолерантного теста показали, что у крыс, получавших 50% жиров в диете, наблюдается повышение чувствительности к глюкозе, так как максимальный подъем уровня глюкозы у крыс HFD-группы превышал данный показатель контрольных животных в 1.7 раза (табл. 1), при этом площадь под кривой “глюкоза–время” у HFD крыс была больше (25.2 ± 1.6 усл. ед.), чем у животных, получавших стандартный рацион (16.0 ± 0.5 усл. ед., $p < 0.001$). Инсулинорезистентный тест показал, что крысы HFD-группы при введении инсулина имели менее выраженное снижение уровня глюкозы в

Таблица 2. Индекс массы органов и тканей крыс, получавших различную по содержанию жиров диету

Показатель	Высокожировая группа <i>n</i> = 25	Контрольная группа <i>n</i> = 25	<i>p</i>
Индекс массы миокарда, мг/г	2.87 ± 0.12	2.59 ± 0.16	<0.001
Индекс массы левого желудочка, мг/г	2.11 ± 0.13	1.84 ± 0.12	<0.001
Индекс массы эпидидимального жира, мг/г	15.68 ± 2.06	11.67 ± 1.58	<0.01
Индекс массы забрюшинного жира, мг/г	17.77 ± 2.17	9.98 ± 2.40	<0.001

крови по сравнению с контрольной группой (табл. 1), при этом площадь под кривой “глюкоза–время” у HFD-группы была больше (11.4 ± 0.9 усл. ед.), чем у контрольных животных (8.5 ± 0.3 усл. ед.). Константа скорости утилизации глюкозы (КИТТ) у HFD-крыс была значимо меньше ($2.1 \pm 0.8\%/мин$) чем у животных контрольной группы ($5.8 \pm 1.5\%/мин$, $p < 0.01$).

Результаты исследования также показали, что потребление HFD рациона имеет выраженный гипертензивный эффект, уровень АД крыс HFD-группы был значимо выше, чем контрольной (143 ± 5 и 120 ± 4 мм рт. ст. соответственно, $p < 0.001$).

Показано, что потребление диеты, содержащей 50% жиров, вызывает активизацию процессов ремоделирования миокарда, поскольку значимо увеличивается индекс массы миокарда и левого желудочка (табл. 2). Высокое содержание жиров в диете приводит к висцеральному ожирению: индекс массы эпидидимального и забрюшинного жира были значительно больше у HFD-крыс, чем у крыс, получавших стандартный пищевой рацион (табл. 2).

При исследовании влияния HFD на реактивность брыжеечных сосудов использовались агонисты, действие которых было опосредовано как эндотелийзависимыми (АХ), так и эндотелийнезависимыми (нитропруссид натрия, фенилэфрин) механизмами. Для определения роли различных механизмов эндотелийзависимой вазодилатации использовали блокаторы, поэтому прежде всего была проведена оценка влияния ингибиторов на тонус сосудов перед тестирующим воздействием. У всех крыс, независимо от группы, инкубация сосудов в физиологическом растворе, содержащем комплекс блокаторов, значимо не изменяла диаметр сосудов. Так, при принятии исходного диаметра сосуда за 100%, диаметр артерий у крыс HFD-группы составлял после инкубации с: L-NAME – $102 \pm 6\%$, комплексом L-NAME и индометацина – $96 \pm 6\%$, комплексом L-NAME, индометацина и ТЭА – $94 \pm 5\%$; у крыс контрольной группы при инкубации с: L-NAME – $97 \pm 7\%$, комплексом L-NAME и индометацина – $95 \pm 5\%$, комплексом L-NAME, индометацина и ТЭА $96 \pm 3\%$.

Оценка действия ФЭ на брыжеечные артерии показала, что у крыс HFD-группы амплитуда констрикции сосудов была в среднем на 29% больше, чем в контрольной группе (рис. 1а).

Для изучения влияния HFD на эндотелийнезависимую реактивность брыжеечных артерий крыс использовали оценку величины релаксации предварительно сокращенных ФЭ артерий на введение в перфузионный раствор нитропруссид натрия, источника экзогенного NO (рис. 1б). Эксперименты показали, что HFD в течение 10 нед. не оказывает значимого влияния на вазодилаторный эффект нитропруссид натрия, можно отметить лишь некоторую тенденцию к уменьшению амплитуды релаксации сосудов у HFD-крыс по сравнению с группой, получавшей стандартный рацион.

Для изучения влияния HFD на эндотелийзависимую вазодилатацию провели оценку кумулятивного эффекта введения в омывающий сосуд раствора АХ в сту-

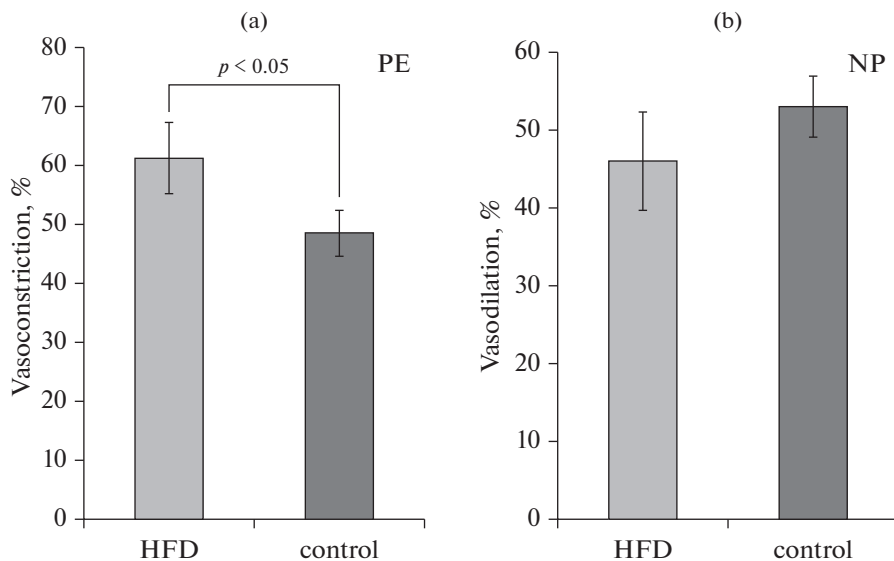


Рис. 1. Влияние высокожировой диеты на эндотелийнезависимую реактивность брыжеечных артерий. (a) – амплитуда сокращения брыжеечных артерий при введении в омывающий сосуд раствора фенолэфрина (PE, 1×10^{-6} моль/л). По оси ординат – амплитуда констрикции, выраженная в процентах от исходного диаметра сосуда. (b) – амплитуда дилатации предварительно сокращенных фенолэфрином (1×10^{-6} моль/л) брыжеечных артерий при введении в омывающий сосуд раствора нитропруссид натрия (NP, 1×10^{-6} моль/л). По оси ординат – амплитуда дилатации, выраженная в процентах от амплитуды констрикции сосуда при действии фенолэфрина. Экспериментальные группы: HFD – крысы, получавшие диету с высоким содержанием животных жиров (50%), $n = 15$; control – крысы, получавшие стандартную диету, $n = 15$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. p – значимость различий между группами.

пенчато повышающейся концентрации от 1×10^{-10} до 1×10^{-5} моль/л на амплитуду дилатации предварительно сокращенных ФЭ брыжеечных артерий. Результаты показали, что у крыс, получавших HFD, по сравнению со стандартной диетой, наблюдается ослабление вазодилатации: амплитуда релаксации значительно уменьшалась уже при концентрации АХ 1×10^{-8} моль/л, а при повышении концентрации АХ различия между группами усилились (рис. 2a). Кроме того, расчет площади под кривой дозозависимого эффекта АХ показал, что общая реактивность брыжеечных артерий крыс, получавших HFD, снижалась в среднем на 28% по сравнению с показателем контрольной группы (рис. 2b).

Оценка дилататорного эффекта АХ при концентрации 1×10^{-5} моль/л была использована в исследовании для уточнения роли основных механизмов АХ-индуцированной вазодилатации у крыс, получавших различное количество жиров в диете. Эксперименты показали, что HFD вызывает угнетение вызванной АХ релаксации брыжеечных сосудов: амплитуда вазодилатации была на 19.6% меньше, чем в контрольной группе (рис. 3a).

Для того чтобы определить возможные механизмы снижения АХ-индуцированной вазодилатации крыс, получавших HFD, оценивали изменение диаметра брыжеечных артерий при действии АХ в условиях ингибирования NO-синтазы введением в омывающий сосуд раствор L-NAME, а также L-NAME в сочетании с ингибитором

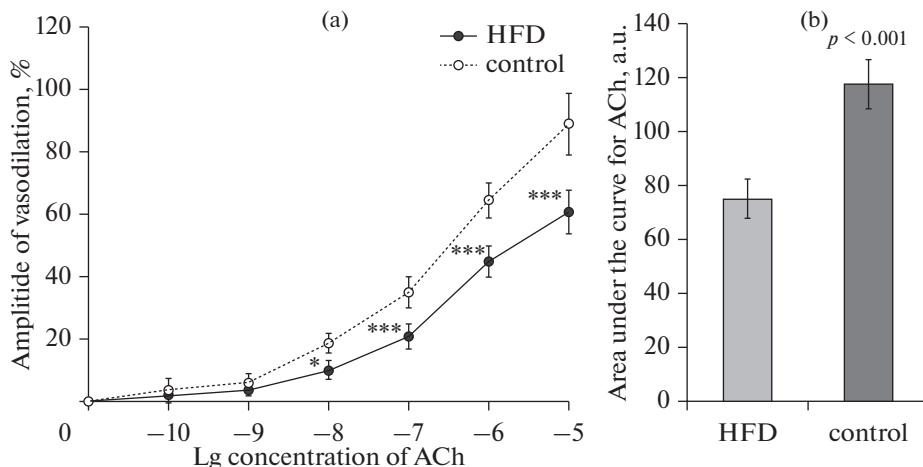


Рис. 2. Влияние высокожировой диеты на ацетилхолин-индуцированную дилатацию предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий крыс, кумулятивный эффект. (а) – амплитуда дилатации брыжеечных артерий при введении в омывающий сосуд раствора ацетилхолина (ACh): по оси абсцисс – логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – амплитуда вазорелаксации, выраженная в процентах от амплитуды вазоконстрикции при действии фенилэфрина (1×10^{-6} моль/л). (б) – площадь под кривой доза–эффект для ацетилхолина: по оси ординат – площадь под кривой зависимой от концентрации ацетилхолина амплитуды дилатации, усл. ед. Экспериментальные группы: HFD – крысы, получавшие диету с высоким содержанием животных жиров (50%), $n = 10$; control – крысы, получавшие стандартную диету, $n = 10$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. * – различия между группами значимы ($p < 0.05$), *** – различия между группами значимы ($p < 0.001$).

циклооксигеназы индометацином и неспецифическим блокатором K^+ -каналов ТЭА. Эксперименты показали, что при блокаде NO-синтазы, по сравнению с условиями без блокаторов, амплитуда дилатации значительно снижалась у крыс HFD-группы на $46.6 \pm 6.8\%$, однако в контрольной группе понижение амплитуды вазорелаксации оказалось более выраженным – на $66.7 \pm 5.2\%$ ($p < 0.001$). Добавление в инкубационную среду комплекса L-NAME с индометацином значимо не изменило реакцию сосудов на АХ по сравнению с применением только блокатора NO-синтазы (рис. 3б). В то же время добавление ТЭА в инкубационный раствор, содержащий L-NAME и индометацин, привело к значимому уменьшению амплитуды дилатации сосудов у крыс HFD-группы на $26.8 \pm 3.8\%$, у контрольных животных – на $37.9 \pm 4.3\%$ (рис. 3б). После применения комплекса трех блокаторов реактивность сосудов к действию АХ у HFD-крыс оказалась в среднем на 40% выше, чем у контрольных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что HFD оказывает значительное влияние на липидный и глюкозный обмен, а также на функциональное состояние сосудов. Используемая в течение 10 нед. HFD приводила к появлению у крыс основных признаков МС. Отсутствие общего ожирения у крыс при потреблении HFD в наших экспериментах согласуется с некоторыми исследованиями [12, 13], однако другие авторы сообщают о повышенной массе тела крыс, получавших HFD [4, 14, 15]. В нашем

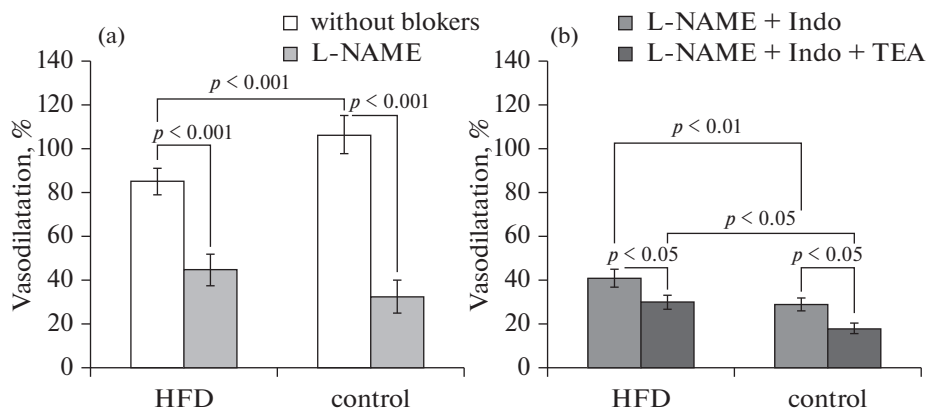


Рис. 3. Влияние высокожировой диеты на ацетилхолин-индуцированную дилатацию предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий крыс. Амплитуда дилатации предварительно сокращенных фенилэфрином (1×10^{-6} моль/л) брыжеечных артерий при введении в омывающий сосуд раствора ацетилхолина (1×10^{-5} моль/л): (а) – в отсутствие блокаторов и после инкубации сосудов с L-NAME (1×10^{-4} моль/л); (б) – после инкубации сосудов с комплексом L-NAME, индометацина (Indo, 1×10^{-5} моль/л) и ТЭА (1×10^{-3} моль/л). По оси ординат: амплитуда вазодилатации при действии ацетилхолина, выраженная в процентах от амплитуды сокращения на фенилэфрин. Экспериментальные группы: HFD – крысы, получавшие диету с высоким содержанием животных жиров (50%), $n = 15$; control – крысы, получавшие стандартную диету, $n = 15$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. p – значимость различий между группами.

исследовании HFD вызвала развитие у крыс висцерального ожирения, что считается более значимым патологическим фактором, чем общее ожирение. Показано, что при висцеральном ожирении наблюдается снижение синтеза сосудорасширяющих адипокинов, лептина и усиление производства обладающих патологической активностью цитокинов и свободных радикалов [11, 16], а также развитие хронического воспаления [17], что может усилить дисфункцию сосудов.

В нашем исследовании потребление HFD приводило к росту уровня АД, что могло быть следствием как показанной нами эндотелиальной дисфункции, выражающейся в снижении вазодилатирующей способности сосудов, приводящей к росту сосудистого тонуса, так и развития симпатикотонии, отмечающейся при HFD [14]. Возможным следствием подъема уровня АД можно считать активизацию процессов ремоделирования миокарда, о которой судили по отмеченному нами повышению индекса массы миокарда и левого желудочка. При ожирении усиление гипертрофии миокарда отмечается как у людей [18], так и у экспериментальных животных [19].

Наши исследования показали возможность изменения метаболизма глюкозы при модификации только жировой составляющей диеты уже на ранних сроках, при этом отмечалась как инсулинорезистентность, так и повышение чувствительности к глюкозе, что согласуется с другими исследованиями, показавшими изменение углеводного обмена уже через 2–8 нед. HFD [20, 21]. Таким образом, потребление HFD приводило к появлению всех основных факторов МС у крыс.

Проведенные исследования показали, что развитие МС сопровождается повышением констрикторной реакции сосудов на действие ФЭ. Увеличение вызванной ФЭ реактивности сосудов при МС отмечалось и другими авторами как при применении HFD [22], так и при использовании высокоуглеводной нагрузки [23]. По-

скольку величина сосудистого тонуса определяется балансом между констрикторными и дилаторными факторами, действующими на ГМК [24], то усиление реакций сосудов на констрикторные агенты, в частности на ФЭ, которое наблюдается при HFD, может приводить к дисбалансу между сосудорасширяющими и сосудосуживающими влияниями даже при сохранении нормальной продукции эндотелием вазорелаксирующих факторов.

С целью изучения влияния HFD на эндотелийзависимую вазорелаксацию оценивали АХ-индуцированную дилатацию брыжеечных артерий крыс. Эксперименты показали, что HFD снижает амплитуду вызванного АХ расслабления сосудов у крыс почти на 20% по сравнению с животными, получавшими стандартную диету, то есть развивалась эндотелиальная дисфункция. Ослабление релаксации сосудов различного типа у животных с МС отмечали и другие исследователи в экспериментах *in vitro* [10, 11, 25]. Важно, что уменьшение реакции на АХ при повышенном потреблении жиров отмечается не только у экспериментальных животных [26], но и у людей, показавших значительное снижение реакции кровотока в предплечье на инфузию АХ при потреблении диеты, содержащей более 35% жиров [9].

Принято считать, что эндотелийзависимая релаксация сосудов зависит от активности трех основных механизмов: NO-зависимых, простагландин-опосредованных, а также эндотелиальной гиперполяризации [27, 28]. Роль каждого из этих путей АХ-индуцированной вазодилатации мы попытались оценить в данном исследовании.

Основным вазодилатирующим фактором, продуцируемым эндотелием, считают NO [28]. Для определения степени участия связанных с NO механизмов дилатации перед проведением тестового воздействия сосуд инкубировали в растворе, содержащем ингибитор NO-синтазы L-NAME, и оценивали разницу в амплитуде дилатации без блокатора и после его применения. Прекращение продукции NO сопровождалось уменьшением вызванной АХ вазорелаксации как у контрольных крыс, так и у животных, получавших HFD. Однако анализ результатов показал, что HFD приводит к снижению роли NO-опосредованного механизма в дилатации брыжеечных артерий, поскольку инкубация сосудов с L-NAME снижала амплитуду вазодилатации у HFD-крыс в меньшей степени, чем у контрольных животных. Участие NO в реакции сосудов на АХ зависит не только от количества синтезированного эндотелием NO, но и от чувствительности ГМК к нему. Наши исследования показали, что снижение роли NO-зависимого пути расслабления сосудов HFD-крыс не связано с изменением чувствительности ГМК к NO, поскольку отсутствовали различия с контрольной группой в амплитуде вызванной нитропруссидом натрия дилатации сосудов у крыс. Таким образом, МС приводит к нарушению NO-зависимого механизма регуляции сосудистого тонуса вследствие ослабления синтеза NO эндотелием при сохранении нормальной реактивности ГМК на действие NO. Наши результаты, полученные на сосудах в условиях *in vivo*, согласуются с экспериментальными исследованиями *in vitro*, показавшими ослабление NO-зависимых механизмов вазодилатации при развитии МС у животных [10, 22], а также с клиническими исследованиями при МС у людей [29, 30].

Так как NO обладает способностью модулировать продукцию эндотелием других вазодилаторов [31, 32], то роль отличных от NO механизмов релаксации сосудов исследовалась на фоне ингибирования NO-синтазы. Учитывая, что одним из основных факторов, регулирующих тонус кровеносных сосудов, являются простагландины, мы оценили влияние HFD на опосредованные простагландинами механизмы вазодилатации. Поскольку простаглицлин считается основным простагландином, участвующим в эндотелийзависимой вазодилатации [33], был использован блокатор циклооксигеназы индометацин. Сравнение амплитуды вазодилатации после инкубации сосудов с L-NAME и при использовании комплекса L-NAME и

индометацина показало, что блокада циклооксигеназы не оказывала существенно-го влияния на амплитуду дилатации сосудов как у HFD-крыс, так и у контрольных животных. Таким образом, снижение реактивности сосудов на АХ у крыс, получавших HFD, не связана с изменением активности простагландин-зависимых механизмов. Наши данные согласуются с результатами исследований *in vitro* на сосудистых кольцах, которые также показали отсутствие влияния МС на опосредованную простагландинами дилатацию сосудов [10, 34].

Одним из важнейших механизмов эндотелийзависимой дилатации сосудов является эндотелиальная гиперполяризация [27, 28]. Несмотря на то, что природа гиперполяризующего фактора точно не установлена, развитие эндотелиальной гиперполяризации реализуется через активацию локализованных в эндотелии K^+ -каналов [35–37]. Для исследования роли K^+ -каналов в реакции брыжеечных артерий на АХ использовали предварительную инкубацию сосудов в физиологическом растворе, содержащем неспецифический блокатор K^+ -каналов ТЭА, который применяли в комплексе с L-NAME и индометацином. Хотя ТЭА является неспецифическим блокатором как Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости (BK_{Ca}), так и различных потенциал-зависимых K^+ -каналов (K_v), считается, что при концентрации 10^{-3} моль/л он достаточно эффективен в отношении BK_{Ca} [38]. Результаты показали, что HFD приводит к снижению роли BK_{Ca} , а, возможно, и K_v , в АХ-индуцированной вазодилатации, поскольку у крыс HFD-группы снижение амплитуды релаксации брыжеечных артерий, измеренной до и после применения ТЭА, было меньше, чем у контрольных животных.

Применение комплекса трех блокаторов (L-NAME, индометацина и ТЭА) не привело к полному ингибированию релаксации при действии АХ. Остаточная реактивность на действие АХ может осуществляться через механизм эндотелиальной гиперполяризации, опосредованной активностью Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов промежуточной (IK_{Ca}) и малой (SK_{Ca}) проводимости [39, 40]. В наших экспериментах после инкубации сосудов с комплексом трех блокаторов амплитуда дилатации сосудов крыс HFD-группы оказалась значительно больше, чем у контрольных животных, что может свидетельствовать о повышении роли механизма эндотелиальной гиперполяризации в эндотелийзависимой релаксации брыжеечных артерий крыс, получавших HFD. В отличие от наших данных, в некоторых исследованиях отмечено снижение экспрессии IK_{Ca} и SK_{Ca} при HFD и сочетании HFD и высокоуглеводной диеты [14, 41], однако длительность диетического воздействия в данных исследованиях была значительно большей. Возможно, что в наших экспериментах на ранних сроках МС сопровождался первоначальной компенсаторной активацией механизма эндотелиальной гиперполяризации, которая развивалась в ответ на снижение эффективности NO-зависимых механизмов вазодилатации.

Таким образом, наши исследования показали, что HFD у крыс длительностью 10 нед. приводит к развитию МС, который характеризуется гиперглицидемией, подъемом уровня АД, инсулинорезистентностью, эндотелиальной дисфункцией. Нарушение функционального состояния брыжеечных артерий HFD-крыс выражается в усилении констрикторных реакций на ФЭ, а также в снижении реактивности сосудов к действию АХ. Эндотелиальная дисфункция у крыс, получавших HFD, опосредована как нарушением NO-зависимых механизмов вазодилатации, в частности уменьшением продукции NO эндотелием, так и снижением эффективности BK_{Ca} . Уменьшение биодоступности NO при HFD частично компенсируется активацией механизмов эндотелиальной гиперполяризации (опосредованной активностью IK_{Ca} и SK_{Ca}) в ацетилхолин-индуцированной вазодилатации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП Научно-технологическое развитие Российской Федерации (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении этической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование и проведение эксперимента, получение и обработка данных, написание и редактирование манускрипта (И.Г.Т.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA* (2021) Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med* 42(3): 199–214.
<https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>
2. *Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL* (2017) Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 11(8): 215–225.
<https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
3. *Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S* (2016) Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab* 13: 65.
<https://doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9>
4. *Abdulrahman AO, Kuerban A, Alshehri ZA, Abdulaal WH, Khan JA, Khan MI* (2020) Urolithins Attenuate Multiple Symptoms of Obesity in Rats Fed on a High-Fat Diet. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 3337–3348.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S268146>
5. *Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruhart JC, James WPT, Loria CM, Smith SC Jr* (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120: 1640–1645.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
6. *Koliaki C, Liatis S, Kokkinos A* (2019) Obesity and Cardiovascular Disease: Revisiting an Old Relationship. *Metabolism* 92: 98–107.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.011>
7. *Stanek A, Fazeli B, Bartuś S, Sutkowska E* (2018) The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data. *Biomed Res Int* 2018: e1098039.
<https://doi.org/10.1155/2018/1098039>
8. *Suzuki T, Hirata K, Elkind MS, Jin Z, Rundek T, Miyake Y, Boden-Albala B, Di Tullio MR, Sacco R, Homma S* (2008) Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Am Heart J* 156(2): 405–410.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.02.022>
9. *Dow CA, Stauffer BL, Greiner JJ, DeSouza CA* (2015) Influence of habitual high dietary fat intake on endothelium-dependent vasodilation. *Appl Physiol Nutr Metab* 40(7): 711–715.
<https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0006>
10. *Lozano-Cuenca J, Valencia-Hernández I, López-Canales OA, Flores-Herrera H, López-Mayorga RM, Castillo-Henkel EF, López-Canales JS* (2020) Possible mechanisms involved in the effect of the subchronic administration of rosuvastatin on endothelial function in rats with metabolic syndrome. *Braz J Med Biol Res* 53(2): e9304.
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20199304>
11. *Oishi JC, Castro CA, Silva KA, Fabricio V, Carnio EC, Phillips SA, Duarte ACGO, Rodrigues GJ* (2018) Endothelial Dysfunction and Inflammation Precedes Elevations in Blood Pressure Induced by a High-Fat Diet. *Arq Bras Cardiol* 110(6): 558–567.
<https://doi.org/10.5935/abc.20180086>

12. *Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X* (2017) In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *Peer J* 5: e3697. <https://doi.org/10.7717/peerj.3697>
13. *Ramalho L, da Jornada MN, Antunes LC, Hidalgo MP* (2017) Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. *Nutr Diabetes* 7(3): e245. <https://doi.org/10.1038/nutd.2016.47>
14. *García ML, Milanez MIO, Nishi EE, Sato AYS, Carvalho PM, Nogueira FN, Campos RR, Oyama LM, Bergamaschi CT* (2021) Retroperitoneal adipose tissue denervation improves cardiometabolic and autonomic dysfunction in a high fat diet model. *Life Sci* 283: 119841. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119841>
15. *Gradel AKJ, Salomonsson M, Sørensen CM, Holstein-Rathlou NH, Jensen LJ* (2018) Long-term diet-induced hypertension in rats is associated with reduced expression and function of small artery SK_{Ca}, IK_{Ca}, and Kir2.1 channels. *Clin Sci (Lond)* 132(4): 461–474. <https://doi.org/10.1042/CS20171408>
16. *Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H* (2007) Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1023–1033. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055>
17. *Sudhakar M, Silambanan S, Chandran AS, Prabhakaran AA, Ramakrishnan R* (2018) C-Reactive Protein (CRP) and Leptin Receptor in Obesity: Binding of Monomeric CRP to Leptin Receptor. *Front Immunol* 9: 1167. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01167>
18. *Mahajan R, Lau DH, Sanders P* (2015) Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. *Trends Cardiovasc Med* 25: 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.09.005>
19. *Gutiérrez-Cuevas J, Sandoval-Rodríguez A, Monroy-Ramírez HC, Mercado MV-D, Santos-García A, Armendáriz-Borunda J* (2020) Prolonged-release pirfenidone prevents obesity-induced cardiac steatosis and fibrosis in a mouse NASH model. *Cardiovasc Drugs Ther* 35(5): 927–938. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07014-9>
20. *Kwiatkowski G, Bar A, Jaszczal A, Chłopiński S* (2021) MRI-based in vivo detection of coronary microvascular dysfunction before alterations in cardiac function induced by short-term high-fat diet in mice. *Sci Rep* 11(1): 18915. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98401-1>
21. *Zhang XY, Guo CC, Yu YX, Xie L, Chang CQ* (2020) Establishment of high-fat diet-induced obesity and insulin resistance model in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban (Chinese)* 52(3): 557–563. <https://doi.org/10.19723/j.issn.1671-167X.2020.03.024>
22. *Azemi AK, Siti-Sarah AR, Mokhtar SS, Rasool AHG* (2022) Time-Restricted Feeding Improved Vascular Endothelial Function in a High-Fat Diet-Induced Obesity Rat Model. *Vet Sci* 9(5): 217. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050217>
23. *Царева ИА, Иванов ГТ, Лобов ГИ* (2022) Ранние изменения функционального состояния артерий и сосудов микроциркуляторного русла при моделировании метаболического синдрома. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1134–1147. [*Tsareva IA, Ivanova GT, Lobov GI* (2022) Early Changes in the Functional State of the Arteries and Vessels of the Microcirculatory Bed in Modeling the Metabolic Syndrome. *Russ J Physiol* 108(9): 1134–1147. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813922090084>
24. *Ledoux J, Werner EM, Brayden EJ, Nelson TM* (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21: 69–78. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2005>
25. *Gamez-Mendez AM, Vargas-Robles H, Ríos A, Escalante B* (2015) Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. *PLoS One* 10(9): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138609>
26. *Madkhali HA* (2020) Morin attenuates high-fat diet induced-obesity related vascular endothelial dysfunction in Wistar albino rats. *Saudi Pharm J* 28(3): 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.01.009>
27. *Rubanyi GM* (1991) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46(1): 27–36. <https://doi.org/10.1002/jcb.240460106>
28. *Freed JK, Gutterman DD* (2017) Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* 69(5): 264–272. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000463>
29. *Dimassi S, Chahed K, Boumiza S, Canault M, Tabka Z, Laurant P, Riva C* (2016) Role of eNOS- and NOX-containing microparticles in endothelial dysfunction in patients with obesity. *Obesity*

- 24: 1305–1312.
<https://doi.org/10.1002/oby.21508>
30. *Schinzari F, Iantorno M, Campia U, Mores N, Rovella V, Tesauro M, Di Daniele N, Cardillo C* (2015) Vasodilator responses and endothelin-dependent vasoconstriction in metabolically healthy obesity and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(9): E787–E792.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00278.2015>
 31. *Looff-Wilson RC, Ashley BS, Billig JE, Wolfert MR, Ambrecht LA, Bearden SE* (2008) Chronic diet-induced hyperhomocysteinemia impairs eNOS regulation in mouse mesenteric arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(1): R59–R66.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00833.2007>
 32. *Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ* (2012) Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14(4): 198–205.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x>
 33. *Parkington HC, Coleman HA, Tare M* (2004) Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* 49(6): 509–514.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.11.012>
 34. *Rubio-Ruiz ME, Pérez-Torres I, Diaz-Diaz E, Pavón N, Guarner-Lans V* (2014) Non-steroidal anti-inflammatory drugs attenuate the vascular responses in aging metabolic syndrome rats. *Acta Pharmacol Sin* 35(11): 1364–1374.
<https://doi.org/10.1038/aps.2014.67>
 35. *Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, Takatori S, Hashikawa-Hobara N, Kitamura Y, Kawasaki H* (2011) New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *J Pharmacol Sci* 116(4): 332–336.
<https://doi.org/10.1254/jphs.10r30fm>
 36. *Mandalà M, Gokina N, Barron C, Osol G* (2012) Endothelial-derived hyperpolarization factor (EDHF) contributes to PLGF-induced dilation of mesenteric resistance arteries from pregnant rats. *J Vasc Res* 49: 43–49.
<https://doi.org/10.1159/000329821>
 37. *Busse R, Edwards G, Féletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH* (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23(8): 374–380.
[https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)02050-3](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02050-3)
 38. *Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF* (2017) Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 16; 7(2): 485–581.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
 39. *Köhler R, Oliven-Viguera A, Wulff H* (2016) Endothelial Small- and Intermediate-Conductance K Channels and Endothelium-Dependent Hyperpolarization as Drug Targets in Cardiovascular Disease. *Adv Pharmacol* 77: 65–104.
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.04.002>
 40. *Féletou M* (2016) Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharm* 67: 373–387.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000346>
 41. *Haddock RE, Grayson TH, Morris MJ, Howitt L, Chadha PS, Sandow SL* (2011) Diet-induced obesity impairs endothelium-derived hyperpolarization via altered potassium channel signaling mechanisms. *PLoS One* 6(1): e16423.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016423>

Mesenteric Artery Reactivity in the Development of Metabolic Syndrome in Rats Fed on a High-Fat Diet

G. T. Ivanova*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

*e-mail: ivanovagt@infran.ru

High fat diet can lead to the development of metabolic syndrome (MS). However, the question of the mechanisms of pathophysiological processes in MS has not been studied enough. The aim of the work was to study the effect of a high-fat diet (HFD) on the reactivity of the mesenteric arteries of Wistar rats *in vivo*, as well as to evaluate the change in the mechanisms of endothelium-dependent arterial dilatation in HFD. The HFD-group of rats ($n = 25$) received HFD containing 50% animal fat for 10 weeks, the control

group ($n = 25$) received a standard diet. The effect of HFD on endothelium-dependent and endothelium-independent responses of the mesenteric arteries under the action of agonists in the absence and with the use of blockers of NO-synthase (L-NAME), cyclooxygenase (indomethacin), and K^+ -channels (tetraethylammonium) was assessed using photomicrography and video recording of mesenteric artery diameter *in vivo*. HFD in rats led to the development of MS, including dyslipidemia, hyperglycemia and insulin resistance, and an increase in blood pressure. MS was accompanied by impaired functional state of the mesenteric arteries. In rats of the HFD group, compared with the control group, there was an increase in the constrictor reaction to phenylephrine by 29%, as well as a decrease in the reactivity of vessels previously contracted by phenylephrine under the action of acetylcholine by 36%. Pre-incubation of vessels with blockers reduced the amplitude of relaxation under the action of acetylcholine, compared with the initial acetylcholine-induced vasorelaxation, in HFD-group rats: with L-NAME – by 47%, L-NAME and indomethacin – by 50%, L-NAME, indomethacin and tetraethylammonium – by 65%; in the control group – by 69, 72 and 83%, respectively. HFD had no significant effect on the amplitude of vasodilation under the action of sodium nitroprusside. Thus, endothelial dysfunction in HFD-treated rats was mediated both by impairment of NO-dependent mechanisms of vasodilation, in particular, by a decrease in NO production by the endothelium, and by a decrease in the effectiveness of BK_{Ca} . The decrease in NO bioavailability in HFD was partially compensated by the activation of endothelial hyperpolarization mechanisms (mediated by IK_{Ca} and SK_{Ca} activities) in acetylcholine-induced vasodilation.

Keywords: metabolic syndrome, high-fat diet, mesenteric artery, endothelium, acetylcholine-induced dilatation, vasoconstriction, phenylephrine, nitroprusside, Wistar

**МЕТИЛОБОГАЩЕННАЯ ДИЕТА МАТЕРИ НОРМАЛИЗУЕТ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИКЛА СОН–БОДРСТВОВАНИЕ И СОННЫХ ВЕРЕТЕН
У ВЗРОСЛОГО ПОТОМСТВА КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij
С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ**

© 2023 г. А. В. Габова¹, *, К. Ю. Саркисова¹

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

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

Поступила в редакцию 06.10.2022 г.

После доработки 24.11.2022 г.

Принята к публикации 24.11.2022 г.

Ранее было показано, что перинатальная метилобогащенная диета (МОД) матери уменьшает число пик-волновых разрядов (ПВР) и поведенческие симптомы депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Эпилепсия и депрессия обычно сопровождаются нарушениями цикла сон–бодрствование. ПВР и сонные веретена являются различными проявлениями таламокортикальной активности. Предполагается, что патологические изменения в таламокортикальной системе, которые приводят к ПВР, изменяют и сонные веретена. Возможно, что МОД матери оказывает положительное влияние не только на ПВР, но и на сонные веретена. Цель данной работы – выяснить, влияет ли МОД матери на цикл сон–бодрствование и изменяет ли характеристики сонных веретен у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Показано, что у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими в перинатальном периоде МОД, по сравнению с потомством, матери которого потребляли контрольную диету (КД), значимо увеличивается относительная длительность быстрого сна. У потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, относительная длительность быстрого сна и число его эпизодов становятся неотличимыми от аналогичных показателей у неэпилептических крыс Wistar. МОД матери увеличивает также число переходов от медленноволнового сна к быстрому сну. Имеется значимая отрицательная корреляция между числом ПВР и длительностью быстрого сна. МОД матери по сравнению с КД уменьшала амплитуду и спектральную плотность мощности сонных веретен. Они становились значительно ближе к амплитуде и спектральной плотности мощности сонных веретен у крыс Wistar. Таким образом, МОД матери нормализует цикл сон–бодрствование и характеристики сонных веретен у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Мы предполагаем, что этот позитивный эффект связан с уменьшением симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии, а также с коррекцией активности таламокортикальной системы.

Ключевые слова: метилобогащенная диета матери, абсансная эпилепсия, генетическая модель, крысы линии WAG/Rij, пик-волновой разряд, цикл сон–бодрствование, быстрый (REM) сон, медленноволновой (non-REM) сон, промежуточный сон (intermediate sleep), сонное веретено

DOI: 10.31857/S086981392301003X, EDN: IYQRQF

Крысы линии WAG/Rij являются валидной моделью генетической абсансной эпилепсии с коморбидной депрессией [1]. Абсансная эпилепсия характеризуется спонтанными генерализованными пик-волновыми разрядами (ПВР) на ЭЭГ, сопровождающимися потерей сознания (уменьшение реагирования на внешние стимулы). Метилобогатая диета (МОД) матери в перинатальном периоде является эпигенетическим фактором, влияющим на метилирование ДНК и экспрессию генов в мозге у потомства в особо чувствительном для их развития периоде. Эпигенетические модификации влияют на развитие психических и неврологических заболеваний, среди которых эпилепсия [2] и депрессия [3]. Ранее мы показали, что МОД матери во время перинатального периода уменьшает число ПВР и подавляет проявление коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij [4]. Обнаружена связь между гипометилированием отдельных участков ДНК и нарушениями сна в виде его фрагментированности и инверсии цикла сон—бодрствование [5]. Качество сна имеет большое значение для когнитивных и физиологических функций организма [6, 7]. Для формирования долговременной памяти необходим процесс консолидации, который зависит от качества сна. Недавно приобретенные знания и навыки консолидируются во время быстрого (REM) сна, а его дефицит может приводить к когнитивным нарушениям. Увеличение числа и длительности сонных веретен (14–16 Гц) после обучения коррелирует с улучшением выполнения выработанного навыка. Предполагают, что сонные веретена “вовлечены в диалог гиппокампа и неокортекса, необходимый для консолидации памяти” [8].

Известно, что эпилепсия и депрессия влияют на сон, изменяя характеристики цикла сон—бодрствование. Нарушения сна обнаружены как у пациентов с абсансной эпилепсией [9, 10], так и у генетической модели абсансной эпилепсии — у крыс линии WAG/Rij [11–13]. Ранее было установлено, что относительная длительность быстрого сна у крыс линии WAG/Rij меньше, чем у неэпилептических крыс линии ACI, а длительность медленноволнового сна больше [12]. Хроническое введение антиабсансного препарата этосуксимида, подавляющего появление ПВР, влияло на длительность быстрого сна. Хотя в течение суток относительная длительность быстрого сна изменялась, в конце светового периода суток и в начале темного периода суток (период, в котором обычно проводят записи ЭЭГ) общая и относительная длительность быстрого сна у крыс линии WAG/Rij, потреблявших этосуксимид с питьевой водой в течение четырех месяцев, была меньше, чем у контрольных крыс, которые этосуксимид не потребляли или потребляли в течение двух месяцев, а параметры медленноволнового сна не изменялись [14]. Авторы полагают, что уменьшение симптомов коморбидной депрессии, вызываемое длительным и хроническим потреблением этосуксимида, может быть связано с уменьшением быстрого сна. Имеются данные, свидетельствующие о том, что неонатальное введение трициклического антидепрессанта кломипрамина вызывает у крыс линии WAG/Rij в возрасте восьми месяцев увеличение длительности быстрого сна, при этом длительность медленноволнового сна и бодрствования значимо не изменялись. Интересно, что кломипрамин уменьшал также число ПВР у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij [15]. На пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс показано, что депривация быстрого сна приводит к усилению перекисного окисления липидов, а также к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов в коре мозга, что, согласно предположению авторов, приводит к гипервозбудимости и становится причиной понижения порога возникновения эпилептических разрядов [16].

Переход от медленноволнового сна к быстрому сну или состоянию бодрствования у животных и человека в большинстве случаев сопровождается промежуточным сном. Промежуточный сон длительностью от нескольких секунд до несколь-

ких минут – это переходная фаза от медленноволнового к быстрому сну или состоянию бодрствования. В этой фазе присутствуют веретена в фронтопарietальной коре и тета-активность в гиппокампе, проявляющаяся также в окципитальной коре. У человека длительность промежуточной фазы сна увеличивается при психических расстройствах [17]. Показано, что длительность промежуточного сна у крыс линии WAG/Rij больше, чем у крыс Wistar [11].

Известно, что ПВР является результатом таламокортикальных взаимодействий и запускается глубокими слоями соматосенсорной коры, в которых повышена возбудимость при эпилепсии как у крыс линии WAG/Rij [18–20], так и у пациентов с абсансной эпилепсией [21, 22]. Сонные веретена, так же, как и ПВР, являются проявлениями таламокортикальной активности, но запускаются ретикулярным ядром таламуса [23–25]. Ранее предполагали, что ПВР при абсансной эпилепсии являются патологической трансформацией сонных веретен [26]. Однако в настоящее время экспериментальные данные не подтверждают это мнение [21]. Наиболее убедительным доказательством являются данные о том, что этосуксимид в определенных условиях может подавлять ПВР и стимулировать появление сонных веретен [28]. Изменения в таламокортикальной системе при абсансной эпилепсии у крыс линии WAG/Rij не только приводят к спонтанной генерации ПВР, но и влияют на характеристики сонных веретен. В частности показано, что у крыс линии WAG/Rij и Wistar число веретен, разделенных на типы по их средней частоте, различается. Число “медленных” и “средних” веретен (с частотой 8–12.4 Гц) было больше у крыс линии WAG/Rij, в то время как у крыс Wistar, напротив, преобладали “быстрые” и “экстрабыстрые” веретена (с частотой 12.5–16 Гц) [29]. По нашим данным, средняя частота веретен у крыс Wistar составляет 13.0 ± 0.4 Гц [30]. Это значение подтверждает, что у крыс Wistar большинство веретен находится в области “быстрых” частот. Однако имеются ли изменения в амплитуде веретен у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar, неизвестно.

Таким образом, ранее полученные данные указывают на то, что у крыс линии WAG/Rij с абсансной эпилепсией по сравнению с неэпилептическими крысами имеются нарушения цикла сон–бодрствование, такие как пониженная длительность быстрого сна и увеличенная длительность промежуточной стадии сна. Тот факт, что изменение числа ПВР сопровождается изменением длительности быстрого сна, может свидетельствовать о том, что между числом ПВР и длительностью быстрого сна могут существовать причинно-следственные связи. Однако прямые доказательства того, что число ПВР коррелирует с длительностью быстрого сна, отсутствуют. Кроме того, сравнительный анализ амплитуды и спектральной плотности мощности сонных веретен у эпилептических крыс линии WAG/Rij и неэпилептических крыс Wistar никем ранее не проводился.

Цель данной работы – выяснить: 1) влияет ли МОД матери на цикл сон–бодрствование и изменяет ли характеристики сонных веретен у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij; 2) существует ли корреляция между числом ПВР и длительностью быстрого сна. Для достижения этой цели у крыс-самцов линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД или контрольную диету (КД) в перинатальном периоде, и у неэпилептических крыс Wistar исследовали абсолютную (мин), относительную (%) длительность стадий и число их эпизодов в цикле сон–бодрствование, а также амплитуду и спектральную плотность мощности сонных веретен.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 7-месячных крысах-самцах линии WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией и неэпилептических крысах Wistar. Используются крысы линии WAG/Rij, разводимые в Институте высшей нервной деятельности и

нейрофизиологии РАН и представляющие примерно 73-е поколение от родителей, исходно полученных из Нидерландов (Университет Radboud, Nijmegen) в 1995 г. В нашей популяции крыс линии WAG/Rij ПВР имеют все животные, и они полностью воспроизводят исходный эпилептический фенотип от одного поколения к другому. Это их отличает от другой популяции крыс линии WAG/Rij, также разводимых в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Однако 25% животных в этой популяции не имеют ПВР [31]. Крысы Wistar, которые были использованы в настоящей работе, не имели ПВР. Все животные не были чувствительны к аудиогенным воздействиям [32].

Было исследовано потомство крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, постреблявшими КД ($n = 8$), МОД ($n = 8$), и крыс Wistar ($n = 7$). Использовали МОД, содержащую на 1 кг корма следующие доноры метильных групп и кофакторы одноуглеродного цикла: холин 15 г; бетаин 15 г; L-метионин 7.5 г; фолиевая кислота 15 мг; витамин B12 1.5 мг; $ZnSO_4$ 150 мг. Эти ингредиенты давали самкам крыс с пищей в течение 7 дней до спаривания, во время спаривания, в течение беременности и в течение 7 дней после рождения крысят [33]. Крысы содержались в стандартных условиях вивария. Регистрацию ЭЭГ проводили у свободно передвигающихся животных в течение 3 ч в день (с 16.00 до 19.00) эпидурально с фронтальных (AP +2 мм, L 2.5 мм) и окципитальных (AP -6 мм, L 4 мм) отделов коры. Запись ЭЭГ осуществляли с использованием восьмиканального беспроводного усилителя биопотенциалов BR8V1 (Texas Instruments, США) в соответствии с ранее описанной методикой [34, 35] монополярно, референтный электрод устанавливали над мозжечком. Частота дискретизации записи ЭЭГ составляла 250 Гц, ЭЭГ записывали без фильтрации. Для анализа ЭЭГ использовали полосу пропускания от 1 до 40 Гц. Вживление электродов (маленькие винтики из нержавеющей стали) в кости черепа выполняли под хлоралгидратной анестезией (400 мг/кг, в/б). Регистрацию ЭЭГ проводили приблизительно через 7 дней после вживления электродов. Анализировали записи ЭЭГ, зарегистрированные во фронтальной коре мозга, в которой ПВР имеют наибольшую амплитуду и более отчетливые морфологические характеристики, а фронтальные сонные веретена (frontal anterior spindles) характеризуются хорошо выраженными изменениями. Записи ЭЭГ проводили во второй половине дня, когда у крыс линии WAG/Rij наблюдают наибольшее число ПВР, а характеристики цикла бодрствование—сон и сонных веретен в большей степени изменены [12]. Стадии сна и бодрствования определяли при визуальном инспектировании записей ЭЭГ в соответствии с критериями, приведенными для крыс линии WAG/Rij в работе [12, 15].

Состояние бодрствования сопровождалось ЭЭГ-активностью с доминированием тета- (6–8 Гц) и бета- (20–40 Гц) частот. ЭЭГ-активность, содержащая сонные веретена с частотой (10–16 Гц), тета-волны и медленные волны (2–4 Гц) определяли как легкий медленноволновый сон. Глубокий медленноволновый сон характеризовался постепенно исчезающими сонными веретенами и увеличивающимся числом медленных дельта-волн (1.5–4 Гц). Непрерывная тета-активность (6–8 Гц), наступающая после медленноволнового сна, отличающаяся от ритма бодрствования отсутствием бета-частот и двигательных реакций, нерегулярным дыханием и появлением подергиваний животного, идентифицировалась как быстрый сон. Промежуточная фаза сна характеризовалась веретенами с острыми пиками во фронтальной коре и тета-ритмом в окципитальной коре. Пребывание в одной стадии цикла сон—бодрствование с перерывом менее, чем на 15 с, определяли как один эпизод этой стадии. Число и длительность эпизодов стадий цикла сон—бодрствование измерялись полуавтоматически. Вычисляли среднее число эпизодов (n) стадий цикла сон—бодрствование, их абсолютную (мин) и относительную (в %) длительность, длительность эпизодов промежуточного сна на протяжении всей за-

писи. Кроме того, определяли число переходов из медленноволнового сна в парадоксальный и в бодрствование. В медленноволновом сне выделяли сонные веретена для последующего анализа. На фоне дельта-волн они отличались увеличенной амплитудой (до 800 мкВ) и основной частотой (от 12 до 16 Гц). Усредненный спектр мощности сонных веретен вычислялся из Фурье-спектров, построенных методом Уэлча (окно Хэннинга, ширина окна 2 с, перекрытие окна 7/8). Для сравнения групп спектров сонных веретен использовался групповой статистический тест Манна–Уитни (альфа-уровень 0.05) с поправкой Бонферрони на число значений в спектре и число парных сравнений. Применялась программа Procedure (автор А.А. Морозов, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН). Для построения спектров брали выборку из 45–50 сонных веретен в каждой группе крыс. Также вычисляли средние значения амплитуды сонных веретен. Для вычисления средних значений брали 28–30 сонных веретен в каждой группе. Амплитуда сонных веретен определялась полуавтоматическим способом с помощью программы HILB4 (автор А.А. Морозов, Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН). Исходные данные поступали в формате edf. С помощью программы на графике сонного веретена вручную отмечались локальные минимумы и максимумы. Значения минимумов и максимумов автоматически передавались в программу Матлаб в виде двух векторов отрицательных и положительных чисел, обозначающих смещение локального минимума или максимума относительно нулевой линии в мкВ. Амплитудой веретена определялась как сумма абсолютных значений локального максимума и локального минимума сонного веретена. Для каждой группы рассчитывали среднюю амплитуду сонных веретен.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ “STATISTICA Release 7”. Использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), непараметрический аналог ANOVA – Kruskal–Wallis H test и критерий U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Определение различий между средними значениями показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмена–Кейлса (Newman–Keuls test). Вычисляли линейный коэффициент корреляции Пирсона для показателей числа ПВР и длительности быстрого сна. Для вычисления коэффициента корреляции использовали записи ЭЭГ у 26 крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД в перинатальном периоде.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На круговых диаграммах (рис. 1) показана относительная длительность стадий цикла сон–бодрствование у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД и МОД, и у потомства крыс Wistar аналогичного возраста. Статистический анализ (ANOVA) показал, что МОД матери оказывает влияние на относительную длительность бодрствования и быстрого сна в цикле сон–бодрствование у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij: МОД матери по сравнению с КД вызывает тенденцию к уменьшению бодрствования [$H_{(2,23)} = 4.1, p = 0.1; U = 16, p = 0.09$] и значимое увеличение быстрого сна [$F_{(1,14)} = 5.1, p < 0.05$]. Вследствие этого структура цикла сон–бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, становится неотличимой от цикла сон–бодрствование у крыс Wistar. Влияние МОД матери на относительную длительность медленноволнового сна было незначимым [$H_{(2,23)} = 2.4, p = 0.3$]. У крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, по сравнению с крысами Wistar наблюдали тенденцию [$F_{(1,13)} = 3.36, p = 0.09$] к большей относительной длительности бодрствования и тенденцию [$F_{(1,13)} = 2.5, p = 0.1$] к меньшей относительной длительности быстрого сна.

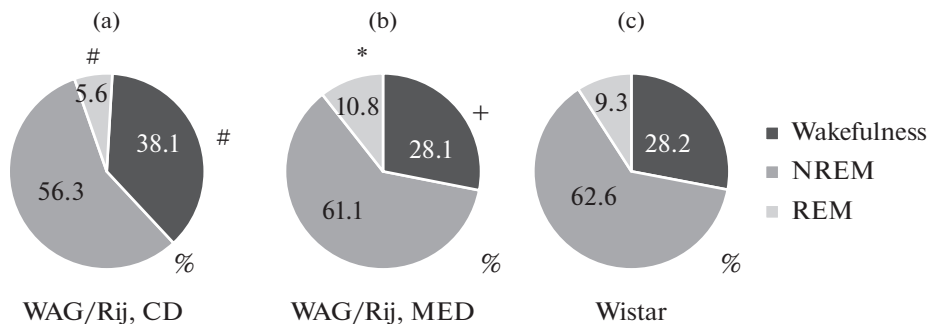


Рис. 1. Относительная длительность (%) стадий цикла сон–бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями перинатально потреблявшими МОД и КД, и у крыс Wistar. (a) – крысы линии WAG/Rij, КД; (b) – крысы линии WAG/Rij, МОД; (c) – крысы Wistar. * $p < 0.05$, + $0.05 < p < 0.1$ (тенденция) по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД. # $0.05 < p < 0.1$ (тенденция) по сравнению с крысами Wistar. CD – КД, MED – МОД. Wakefulness – бодрствование, NREM – медленноволновый сон, REM – быстрый сон.

Дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что МОД матери оказывает значимое влияние на число ПБВ [$F_{(1,14)} = 9.5$, $p < 0.01$] и незначимое на среднюю длительность ПБВ [$F_{(1,14)} = 0.02$, $p = 0.9$] у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. У потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, число ПБВ было меньше, чем у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД, но больше, чем у потомства крыс Wistar аналогичного возраста (рис. 2).

Установлено, что число ПБВ отрицательно коррелирует с длительностью быстрого сна ($R = -0.42$, $p < 0.05$) (рис. 3).

Статистический анализ (ANOVA) показал, что МОД матери оказывает значимое влияние на число эпизодов бодрствования [$F_{(2,20)} = 6.4$, $p < 0.01$], медленноволнового сна [$F_{(2,20)} = 3.7$, $p = 0.04$] и быстрого сна [$F_{(2,20)} = 6.9$, $p < 0.01$] (рис. 4).

Число эпизодов бодрствования у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявших МОД и крыс Wistar значимо не отличалось. МОД матери по сравнению с КД вызывал тенденцию к уменьшению числа эпизодов бодрствования. У потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД, число эпизодов бодрствования было значимо больше, чем у крыс Wistar. Число эпизодов медленноволнового сна у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было значимо больше по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, и по сравнению с крысами Wistar. Различия числа эпизодов быстрого сна у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, и крыс Wistar было незначимым. У потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД и крыс Wistar, число эпизодов быстрого сна было значимо больше, чем у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД (рис. 4).

МОД матери не оказывала значимого влияния на общую длительность (мин) эпизодов стадий цикла сон–бодрствования [$F_{(2,20)} \leq 1.7$, $p \geq 0.2$].

Статистический анализ (ANOVA) показал, что у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД, по сравнению с потомством крыс Wistar число переходов от медленноволнового сна к бодрствованию больше [$F_{(1,13)} = 18.63$, $p < 0.001$], а число переходов от медленноволнового сна к парадоксаль-

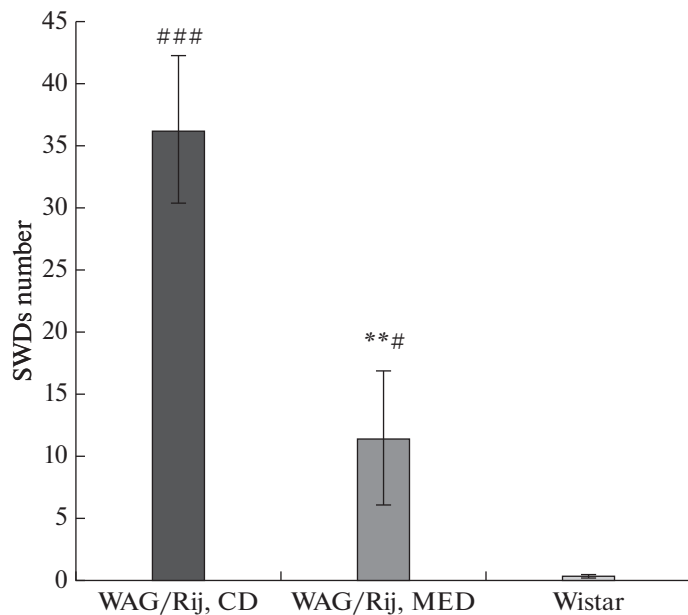


Рис. 2. Число ПВР у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями потреблявших МОД и КД, и у крыс Wistar. $**p < 0.01$ по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД. $\#p < 0.05$, $###p < 0.001$ по сравнению с крысами Wistar. SWDs number – число ПВР. CD – КД, MED – МОД.

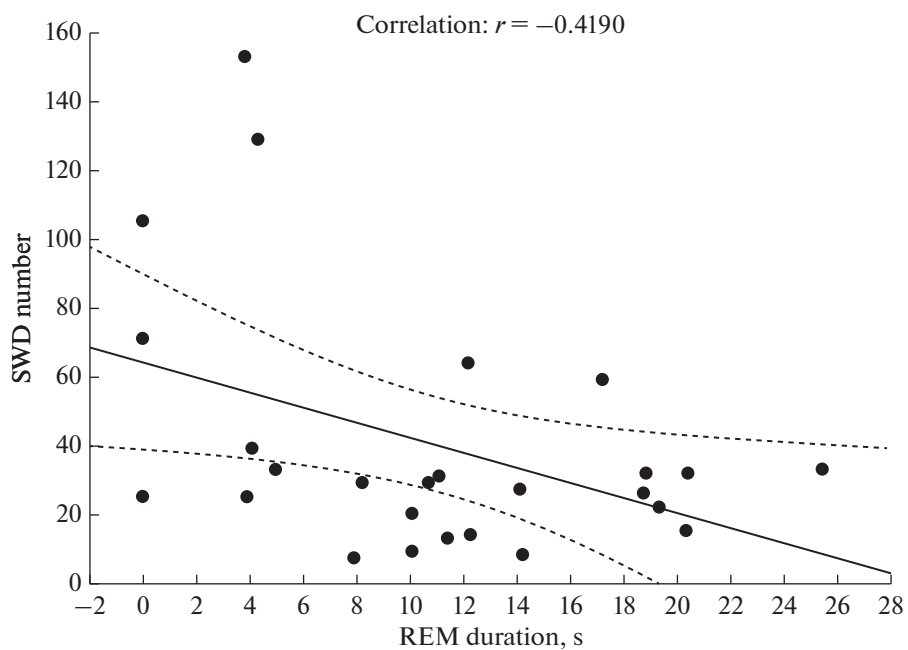


Рис. 3. Связь между числом ПВР и длительностью быстрого сна. SWD number – число ПВР; REM duration – длительность быстрого сна, с.

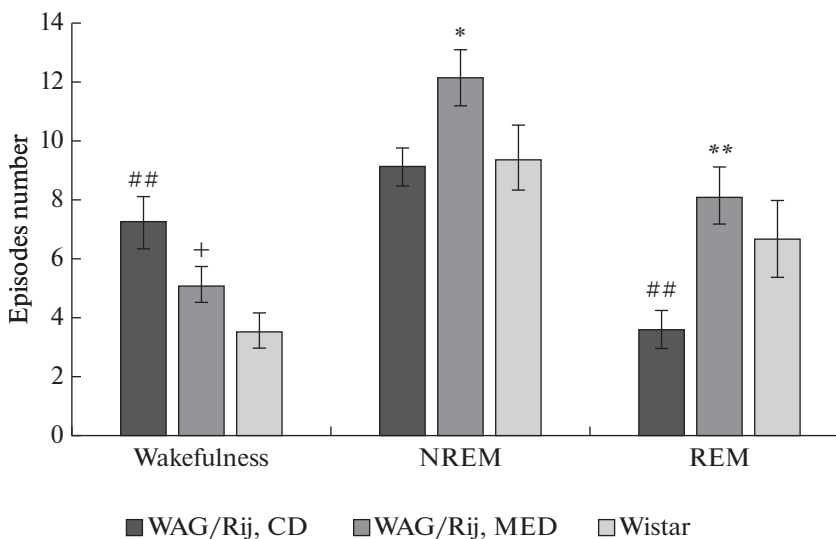


Рис. 4. Число эпизодов стадий цикла сон–бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, и крыс Wistar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, ## $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar.

ному – меньше [$F_{(1,13)} = 8.34$, $p = 0.01$]. МОД матери вызывала у потомства крыс линии WAG/Rij уменьшение числа переходов от медленноволнового сна к бодрствованию [$F_{(1,13)} = 18.63$, $p < 0.001$], а также увеличение числа переходов от медленноволнового сна к парадоксальному [$F_{(1,13)} = 7.44$, $p = 0.02$]. При этом различия между крысами линии WAG/Rij, рожденными матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с потомством крыс Wistar по этим показателям становились незначимыми (рис. 5).

За медленноволновым сном в большинстве случаев следует промежуточный сон, который переходит в быстрый сон или бодрствование.

Длительность промежуточной стадии сна у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД, значительно больше, чем у неэпилептических крыс Wistar. У потомства крыс, матери которых потребляли МОД, по сравнению с КД, имеется тенденция к уменьшению длительности промежуточной стадии сна (рис. 6).

Анализ усредненной спектральной плотности мощности сонных веретен показал, что МОД матери по сравнению с КД уменьшает спектральную плотность мощности сонных веретен в стадии медленноволнового сна у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Она становится значительно ближе к спектральной плотности мощности частот сонных веретен у неэпилептических крыс Wistar, особенно на дельта- и тета-частотах (рис. 7).

Сонные веретена у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД и МОД, и у крыс Wistar также различаются по амплитуде. Амплитуда сонных веретен у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, значительно меньше, чем у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД, и незначимо отличается от амплитуды сонных веретен у крыс Wistar. Значимого влияния МОД матери на коэффициент асимметрии сонных веретен не выявлено (табл. 1).

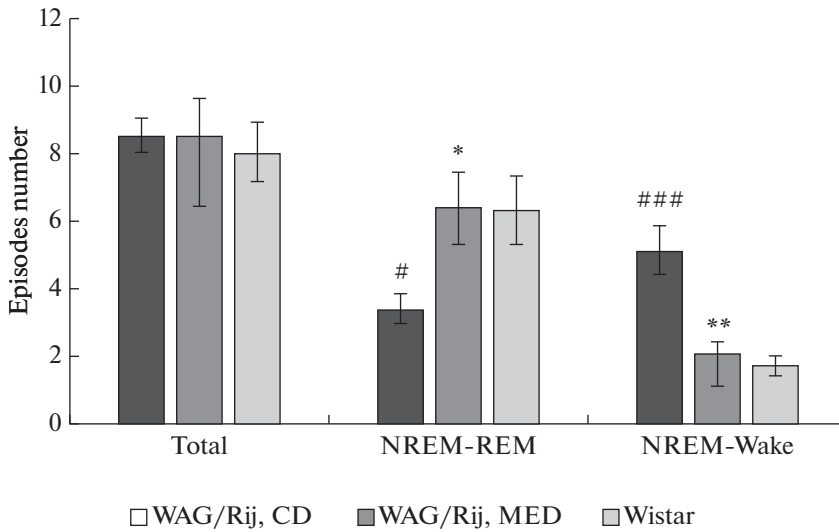


Рис. 5. Число переходов от медленноволнового сна к быстрому сну и бодрствованию у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, и крыс Wistar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ по сравнению с крысами Wistar. Transitions number – число переходов. Total – общее число переходов. NREM-REM – переходы от медленноволнового сна к быстрому сну. NREM-Wake – переходы от медленноволнового сна к бодрствованию.

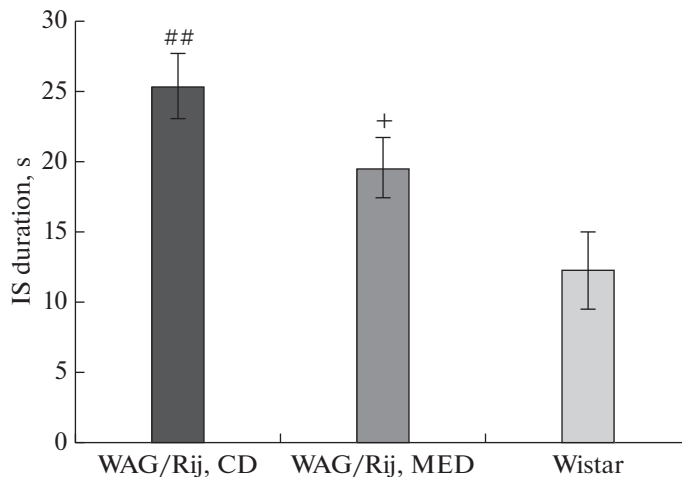


Рис. 6. Длительность промежуточной стадии сна у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, и крыс Wistar. + $0.05 < p < 0.1$ (тенденция) по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, ## $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar. IS duration, s – длительность промежуточной стадии, с. WAG/Rij, CD – потомство крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, WAG/Rij, MED – потомство крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД.

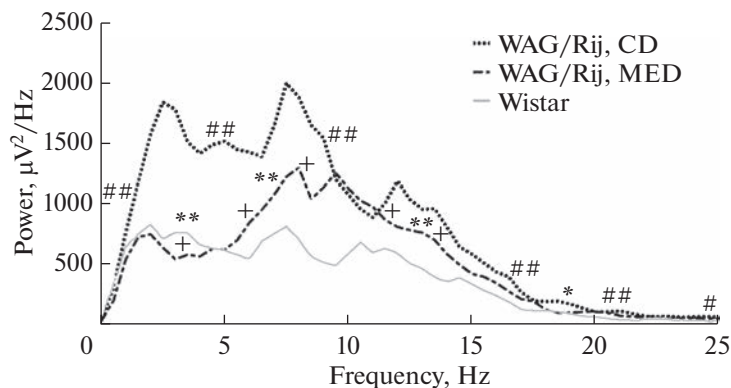


Рис. 7. Усредненные спектры мощности сонных веретен у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД и КД, и крыс Wistar, вычисленные методом Уэлча с применением быстрого преобразования Фурье. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ по сравнению с потомством матерей, потреблявших КД, на частотах 1.5–6, 7, 14, 19 Гц. + $p < 0.05$ по сравнению с крысами Wistar на частотах 3, 6, 7.5–11, 13 Гц; ## $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar на частотах 2–10, 17, 21 Гц, Power, $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ – спектральная плотность мощности, $\text{мкВ}^2/\text{Гц}$; Frequency, Hz – частота, Гц.

На примере двух крыс линии WAG/Rij, мать одной из них потребляла КД, а другой МОД в перинатальном периоде, продемонстрированы различия, зависящие от диеты матери, между разрядами в стадии спокойного бодрствования и между сонными веретенами во время медленноволнового сна во фронтальной коре мозга (рис. 8).

У потомства крыс WAG/Rij, матери которых потребляли КД, на ЭЭГ, в основном, присутствуют зрелые ПВР (рис. 8а, 1), являющиеся спонтанно возникающей генерализованной ритмической активностью, состоящей из чередующихся пиков и волн, в которых выделяют четыре компонента (рис. 8а, 2). Вейвлет-спектрограмма отражает частотно-временные характеристика ПВР: начало ПВР на частоте 12 Гц, которая быстро, в течение приблизительно 0.5 с, уменьшается. Далее на протяжении нескольких секунд ПВР имеет стабильную частоту 7–8 Гц. У взрослого потомства крыс линии WAG/Rij МОД матери значительно уменьшает число зрелых ПВР (см. рис. 2), которые замещаются незрелыми разрядами. В незрелом разряде (рис. 8с, 1) перемежаются пик-волновые комплексы, состоящие из четырех компонентов, и осцилляции, напоминающие сонные веретена, состоящие из двух компонентов (рис. 8с, 2). Средняя амплитуда и коэффициент асимметрии незрелого разряда значительно меньше, чем у зрелого ПВР. Вейвлет-спектрограмма разряда демонстрирует неустойчивую частоту незрелого разряда (рис. 8с, 3).

Таблица 1. Амплитуда и коэффициент асимметрии сонных веретен у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, КД и у крыс Wistar

Группа крыс	Амплитуда, мкВ	Коэффициент асимметрии, %
WAG/Rij, КД	517.13 ± 57.9 ^{##}	56.25 ± 1.49
WAG/Rij, МОД	314.75 ± 24.75 ^{**}	55.88 ± 1.91
Wistar	267.14 ± 21.53	54.71 ± 2.07

Средние значения ± ошибка среднего ($M \pm m$). ** $p < 0.01$ по сравнению с потомством матерей, потреблявших КД; ## $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar.

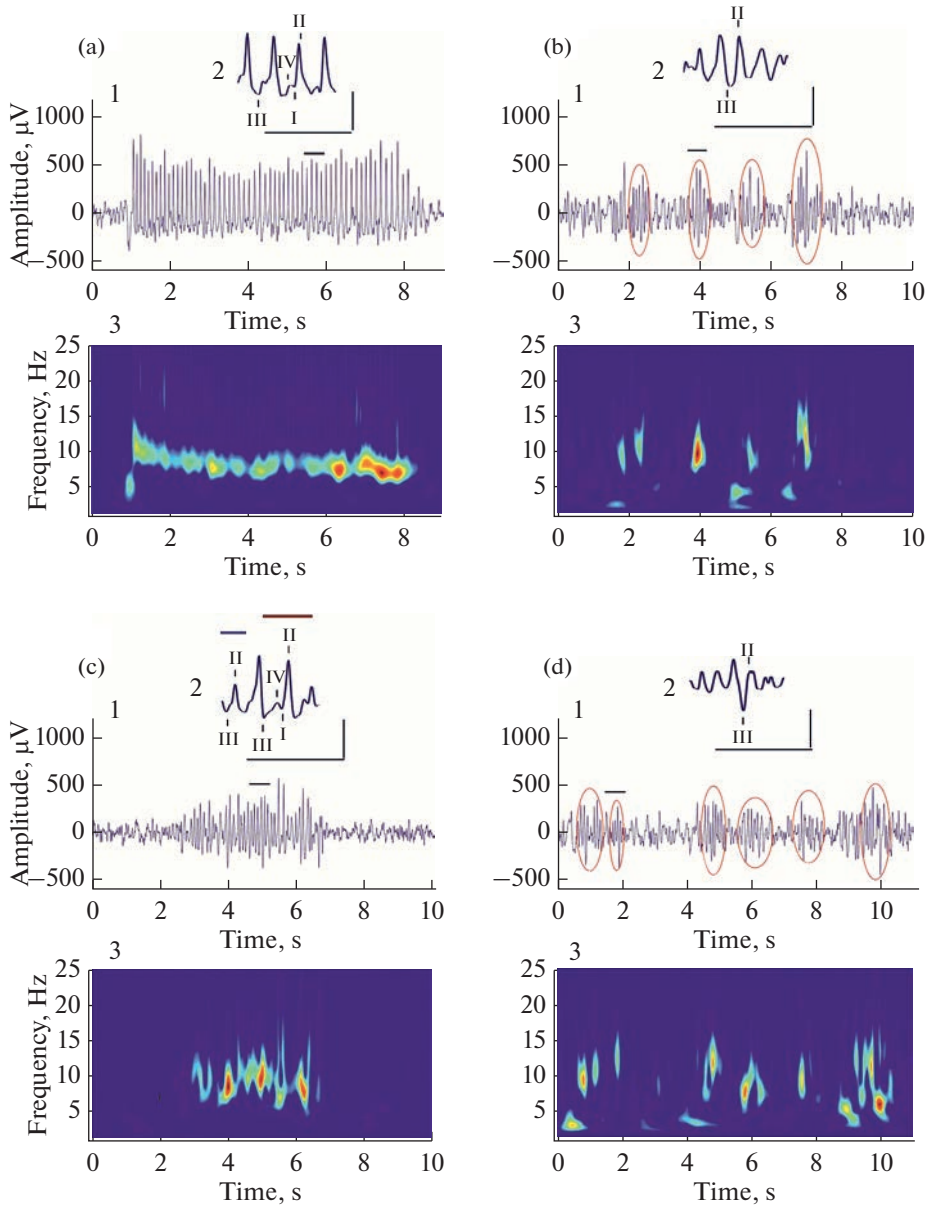


Рис. 8. Разряды в спокойном бодрствовании и фрагменты медленноволнового сна с веретенами во фронтальной коре у двух крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, одна из которых потребляла КД (рис. 8a, b), а другая – МОД (рис. 8c, d). 1 – зрелый ПВР; (c) – незрелый разряд; (b), (d) – медленноволновый сон (веретена отмечены красными эллипсами). 1 – разряд/медленноволновый сон; 2 – фрагмент разряда/сонного веретена, представленный на увеличенной по времени шкале (отмечен черной горизонтальной линией над ЭЭГ) с целью иллюстрации их морфологии; над фрагментом незрелого разряда синей чертой отмечена часть, имеющая два компонента, красной – четыре компонента: I – ранний позитивный переходный процесс (ранний ППП), II – пик 2, III – поздний ППП, IV – волна; 3 – вейвлет-спектрограмма разряда/медленноволнового сна. Увеличенная шкала: время 500 мс (абсцисса), амплитуда 500 мкВ (ордината). Amplitude, μV – амплитуда, мкВ; Frequency, Hz – частота, Гц; Time, s – время, с.

Медленноволновый сон у крысы линии WAG/Rij, мать которой потребляла КД (рис. 8b, 1), отличается от медленноволнового сна крысы, мать которой потребляла МОД (рис. 8d, 1). У обеих крыс веретена представляют осцилляции, имеющие только два компонента: пик, менее острый, чем у ПВР (рис. 8b, 2; d, 2) и поздний ППП. У крысы линии WAG/Rij, мать которой потребляла МОД, сонные веретена имеют меньшую амплитуду (сравни рис. 8b, 1, 2 и d, 1, 2), что иллюстрирует усредненные данные, представленные в табл. 1.

У крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД, промежуточная стадия сна значительно чаще переходит в стадию бодрствования, чем в стадию быстрого сна (рис. 9), что свидетельствует о частом прерывании сна. Кроме того, у крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД, промежуточная стадия сна значительно длительнее, чем у крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД (сравни рис. 9, a, IS и b, IS, а также рис. 6).

У крысы линии WAG/Rij, мать которой потребляла КД, медленноволновый сон сменяется промежуточной стадией, а затем переходит в стадию бодрствования (рис. 9a). У крысы линии WAG/Rij, мать которой потребляла МОД, медленноволновый сон переходит в промежуточную стадию, более короткую, чем у крысы, мать которой потребляла КД, а затем наступает стадия быстрого сна (рис. 9b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ длительности стадий цикла сон–бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД и МОД, и у крыс Wistar показал, что МОД матери по сравнению с КД увеличивает относительную длительность быстрого сна, она становилась равной длительности этой стадии у крыс Wistar. Длительность медленноволнового сна не изменялась. Наблюдали тенденцию к уменьшению длительности бодрствования. В данном исследовании показано, что МОД матери уменьшает число ПВР, но не влияет на их среднюю длительность. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными [4]. Данные об уменьшении числа ПВР и увеличении длительности быстрого сна под действием МОД указывают на существование связи между этими показателями, что подтверждается наличием отрицательной корреляции между числом ПВР и длительностью быстрого сна. Полученные нами результаты также согласуются с исследованиями, в которых относительная длительность быстрого сна у крыс линии WAG/Rij была меньше, чем у неэпилептических крыс ACI [12], а при введении кломипрамина [15] увеличение относительной длительности быстрого сна сопровождалось уменьшением числа ПВР. Связь между количеством быстрого сна и числом разрядов была установлена также в экспериментах с пилокарпином. Уменьшение быстрого сна наблюдалось у модели эпилепсии у крыс Wistar, вызванной пилокарпином, провоцирующим возникновение разрядов. Пилокарпин вызывает усиление перекисного окисления липидов и выброс провоспалительных цитокинов в коре головного мозга у крыс, что, как полагают авторы, приводит к повышению возбудимости коры и к понижению порога возникновения эпилептических разрядов [16]. Таким образом, нормализация относительного количества быстрого сна у потомства у крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, по-видимому, связана с уменьшением числа ПВР, вызываемых МОД.

Число эпизодов быстрого сна у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и крыс Wistar близко по величине и значимо больше, чем у потомства крыс, матери которых потребляли КД. Длительность эпизодов значимо не изменялась независимо от того, потребляли ли матери в перинатальном периоде КД или МОД, а также по сравнению с крысами Wistar. Это приводит к предположению о том, что увеличение длительности быстрого сна у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с

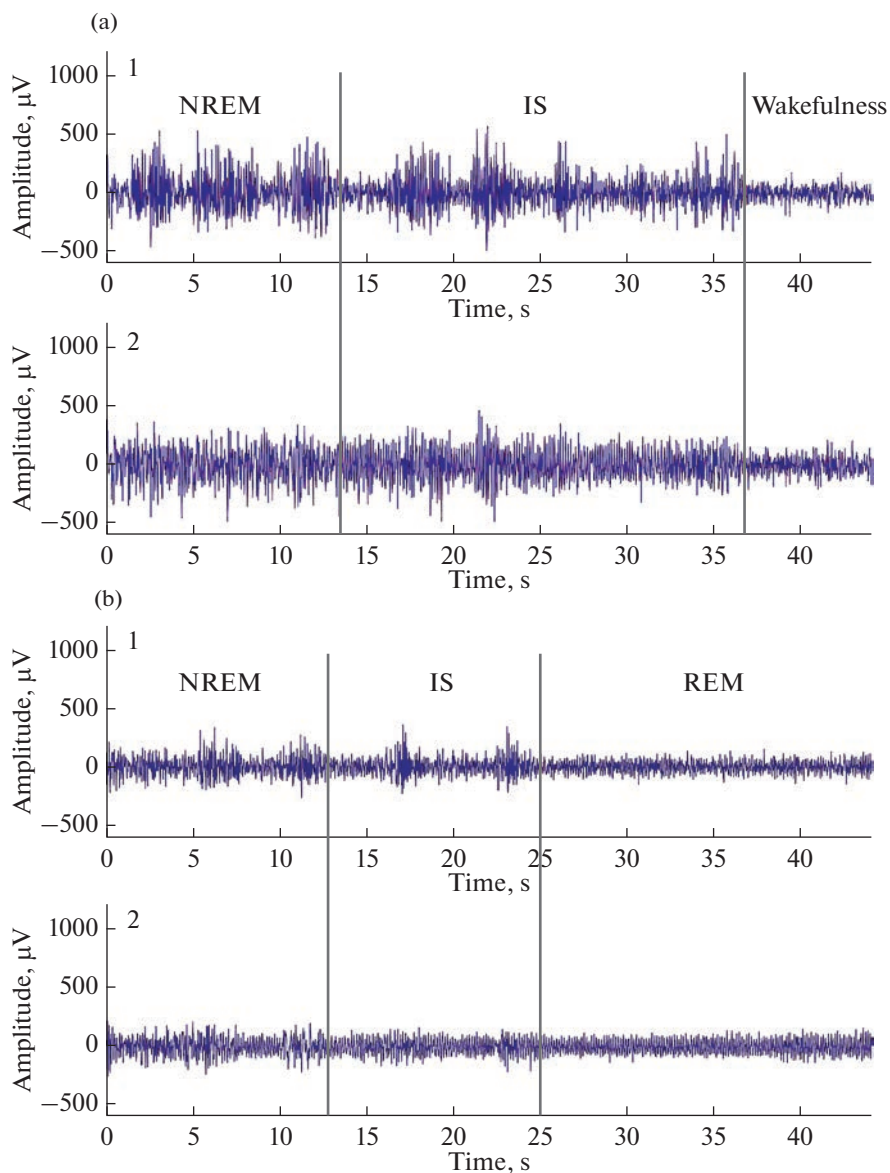


Рис. 9. Примеры перехода от медленноволнового к промежуточному сну и затем к бодрствованию (а) или быстрому сну (б) у крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли КД и МОД в перинатальном периоде. Стадии сна разделены красными вертикальными линиями. (а) – крыса, мать которой потребляла КД. (б) – крыса, мать которой потребляла МОД. 1 – фронтальная кора, 2 – окципитальная кора. NREM – медленноволновой сон, IS – промежуточный сон, Wakefulness – бодрствование, REM – быстрый сон.

КД, происходит за счет увеличения числа их эпизодов. Нами показано, что число переходов медленноволнового сна в быстрый сон по сравнению с числом переходов в бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, значительно больше по сравнению с потомством, матери которых по-

требляли КД. При этом длительность промежуточной стадии сна имеет тенденцию к уменьшению у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД в перинатальном периоде, по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, и у крыс Wistar. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о том, что у крыс линии WAG/Rij переход от медленноволнового сна к быстрому сну происходит значительно реже, чем у крыс Wistar, а длительность промежуточной стадии сна увеличена [11]. Увеличение числа эпизодов медленноволнового сна, за которым следует быстрый сон и тенденция к уменьшению длительности промежуточного сна у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, свидетельствует о нормализации перехода от медленноволнового к быстрому сну, что приводит к увеличению относительной длительности быстрого сна.

Известно, что ПВР и сонные веретена являются результатом таламокортикальных взаимодействий. Однако они запускаются разными структурами: ПВР – глубокими слоями соматосенсорной коры [18–22]; сонные веретена – ретикулярным ядром таламуса [23, 27, 36]. Поэтому изменение работы таламокортикальной системы под воздействием МОД матери может приводить как к снижению числа ПВР, так и изменять характеристики сонных веретен в медленноволновом сне, что было продемонстрировано в настоящей работе.

В усредненных спектрах мощности частот сонных веретен у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и у крыс Wistar спектры в дельта- и тета-диапазонах (от 1.5 до 7 Гц) более близки по величине, чем на частоте альфа-диапазона (8–13 Гц). Хотя принято считать, что у сонных веретен преобладают частоты 8–16 Гц [29], на вейвлет-спектрограммах (рис. 8) мы видим увеличенную мощность в дельта- и тета-диапазоне частот одновременно с альфа- и бета-частотами. Аналогичная увеличенная мощность в дельта- и тета-диапазоне показана в работе других авторов [29]. Мы не рассматриваем дельта-волны медленноволнового сна в данной работе отдельно. Однако данные о дельта-составляющих веретен, полученные нами, дают основание предполагать, что дельта-волны медленноволнового сна у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, также приближаются по своей амплитуде к дельта-волнам у неэпилептических крыс Wistar. Несмотря на то, что относительная длительность медленноволнового сна под влиянием МОД матери у потомства крыс линии WAG/Rij значительно не изменяется, структура ЭЭГ медленноволнового сна существенно изменяется. В работе [29] показано, что у неэпилептических крыс Wistar сонные веретена имеют частоту, отличающуюся от частоты веретен у крыс линии WAG/Rij. Мы показали, что в медленноволновом сне у крыс линии WAG/Rij значительно изменяется спектр мощности и амплитуда веретен. Они становятся близкими к спектру мощности и амплитуде веретен неэпилептических крыс Wistar, что свидетельствует об улучшении качества медленноволнового сна. Как известно, улучшение качества медленноволнового сна способствует улучшению памяти [37]. Мы можем предположить, что МОД матери во время перинатального периода вызывает не только нормализацию цикла сон–бодрствование, но может также вызвать улучшение когнитивных функций у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, нарушения которых были обнаружены ранее [38, 39]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы проверить это предположение.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что МОД матери вызывает у потомства крыс линии WAG/Rij стойкое подавление симптомов абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии, что сопровождается повышением экспрессии гена ионного канала HCN1 в соматосенсорной коре мозга – зоне генерации ПВР [40]. Каналопатия, в частности уменьшение экспрессии HCN1, считается ключевым механизмом патогенеза абсансной эпилепсии у крыс линии WAG/Rij [41]. Инте-

ресно, что МОД матери вызывает такое же повышение экспрессии HCN1 у крыс линии WAG/Rij, как и длительное хроническое введение этосуксимида – антиабсансного препарата первого выбора [42, 43]. Это позволяет предположить, что МОД матери на ранних стадиях онтогенеза препятствует снижению экспрессии HCN1 в соматосенсорной коре у потомства крыс линии WAG/Rij, предотвращая повышение возбудимости в этой области мозга и, тем самым, генерацию ПВР. Другими словами, предполагается, что МОД матери в перинатальном периоде нормализует функционирование кортико-таламо-кортикальной системы, что приводит не только к уменьшению числа ПВР, но и нормализации характеристик цикла сон–бодрствование и сонных веретен у потомства крыс линии WAG/Rij.

Тот факт, что МОД матери подавляет коморбидную депрессию и увеличивает длительность быстрого сна у крыс линии WAG/Rij, на первый взгляд, не согласуется с общепринятой точкой зрения, свидетельствующей о том, что депрессия у людей и животных сопровождается увеличением длительности парадоксального сна, а антидепрессанты, приводящие к уменьшению депрессивных расстройств, уменьшают длительность парадоксального сна [44]. Однако сопоставление эффектов антидепрессантов различных механизмов действия показало, что для проявления антидепрессантного действия подавление парадоксального сна не является обязательным [45]. Возможно, что кажущаяся парадоксальность эффекта МОД матери (антидепрессантное действие, сопровождающееся увеличением парадоксального сна) обусловлена эпигенетическим механизмом действия (воздействие на метилирование ДНК, приводящее к изменению экспрессии генов). Необходимы дальнейшие более глубокие исследования для выяснения эпигенетических механизмов антидепрессантного эффекта МОД.

Таким образом, нами впервые показано, что у потомства крыс WAG/Rij, матери которых потребляли МОД, происходит нормализация относительной длительности стадий цикла сон–бодрствование, длительности промежуточного сна, спектров мощности сонных веретен и их амплитуды. Предполагается, что этот благоприятный эффект МОД матери на цикл сон–бодрствование у потомства крыс линии WAG/Rij является, прежде всего, результатом изменения функционирования таламокортикальной системы, снижения возбудимости соматосенсорной коры мозга и уменьшения признаков абсансной эпилепсии предположительно за счет повышения экспрессии гена ионного канала HCN1, критически влияющего на возбудимость соматосенсорной коры.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00327-А).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. – Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными. Экспериментальные протоколы утверждены этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 5 от 02.12.2020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Алексею Александровичу Морозову, старшему научному сотруднику Института радиотехники и электроники РАН им. В.А. Котельникова, за предоставление программ Hilb4 и Procedure, используемых при анализе данных, и консультативную помощь в ходе работы над статьей. Авторы выражают благодарность Екатерине Александровне Федосовой, младшему научному сотруднику Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, за проведение операций по вживлению электродов животным и помощь в записи ЭЭГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarkisova K, van Luijelaar 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>
2. *Kobow K, Blümcke I* (2012) The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia* 53: 11–20.
<https://doi.org/10.1111/epi.12031>
3. *Vialou V, Feng J, Robison AJ, Nestler EJ* (2013) Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 59–87.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134540>
4. *Sarkisova KY, Gabova AV, Fedosova EA, Shatskova AB* (2020) Gender-dependent effect of maternal methyl-enriched diet on the expression of genetic absence epilepsy and comorbid depression in adult offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 494: 244–247.
<https://doi.org/10.1134/S0012496620050075>
5. *Lahtinen A, Puttonen S, Vanttola P, Viitasalo K, Sulkava S, Pervjakova N, Joensuu A, Salo P, Toivola A, Härmä M, Milani L, Perola M, Paunio T* (2019) A distinctive DNA methylation pattern in insufficient sleep. *Sci Rep* 9: 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-38009-0>
6. *Colavito V, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Pifferi F, Lamberty Y, Bentivoglio M, Bertini G* (2013) Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci* 7: 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00106>
7. *Kansagra S* (2020) Sleep disorders in adolescents. *Pediatrics* 145(Suppl 2): S204–S209.
<https://doi.org/10.1542/PEDS.2019-20561>
8. *Fogel SM, Smith CT* (2011) The function of the sleep spindle: A physiological index of intelligence and a mechanism for sleep-dependent memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1154–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.003>
9. *Al-Biltagi MA* (2014) Childhood epilepsy and sleep. *World J Clin Pediatr* 3: 45.
<https://doi.org/10.5409/wjcp.v3.i3.45>
10. *Dinopoulos A, Tsirouda MA, Bonakis A, Pons R, Pavlopoulou ID, Tzoumakis K* (2018) Sleep architecture and epileptic characteristics of drug naïve patients in childhood absence epilepsy spectrum. A prospective study. *Seizure* 59: 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.04.021>
11. *Gandolfo G, Romettino S, Gottesmann C, Van Luijelaar G, Coenen A* (1990) Genetically epileptic rats show a pronounced intermediate stage of sleep. *Physiol Behav* 47: 213–215.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90063-A](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90063-A)
12. *van Luijelaar G, Bikbaev A* (2007) Midfrequency cortico-thalamic oscillations and the sleep cycle: Genetic, time of day and age effects. *Epilepsy Res* 73: 259–265.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.11.002>
13. *Sitnikova E* (2021) Sleep disturbances in rats with genetic predisposition to spike-wave epilepsy (WAG/Rij). *Front Neurol* 12: 1–6.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.766566>
14. *van Luijelaar G, Wilde M, Citraro R, Scicchitano F, van Rijn C* (2012) Does antiepileptogenesis affects sleep in genetic epileptic rats? *Int J Psychophysiol* 85: 49–54.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2011.09.010>

15. Kovács Z, Czurkó A, Kékesi KA, Juhász G (2012) Neonatal tricyclic antidepressant clomipramine treatment reduces the spike-wave discharge activity of the adult WAG/Rij rat. *Brain Res Bull* 89: 102–107.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.010>
16. Mohammed HS, Khadrawy YA (2021) Electrophysiological and neurochemical evaluation of the adverse effects of REM sleep deprivation and epileptic seizures on rat's brain. *Life Sci* 273: 119303.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119303>
17. Grubar JC (1983) Sleep and mental deficiency. *Rev Electroencephal Neurophysiol Clin* 13: 107–113.
[https://doi.org/10.1016/S0370-4475\(83\)80068-9](https://doi.org/10.1016/S0370-4475(83)80068-9)
18. Meeren HKM, Pijn JPM, Van Luijckelaar 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>
19. Polack P-O, Guillemain I, Hu E, Deransart C, Depaulis A, Charpier S (2007) Deep layer somatosensory cortical neurons initiate spike-and-wave discharges in a genetic model of absence seizures. *J Neurosci* 27: 6590–6599.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0753-07.2007>
20. Lütjohann A, Van Luijckelaar G (2012) The dynamics of cortico-thalamo-cortical interactions at the transition from pre-ictal to ictal LFPs in absence epilepsy. *Neurobiol Dis* 47: 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.023>
21. Westmijse I, Ossenblok P, Gunning B, van Luijckelaar G (2009) Onset and propagation of spike and slow wave discharges in human absence epilepsy: A MEG study. *Epilepsia* 50: 2538–2548.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02162.x>
22. Sarrigiannis PG, Zhao Y, He F, Billings SA, Baster K, Rittley C, Yianni J, Zis P, Wei H, Hadjivasiliou M, Grunewald R (2018) The cortical focus in childhood absence epilepsy: evidence from nonlinear analysis of scalp EEG recordings. *Clin Neurophysiol* 129(3): 602–617.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.11.029>
23. Fernandez LMJ, Lüthi A (2020) Sleep spindles: Mechanisms and functions. *Physiol Rev* 100: 805–868.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2018>
24. Steriade M, Deschenes M (1984) The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res Rev* 8: 1–63.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(84\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0165-0173(84)90017-1)
25. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262(5134): 679–685.
<https://doi.org/10.1126/science.8235588>
26. Kostopoulos G, Gloor P, Pellegrini A, Gotman J (1981) A study of the transition from spindles to spike and wave discharge in feline generalized penicillin epilepsy: Microphysiological features. *Exp Neurol* 73: 55–77.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90045-5)
27. Leresche N, Lambert RC, Errington AC, Crunelli V (2012) From sleep spindles of natural sleep to spike and wave discharges of typical absence seizures: Is the hypothesis still valid? *Pflugers Arch* 463: 201–212.
<https://doi.org/10.1007/s00424-011-1009-3>
28. Kozák G, Földi T, Berényi A (2020) Spike-and-wave discharges are not pathological sleep spindles, network-level aspects of age-dependent absence seizure development in rats. 7(1): eNeuro 0253-19.2019.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0253-19.2019>
29. Sitnikova E, Hramov AE, Grubov V, Koronovsky AA (2014) Time-frequency characteristics and dynamics of sleep spindles in WAG/Rij rats with absence epilepsy. *Brain Res* 1543: 290–299.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.11.001>
30. 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: 245–252.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00893-y>
31. Sitnikova EY, Smirnov KS, Grubov VV, Hramov AE (2019) Diagnostic principles of immature epileptic (proepileptic) EEG activity in rats with genetic predisposition to absence epilepsy. *Informatsionno-Upravliaiushchie Sist* 2019: 89–97.
<https://doi.org/10.31799/1684-8853-2019-1-89-97>
32. Sarkisova KY, Kulikov MA (2006) Behavioral characteristics of WAG/Rij rats susceptible and non-susceptible to audiogenic seizures. *Behav Brain Res* 166: 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.024>
33. Surina NM, Ashapkin VV, Merzalov IB, Perepelkina OV, Fedotova IB, Pavlova GV, Poletaeva II (2014) Audiogenic seizure proneness after methyl-enriched diet in ontogeny. *Dokl Biol Sci* 454:

- 62–64.
<https://doi.org/10.1134/S0012496614010219>
34. *Sarkisova KY, Gabova AV* (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17(7): e12477.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12477>
 35. *Sarkisova KY, Gabova AV, Kulikov MA, Fedosova EA, Shatskova AB, Morosov 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>
 36. *Gobbo D, Scheller A, Kirchhoff F* (2021) From physiology to pathology of cortico-thalamo-cortical oscillations: astroglia as a target for further research. *Front Neurol* 12: 1–26.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661408>
 37. *Zhang Y, Gruber R* (2019) Can slow-wave sleep enhancement improve memory? A review of current approaches and cognitive outcomes. *Yale J Biol Med* 92: 63–80.
 38. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KYu* (2022) Ethosuximide improves cognitive flexibility during reversal learning in WAG/Rij rats with absence epilepsy and comorbid depression. *J Evol Biochem Physiol* 58: 98–116.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022010100>
 39. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KYu* (2021) Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 51: 501–512.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01097-z>
 40. *Sarkisova K, Fedosova E, Shatskova A, Gabova A, Rudenok M, Stanishevskaya V, Slominsky P* (2021) Maternal methyl-enriched diet alters absence seizures, depression-like comorbidity and DNMT1, HCN1 and TH gene expression in adult offspring. 34th Int Epilepsy Congress Virtual, 2021. *Epilepsia. Special Issue. S3*. 62: 135–136.
<https://doi.org/10.1111/epi.17079>
 41. *Strauss U, Kole MHP, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA* (2004) An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19: 3048–3058.
<https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03392.x>
 42. *Sarkisova K, van Luijelaar G* (2022) The impact of early-life environment on absence epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *IBRO Neurosci Rep* 13: 436–438.
<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.10.012>
 43. *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>
 44. *Palagini L, Baglioni C, Ciaparelli A, Gemignani A, Riemann D* (2013) REM sleep dysregulation in depression: state of the art. *Sleep Med Rev* 17: 377–390.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2012.11.001>
 45. *Steiger A, Pawlowski M, Kimura M* (2015) Sleep electroencephalography as a biomarker in depression. *Chrono Physiol Ther* 5: 15–25.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030607>

Maternal Methyl-Enriched Diet Normalizes Characteristics of the Sleep–Wake Cycle and Sleep Spindles in Adult Offspring of WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy

A. V. Gabova^a, * and K. Yu. Sarkisova^a

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

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

It has been previously shown that the perinatal maternal methyl-enriched diet (MED) reduces the number of spike-wave discharges (SWDs) and behavioral symptoms of depression in the adult offspring of WAG/Rij rats. Epilepsy and depression are usually accompanied by disturbances in the sleep-wake cycle. SWDs and sleep spindles are different manifestations of thalamocortical activity. It is assumed that pathological alterations in the thalamocortical system that lead to SWD also change the sleep spindles. It is possible that the maternal MED has a positive effect not only on the SWD, but also on the sleep spindles. The purpose of this work is to find out whether maternal MED affects the sleep-wake cycle and whether it changes the characteristics of sleep spindles in adult off-

spring of WAG/Rij rats. It has been shown that in the offspring of WAG/Rij rats born to mothers who consumed MED during the perinatal period compared to the offspring whose mothers consumed control diet (CD), the relative duration of REM sleep significantly increases. In the offspring of WAG/Rij rats whose mothers consumed MED, the relative duration of REM sleep and the number of its episodes become indistinguishable from those in non-epileptic Wistar rats. Maternal MED also increases the number of transitions from slow-wave to REM sleep. There is a significant negative correlation between the number of SWDs and the duration of REM sleep. Maternal MED compare to CD decreased the amplitude and spectral power density of sleep spindles. They became much closer to the amplitude and spectral power of density of sleep spindles in Wistar rats. Thus, maternal MED normalizes characteristics of the sleep-wake cycle and sleep spindles in adult offspring of WAG/Rij rats. We hypothesize that this positive effect is associated with a reduction in the symptoms of absence epilepsy and comorbid depression, as well as with the correction of the activity of the thalamocortical system.

Keywords: methyl-enriched diet, absence epilepsy, genetic model, WAG/Rij rat, spike-wave discharge, sleep–wake cycle, rapid eye movement (REM) sleep, slow-wave (non-REM) sleep, intermediate sleep (IS), sleep spindle

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОСТНОГО ГОМЕОСТАЗА
ПРИ РАЗВИТИИ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ
БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2023 г. Н. А. Шабалдин¹, *, А. В. Синицкая²,
А. В. Шабалдин^{1,2}, Р. А. Мухамадияров²

¹ Кемеровский государственный медицинский университет МЗ РФ, Кемерово, Россия

² НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

*E-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Патогенез ряда заболеваний характеризуется нарушением регуляции костного гомеостаза с прогрессирующим развитием остеодеструкции. Вместе с тем ведется активное изучение механизмов, приводящих к смещению баланса остеорепаративного и остеорезорбционного направления остеогенеза. Определение молекулярно-клеточных паттернов, влияющих на динамику изменений костного метаболизма, является значимой задачей в среде широкого круга специалистов. Такие исследовательские работы позволяют предложить алгоритмы таргетного терапевтического воздействия на различные ключевые звенья патогенеза остеодеструкции. В проведенном исследовании выполнен анализ экспрессии генов, участвующих в поддержании костного гомеостаза, а также изучено изменение гистологической картины в экспериментальных условиях в зависимости от времени, прошедшего с момента индукции асептического некроза. Результаты работы отображали гетерогенность развития остеодеструкции в экспериментах на крысах линии Вистар при хирургически созданном очаге гипоперфузии головки бедренной кости на фоне повышения внутрисуставного давления. В первые две недели развития асептического некроза наиболее активно экспрессировался ген *hif1a*, который может рассматриваться с позиции триггера дальнейшего нарушения костного метаболизма. При этом экспрессия мРНК генов остеогенеза и остеорезорбции была снижена. Наиболее активные остеолитические процессы по данным электронной микроскопии, а также увеличение экспрессии генов индукции остеокластогенеза наблюдались на 6-й неделе эксперимента. Остеорепаративная направленность метаболизма костной ткани постепенно увеличивалась от начала исследования, и через 2 мес. после индукции аваскулярного некроза головки бедренной кости в образцах определялись активные остеобласты, усиление экспрессии генов костного матрикса и остеобластогенеза. Таким образом, развитие остеодеструкции является крайне гетерогенным процессом с динамически меняющимися в зависимости от времени молекулярными паттернами, определяющими активность сигнальных путей костного метаболизма.

Ключевые слова: остеодеструкция, ген *hif1a*, асептический некроз, провоспалительные цитокины

Гомеостаз костной ткани является динамическим процессом, сохраняющим баланс посредством функционирования большого количества разнообразных внутриклеточных и межклеточных сигнальных путей, направленных на регуляцию остеобластогенеза и остеокластогенеза [1]. При этом сигналинг костного метаболизма характеризуется значительной гетерогенностью: так, в нем участвуют системы рецептора активатора ядерного фактора каппа β , его лиганда и остеопротегерина (RANK–RANKL–OPG), канонический wnt (wingless)/b катенин, JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK (протеинкиназа, активируемая митогенами), фосфорилирование, а также большое количество разнообразных медиаторов [2–4].

В патогенезе ряда заболеваний, таких как ревматоидный, ювенильный идиопатический артриты, асептический некроз и остеохондропатия наблюдается смещение баланса регуляции процессов ремоделирования в сторону преобладания костной резорбции. Характер остеодеструкции во многом определяется природой той или иной нозологической формы, однако в большинстве случаев можно выделить стадийность течения патологии с активацией определенных молекулярно-клеточных регуляторных звеньев.

Ключевая роль в генезе асептического некроза и остеохондропатии головки бедренной кости принадлежит нарушению перфузии проксимального отдела бедра, при этом ишемический стресс, последующий за этим, может являться триггерным фактором нарушения метаболизма костной ткани [5]. Тканевая кислородная недостаточность приводит к повышению транскрипции гена гипоксией индуцированного фактора 1 (*hif1a*), который может транскрибироваться в большинстве клеток. Кислород-зависимая субъединица HIF-1 α является маркером острой тканевой гипоксии. Высокий уровень экспрессии *hif1a* реализует стресс-реакцию организма с преобладанием провоспалительных реакций, что может привести к дисбалансу биологического действия цитокинов [6].

Так, ряд исследований выявил повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов хондроцитами при развитии остеодеструкции, увеличение концентрации которых рассматривается как один из основных компонентов индукции дифференцировки остеокластов посредством сигнальной системы RANK–RANKL–OPG. Известно, что биологическое действие таких цитокинов как интерлейкин 1 β (IL-1 β), интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли α (TNF- α) направлено на усиление экспрессии лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа β (RANKL) на поверхности остеобластов и активированных Т-лимфоцитах [7]. В результате связывания лиганда (RANKL) и рецептора активатора ядерного фактора каппа β (RANK), находящегося на плазматической мембране преостеокластов, происходит транспорт ядерного фактора каппа β (NF- κ B) из цитоплазмы в ядро клетки с последующей транскрипцией генов дифференцировки зрелых остеокластов. Остеопротегерин (OPG) связывает свободный и мембранно-ассоциированный RANKL, тем самым препятствует его взаимодействию с RANK, ингибирует процесс созревания остеокластов из прогениторных клеток. Высокий уровень провоспалительных цитокинов приводит к преобладанию продуцирования RANKL, индукции остеокластогенеза, и, как следствие, усилению процессов остеолитического [8].

Тем не менее, активация тех или иных сигнальных путей и повышение концентрации регуляторных молекул во многом зависят от стадии течения асептического некроза, а также времени, прошедшего с момента начала заболевания.

Цель исследования: оценить динамику экспрессии генов, участвующих в поддержании костного гомеостаза, изменении гистологической картины в экспериментальных условиях при хирургической индукции асептического некроза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа проведена на 20 самцах крыс линии Вистар, массой тела 250 ± 25 г, в возрасте 3 мес. Экспериментальная часть работы с лабораторными животными проводилась на базе вивария, располагающегося в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово. Выведение крыс из эксперимента осуществлялось путем декапитации каждые 2 нед. по 4 особи в течение 2 мес.

Всем крысам проведены хирургические манипуляции по предложенной авторам модели [9]. Для этого на правом бедре, в проекции тазобедренного сустава, выполнялся хирургический доступ длиной до 2 см с последующим наложением плотной лигатуры из рассасывающегося шовного материала викрил вокруг шейки бедренной кости, иссечением надкостницы в проксимальном отделе и введением в полость сустава 1.5 мл 2%-ного раствора реополиглюкина. После выведения животных из эксперимента выполнялась экстирпация бедренных костей со стороны индукции асептического некроза и с условно-здоровой в качестве сравнения. Для подтверждения факта развития асептического некроза и степени остеодеструктивных изменений выполнены исследования макропрепарата, а также гистологическое исследование с использованием электронной микроскопии.

Тотальную РНК выделяли из шейки бедренной кости, пораженной асептическим некрозом, а также здоровой кости, с использованием набора RNeasyMicroKit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной РНК определяли на спектофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США).

Уровень экспрессии генов определяли методом кПЦР с обратной транскрипцией с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Праймеры были синтезированы на приборе ABI 3900 high-throughput DNA synthesiser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) компанией Евроген (Москва, Россия). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *actb*, *tbp*, *b2m* (табл. 1) в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ и выражали в виде кратного изменения относительно контрольных образцов. Скорректированные значения были представлены в виде тепловой карты (светло-зеленый, серый и сиреневый цвета отражали кратность изменения ≤ 0.50 , $0.51-1.99$ и ≥ 2.00 соответственно).

Для выполнения сканирующей электронной микроскопии эксплантированные образцы головок бедренных костей фиксировали в формалине в течение 24 ч, затем постфиксировали 1%-ным тетраоксидом осмия в 0.1 М фосфатном буфере и окрашивали 2%-ным раствором тетраоксида осмия в бидистиллированной воде в течение 48 ч. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, окрашивали 2%-ным уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-ном этаноле, обезвоживали 99.7%-ным изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 ч и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1 : 1 (6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60°C. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-II (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверх-

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в эксперименте

Ген	Последовательность/Референсный номер	Белок
<i>Il4</i>	Forward:5'-TGACC GGGAACGGTATCCA-3' Reverse:5'- GTTGCCGTAAGGACGTCTGG-3'	Интерлейкин-4
<i>Il6</i>	Forward:5'-AGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3' Reverse: 5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'	Интерлейкин-6
<i>Il1B</i>	Forward:5'-CCTCGTGCTGTCTGACCCAT-3' Reverse: 5'-GGTGGGTGTGCCGTCTTTCA-3'	Интерлейкин-1b
<i>Tnfa</i>	Forward: 5'-AGAGCCCCAATCTGTGTCC-3' Reverse: 5'-CCGCAATCCAGGCCACTACT-3'	Фактор некроза опухоли
<i>Tgfb</i>	Forward: 5'-ACTCCCCTGGCTTCTAGTGC-3' Reverse: 5'-GGGACTGGCGAGCCTTAGTT-3'	Трансформирующий ростовой фактор, бета-1
<i>Sp7</i>	Forward:5'-ACCCGAAGCGACCACTTGAG-3' Reverse:5'-GCTTCTTCTTCCCGACGCT-3'	Sp7 транскрипционный фактор (остерикс)
<i>Runx2</i>	Forward: 5'-GCTTCATTCGCCTCACAAACA-3' Reverse: 5'-TGGTCTCGGTGGCTGGTAGT-3'	Субъединица альфа-1 ядра-связывающего фактора
<i>Opn/spp1</i>	Forward: 5'-AAGCCAGCCAAGGACCAACTA-3' Reverse:5'-GCTTCTGAGATGGGTCAGGCT-3'	Остеопонтин
<i>Bmp2</i>	Forward: 5'-ACCCGCTGTCTTCTAGTGTTC-3' Reverse:5'- AGCAGCCTCAACTCAAACCTCG-3'	Костный морфогенетический белок 2
<i>Bglap</i>	Forward:5'-GTCCAAGCAGGAGGGCAGTAA-3' Reverse:5'-GTCACACACCTCCCTGTGA-3'	Остеокальцин
<i>Rankl</i>	Forward:5'-TGGAAGGTTTCGTGGCTCGAT-3' Reverse:5'-ATGGGAACCCGATGGGATGT-3'	Лиганд рецептора активатора ядерного фактора карра-В
<i>Alpl</i>	Forward:5'-TGCCTACTTGTGTGGCGTGA-3' Reverse:5'-ATGGACGTGACCTCGTTCCC-3'	Тканеспецифичная щелочная фосфатаза
<i>Hif1a</i>	Forward:5'-AACAAAACACGCAGCGAAGC-3' Reverse:5'-GCACCAAGCACGTCATAGGC-3'	Гипоксией индуцированный фактор 1
<i>b2m</i>	Forward:5'-GGTGACCGTGATCTTCTGGTG-3' Reverse: 5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCCAT-3'	Микроглобулин бета-2
<i>actb</i>	Forward:5'-ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3' Reverse: 5'-CCATACCACCATCACACCCT-3'	Актин
<i>tbp</i>	Forward:5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC -3' Reverse: 5'-TGGGTTATCGCACGCACCAT-3'	ТАТА-связывающий белок

ность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 15 кВ. Морфометрический анализ гистологических препаратов выполнен с использованием сетки Автандилова.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoftInc (США), версия 10.0 по правилам вариационной статистики. Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании имеют нормальное распределение, поэтому в дальнейшем расчеты производились методами параметрической статистики. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей (%). Количественные данные представляли в виде средней и стандартной ошибки ($M \pm m$). Сравнение значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках проводили с помощью критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Макропрепарат со стороны асептического некроза через 2 нед. после начала эксперимента характеризовался склерозированием головки бедренной кости без снижения высоты эпифиза в 100% случаев. Электронная микроскопия отобразила сохранение архитектоники костных трабекул без изменений их объема. Однако количество активных остеобластов было несколько снижено по сравнению с контралатеральной условно-здоровой конечностью. Также отмечалось снижение толщины гиалинового хряща, тем не менее, количество хондроцитов не изменялось (рис. 1).

Локальное снижение обогащения кислородом костной ткани приводит к усилению экспрессии гена гипоксией индуцированного фактора 1 (*hif1a*) через 2 нед. после индукции аваскулярного некроза. Изменение экспрессии гена *hif1a* является наиболее выраженным по отношению к другим исследуемым регуляторам метаболических путей в первые 2 нед. исследования. Известно, что *hif1a* участвует в регуляции транскрипции генов ангиогенеза, клеточного апоптоза, пролиферации, остеогенеза и др. [10]. Так, усиленная транскрипция гена *hif1a* может рассматриваться как пусковой фактор в изменении профиля мРНК и приводить к нарушению функционирования сигнальных путей, регулирующих костный гомеостаз.

Полуколичественная оценка уровней экспрессии генов представлена в табл. 2. Как видно из таблицы, наряду с увеличением экспрессии *hif1a* в первые 2 нед. индукции асептического некроза наблюдалась картина снижения активности остеогенной дифференцировки. Ингибированию остеобластогенеза могло способствовать снижение экспрессии одного из ключевых генов, регулирующего клеточный цикл дифференцировки и активации остеобластов транскрипционного фактора – *runx2*. Кроме того, наблюдалось угнетение транскрипции гена остеопонтина (*spp1*), кодирующего одноименный белок – одного из основных компонентов внеклеточного костного матрикса.

Следует отметить снижение экспрессии трансформирующего фактора роста (*tgfb*), кодирующего белок, связанный с ангиогенезом и остеогенезом. Наряду с этим не наблюдалось значимых изменений экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*il1b*, *tnfa*, *il6*), а экспрессия гена лиганда рецептора активатора ядерного фактора карра-В (*rankl*), как одного из основных компонентов сигнального пути остеокластогенеза, напротив, была снижена (табл. 2).

Через 1 мес. после хирургической индукции асептического некроза макропрепарат головки бедренной кости имел признаки склерозирования, высота эпифиза снижена. Гистологическое исследование отобразило истончение костных трабекул, увеличение количества активных остеокластов. Расположение хондроцитов гиалинового хряща беспорядочное. Кроме того, обнаруживались дистрофические изменения в зоне роста (рис. 2).

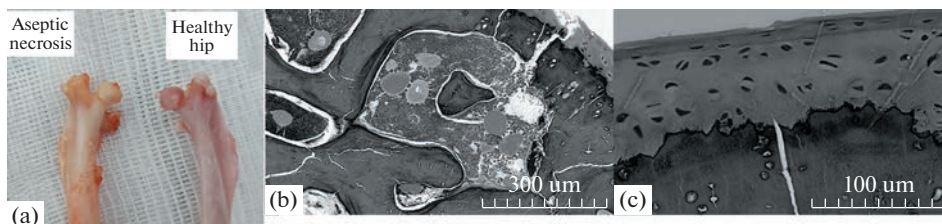


Рис. 1. (а) – Макропрепарат. (б) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 150$ – сохранение объема костных трабекул. (с) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 500$ – ядра хондроцитов упорядочены.

Таблица 2. Изменение экспрессии генов через 2 нед. с момента индукции асептического некроза

Ген	Контроль ($M \pm m$)	Некроз ($M \pm m$)
<i>bmp2</i>	19.3 \pm 3.3	3.9 \pm 0.4*
<i>alpl</i>	11.5 \pm 1.5	8.5 \pm 1.7
<i>hif1a</i>	0.1 \pm 0.001	1.7 \pm 0.2*
<i>rankl</i>	5.8 \pm 1.2	3.7 \pm 0.7
<i>runx2</i>	13.9 \pm 3.1	6.9 \pm 1.4
<i>sp7</i>	17.5 \pm 3.2	13.6 \pm 2.1
<i>bglap</i>	1.8 \pm 0.1	3.1 \pm 0.7
<i>spp1</i>	7.4 \pm 1.1	3.1 \pm 1.2
<i>tgfb</i>	20.1 \pm 4.8	8.3 \pm 1.4*
<i>il1b</i>	0.7 \pm 0.029	0.8 \pm 0.042
<i>tnfa</i>	6.8 \pm 1.8	8.8 \pm 2.043
<i>il6</i>	11.5 \pm 2.3	7.4 \pm 1.2

* – $p < 0.05$; уровень экспрессии генов представлен в условных единицах.

Через 4 нед. после хирургического вмешательства отмечается резкое угнетение экспрессии гена *hif1a* со стороны некроза, ее уровень был додиагностический. Также была снижена экспрессия гена тканеспецифической щелочной фосфатазы (*alpl*), который регулирует минеральную плотность кости.

В динамике отмечены изменения в регулировке остеобластогенеза. Так, экспрессия гена *runx2* в динамике нормализовалась и не имела отличий от здоровой конечности, в то время как экспрессия гена остеокальцина (*bglap*), основного неколлагенового протеина кости, напротив, снизилась. Кроме того, отмечается увеличение экспрессия гена остеопонтина (*spp1*).

Экспрессия генов провоспалительных цитокинов в головке бедренной кости, подверженной ишемическому стрессу (*tnfa*, *il1b*, *il6*), не отличалась от контралатеральной конечности. Экспрессия гена *rankl* в динамике имела тенденцию к росту со стороны хирургической индукции аваскулярного некроза, однако через 4 нед. после начала эксперимента не имела значимых отличий от условно-здоровой стороны (табл. 3).

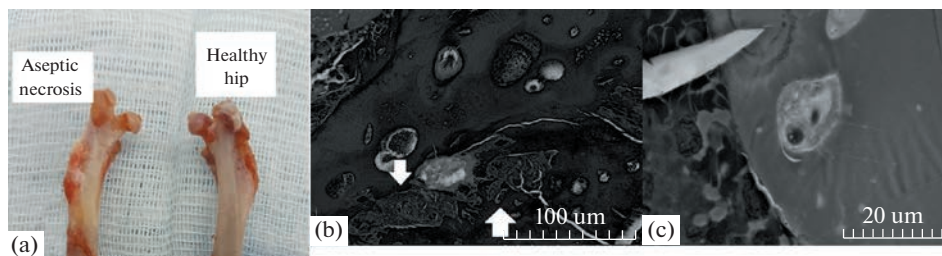


Рис. 2. (а) – Макропрепарат. (б) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 500$ – истончение, деформация костных трабекул, дистрофические изменения зоны роста (указаны стрелочкой). (с) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 2000$ – единственный активный остеокласт в зоне костной резорбции.

Таблица 3. Изменение экспрессии генов через 4 нед. с момента индукции асептического некроза

Ген	Контроль ($M \pm m$)	Некроз ($M \pm m$)
<i>bmp2</i>	199.3 \pm 59.1	218.7 \pm 64.3
<i>alpl</i>	189.02 \pm 48.3	91.6 \pm 29.7*
<i>hif1a</i>	0.015 \pm 0.001	0.001 \pm 0.0001*
<i>rankl</i>	49.1 \pm 10.7	59.8 \pm 11.3
<i>runx2</i>	105.1 \pm 30.5	97.8 \pm 17.2
<i>sp7</i>	258.7 \pm 69.1	272.1 \pm 71.4
<i>bglap</i>	33.031 \pm 8.1	22.6 \pm 6.2
<i>spp1</i>	2.9 \pm 0.8	22.8 \pm 5.9
<i>tgfb</i>	224.9 \pm 61.5	217.1 \pm 53.7
<i>il1b</i>	1.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
<i>tnfa</i>	216.6 \pm 61.2	247.8 \pm 66.2
<i>il6</i>	52.5 \pm 4.2	59.1 \pm 14.3

* – Значимость $p < 0.05$; уровень экспрессии генов представлен в условных единицах.

Оценка асептического некроза в 6 нед. показала, что отмечается прогрессирующее снижение высоты эпифиза головки бедренной кости. При гистологическом исследовании обнаруживались ярко выраженные деструктивные изменения зоны роста, разрастание плотной соединительной ткани среди костных трабекул. Ядра хондроцитов с признаками деструктивных изменений расположены хаотично, при этом толщина гиалинового хряща прогрессивно снижалась. Определялось большое количество активных остеокластов в зонах костной резорбции (рис. 3).

Через 6 нед. после хирургической индукции асептического некроза становится наиболее очевидная роль провоспалительных цитокинов в индукции остеокластогенеза. Так, исследование отобразило усиление экспрессии генов провоспалительных цитокинов *tnfa* и *il6* в головке бедренной кости после хирургического вмешательства. Синергично с ростом экспрессии провоспалительных цитокинов увеличилась экспрессия гена *rankl*, кодирующего ключевой мембранный белок, участвующий в работе сигнального пути RANK-RANKL-OPG, направленного на дифференцировку и активацию остеокластов (табл. 4).

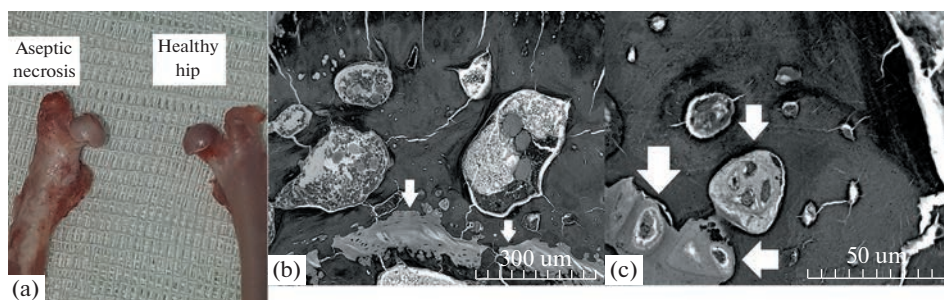


Рис. 3. (а) – Макропрепарат. (б) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 150$ – разрастание соединительной ткани среди костных трабекул (указано стрелочками). (с) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 1000$ – многочисленные активные остеокласты в зоне костной резорбции (указаны стрелочкой).

Таблица 4. Изменение экспрессии генов через 6 нед. с момента индукции асептического некроза

Ген	Контроль ($M \pm m$)	Некроз ($M \pm m$)
<i>bmp2</i>	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<i>alpl</i>	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>hif1a</i>	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.008
<i>rankl</i>	0.1 ± 0.004	$1.1 \pm 0.1^*$
<i>runx2</i>	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>sp7</i>	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.2
<i>bglap</i>	3.2 ± 0.7	2.3 ± 0.3
<i>spp1</i>	5.3 ± 0.9	2.4 ± 0.3
<i>tgfb</i>	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
<i>il1b</i>	0.1 ± 0.009	0.1 ± 0.008
<i>tnfa</i>	0.032 ± 0.002	$0.5 \pm 0.015^*$
<i>il6</i>	0.2 ± 0.027	$0.6 \pm 0.027^*$

* – Значимость $p < 0.05$; уровень экспрессии генов представлен в условных единицах.

Наряду с процессами остеокластогенеза в профиле мРНК появляются признаки индукции остеогенеза. Так, усиливается экспрессия генов остеобластной дифференцировки *runx2* и *sp7*. Кроме того, в динамике угнетение экспрессии гена *alpl* через 6 нед. течения асептического некроза меняется на ее значимый рост.

Макропрепарат через 8 нед. характеризовался выраженными дистрофическими изменениями со стороны суставного хряща. Головка бедренной кости приобретала эллипсоидную форму, со сниженной высотой эпифиза, укорочением шейки бедренной кости, высоким стоянием большого вертела. Гистологическая картина характеризовалась грубыми нарушениями архитектоники костных трабекул, замещения большого объема кости соединительной тканью. Поверх гиалинового хряща разрасталась соединительная ткань. Однако вместе со столь яркими дегенеративно-дистрофическими изменениями прослеживались признаки остеорепарации в виде определения активных остеобластов (рис. 4).

Через 2 мес. в ходе экспериментальной работы отображаются признаки развития процессов образования костной ткани. Со стороны индукции аваскулярного некроза увеличивалась экспрессия генов белков костного матрикса (*bmp2*), минеральной плотности костной ткани (*alpl*), внеклеточного костного матрикса (*spp1*).

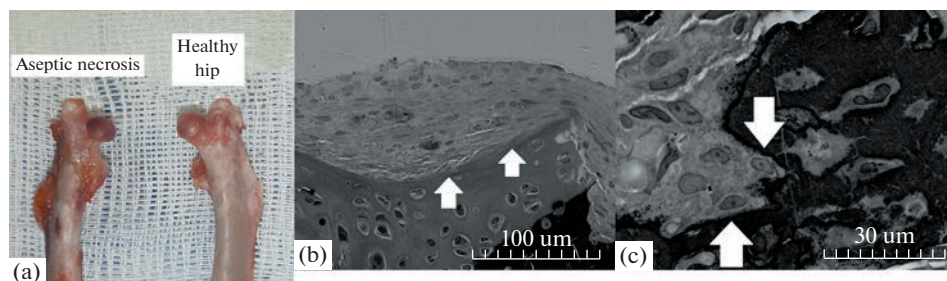


Рис. 4. (а) – Макропрепарат. (б) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 500$ – разрастание фиброзной ткани поверх гиалинового хряща (указано стрелочками). (с) – Электронная микроскопия со стороны асептического некроза, увеличение $\times 1500$ – многочисленные активные остеобласты (указаны стрелочкой).

Таблица 5. Изменение экспрессии генов через 8 нед. с момента индукции асептического некроза

Ген	Контроль ($M \pm m$)	Некроз ($M \pm m$)
<i>bmp2</i>	0.018 ± 0.001	0.047 ± 0.002
<i>alpl</i>	0.1 ± 0.009	0.2 ± 0.021
<i>hif1a</i>	0.1 ± 0.002	0.1 ± 0.004
<i>rankl</i>	0.02 ± 0.001	0.04 ± 0.002
<i>runx2</i>	0.1 ± 0.001	0.1 ± 0.003
<i>sp7</i>	0.1 ± 0.003	0.2 ± 0.04
<i>bglap</i>	0.8 ± 0.02	1.4 ± 0.1
<i>spp1</i>	1.2 ± 0.1	3.8 ± 0.2*
<i>tgfb</i>	0.5 ± 0.007	0.001 ± 0.0001*
<i>il1b</i>	0.1 ± 0.002	0.3 ± 0.03*
<i>mfa</i>	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001
<i>il6</i>	0.1 ± 0.003	1.8 ± 0.1*

* – Значимость $p < 0.05$; уровень экспрессии генов представлен в условных единицах.

Однако наиболее ярко выраженные изменения оставались в системе цитокинов с усиленной экспрессией генов провоспалительных медиаторов, таких как *il1b*, *il6*. Тем не менее, активность *rankl* в динамике снизилась и не имела значимых отличий от условно-здоровой конечности (табл. 5).

В целом, исследование динамики изменения экспрессии генов, участвующих в регуляции костного гомеостаза, отобразило гетерогенность развития остеодеструкции на фоне хирургически созданного очага гипоперфузии головки бедренной кости и увеличения внутрисуставного давления в тазобедренном суставе. Так, в первые 2 нед. наиболее активная экспрессия зафиксирована для гена *hif1a*, на фоне снижения экспрессии *tgfb*. Кроме того, отмечалось угнетение всех генов костного метаболизма, как остеогенной, так и остеорезорбтивной направленности. Однако экспрессия генов, кодирующих белки сигнальных путей остеобластогенеза, костного матрикса, внеклеточного костного матрикса, снижалась более активно, чем генов остеорезорбции. Через 1 мес. после начала эксперимента профиль мРНК генов костного метаболизма имел тенденцию к нормализации, с последующим усилением экспрессии генов остеокластогенеза, которая достигала наибольшей активности к 6-й неделе эксперимента. Экспрессия генов остеобластной дифференцировки, формирования костной ткани прогрессирующе возрастала в течение 2 мес. эксперимента (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В разработке новых алгоритмов лечения нозологических форм, сопровождающихся нарушениями регуляции костного гомеостаза, с целью таргетного воздействия на определенное звено патогенеза, важное значение имеет понимание принципов развития и стадийности патологических процессов течения остеодеструкции. Так, выполняются научно-исследовательские работы, посвященные поиску молекулярно-клеточных паттернов, определяющих особенности нарушений функционирования сигнальных путей, регулирующих костный гомеостаз при асептическом некрозе головки бедренной кости [11, 12]. Однако в большинстве работ

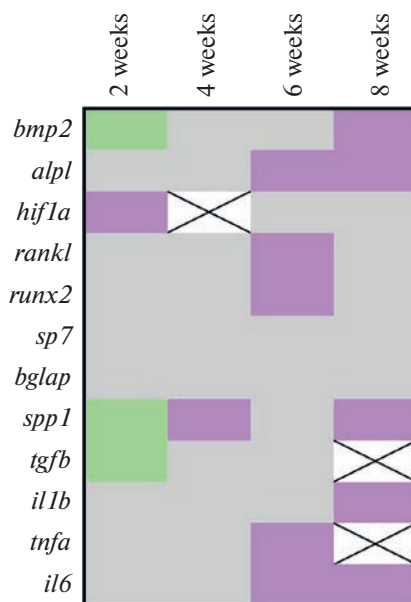


Рис. 5. Измерение генной экспрессии в шейке бедренной кости по сравнению с контролем. Светло-зеленый, серый и сиреневый цвета отражают кратность изменения ≤ 0.50 , $0.51 - 1.99$ и ≥ 2.00 соответственно. Белый прямоугольник отражает додиагностический уровень экспрессии генов.

рассматриваются определенные стадии патологии без оценки динамики изменений маркеров костного гомеостаза по мере развития заболевания. Представленная работа посвящена анализу динамики изменения профиля мРНК, гистологической картины развития аваскулярного некроза, поиску закономерностей функционирования сигнальных путей, регулирующих остеокластогенез и остеобластогенез.

Ведущее значение, определяющее достоверность результатов исследования, принадлежит условиям проведения эксперимента, способу моделирования патологического состояния. При несоответствии методов и методик выполнения экспериментальной работы реальным знаниям об этиологии заболеваний, конечные выводы будут носить достаточно условный характер. Так, в проведенной работе хирургическая индукция аваскулярного некроза базируется на двух основных компонентах: создание очага гипоперфузии головки бедренной кости на фоне повышения внутрисуставного давления в полости тазобедренного сустава, так как эти два фактора рассматриваются большинством исследователей как пусковые в манифестации и прогрессировании остеодеструктивных процессов при асептическом некрозе, остеохондропатии тазобедренного сустава. Так, Kim используя МРТ с перфузией у больных с остеохондропатией тазобедренного сустава, подтверждает наличие очага дефицита накопления контрастного вещества в области головки бедренной кости, который определяет в дальнейшем зону костной резорбции [13].

Проведенные хирургические манипуляции у крыс создают условия для формирования локальной тканевой кислородной недостаточности области проксимальной трети бедра. Острое гипоксическое воздействие на клетки костной и хрящевой ткани запускают механизм адаптации в виде усиления продукции типовой регуляторной молекулы – фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (*hif1a*). В выпол-

ненном исследовании через 2 нед. после индукции асептического некроза наибольшие изменения по отношению к условно-здоровой конечности наблюдались в транскрипции гена *hif1a*, которая была значительно усилена со стороны развития остеодеструкции. При этом, учитывая значимость регуляторной функции *hif1a*, который принимает участие в ангиогенезе, хондрогенезе, остеогенезе, такие изменения можно рассматривать с позиции пускового фактора в дальнейшем нарушении костного метаболизма и прогрессирующего развития резорбции костной ткани.

Так, через 2 нед. в ходе выполнения экспериментальной работы наблюдается картина угнетения остеобластогенеза, о чем может свидетельствовать снижение экспрессии одного из ключевых генов, регулирующих клеточный цикл дифференцировки остеобластов – *runx2*. Наряду с этим, развитие остеодеструкции подтверждает ингибирование гена (*bmp2*) белка костного матрикса – костного морфогенетического белка, гена внеклеточного костного матрикса – остеопонтина (*spp1*).

Ген остеокальцина (*bglap*), напротив, продемонстрировал тенденцию к росту экспрессии через 2 нед. после индукции асептического некроза. Такие изменения, по-видимому, связаны с тем, что остеокальцин контролирует более поздние стадии остеогенеза, синтез основного неколлагенового протеина костной ткани, а также связывание кальция и гидроксиапатита во внеклеточном костном матриксе. При этом наиболее быстро на дифференцировку преостеобластов влияет изменение уровня экспрессии мРНК генов *runx2* и *bmp2* и лишь затем *bglap* [14].

Угнетение экспрессии гена трансформирующего фактора роста (*tgfb*), влияющего на ангиогенез, остеокластогенез также может способствовать остеодеструктивным процессам. Снижение активности ревазуляризации зоны гипоперфузии создает предпосылки для дальнейшего прогрессирующего развития тканевой кислородной недостаточности, экспрессии *hif1a*.

Наряду с этим, в первые 2 нед. течения асептического некроза не отмечалось признаков усиления остеокластогенеза. Экспрессия мРНК таких провоспалительных цитокинов, как *IL1b*, *TNF α* и *IL6*, значимо не изменялась по сравнению с условно-здоровой конечностью. Усиление биологического действия представленных цитокинов способствует индукции остеокластогенеза посредством сигнального пути RANK-RANKL-OPG. Однако через 2 нед. после хирургических манипуляций уровень мРНК *rankl*, кодирующего ключевой мембранный протеин, участвующий в дифференцировке и активации зрелых остеокластов, напротив, в проксимальном эпифизе бедренной кости стороны течения аваскулярного некроза был несколько снижен по сравнению с контралатеральной стороной.

Через 1 мес. после хирургической индукции асептического некроза прогениторные гены остеобластной направленности имели тенденцию к восстановлению темпов метаболизма. Уровень мРНК *runx2*, *sp7* не отличался от условно-здоровой конечности. Отмечалось некоторое снижение *bglap*, что может свидетельствовать о нарушении в более поздних стадиях дифференцировки остеобластов, снижения синтеза хрящевого матрикса, коллагена.

При этом ген остеопонтина характеризовался значимым усилением экспрессии, в то время как концентрация *alpl* снижалась. Роль остеопонтина в регулировании костного метаболизма до конца неизвестна, при этом экспрессия белка может проходить как на поверхности остеобластов, так и остеокластов. Существуют исследовательские работы, подтверждающие влияние резкого усиления экспрессии гена остеопонтина на индукцию пролиферации и дифференцировки остеокластов [15]. Наряду со снижением экспрессии гена *alpl*, такие изменения могут свидетельствовать о прогрессирующем снижении костной плотности на фоне постепенного усиления активности остеокластов и ингибирования основного фермента минерализации кости – тканеспецифической щелочной фосфатазы.

Также отмечалось избыточное угнетение экспрессии *hif1a*, что может оказывать отрицательное действие на процессы ревазуляризации зоны гипоперфузии, так как известна синергическая роль воздействия *hif1a* на фактор роста эндотелия сосудов. Таким образом, представленные изменения могут отрицательно влиять на усиление кровотока и оксигенации аваскулярной зоны головки бедренной кости.

Наиболее активная экспрессия генов, участвующих в индукции остеокластогенеза, наблюдалась с 6-й недели эксперимента. Так, рост уровня экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL6, TNF α сопровождался сверхэкспрессией гена *rankl*. Известно, что концентрация RANKL напрямую коррелирует с усилением биологического действия провоспалительных цитокинов, при этом связывание RANK с RANKL приводит к активации ядерного транскрипционного фактора с последующей дифференцировкой зрелых остеокластов из преостеоклатных клеток. Такие изменения профиля мРНК способствуют увеличению остеолитической активности, смещению баланса костного гомеостаза за счет индукции остеокластогенеза.

На фоне активации остеорезорбции появляются признаки усиления остеогенеза в виде увеличения экспрессии мРНК тканеспецифической щелочной фосфатазы (*alpl*), протеинов костного матрикса (*bmp2*), белков остеобластогенеза (*runx2*, *sp7*). Однако изменения в системе остеокластогенеза носят более выраженный характер.

Через 2 мес. проведения экспериментальной работы усилилась активность ремоделирования костной ткани, что отображено в увеличении экспрессии генов *bmp2*, *spp1*, *alpl*. Уровень гена *rankl* имел тенденцию к снижению. Однако о сохраняющемся преобладании остеорезорбтивных процессов может свидетельствовать значительно превышающая изменения в остальных генах костного метаболизма оверэкспрессия провоспалительных цитокинов.

Таким образом, манифестация хирургически индуцированного асептического некроза головки бедренной кости путем создания зоны гипоперфузии и увеличения внутрисуставного давления связана со значительным усилением экспрессии гена *hif1a* на фоне пониженной экспрессии *tgfb*. Концентрация генов остеогенной и остеорезорбтивной направленности снижались неравномерно с преобладанием угнетения остеобластогенеза, генов костного матрикса. Такие паттерны изменения профиля мРНК могут свидетельствовать о первостепенной значимости на ранних стадиях развития асептического некроза *hif1a* как триггерного фактора развития последующих нарушений костного метаболизма, при этом равновесие в процессах ремоделирования костной ткани смещалось в первые 2 нед. за счет наиболее выраженного подавления остеогенеза.

Индукция остеорезорбции в виде активации большого количества остеокластов, замещения костных трабекул соединительной тканью, разрушения хондроцитов по данным гистологического исследования и оверэкспрессией генов провоспалительных цитокинов сигнального пути остеокластогенеза была наиболее значимой на 6-й неделе эксперимента. Параллельно с процессами, обуславливающими деструкцию кости, прогрессивно усиливалась активность остеорепарации, достигая максимума на 2-м месяце эксперимента. Так, через 8 нед. проведения исследования, по данным гистологического исследования на фоне грубых дегенеративно-дистрофических изменений костной, хрящевой ткани, определяются активные остеобласты, что свидетельствует о постепенной оссификации зон разряжения костной плотности. Профиль мРНК также характеризуется усилением экспрессии генов остеобластогенеза, костного матрикса. Таким образом, полученные данные указывают на гетерогенность развития остеодеструктивных процессов при асептическом некрозе головки бедренной кости, при которых ингибирование остеогенных процессов на ранних стадиях сменяется индукцией остеорезорбции к 6-й неделе и постепенной активацией остеорепарации, начиная со 2-го месяца. Тем не

менее, следует отметить, что синтез многих сигнальных белков, в том числе HIF1 α , регулируется на посттрансляционном уровне, и уровень экспрессии мРНК не всегда однозначно отображает протекающие биологические процессы. Таким образом, для более детального понимания патогенеза развития асептического некроза, требуется проведение дальнейших исследований по изучению концентрации регуляторных протеинов и их динамического изменения по мере течения остеодеструкции.

Выводы: выполненная работа отображает гетерогенность развития остеодеструкции на фоне создания очага гипоперфузии головки бедренной кости и увеличения внутрисуставного давления в тазобедренном суставе. При этом ведущее значение в патогенезе индукции асептического некроза может принадлежать повышенной экспрессии *hif1a* с дальнейшим развитием изменений в цитокиновом статусе. Увеличение концентрации гена *hif1a* на ранних стадиях аваскулярного некроза ведет к нарушению процессов метаболизма костной ткани, ингибированию остеобластогенеза с последующей активацией сигнальных путей остеокластогенеза на более поздних стадиях за счет усиления экспрессии генов провоспалительных цитокинов *il1b*, *tnfa* и *il6*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет финансирования гранта “Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук”, МК-4132.2022.3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Эксперимент выполнялся согласно “Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей”, принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ ЕЕС от 24.11.1986 “По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях” на базе Кемеровского государственного медицинского университета и НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний г. Кемерово.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, хирургические манипуляции, написание статьи – Н.А.Ш., обработка данных, редактирование статьи – А.В.Ш., выделение, анализ экспрессии генов – А.В.С., выполнение электронной микроскопии, анализ полученных данных – Р.А.М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршунова ЕЮ, Белохвостикова ТС, Дмитриева ЛА (2011) Иммунологический контроль гомеостаза костной ткани. Политравма 1: 82–85. [Korshunova IM, Belokhvostikova TS, Dmitrieva LA (2011) Immunological control of bone tissue homeostasis. Polytrauma 1: 82–85. (In Russ)].
2. Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Fernández-Villabrille S, Dusso A, Cannata-Andía JB, Naves-Díaz M, Panizo S (2021) Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ β -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. Calcif Tissue Int 108: 439–451. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00803-2>

3. *Castro LF, Burke AB, Wang HD, Tsai J, Florenzano P, Pan KS, Bhattacharyya N, Boyce AM, Gafni RI, Molinolo AA, Robey PG, Collins MT* (2019) Activation of RANK/RANKL/OPG pathway is involved in the pathophysiology of fibrous dysplasia and associated with disease burden. *J Bone and Mineral Res* 34(2): 290–294.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.3602>
4. *Chen XJ, Shen YS, He MC, Yang F, Yang P, Pang FX, He W, Cao Y, Wei QS* (2019) Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed & Pharmacother* 112.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108746>
5. *Chong DY, Schrader T, Laine JC, Yang S, Gilbert SR, Kim HKW* (2021) Reliability and Validity of Visual Estimation of Femoral Head Hypoperfusion on Perfusion MRI in Legg-Calve-Perthes Disease. *J Pediatr Orthopaed* 41(9): 780–786.
<https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000001945>
6. *Чумакова СП, Уразова ОИ, Винс МВ, Шипулин ВМ, Пряхин АС, Букреева ЕБ, Буланова АА, Кошель АП, Новицкий ВВ* (2020) Содержание гипоксия-индуцируемых факторов и медиаторов иммуносупрессии в крови при заболеваниях, ассоциированных с гипоксией. *Бюл сибирск мед* 19(3): 105–112. [*Chumakova SP, Urazova OI, Vince MV, Shipulin VM, Pryakhin AS, Bukreeva EB, Bulanova AA, Purse AP, Novitsky VB* (2020) The content of hypoxia-induced factors and mediators of immunosuppression in the blood in diseases associated with hypoxia. *Bull Siber Med* 19(3): 105–112. (In Russ)].
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-105-112>
7. *Nikolic N, Jakovljevic A, Carkic J, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Soldatovic I, Andric M, Ivanovic V, Milasin J* (2019) Notch Signaling Pathway in Apical Periodontitis: Correlation with Bone Resorption Regulators and Proinflammatory Cytokines. *J Endodont* 45(2): 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.10.015>
8. *Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E* (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone and Mineral Metabol* 39: 19–26.
<https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
9. *Шабалдин НА, Шабалдин АВ, Попова НЕ, Постникова АВ, Богданов ЛА, Богданов АВ* (2022) Экспериментальная модель асептического некроза головки бедренной кости при изучении болезни Легга–Кальве–Пертеса. *Фундамент и клин мед* 7(3): 23–30. [*Shabalдин NA, Shabalдин AV, Popova NE, Postnikova AV, Bogdanov LA, Bogdanov AV* (2022) Experimental model of aseptic necrosis of the femoral head in the study of Legg-Calve-Perthes disease. *Fundament and Clin Med* 7(3): 23–30. (In Russ)].
<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-3-23-30>
10. *Yellowley CE, Genetos DC* (2019) Hypoxia Signaling in the Skeleton: Implications for Bone Health. *Current Osteopor Rep* 17: 26–35.
<https://doi.org/10.1007/s11914-019-00500-6>
11. *Kuroyanagia G, Adapala NS, Yamaguchi R, Kamiya N, Deng Z, Aruwajoye O, Kutschke M, Chen E, Jo C, Ren Y, Kim HKW* (2018) Interleukin-6 deletion stimulates revascularization and new bone formation following ischemic osteonecrosis in a murine model. *Bone* 116: 221–231.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.08.011>
12. *Adapala NS, Kim HKW* (2016) Comprehensive Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Immature Articular Cartilage following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head in Piglets. *PLoS One* 11(4): e0153174.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>
13. *Johnson CP, Wang L, Tóth F, Aruwajoye O, Carlson CS, Kim HKW, Ellermann JM* (2018) Quantitative MRI Helps to Detect Hip Ischemia: Preclinical Model of Legg–Calvé–Perthes Disease. *Radiology* 289(2): 386–395.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2018180497>
14. *Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC* (2000) Runx2 is a common target of transforming growth factor b1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 23(20): 8783–8792.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8783-8792.2000>
15. *Dong M, Yu X, Chen W, Guo Z, Sui L, Xu Y, Shang Y, Niu W, Kong Y* (2018) Osteopontin Promotes Bone Destruction in Periapical Periodontitis by Activating the NF- κ B Pathway. *Cell Physiol Biochem* 49(3): 884–898.
<https://doi.org/10.1159/000493219>

Dynamics of the Expression of Bone Homeostasis Genes in the Development of Aseptic Necrosis of the Femoral Head in the Experiment

N. A. Shabaldin^{a, *}, A. V. Sinitskaya^b, A. V. Shabaldin^{a, b}, and R. A. Mukhamadiyarov^b

^a *Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kemerovo, Russia*

^b *Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

*e-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

The pathogenesis of a number of diseases is characterized by a violation of the regulation of bone homeostasis, with the progressive development of osteodestruction. At the same time, an active study of the mechanisms leading to a shift in the balance of osteoreparative and osteoresorption directions of osteogenesis is underway. The determination of molecular and cellular patterns affecting the dynamics of changes in bone metabolism is a significant task among a wide range of specialists. Such research works allow us to propose algorithms for targeted therapeutic effects on various key links in the pathogenesis of osteodestruction. The study analyzed the expression of genes involved in maintaining bone homeostasis, changes in the histological picture under experimental conditions, depending on the time elapsed since the induction of aseptic necrosis. The result of the work showed the heterogeneity of the development of osteodestruction in an experiment on Wistar rats, with a surgically created focus of hypoperfusion of the femoral head against the background of increased intra-articular pressure. In the first two weeks of the development of aseptic necrosis, the expression of the *hif1a* gene was most actively determined, which can be considered from the position of a trigger for further disruption of bone metabolism. At the same time, the concentration of m-RNA of osteogenesis and osteoresorption genes was reduced. The most active osteolytic processes according to electron microscopy data, increases in the expression of osteoclastogenesis induction genes were observed at 6 weeks of the experiment. The osteoreparative orientation of bone metabolism gradually increased from the beginning of the study and 2 months after the manifestation of avascular necrosis of the femoral head, active osteoblasts, increased expression of bone matrix genes, osteoblastogenesis were determined. Thus, the development of osteodestruction is an extremely heterogeneous process, with dynamically changing molecular patterns depending on time, determining the activity of signaling pathways of bone metabolism.

Keywords: osteodestruction, *hif1a*, aseptic necrosis, proinflammatory cytokines

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ α -ГАРПИНИНА,
БЛОКИРУЮЩЕГО КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ $K_v1.3$

© 2023 г. А. М. Гиголаев¹, В. М. Табакмахер¹, С. Пеньёр²,
Я. Титгат², А. А. Василевский^{1,3, *}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

²Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

³Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская область, Россия

*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 02.12.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Актуальной задачей современной физиологии и фармакологии является получение соединений, обладающих специфичностью в отношении определенных изоформ ионных каналов. В серии статей мы показали, что α -гарпининовая укладка может служить шаблоном для рационального проектирования пептидных лигандов калиевых каналов. В данной работе было использовано молекулярное моделирование, чтобы оптимизировать структуру ранее полученного пептида Tk-hefu-10, селективного блокатора каналов $K_v1.3$, полумаксимальная концентрация ингибирования ($ИК_{50}$) для которого составляет ≈ 150 нМ. Расчеты молекулярной динамики комплекса Tk-hefu-10– $K_v1.3$ предоставили информацию о взаимодействии отдельных аминокислотных остатков пептида и канала, а анализ этих взаимодействий позволил предложить аминокислотные замены в структуре Tk-hefu-10 для увеличения его аффинности. Новый пептид Tk-hefu-12 представляет собой укороченный на один остаток аналог Tk-hefu-10 с пятью заменами; экспериментальная проверка активности показала, что его $ИК_{50} \approx 70$ нМ против $K_v1.3$. Кроме того, в структуре Tk-hefu-12 отсутствуют остатки метионина, что позволяет перейти к получению пептидов линейки Tk-hefu с использованием бромциана.

Ключевые слова: потенциал-зависимый калиевый канал, лиганд, блокатор, пептид, альфа-гарпинин, рекомбинантный белок

DOI: 10.31857/S0869813923010041, EDN: IYEAZZ

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (K_v) формируют нисходящую фазу потенциала действия и потому играют важную роль в физиологии нервной системы и мышц [1]. Интересно, что K_v встречаются также в клетках и тканях, не являющихся электровозбудимыми. В частности, изоформа $K_v1.3$ характерна для клеток иммунной системы [2]. Эти каналы необходимы для пролиферации особой субпопуляции Т-клеток и секреции ими цитокинов [3–5]. Предполагается, что гомомерные $K_v1.3$ служат фармакологической мишенью в различных аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, диабет 1-го типа, ревматоидный артрит и псориаз, а ингибиторы этих каналов будут оказывать терапевтический эф-

фект [3, 5, 6]. Очевидно, что разработка селективных лигандов K_V является важной задачей современной фармакологии.

Ранее было показано, что сравнительно простая укладка защитных пептидов растений, называемых α -гарпининами, может быть использована для рационального дизайна блокаторов K_V [7]. Эта укладка состоит из двух коротких антипараллельных α -спиралей, стабилизированных двумя дисульфидными связями; общая длина пептидов составляет ~20–50 аминокислотных остатков. Для этого в структуру пептида Tk-AMP-X2 из пшеницы *Triticum kiharae* мы внесли так называемую “функциональную диаду” блокаторов калиевых каналов и получили пептид Tk-hefu. Затем нам удалось с помощью подходов белковой топографии и молекулярной динамики (МД) создать селективные блокаторы различных изоформ каналов: $K_V1.3$ [8, 9] и $K_V1.6$ [10]. При этом в качестве шаблона был использован тот же пептид Tk-hefu, и в его структуру последовательно вносили точечные замены, руководствуясь соображениями о вкладе конкретных аминокислотных остатков в стабильность комплекса пептида с каналами. В результате, в частности, был получен пептид Tk-hefu-10 (см. аминокислотную последовательность на рис. 1а) с полумаксимальной концентрацией ингибирования $IK_{50} \approx 150$ нМ в отношении $K_V1.3$ [9].

В данной работе производилась дальнейшая оптимизация производных Tk-hefu. Основное внимание было уделено остаткам, которые образуют слабые взаимодействия с порой $K_V1.3$. Используя модель комплекса Tk-hefu-10 с $K_V1.3$, были предложены новые замены, которые должны привести к его стабилизации. В результате был получен новый пептид Tk-hefu-12, обладающий $IK_{50} \approx 70$ нМ в отношении $K_V1.3$.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное моделирование. Структурная модель комплекса Tk-hefu-10 с $K_V1.3$ была построена нами ранее [10]. Процедура *in silico* мутагенеза с целью визуализации предлагаемых изменений в структуре Tk-hefu-10 была выполнена в программе PyMOL Molecular Graphics System, версия 1.8 (Schrödinger, LLC).

Подготовка комплекса Tk-hefu-10 с $K_V1.3$ к моделированию МД была проведена с использованием оригинального программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати) аналогично процедуре, описанной ранее [10]. Комплекс помещали внутрь липидного бислоя, имитирующего мембрану нейронов. Был использован предварительно уравновешенный фрагмент бислоя ($7.0 \times 7.0 \times 13.5$ нм³; 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин/холестерин, POPC:POPE:Chl; 100:50:50 молекул соответственно, сольватированных 14172 молекулами воды), что подробно описано в предыдущих работах [8, 11, 12]; некоторые молекулы фосфолипидов и Chl были удалены, чтобы освободить место для белка. Для сольватации использовали модель воды TIP3P [13] и ионы Na^+/Cl^- в количестве, необходимом для поддержания электронейтральности.

Молекулярная система была уравновешена (нагрета до 37°C) в течение 100 пс МД. Положения C^α -атомов остатков канала, не формирующих вестибюль его поры, а также N^ϵ -атом остатка K22 в Tk-hefu-10 фиксировали во время уравновешивания для предотвращения дестабилизации исходного комплекса. Затем рассчитывали МД длительностью 500 нс. Все МД эксперименты были выполнены с помощью программного обеспечения GROMACS, версия 2020 [14], с использованием набора параметров AMBER99SB-ILDN [15]. Моделирование проводили с временным ша-

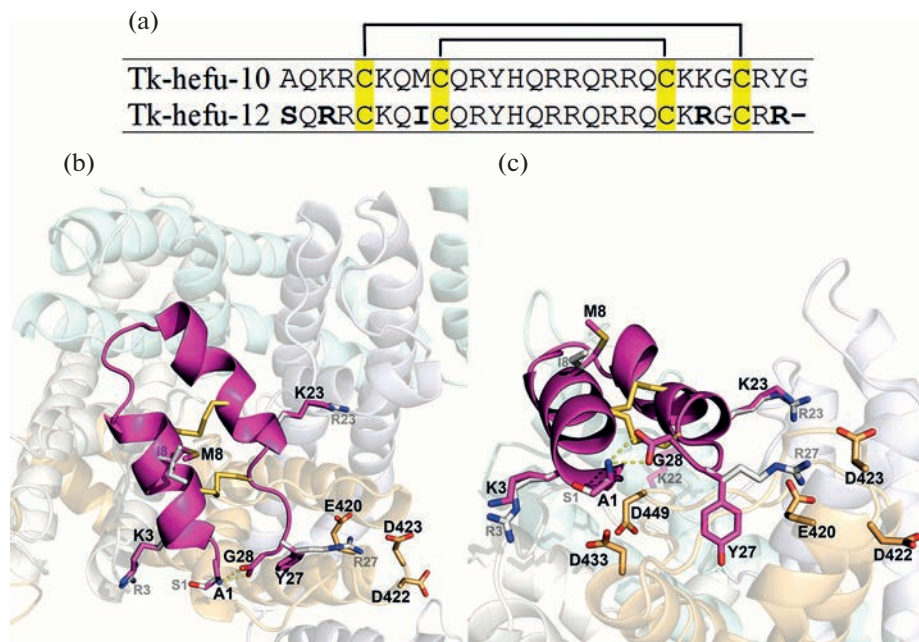


Рис. 1. Аминокислотные последовательности исследуемых пептидов и модель комплекса Тк-hefu-10 с каналом $Kv1.3$. (a) – Сравнение аминокислотных последовательностей Тк-hefu-10 и 12. Остатки цистеина выделены желтым, показано расположение дисульфидных связей. (b) – Модель комплекса Тк-hefu-10– $Kv1.3$ после 200 нс МД в гидратированном липидном бислое. Вид внешнего вестибюля поры канала. (c) – Вид со стороны клеточной мембраны. Субъединицы канала (показаны полупрозрачно на заднем плане) и пептид (показан розовым цветом) представлены в виде ленточных моделей. Затыкающий пору канала остаток K22 (полупрозрачный на панели c), некоторые остатки пептида Тк-hefu-10, выбранные для замены/делеции, возможное положение боковой цепи остатков S1, R3, I8, R23 и R27 (показаны белым цветом) и дисульфидные мостики в пептиде Тк-hefu-12, а также некоторые отрицательно заряженные остатки канала показаны стержневыми моделями. Желтыми пунктирными линиями обозначены полярные контакты между N- и C-концевыми остатками пептида. Визуализация выполнена с помощью программы РумОL.

гом 2 фс, с использованием трехмерных периодических граничных условий, в изотермическом-изобарическом (NPT) ансамбле с полуизотропным давлением 1 бар и при температуре 37°C. Использовали алгоритмы баростата Берендсена [16] и термостата V-rescale [17]. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия рассчитывали с применением сферической функции обрезания потенциала с отсечкой 1.4 нм. Электростатические взаимодействия учитывали с помощью алгоритма PME.

Анализ межмолекулярных контактов в ходе МД выполняли с использованием программного пакета IMPULSE аналогично процедурам, подробно описанным в предшествующем исследовании [8]. Водородные связи оценивали с использованием параметров утилиты hbond пакета GROMACS [14] (расстояние $D-A \leq 0.35$ нм и угол $D-H-A \geq 150^\circ$ для водородной связи $D-H \cdots A$, где D и A – донор и акцептор водородной связи соответственно); солевые мостики, π -катионные и стэкинг-взаимодействия, а также гидрофобные контакты рассчитывали, как описано ранее [18, 19]. Визуализация трехмерных структур белковых комплексов была выполнена с помощью программы РумОL.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для синтеза гена Tk-hefu-12

Название	Последовательность (5'—3')
F1	GC GATAGGTACCGACGACGATGACCGTTCC CAGCGTCGTTGC
F2	GCCAGCGTTATCATCAGCGTCGTCAGCGTCGTCAGTGCAAACGTGGCTGC
R1	TATCGCG GATCC СТАACGACGGCAGCCACGTTTGCACTG
R2	CGCTGATGATAACGCTGGCACATCTGTTTGCAACGACGCTGGGAACG

Жирным выделены сайты рестрикции, курсивом выделена последовательность, кодирующая сайт гидролиза энтеропептидазы человека.

Получение рекомбинантного пептида. Tk-hefu-12 был получен с использованием нашего стандартного подхода [7–9]. Пептид был получен в бактериальной системе экспрессии в составе гибридного белка Trx–Tk-hefu-12, также содержащего вспомогательный белок тиоредоксин (Trx) [20], сайт гидролиза энтеропептидазы человека [21] и гексагистидиновую последовательность.

Последовательность ДНК, кодирующая Tk-hefu-12, была получена из синтетических олигонуклеотидов при помощи ПЦР. На первом этапе полная целевая последовательность была синтезирована в результате пяти циклов ПЦР с использованием двух прямых (F1 и F2) и двух обратных праймеров (R1 и R2; табл. 1). Затем реакционная смесь была разведена в 100 раз и использовалась в качестве матрицы. Для наработки целевой последовательности использовались только крайние праймеры (F1 и R1). Амплифицированный фрагмент ДНК вставили в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen) по сайтам рестрикции KpnI и BamHI — в результате была получена плаزمида pET-32b-Tk-hefu-12.

Эта плазмида затем использовалась для трансформации штамма *Escherichia coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) [22]. Трансформированные бактерии культивировались в присутствии ампициллина при температуре 30°C в среде LB до середины экспоненциальной фазы роста. Экспрессию гена гибридного белка Trx–Tk-hefu-12 индуцировали 0.2 мМ изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом, после чего бактериальную культуру инкубировали при комнатной температуре (24°C) в течение 16 ч. Клеточную массу отделили центрифугированием, ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии (300 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0) и обработали ультразвуком. Полученный лизат наносили на колонку со смолой HisPur Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific). Гибридный белок очищали по протоколу производителя смолы.

Полученный гибридный белок Trx–Tk-hefu-12 растворяли в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0) в концентрации 1 мг/мл. К раствору белка добавляли легкую цепь энтеропептидазы человека (1 МЕ фермента на 1 мг белка). Протеолиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Отщепленный пептид Tk-hefu-12 очищали с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке Jupiter C₅ (4.6 × 250 мм; Phenomenex) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) в присутствии 0.1%-ного раствора трифторуксусной кислоты.

Масс-спектрометрия. Для измерения молекулярной массы пептида использовали метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии. Измерение проводили на приборе Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik) в режиме рефлектрона с ошибкой масс не более 100 ppm как было описано ранее [23].

Электрофизиология. Эксперименты выполнялись как описано ранее [24]. Ген K_v1.3 человека (GenBank ID: NM002232) экспрессировали в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Для этого линейаризованная плазмида pCI-neo, содержащая соот-

ветствующий ген, была транскрибирована *in vitro* с использованием набора T7 mMESSAGE-mMACHINE (ThermoFisher Scientific). мРНК, кодирующая канал, инъецировали в ооциты при помощи микроинжектора (Drummond Scientific). Ооциты инкубировали в буфере ND96: (в mM) 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂ и 5 HEPES (pH 7.4), также содержащем 50 мг/л сульфата гентамицина.

Для регистрации токов через мембрану ооцитов использовали метод двухэлектродной фиксации потенциала. Эксперименты проводили при комнатной температуре (18–22°C) с использованием усилителя Geneclamp 500 (Molecular Devices) и программного обеспечения pClamp (Axon Instruments). В качестве омывающего ооциты раствора использовали буфер ND96. Ток через K_v1.3 вызывался импульсом от –90 до 0 мВ в течение 250 мс, за которым следовал импульс до –50 мВ. Для построения кривой доза – ответ данные анализировали по уравнению Хилла:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{IK_{50}}{C_{\text{пептида}}} \right)^h},$$

где y – ингибирование тока в %, $C_{\text{пептида}}$ – концентрация Tк-hefu-12, IK_{50} – полу-максимальная ингибирующая концентрация Tк-hefu-12, h – коэффициент Хилла.

Все измерения проведены в трех или более повторах ($n \geq 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наши предыдущие исследования показали, что введение положительно заряженных остатков в область Tк-hefu, взаимодействующую с K_v, улучшает связывание [9]. И наоборот, присутствие отрицательно заряженных остатков ослабляет его (как в случае Tк-hefu и Tк-hefu-4, имеющих остатки E23 и E6 соответственно). Это хорошо согласуется с наблюдением, что внешний вестибуль поры K_v обычно заряжен отрицательно [25]. В результате проведенного компьютерного исследования была получена траектория МД комплекса Tк-hefu-10–K_v1.3 в водно-мембранном окружении продолжительностью 500 нс (рис. 1b, c). Отмечено, что ориентация Tк-hefu-10 относительно канала не претерпевает значительных изменений в течение МД. Анализ траектории продемонстрировал высокую стабильность комплекса: среднеквадратичное отклонение положения C^α-атомов Tк-hefu-10 составило в среднем 0.37 нм. Строение комплекса на протяжении траектории МД оставалось похожим на молекулярные системы, исследованные нами ранее [8–10].

Стратегия внесения модификаций. Внимательное рассмотрение модели комплекса Tк-hefu-10–K_v1.3 а также имеющиеся экспериментальные данные об активности Tк-hefu-10 и его аналогов [8–10] позволили нам предложить аминокислотные замены в структуру пептида для увеличения его аффинности в отношении K_v1.3 (рис. 1a):

1. Исходя из того, что остатки аргинина имеют больше возможностей для образования специфических контактов (водородных связей, солевых мостиков, π – π и π -катионных взаимодействий), чем остатки лизина, было принято решение внести замены K3R и K23R. Аналогично предложена замена A1S: в отличие от аланина, серин способен образовывать водородные связи своей боковой цепью.

2. При анализе траектории комплекса Tк-hefu-10–K_v1.3 были сделаны следующие наблюдения: (а) карбоксильная группа С-концевого остатка пептида G28 находится вблизи одноименно заряженных боковых цепей остатков K_v1.3: E420, D422, D423, D433 и D449, что может негативно сказываться на устойчивости комплекса ввиду их взаимного отталкивания; (б) эта же карбоксильная группа образует внутримолекулярный солевой мостик и водородную связь с аминокислотной группой

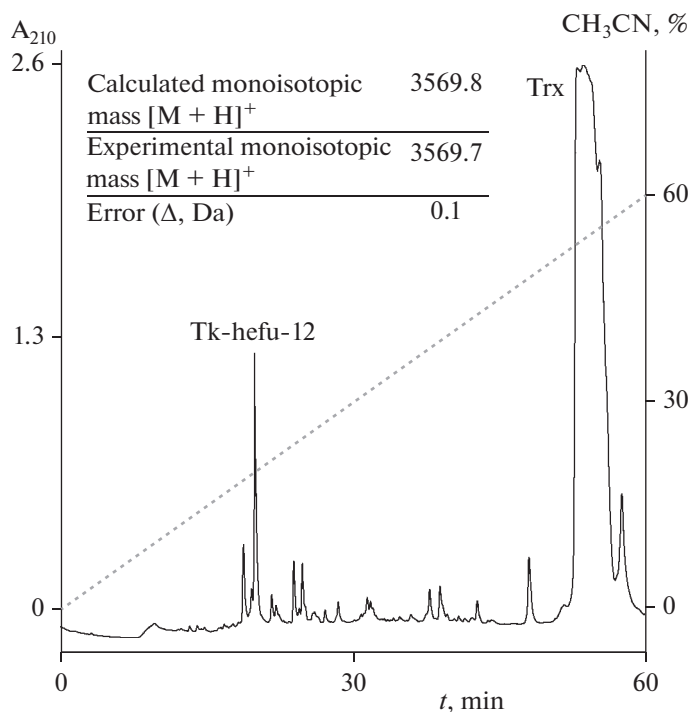


Рис. 2. Получение Tk-hefu-12. Профиль разделения гидролизата гибридного белка Trx–Tk-hefu-12 при помощи ОФ-ВЭЖХ. В таблице указаны расчетная и экспериментально измеренная молекулярные массы Tk-hefu-12.

остатка A1, что может препятствовать образованию его контактов с каналом. С целью уменьшения негативного влияния этих факторов было принято решение укоротить пептид на один остаток с С-конца.

3. Поскольку боковая цепь Y27 в комплексе Tk-hefu-10 с K_v1.3 находится рядом с остатками канала E420, D422 и D423, было принято решение произвести замену Y27R. Вводимый остаток аргинина, как было отмечено выше, имеет обширные возможности образования новых полярных контактов.

Кроме того, мы также решили заменить единственный остаток метионина в структуре пептида. Дело в том, что в лабораторной практике зачастую проще и быстрее получать рекомбинантные пептиды с использованием бромциана для расщепления гибридного белка. Из двух возможных остатков, имеющих примерно равные по размеру боковые цепи с метионином (лейцин и изолейцин), мы выбрали изолейцин (замену M8I), поскольку, к примеру, среди харибдотоксина и родственных блокаторов K_v имеет место именно такая замена [26].

Получение и тестирование оптимизированного α-гарпинина. Все вышеперечисленные изменения привели к структуре Tk-hefu-12 (рис. 1а). Для экспериментальной проверки эффекта предложенных замен пептид Tk-hefu-12 был получен с использованием подходов молекулярной биологии и химии белка. Мы использовали штамм *E. coli* SHuffle T7 Express, оптимальный для наработки дисульфид-содержащих белков. Синтетический ген, кодирующий пептид, был вставлен в экспрессионный вектор pET-32b, Trx был использован как белок-помощник для увеличения

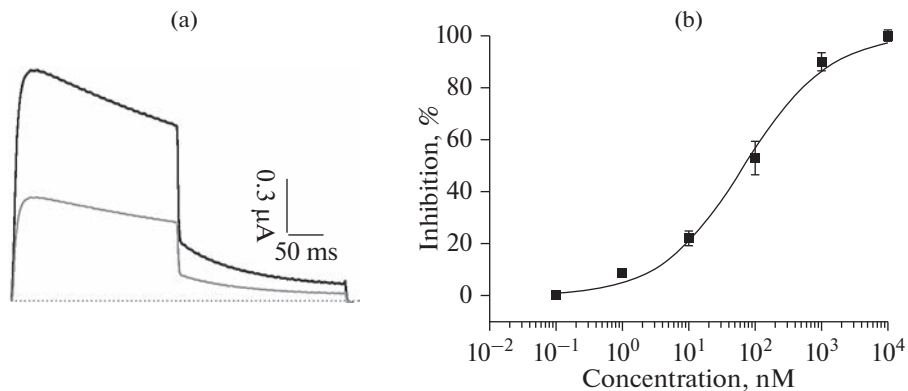


Рис. 3. (a) – Репрезентативная запись токов через мембрану ооцитов в контроле (черная кривая) и в присутствии 70 нМ пептида Tk-hefu-12 (серая кривая). (b) – Кривая зависимости ингибирования тока через канал от концентрации пептида Tk-hefu-12. Вертикальные линии на квадратах показывают стандартную ошибку среднего ($n \geq 3$).

выхода. Целевой пептид был получен в результате ферментативного гидролиза слитного белка энтеропептидазой человека с последующим разделением при помощи ОФ-ВЭЖХ и идентификацией с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии (рис. 2). Итоговый выход Tk-hefu-12 составил ~2 мг с 1 литра питательной среды.

Активность полученного пептида была изучена на канале $K_v1.3$ методом двухэлектродной фиксации потенциала (рис. 3). Значение IC_{50} составило 68.1 ± 11.0 нМ ($h = 0.66 \pm 0.07$). Таким образом, можно сказать, что внесенные замены в последовательность Tk-hefu-10 позволили увеличить аффинность пептида по отношению к каналу $K_v1.3$ в два раза.

Этот результат указывает на то, что выбранные модификации действительно привели к желаемому эффекту стабилизации комплекса пептида с каналом. Однако увеличение аффинности только в два раза скорее всего вызвано тем, что отдельные модификации на самом деле, вопреки нашим ожиданиям, вносят отрицательный вклад в комплексообразование. Для выяснения роли отдельных замененных остатков необходимо будет получить производные с единичными мутациями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашей целью является дальнейшая оптимизация α -гарпининовой укладки. Этот минифолд показывает себя с лучшей стороны в качестве удобного каркаса для скаффолд-инженерии. В настоящей работе нам удалось получить оптимизированный пептид Tk-hefu-12 с увеличенной аффинностью в отношении важной фармакологической мишени.

Помимо внесения замен, было показано, что Tk-hefu можно укоротить путем удаления С-концевого остатка глицина, который по результатам нашего моделирования является помехой для формирования стабильного комплекса с каналом. Вполне вероятно, что имеется возможность и дальнейшей миниатюризации пептида.

Еще одним шагом в оптимизации Tk-hefu является внесение замены M8I в структуру пептида. Так как в модели комплекса остаток метионина не образует контактов с K_v , то замена на схожий по физико-химическим свойствам остаток не должна повлиять на активность пептида. Заменяв метионин, мы получаем воз-

возможность использовать бромциан для гидролиза слитных белков, что в лабораторных условиях зачастую представляет собой более удобный способ получения пептидов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование строго соответствовало Международным методическим рекомендациям по биомедицинским исследованиям с использованием животных Всемирной организации здравоохранения и методическим рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986). Исследование проводилось в соответствии со стандартами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (8-е издание, Институт лабораторных исследований животных). Лягушки *X. laevis* использовались в лаборатории токсикологии и фармакологии в соответствии с лицензией LA1210239, что было одобрено этическим комитетом по экспериментам на животных Лёвенского университета (P186/2019).

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность Olaf Pongs за предоставление плазмиды pCI-нео-Kv1.3.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана РФФ (проект № 20-44-01015; электрофизиологические исследования) и РФФИ (проект № 20-34-90158; получение пептида).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

А.М.Г. и А.А.В. спланировали исследование. В.М.Т. выполнил молекулярное моделирование. А.М.Г. выполнил биохимические эксперименты и получил рекомбинантные пептиды. С.П. выполнил электрофизиологические эксперименты. А.А.В. руководил биохимическими экспериментами. Я.Т. руководил электрофизиологическими экспериментами. А.М.Г., В.М.Т. и А.А.В. написали статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
2. Feske S, Wulff H, Skolnik EY (2015) Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 33: 291–353.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112212>
3. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003) The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111: 1703–1713.
<https://doi.org/10.1172/JCI16921>
4. Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 280–289.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.03.010>
5. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, S Andrews B, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roock WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus H-G, Neptom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17414–17419.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605136103>

6. Valverde P, Kawai T, Taubman MA (2004) Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19: 155–164.
<https://doi.org/10.1359/JBMR.0301213>
7. Berkut AA, Usmanova DR, Peigneur S, Oparin PB, Mineev KS, Odintsova TI, Tytgat J, Arseniev AS, Grishin E V, Vassilevski AA (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *J Biol Chem* 289: 14331–14340.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530477>
8. Berkut AA, Chugunov AO, Mineev KS, Peigneur S, Tabakmakher VM, Krylov NA, Oparin PB, Lihonosova AF, Novikova EV, Arseniev AS, Grishin EV, Tytgat J, Efremov RG, Vassilevski AA (2019) Protein surface topography as a tool to enhance the selective activity of a potassium channel blocker. *J Biol Chem* 294(48): 18349–18359.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010494>
9. Tabakmakher VM, Gigolaev AM, Peigneur S, Krylov NA, Tytgat J, Chugunov AO, Vassilevski AA, Efremov RG (2021) Potassium channel blocker crafted by α -hairpinin scaffold engineering. *Biophys J* 120: 2471–2481.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.04.020>
10. Gigolaev AM, Lushpa VA, Pinheiro-Junior EL, Tabakmakher VM, Peigneur S, Ignatova AA, Feofanov AV, Efremov RG, Mineev KS, Tytgat J, Vassilevski AA (2022) Artificial pore blocker acts specifically on voltage-gated potassium channel isoform K_v1.6. *J Biol Chem*: 102467.
<https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102467>
11. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, Shulepko MA, Paramonov AS, Chugunov AO, Janickova H, Dolejsi E, Dolezal V, Ukin YN, Tselin VI, Arseniev AS, Efremov RG, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2015) Structural insight into specificity of interactions between nonconventional three-finger weak toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 290(39): 23616–23630.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656595>
12. Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG (2016) Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Sci Rep* 6: 33112.
<https://doi.org/10.1038/srep33112>
13. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79: 926–935.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
14. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
15. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinform* 78(8): 1950–1958.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>
16. Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola A, Haak JR (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
17. Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126(1): 014101.
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>
18. Pyrkov T V, Efremov RG (2007) A fragment-based scoring function to re-rank ATP docking results. *Int J Mol Sci* 8: 1083–1094.
<https://doi.org/10.3390/i8111083>
19. Pyrkov T V, Chugunov AO, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG (2009) PLATINUM: A web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics* 25: 1201–1202.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp111>
20. McCoy J, LaVallie E (2001) Expression and Purification of Thioredoxin Fusion Proteins. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. NJ. USA. 16.8.1–16.8.14.
21. Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* 31(1): 133–139.
[https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00159-1)
22. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact* 11: 56.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>

23. *Kuzmenkov AI, Sachkova MY, Kovalchuk SI, Grishin EV, Vassilevski AA* (2016) Lachesana tarabaevi, an expert in membrane-Active toxins. *Biochem J* 473: 2495–2506. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160436>
24. *Peigneur S, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Béress L, Tytgat J* (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem Pharmacol* 82(1): 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>
25. *Banerjee A, Lee A, Campbell E, MacKinnon R* (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *Elife* 21(2): e00594. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
26. *Tabakmakher VM, Krylov NA, Kuzmenkov AI, Efremov RG, Vassilevski AA* (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Sci Data* 61(6): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x>

Structural Optimization of an α -Hairpinin Blocking Potassium Channels K_V1.3

A. M. Gigolaev^a, V. M. Tabakmakher^a, S. Peigneur^b, J. Tytgat^b, and A. A. Vassilevski^{a, c, *}

^a *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b *KU Leuven, Leuven, Belgium*

^c *Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

**e-mail: avas@ibch.ru*

Obtaining compounds with specificity for certain isoforms of ion channels is a significant problem of current physiology and pharmacology. In a series of papers, we have shown that the α -hairpinin fold can serve as a template for the rational design of peptide ligands of potassium channels. Here, we used molecular modeling to optimize the structure of the previously obtained Tk-hefu-10 peptide, a selective K_V1.3 channel blocker, with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of \approx 150 nM. Molecular dynamics simulation of the Tk-hefu-10–K_V1.3 complex provided information on the interaction of individual amino acid residues of the peptide and channel, and the analysis of these interactions made it possible to propose amino acid substitutions in the structure of Tk-hefu-10 to increase its affinity. Novel Tk-hefu-12 peptide is a truncated analog of Tk-hefu-10 by one residue with five substitutions; it is characterized by an IC₅₀ value of \approx 70 nM against K_V1.3. In addition, there are no methionine residues in the structure of Tk-hefu-12, which makes it possible to obtain Tk-hefu peptides using cyanogen bromide.

Keywords: voltage-gated potassium channel, ligand, blocker, peptide, alpha-hairpinin, recombinant protein

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТЫ СЕМАКСА В МОДЕЛЯХ ОСТРОГО
СТРЕССОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2023 г. Н. Ю. Глазова^{1, 2}, Д. М. Манченко¹, Д. А. Виленский^{1, 3},
Е. А. Себенцова^{1, 2}, Л. А. Андреева², А. А. Каменский^{1, 2}, Л. В. Дергунова²,
С. А. Лимборская², Н. Ф. Мясоедов², Н. Г. Левицкая^{1, 2, *}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

²Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: nglevitskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Острое стрессогенное воздействие вызывает в организме человека и животных каскад нейрохимических реакций, приводящих, в частности, к изменению поведения и повышению толерантности к боли. Важную роль в регуляции реакции организма на стрессорные воздействия играют АКТГ/МСГ-подобные пептиды. Целью представленной работы явилось изучение эффектов аналога АКТГ_{4–10} гептапептида семакс в различных моделях острого стресса. Было исследовано влияние внутрибрюшинного введения семакса в дозах 0.05 и 0.5 мг/кг на изменения поведения и болевой чувствительности крыс Wistar в моделях прерывистого неизбежного электроболевого раздражения и принудительного плавания в холодной воде. Для оценки вовлеченности эндогенной опиоидной системы в эффекты стресса исследовали влияние предварительного введения антагониста опиоидных рецепторов налоксона (1 мг/кг). Используемые стрессогенные воздействия приводили к увеличению болевого порога в тесте “сдавливания задней лапы”, что свидетельствует о развитии стресс-вызванной анальгезии. Кроме того, у крыс, перенесших стресс, наблюдалось снижение исследовательского поведения и возрастание уровня тревожности в тесте “норковая камера”. Как семакс, так и налоксон ослабляли стресс-вызванную анальгезию в модели электроболевого раздражения, но не влияли на величину болевого порога в модели принудительного плавания. Оба исследованных препарата не влияли на поведение крыс в использованных моделях острого стресса. Можно заключить, что семакс ослабляет опиоидную форму стресс-вызванной анальгезии, но не влияет на изменения поведения крыс, перенесших острое стрессогенное воздействие.

Ключевые слова: острый стресс, семакс, налоксон, электроболевое раздражение, принудительное плавание, тревожность, болевая чувствительность

DOI: 10.31857/S0869813923010053, **EDN:** IYBRAD

Стрессогенные воздействия являются неотъемлемой частью жизни любого организма. Стресс можно определить как сложное динамическое состояние, при котором нарушается или находится под угрозой устойчивая внутренняя среда организ-

ма (гомеостаз) [1, 2]. Воздействие стрессора активирует физиологические и психологические реакции организма, направленные на поддержание гомеостаза (стрессорные реакции) [3, 4]. Способность адекватно реагировать на стресс имеет решающее значение для выживания. Нарушение регуляции нейрохимических и нейроэндокринных реакций на стресс играет ключевую роль в возникновении и/или обострении ряда психических и неврологических расстройств, включая тревожность, депрессию и хроническую боль. Исследование реакции на стресс и факторов, которые ее модулируют, необходимо для понимания этиологии связанных со стрессом расстройств и разработки новых подходов к их лечению [2, 5].

Реакция организма на стрессорное воздействие опосредуется координированным действием центральной и периферической нервной системы. В ответ на действие стрессора происходит высвобождение нейромедиаторов, нейропептидов и гормонов, инициирующих системную реакцию организма. Активация симпато-адреналовой системы приводит к выбросу адреналина и норадреналина, которые регулируют периферические реакции на стрессор. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси включает несколько последовательных этапов передачи сигналов: выброс кортикотропин-релизинг-гормона нейронами гипоталамуса; высвобождение адренкортикотропного гормона (АКТГ) передней долей гипофиза; стимуляция выброса глюкокортикоидов корой надпочечников [4, 6]. Поступившие в кровь глюкокортикоиды взаимодействуют со специфическими рецепторами в мозге, воздействуя на когнитивные функции и адаптивное поведение [7]. Кроме того, в развитие стрессорного ответа вовлечены также опиоидная, серотонинергическая, дофаминергическая, ГАМК-ергическая, глутаматная, эндоканабиноидная и другие нейромедиаторные системы мозга [8, 9].

Острое стрессогенное воздействие вызывает в организме человека и животных каскад нейрохимических реакций, приводящих, в частности, к изменению поведения и повышению толерантности к боли. У животных, перенесших стресс, наблюдается снижение исследовательской активности, увеличение уровня тревожности и страха [10]. В регуляцию поведенческого ответа на действие стрессора вовлечены многочисленные нейрохимические механизмы, которые включают в себя различные нейромедиаторы (катехоламины, ГАМК, возбуждающие аминокислоты), а также гормоны, нейротрофины и регуляторные пептиды [2, 7, 11, 12]. Воздействие острого стресса также приводит к снижению болевой чувствительности, развивается стресс-вызванная анальгезия (СВА) [4, 13]. СВА опосредуется активацией антиноцицептивных нисходящих систем, которые подавляют пути передачи болевых стимулов от ноцицепторов к ЦНС [3]. Известно, что СВА может опосредоваться как опиоидными, так и неопиоидными механизмами, различают опиоидную и неопиоидную формы СВА [2, 4, 13]. В развитии неопиоидной СВА участвуют различные нейромедиаторы, такие как серотонин, дофамин, гистамин, эндоканабиноиды, ГАМК, глутамат и др. В зависимости от природы и длительности стрессорного воздействия, а также от вида болевого стимула может происходить как отдельная, так и совместная активация опиоидных и неопиоидных механизмов СВА [2, 4].

Пептиды, относящиеся к семейству меланокортинов (МС), включают в себя АКТГ, α -, β - и γ -меланоцитстимулирующие гормоны (α -, β - и γ -МСГ), фрагменты этих гормонов и их синтетические аналоги. Все эндогенные МС образуются из общего белка предшественника – проопиомеланокортина (ПОМК) [14, 15]. В настоящее время выделено 5 типов меланокортиновых рецепторов – MC1R–MC5R. Рецепторы MCR3 и MCR4 широко представлены в нервной системе, а MC2R экспрессируется преимущественно в клетках коры надпочечников [15, 16]. Все эндогенные МС способны связываться с различными МС-рецепторами, исключением является MC2R – единственным известным эндогенным лигандом этих рецепторов является молекула АКТГ [15]. В структуре всех природных МС присутствует общая последо-

вательность, соответствующая фрагменту АКТГ₄₋₉ – ME(G)HFRW, эта последовательность необходима для связывания со всеми типами MCR [17]. Для активации MC2R помимо АКТГ₄₋₉ нужна последовательность АКТГ₁₅₋₁₈ (KKRR), которая отсутствует в структуре MCG [18].

МС играют важную роль в регуляции эмоционального состояния и реакции организма на стрессорные воздействия [19, 20]. При остром стрессе увеличивается экспрессия мРНК генов ПОМК и MC4R [19]. Показано, что природные и синтетические агонисты MC4R стимулируют тревожность и анорексию, вызванные острым стрессом, а антагонисты этого рецептора ослабляют стресс-вызванные изменения поведения [21]. Все эти данные указывают на важную роль МС и MC4R в регуляции ответа на острый стресс [20, 22]. Большой интерес исследователей вызывает вопрос о взаимодействии МС с опиоидной системой мозга. Показано, что МС и опиоиды являются функциональными антагонистами в ЦНС – при совместном введении МС ингибируют анальгетические эффекты эндогенных опиоидов и морфина [16].

Гептапептид семакс (МЕНFPGP) является аналогом фрагмента АКТГ₄₋₁₀, полностью лишенным эндокринной активности и обладающим пролонгированным нейротропным действием [23]. Структура пептида включает в себя последовательность АКТГ₄₋₇ и обогащенный пролином трипептид PGP. В настоящее время семакс успешно используется в медицине в качестве ноотропного и нейропротекторного лекарственного средства [24]. Изучение эффектов семакса в норме и на фоне стрессогенных воздействий показало, что хроническое введение пептида приводит к снижению уровня тревожности и депрессивности крыс, а также ослабляет последствия хронического непредсказуемого стресса [25, 26]. При однократном введении семакс не оказывал влияния на уровень тревожности и депрессивности крыс в норме, но ослаблял анксиогенные эффекты холицистокинина-тетрапептида [27]. Введение пептида ослабляло когнитивные нарушения, вызванные острым иммобилизационным стрессом [28]. В модели острого стресса, вызванного принудительным плаванием при температуре 28°C, введение семакса перед стрессогенным воздействием блокировало опиоидную составляющую СВА, но не влияло на стресс-вызванные изменения поведения крыс [29].

Известно, что как природа СВА, так и изменения поведения, вызванные острым стрессом, зависят от вида стрессорного воздействия [2, 4]. Зависимость эффектов семакса от вида стрессирующего фактора ранее не исследовалась. Поэтому целью представленной работы явилось изучение эффектов семакса в различных моделях острого стресса. Задачей работы было исследование влияния семакса на изменения поведения и болевой чувствительности крыс в моделях неизбежного прерывистого электроболевого раздражения и принудительного плавания в холодной воде.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах крыс Wistar массой 230–250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-часового светового режима дня.

Гептапептид семакс (МЕНFPGP) синтезирован в Институте молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”. Пептид вводили в водном растворе в дозе 0.05 или 0.5 мг/кг внутривентриально в объеме 1 мл/кг. Контрольным животным вводили эквивалентный объем стерильной дистиллированной воды в соответствующие сроки. Блокатор опиоидных рецепторов налоксон (Naloxone, Sigma, США) вводили внутривентриально, в водном растворе, в дозе 1 мг/кг (1 мл/кг).

Было проведено 3 независимых серии экспериментов. В первой серии опытов в качестве стрессорного воздействия использовали принудительное плавание в холодной воде. Семакс в дозе 0.05 или 0.5 мг/кг и налоксон вводили за 15 мин до начала воздействия. Было использовано 5 групп крыс (15–16 крыс в группе): группа Контроль (животные получали инъекцию растворителя в соответствующее время и не подвергались стрессорному воздействию, находились в домашней клетке); группа Стресс (крысы получали инъекцию растворителя и подвергались стрессорному воздействию); группы Стресс + налоксон, Стресс + семакс-0.05 и Стресс + семакс-0.5 (крысы получали инъекцию соответствующего препарата в указанной дозе и подвергались принудительному плаванию). Болевую чувствительность крыс в тесте “сдавливания задней лапы” измеряли через 5, 20 и 35 мин после окончания стрессогенного воздействия, поведение в “норковой камере” — через 15 мин после воздействия.

Во второй и третьей сериях экспериментов в качестве стрессора использовали прерывистое неизбежное электроболовое раздражение. Во второй серии семакс и налоксон вводили за 15 мин до начала воздействия. Было использовано 5 групп крыс, аналогично серии 1 (15–16 крыс в группе). Болевую чувствительность крыс измеряли через 5, 20 и 35 мин после окончания стрессогенного воздействия, поведение — через 15 мин после воздействия.

В третьей серии семакс вводили через 5 мин после окончания стрессогенного воздействия, а налоксон — за 15 мин до начала воздействия. Было использовано 4 группы животных: Контроль, Стресс, Стресс + налоксон и Стресс + семакс-0.5 (14–15 крыс в группе). Болевую чувствительность крыс измеряли через 10, 25 и 40 мин после окончания стрессогенного воздействия, поведение — через 20 мин после воздействия.

Модели острого стрессогенного воздействия

В модели принудительного плавания крыс помещали в прозрачные пластиковые цилиндры (высота 45, диаметр 20 см) на 2/3 заполненной водой (температура 12°C), длительность плавания составляла 5 мин. После окончания процедуры плавания крыс сушили полотенцем, а затем согревали при помощи фена. К моменту измерения болевой чувствительности (через 5 мин после окончания плавания) животные были согреты и практически высушены, что исключает влияние температуры конечностей на величину болевого порога в тесте “сдавливание задней лапы”.

В модели прерывистого электроболового раздражения крыс индивидуально помещали в экспериментальную камеру с решетчатым полом, соединенным с электростимулятором ЭСЛ-1. Электрическое раздражение наносили в течение 10 мин (10 с тока с интервалом 20 с) при частоте 200 Гц и длительности 0.5 мс. Напряжение варьировало от 60 до 100 В в зависимости от вокализации животного.

Тест “сдавливание задней лапы”

Величину болевого порога крыс до и после стресса измеряли в тесте “сдавливание задней лапы”, в котором болевым раздражителем служит равномерно нарастающее давление на заднюю конечность. Измерение проводилось с помощью анальгезиметра фирмы “Ugo Basile” (Италия). Уровень болевой чувствительности определяли по величине давления на конечность в момент отдергивания лапы. Давление измерялось в условных единицах (у.е.) прибора, одна у.е. соответствовала увеличению нагрузки на 20 г/см². Максимальная нагрузка на конечность составляла 25 у.е. До введения препаратов проводили три измерения исходной болевой чувствительности. При анализе результатов для вычисления фоновой болевой чувствительности исходные значения усредняли. После стресса проводили 3 измерения болевой чувствительности с интервалом 15 мин. При статистической обра-

ботке данных для каждого животного при каждом измерении вычисляли изменение болевой чувствительности относительно фоновых значений.

Тест “норковая камера”

Для оценки исследовательской активности и уровня тревожности крыс применяли тест “норковая камера”. Экспериментальная камера представляет собой ящик с передней стенкой из органического стекла (40 × 40 × 30 см). Пол камеры имеет 13 круглых отверстий (“норок”) и расчерчен на 9 квадратов. При тестировании животное помещали в угол камеры и в течение 3 мин визуальную регистрировали следующие показатели: величина пробега (число пересеченных квадратов), число стоек (подъемов на задние лапы), число обследованных норок (погружений головы в отверстие до уровня ушей).

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки использовали пакет программ Statistica 10. Анализ выборок с помощью критерия Шапиро–Уилка показал, что распределение выборок соответствовало критериям нормального ($p > 0.05$), что позволило нам использовать дисперсионный анализ (ANOVA). Анализ результатов теста “норковая камера” проводили с использованием однофакторного ANOVA (фактор ГРУППА). При анализе изменений болевой чувствительности применяли ANOVA для повторных измерений (repeated ANOVA) для факторов ГРУППА и ВРЕМЯ ИЗМЕРЕНИЯ. В случае достоверного влияния указанных факторов или их взаимодействия, проводили post hoc анализ с использованием критерия Фишера (Fisher LSD test). Для оценки зависимости между параметрами использовали коэффициент корреляции Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные на графиках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние предварительного введения семакса и налоксона на последствия острого стресса, вызванного принудительным плаванием в холодной воде

Оценка изменений болевой чувствительности с помощью ANOVA для повторных измерений выявила статистически значимое влияние факторов ГРУППА ($F_{4,72} = 17.3, p < 0.001$) и ВРЕМЯ ИЗМЕРЕНИЯ ($F_{3,216} = 108.36, p < 0.001$), а также взаимодействие данных факторов ($F_{12,216} = 7.5, p < 0.001$). Дальнейший анализ показал статистически значимое увеличение болевого порога во всех группах крыс, перенесших стресс, через 5 и 20 мин после окончания действия стрессора как относительно фоновых значений ($p < 0.005$), так и по сравнению с группой Контроль ($p < 0.01$) (рис. 1). Значимых отличий между группами стрессированных крыс отмечено не было ($p > 0.17$). Таким образом, у всех крыс, перенесших плавание в холодной воде, наблюдалась СВА. Введение семакса в использованных дозах и налоксона не влияло на изменение болевой чувствительности, вызванное острым стрессом.

При оценке поведения крыс в тесте “норковая камера” было зарегистрировано статистически значимое влияние фактора ГРУППА на величину пробега, число стоек и обследованных норок в данном тесте ($F_{4,73} > 12.0, p < 0.001$). Дальнейший анализ показал статистически значимое снижение регистрируемых показателей во всех группах крыс, перенесших стресс, относительно контрольных значений ($p < 0.001$) (рис. 2). Отличий между группами животных, подвергавшихся стрессу, отмечено не было ($p > 0.15$). Следовательно, использованное воздействие вызывало у крыс снижение исследовательского поведения и увеличение тревожности. Введение семакса и налоксона не влияло на стресс-вызванные изменения поведения животных.

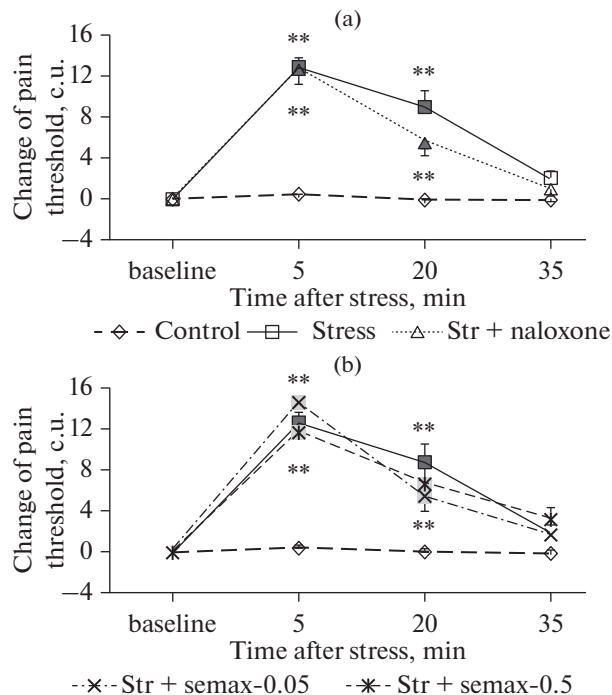


Рис. 1. Влияние налоксона (а) и семакса (б) на изменения болевого порога крыс, вызванные принудительным плаванием в холодной воде (тест сдвливания задней лапы). Налоксон (1 мг/кг) или семакс (0.05 или 0.5 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия. По оси абсцисс – время после окончания воздействия (мин), по оси ординат – изменение болевого порога относительно фоновых значений (условные единицы прибора). В каждой группе по 15–16 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от фоновых значений отмечены закрашенными символами ($p < 0.005$), значимые отличия от группы Контроль – ** ($p < 0.001$).

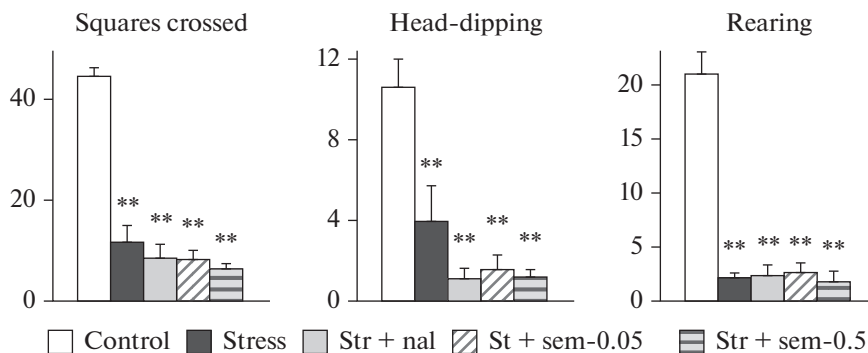


Рис. 2. Влияние налоксона и семакса на изменения поведения крыс в тесте “норковая камера”, вызванные принудительным плаванием в холодной воде (величина пробега, число обследованных норок и стоек). Налоксон (1 мг/кг) или семакс (0.05 или 0.5 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия. Через 15 мин после окончания стресса крыс тестировали в “норковой камере”. В каждой группе по 15–16 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от группы Контроль отмечены ** ($p < 0.001$).

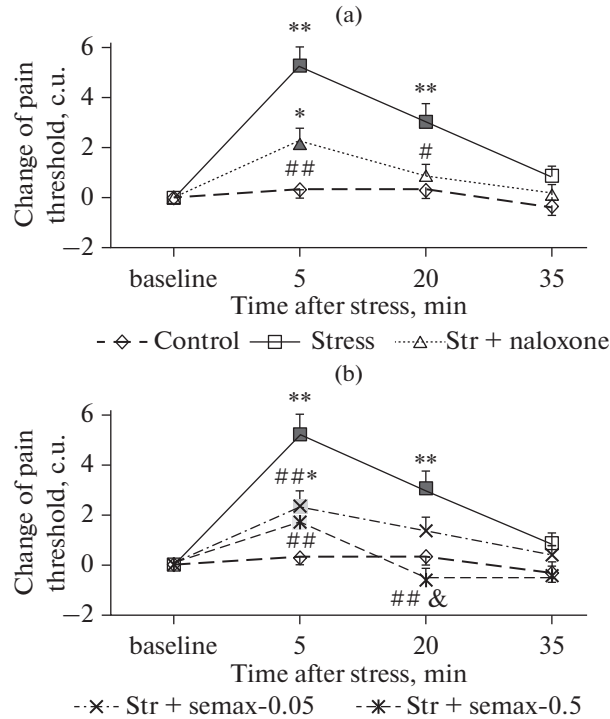


Рис. 3. Влияние налоксона (а) и семакса (б) на изменения болевого порога крыс, вызванные неизбежным электроболевым раздражением (тест сдвливания задней лапы). Налоксон (1 мг/кг) или семакс (0.05 или 0.5 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия. По оси абсцисс — время после окончания воздействия (мин), по оси ординат — изменение болевого порога относительно фоновых значений (условные единицы прибора). В каждой группе по 15–16 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от фоновых значений отмечены закрашенными символами ($p < 0.01$), значимые отличия от группы Контроль —* ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.001$), от группы Стресс — # ($p < 0.05$) и ## ($p < 0.001$), от группы Стресс+семакс-0.05 — & ($p < 0.05$).

2. Влияние предварительного введения налоксона и семакса на последствия острого стресса, вызванного неизбежным электроболевым раздражением

ANOVA для повторных измерений выявил статистически значимое влияние факторов ГРУППА ($F_{4,72} = 10.73$, $p < 0.001$) и ВРЕМЯ ИЗМЕРЕНИЯ ($F_{5,216} = 31.39$, $p < 0.001$), а также взаимодействие данных факторов ($F_{12,216} = 3.94$, $p < 0.001$) для изменений величины болевого порога. Дальнейший анализ показал статистически значимое увеличение болевого порога у крыс группы Стресс через 5 и 20 мин после окончания стрессорного воздействия как относительно фоновых значений ($p < 0.001$), так и относительно соответствующего контроля ($p < 0.001$) (рис. 3).

В группах крыс, получавших перед воздействием инъекции налоксона или семакса в дозе 0.05 мг/кг, через 5 мин после окончания действия стрессора величина болевого порога значимо превышала соответствующие фоновые значения ($p < 0.01$) и контрольные показатели ($p < 0.03$). Через 20 мин после стресса в этих группах значимых отличий болевого порога от фоновых и контрольных значений зарегистрировано не было ($p > 0.30$). В группе Стресс + налоксон отмечалось значимое снижение болевого порога относительно группы Стресс через 5 ($p < 0.001$) и 20 ($p < 0.02$) мин

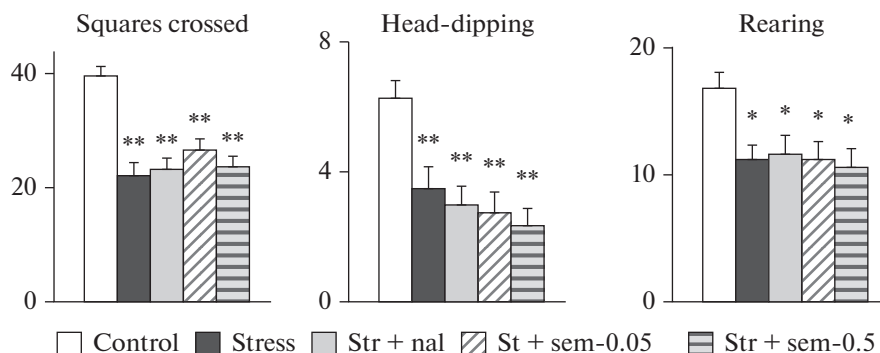


Рис. 4. Влияние налоксона и семакса на изменения поведения крыс в тесте “норковая камера”, вызванные неизбежным электроболевым раздражением (величина пробега, число обследованных норок и стоек). Налоксон (1 мг/кг) или семакс (0.05 или 0.5 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия. Через 15 мин после окончания стресса крыс тестировали в “норковой камере”. В каждой группе по 15–16 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от группы Контроль отмечены * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.001$).

после воздействия. У крыс группы Стресс + семакс-0.05 величина этого показателя статистически значимо отличалась от группы Стресс через 5 мин после воздействия ($p < 0.001$), через 20 мин значимых отличий между этими группами отмечено не было ($p = 0.11$). В группе Стресс + семакс-0.5 не было зарегистрировано значимых отличий болевого порога от фоновых и контрольных значений через 5 и 20 мин после стрессорного воздействия ($p > 0.12$). При этом наблюдалось статистически значимое снижение этого показателя через 5 и 20 мин после воздействия относительно соответствующих значений в группе Стресс ($p < 0.001$).

Значимых отличий между группой Стресс + налоксон и группами крыс, получавших семакс перед стрессогенным воздействием, зарегистрировано не было ($p > 0.28$). В группе Стресс + семакс-0.5 величина болевого порога через 20 мин после воздействия была значимо ниже, чем в группе Стресс + семакс-0.05 ($p < 0.03$). Таким образом, использованное электроболевое раздражение приводило к развитию СВА. Предварительное введение налоксона или семакса в использованных дозах ослабляло анальгезию, вызванную данным воздействием. Эффекты семакса в дозе 0.5 мг/кг были более выражены.

Изучение поведения крыс в тесте “норковая камера” выявило статистически значимое влияние фактора ГРУППА на величину пробега, число обследованных норок и стоек ($F_{4,73} > 3.58$, $p < 0.01$). Дальнейший анализ показал достоверное снижение этих показателей в группах крыс, перенесших электроболевое раздражение, относительно контрольных значений ($p < 0.01$) (рис. 4). Значимых отличий между группами стрессированных крыс зарегистрировано не было ($p > 0.35$). Следовательно, введение семакса в использованных дозах или налоксона не влияло на изменения поведения животных, вызванные неизбежным электроболевым раздражением.

3. Влияние семакса на последствия острого стресса, вызванного неизбежным электроболевым раздражением, при введении пептида после окончания стрессорного воздействия

В данной серии экспериментов семакс вводили через 5 мин после окончания действия стрессора, поэтому измерения болевой чувствительности проводили через 10, 25 и 40 мин, а тест “норковая камера” — через 20 мин после воздействия.

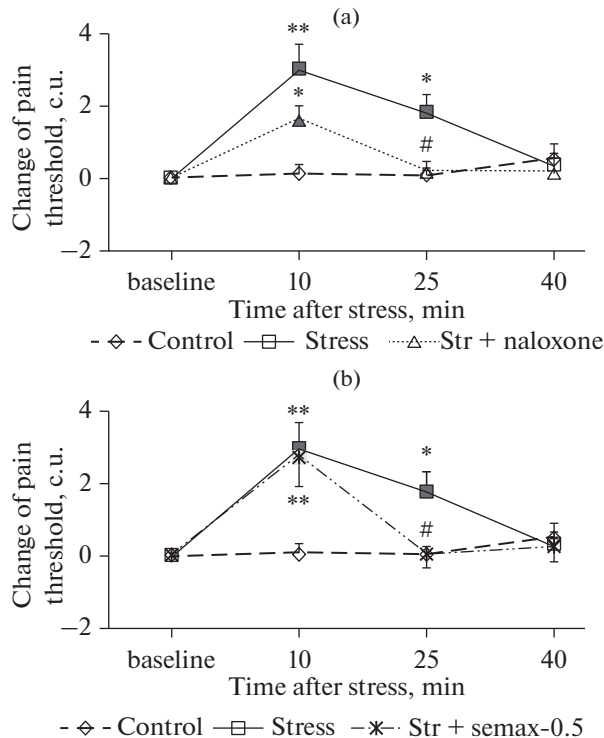


Рис. 5. Влияние налоксона (а) и семакса (б) на изменения болевого порога крыс, вызванные неизбежным электроболевым раздражением (тест сдавливания задней лапы). Налоксон (1 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия, семакс (0.5 мг/кг) – через 5 мин после окончания воздействия. По оси абсцисс – время после окончания воздействия (мин), по оси ординат – изменение болевого порога относительно фоновых значений (условные единицы прибора). В каждой группе по 14–15 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от фоновых значений отмечены закрашенными символами ($p < 0.03$), значимые отличия от группы Контроль – * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.001$), от группы Стресс – # ($p < 0.05$) и ## ($p < 0.001$).

Оценка изменений болевой чувствительности с помощью ANOVA для повторных измерений выявила статистически значимое влияние факторов ГРУППА ($F_{3,54} = 4.06, p = 0.01$) и ВРЕМЯ ИЗМЕРЕНИЯ ($F_{3,162} = 10.77, p < 0.001$), а также взаимодействие данных факторов ($F_{9,162} = 2.16, p = 0.027$). Дальнейший анализ показал достоверное увеличение болевого порога у крыс группы Стресс через 10 и 25 мин после окончания стрессорного воздействия как относительно фоновых значений ($p < 0.001$ и $p = 0.01$ соответственно), так и относительно группы Контроль ($p < 0.001$ и $p = 0.01$ соответственно) (рис. 5). В группе Стресс + налоксон через 10 мин после окончания действия стрессора величина болевого порога значимо превышала соответствующие фоновые и контрольные значения ($p < 0.04$), а через 25 мин после стресса значимых отличий от фона и группы Контроль отмечено не было ($p > 0.80$). В группе крыс, получавших инъекцию налоксона, регистрируемый показатель через 10 мин после воздействия отличался от соответствующих значений в группе Стресс на уровне тенденции ($p = 0.06$), а через 25 мин это отличие было статистически значимым ($p = 0.02$).

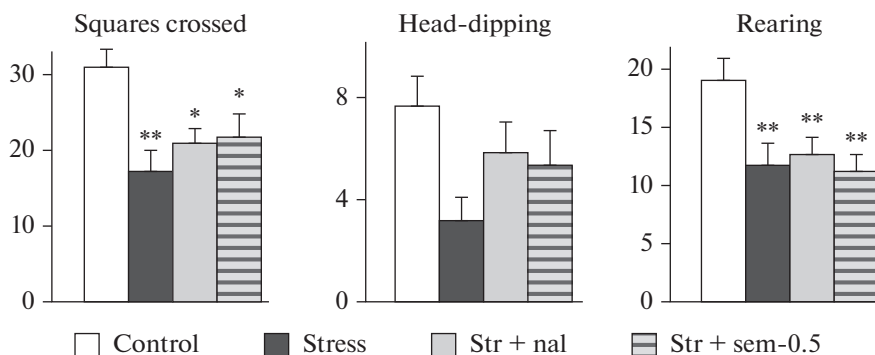


Рис. 6. Влияние налоксона и семакса на изменения поведения крыс в тесте “норковая камера”, вызванные неизбежным электроболевым раздражением (величина пробега, число обследованных норок и стоек). Налоксон (1 мг/кг) вводили за 15 мин до начала стрессогенного воздействия, семакс (0.5 мг/кг) – через 5 мин после окончания воздействия. Через 20 мин после окончания стресса крыс тестировали в “норковой камере”. В каждой группе по 14–15 крыс. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Значимые отличия от группы Контроль отмечены * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.001$).

В группе Стресс + семакс-0.5 через 10 мин после стрессогенного воздействия (через 5 мин после инъекции пептида) величина болевого порога статистически значимо превышала фоновые и контрольные значения ($p < 0.001$), отличий от группы Стресс отмечено не было ($p = 0.94$). Однако через 25 мин после стресса величина болевого порога в этой группе от фоновых значений и группы Контроль не отличалась ($p > 0.92$) и была достоверно ниже, чем в группе Стресс ($p < 0.01$). Значимых отличий между группами Стресс–налоксон и Стресс–семакс-0.5 зарегистрировано не было, но при первом измерении величина болевого порога в группе Стресс–семакс-0.5 превышала соответствующие значения в группе Стресс–налоксон на уровне тенденции ($p = 0.07$).

Таким образом, как и во второй серии экспериментов, электроболевое раздражение приводило к развитию СВА, которая ослаблялась предварительным введением налоксона. Введение семакса в дозе 0.5 мг/кг через 5 мин после окончания стрессорного воздействия не оказывало влияния на величину болевого порога при первом измерении (через 5 мин после инъекции), но приводило к значимому уменьшению СВА через 20 мин после введения препарата.

Изучение поведения крыс в тесте “норковая камера” выявило статистически значимое влияние фактора ГРУППА на величину пробега и число стоек ($F_{3,55} > 4.7$, $p < 0.005$), а также влияние данного фактора на число обследованных норок на уровне тенденции ($F_{3,55} = 2.46$, $p = 0.07$). В группах крыс, перенесших стресс, отмечалось достоверное снижение величины пробега и числа стоек по сравнению с группой контроль ($p < 0.03$) (рис. 6).

Значимых отличий между группами стрессированных крыс зарегистрировано не было ($p > 0.20$). Следовательно, как и во второй серии опытов, электроболевое раздражение вызывало у крыс снижение исследовательского поведения и увеличение тревожности. Ни предварительное введение налоксона, ни введение семакса после стрессогенного воздействия не оказывало значимого влияния на стресс-вызванные изменения поведения животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реакция организма на острое стрессогенное воздействие включает в себя широкий спектр физиологических и поведенческих изменений, в том числе увеличение тревожности и снижение болевой чувствительности [2]. Согласно данным литературы, специфические нейромедиаторные системы, определяющие характер стрессорного ответа, зависят от природы, продолжительности и интенсивности стрессорного воздействия [30]. Показано, что анальгезия, вызванная принудительным плаванием в теплой воде или прерывистым электрическим раздражением конечности, блокируется предварительным введением антагонистов опиоидных рецепторов, однако при увеличении интенсивности и/или продолжительности стрессорного воздействия включаются неопиоидные механизмы СВА [31–34]. В представленной работе нами были использованы две экспериментальные модели острого стресса – принудительное плавание в холодной воде и неизбежное прерывистое электроболевое раздражение. Т.е., были использованы стрессоры, воздействие которых, по данным литературы, должно приводить к развитию неопиоидной и опиоидной формы СВА соответственно [35, 36].

Воздействие использованных стрессоров приводило к увеличению порога реакции на болевое раздражение в тесте “сдавливание задней лапы” через 5 и 20 мин после окончания стресса. У крыс, перенесших плавание в холодной воде, стресс-вызванные изменения болевого порога были более выражены, чем у животных, подвергавшихся электроболевому раздражению. Плавание в холодной воде приводило к снижению температуры тела животного – гипотермии, которая играет важную роль в развитии СВА [37]. В модели принудительного плавания в холодной воде анальгезия развивается в результате взаимодействия двух факторов – эмоционального стресса, вызванного процедурой плавания, и термического стресса, связанного с воздействием низкой температуры [37, 38]. Плавание в холодной воде является стрессором более высокой интенсивности по сравнению с использованным прерывистым электроболевым раздражением, поэтому влияние этого стрессора на величину болевого порога и поведение крыс более выражено.

У крыс, перенесших острый стресс, наблюдалось снижение величины пробега, числа стоек и обследованных норок у крыс в тесте “норковая камера”. Такие изменения параметров поведения животных свидетельствуют об уменьшении исследовательской активности. Показатели исследовательского поведения тесно связаны с изменениями уровня тревожности и эмоциональности. Ранее было показано, что снижение числа стоек и обследованных норок в тесте “норковая камера” отражает возрастание уровня тревожности [39–41]. Полученные нами результаты свидетельствуют о развитии анальгезии, снижении исследовательского поведения и увеличении уровня тревожности в ответ на действие использованных стрессоров, что согласуется с данными литературы [2, 4, 13].

Многочисленные данные свидетельствуют об участии эндогенной опиоидной системы в регуляции стрессорного ответа [13, 42]. Для оценки вовлеченности опиоидной системы в зарегистрированные эффекты использованных стрессогенных воздействий нами исследовалось влияние антагониста опиоидных рецепторов налоксона на эффекты острого стресса. В первой серии экспериментов предварительное введение налоксона не оказывало влияния на изменения поведения и болевой чувствительности, вызванные принудительным плаванием в холодной воде. При этом в группе крыс, перенесших острый стресс, была зарегистрирована статистически значимая отрицательная корреляция между величиной показателей поведения в “норковой камере” и изменениями болевого порога относительно фоновых значений ($-0.83 < r < -0.67$; $p < 0.03$). Отсутствие влияния налоксона на эффекты стрессорного воздействия в данной модели свидетельствует о том, что

принудительное плавание в холодной воде приводит к развитию неопиоидной формы СВА. Налоксон также не оказывал влияния на поведение крыс, перенесших острый стресс, следовательно, нарушения поведения, отмеченные в этой серии опытов, также не связаны с опиоидной системой организма. Наличие значимой корреляции между изменениями болевой чувствительности и поведения животных, вызванными использованным воздействием, указывает на общие механизмы, лежащие в основе этих эффектов стресса.

Во второй и третьей сериях экспериментов в качестве стрессорного воздействия было использовано неизбежное прерывистое электроболевое раздражение. В этом случае предварительное введение налоксона приводило к статистически значимому ослаблению СВА, но не блокировало ее полностью. Влияния на стресс-вызванную тревожность налоксон не оказывал. Оценка зависимости между изменениями болевого порога относительно фоновых значений и параметрами поведения крыс в “норковой камере” не выявила значимой корреляции между этими показателями ($0.12 < r < 0.39$; $p > 0.10$). Следовательно, использованное нами стрессорное воздействие вызывает смешанную форму СВА, содержащую опиоидный компонент. Отсутствие корреляционной зависимости между стресс-вызванными изменениями поведения и болевой чувствительности может указывать на различные механизмы, определяющие данные изменения.

Оценка влияния семакса на уровень болевой чувствительности животных, перенесших стресс, показала, что введение пептида не влияет на величину болевого порога в модели принудительного плавания в холодной воде, но приводит к уменьшению выраженности СВА в модели прерывистого электроболевого раздражения. При введении семакса за 15 мин до начала стрессорного воздействия значимое снижение болевого порога отмечалось через 5 и 20 мин после окончания раздражения (через 30–45 мин после инъекции). При введении пептида после стресса, значимое снижение болевого порога отмечалось только через 25 мин после раздражения (через 20 мин после введения пептида). Таким образом, семакс оказывает влияние на СВА как при введении до, так и после электроболевого раздражения, однако для развития эффекта пептида необходимо не менее 20 мин. Способность налоксона ослаблять СВА в модели электроболевого раздражения указывает на участие эндогенной опиоидной системы в развитии анальгезии. Ранее нами было показано, что предварительное введение семакса уменьшает анальгезию в модели принудительного плавания при температуре 28°C. Введение налоксона также ослабляло СВА, зарегистрированную в этой модели [29]. Способность семакса уменьшать выраженность СВА только в случае анальгезии, чувствительной к налоксону, свидетельствует о влиянии пептида на опиоидную составляющую СВА. Однако поскольку в обеих моделях наблюдалась смешанная форма СВА, нельзя полностью исключить возможность участия других медиаторных систем. На основании полученных данных и проведенных ранее исследований можно предположить, что семакс блокирует опиоидную составляющую анальгезии, вызванной острым стрессорным воздействием. Влияние семакса на СВА определяется механизмом наблюдаемой анальгезии, а не природой использованного стрессора.

Многочисленные исследования свидетельствуют о функциональном взаимодействии меланокортиновой и опиоидной систем организма при модуляции передачи болевого сигнала [16]. Показано, что введение α -МСГ или АКТГ ослабляет анальгезию, вызванную как эндогенными (β -эндорфин), так и экзогенными (морфин) опиоидами [43, 44]. Меланокортиновые и опиоидные рецепторы демонстрируют сходное распределение в спинном мозге и различных областях головного мозга, что обеспечивает анатомическую основу для взаимодействия этих систем [45, 46]. Так, показано, что в нейронах околосинаптического серого вещества могут экспрессироваться одновременно μ -опиоидные рецепторы и МС4R. Вероятно,

колокализация этих рецепторов обеспечивает антиопиоидные эффекты МС [16]. Можно предположить, что ослабление СВА под действием семакса также может быть связано с его антиопиоидным действием.

Изучение влияния семакса на поведение крыс, перенесших острое стрессорное воздействие, показало, что введение пептида в исследованных дозах перед началом или после завершения действия стрессора не влияет на изменения поведения, зарегистрированные через 15–20 мин после стресса, как в модели принудительного плавания в холодной воде, так и в модели электроболевого раздражения. Ранее нами было показано, что предварительное введение семакса также не влияло на изменения поведения крыс через 20–30 мин после стресса в моделях принудительного плавания при температуре 28°C или однократной иммобилизации [28, 29]. Проведенные исследования позволяют заключить, что семакс в исследованных дозах не влияет на кратковременные изменения поведения крыс, вызванные острыми стрессогенными воздействиями различной природы.

Как уже указывалось, последовательность АКТГ_{15–18} необходима для связывания молекулы АКТГ с рецептором МС2R и последующей стимуляции выброса кортикостерона корой надпочечников [18]. Тетрапептид ККRR, соответствующий этой последовательности, связывается с рецептором МС2R, не активирует этот рецептор и препятствует связыванию с ним целой молекулы гормона [47]. Ранее нами были изучены эффекты пептида АКТГ_{15–18} и его аналога АКТГ_{15–18}PGP в модели неизбежного электроболевого раздражения. Было показано, что предварительное введение этих пептидов снижает выброс кортикостерона в ответ на стрессирующее воздействие, уменьшает тревожность, вызванную острым стрессом, но не влияет на выраженность СВА [48]. Сопоставление эффектов АКТГ_{15–18} и семакса в модели острого стресса подтверждает важную роль кортикостерона в регуляции краткосрочных изменений поведения, вызванных прерывистым электроболевым воздействием, и участие эндогенной опиоидной системы в развитии СВА в данной модели.

На основании полученных данных можно заключить, что введение семакса в исследованных дозах приводит к ослаблению опиоидной составляющей СВА, но не влияет на краткосрочные изменения поведения, вызванные острым стрессом. Известно, что острый стресс вызывает как кратковременные, так и отдаленные поведенческие, нейрохимические и структурные изменения, в основе которых могут лежать различные механизмы [5, 49]. Продолжительность долговременных изменений, вызванных острым стрессом, составляет от нескольких часов до нескольких суток [9, 50]. Ранее нами было показано, что предварительное введение семакса ослабляет изменения поведения крыс, зарегистрированные через 4 ч после окончания острого иммобилизационного стресса [51]. Можно предположить, что семакс способен ослаблять долговременные последствия острого стрессогенного воздействия, но не влияет на кратковременные изменения поведения, вызванные острым стрессом. Однако для выяснения влияния семакса на долговременные последствия острого стресса необходимы дальнейшие исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с “Правилами надлежащей лабораторной практики” (Приказ МЗ РФ № 199 от 01.04.2016) и требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента от 22.09.2010.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 19-14-00268 П).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Н.Г.Л., А.А.К., Л.В.Д., С.А.Л., Н.Ф.М.), сбор данных (Н.Ю.Г., Д.М.М., Д.А.В., Е.А.С., Л.А.А.), обработка данных (Н.Ю.Г., Д.М.М., Д.А.В., Е.А.С., Н.Г.Л.), написание и редактирование манускрипта (Н.Г.Л., Н.Ю.Г., Д.М.М., Е.А.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wilder RL* (1995) Neuroendocrine–immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 13: 307–338.
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001515>
2. *Finn DP* (2010) Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. *Immunobiology* 215(8): 629–646.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.05.011>
3. *Ghasemzadeh Z, Rezaeif A* (2015) Ventral hippocampal nicotinic acetylcholine receptors mediate stress-induced analgesia in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 56: 235–242.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.09.008>
4. *Cecconello AL, Torres IL, Oliveira C, Zanini P, Niches G, Ribeiro MF* (2016) DHEA administration modulates stress-induced analgesia in rats. *Physiol Behav* 157: 231–236.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.004>
5. *Tillage RP, Foster SL, Lustberg D, Liles LC, McCann KE, Weinshenker D* (2021) Co-released norepinephrine and galanin act on different timescales to promote stress-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 46(8): 1535–1543.
<https://doi.org/10.1038/s41386-021-01011-8>
6. *Floriou-Servou A, von Ziegler L, Waag R, Schläppi C, Germain PL, Bohacek J* (2021) The Acute Stress Response in the Multiomic Era. *Biol Psychiatry* 89(12): 1116–1126.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.031>
7. *Гуляева НВ* (2022) Нейроэндокринный контроль гиперглутаматергических состояний при патологиях мозга: влияние глюкокортикоидов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108 (9): 1077–1093. [*Gulyaeva NV* (2022) Neuroendocrine control of hyperglutamatergic states in brain pathologies: the effects of glucocorticoids. *Russ J Physiol* 108(9): 1077–1093. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813922090102>
8. *O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F* (2000) The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 93(6): 323–333.
<https://doi.org/10.1093/qjmed/93.6.323>
9. *Busnardo C, Crestani CC, Scopinho AA, Packard BA, Resstel LBM, Correa FMA, Herman JP* (2019) Nitroergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 90: 16–27.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001>
10. *Tang W, Zhou D, Wang S, Hao S, Wang X, Helmy M, Zhu J, Wang H* (2021) CRH Neurons in the Laterodorsal Tegmentum Mediate Acute Stress-induced Anxiety. *Neurosci Bull* 37(7): 999–1004.
<https://doi.org/10.1007/s12264-021-00684-x>
11. *Millan MJ, Brocco M* (2003) The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol* 463(1–3): 67–96.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01275-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01275-5)
12. *McCall JG, Al-Hasani R, Siuda ER, Hong DY, Norris AJ, Ford CP, Bruchas MR* (2015) CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron* 87(3): 605–620.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.002>
13. *al'Absi M, Nakajima M, Bruehl S* (2021) Stress and pain: modality-specific opioid mediation of stress-induced analgesia. *J Neural Transm (Vienna)* 128(9): 1397–1407.
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02401-4>
14. *Gantz I, Fong TM* (2003) The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(3): E468–E474.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00434.2002>

15. Yang Y, Harmon CM (2020) Molecular determinants of ACTH receptor for ligand selectivity. *Mol Cell Endocrinol* 503: 110688. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110688>
16. Sharfman N, Gilpin NW (2021) The Role of Melanocortin Plasticity in Pain-Related Outcomes After Alcohol Exposure. *Front Psychiatry* 12: 764720. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.764720>
17. Fridmanis D, Roga A, Klovins J (2017) ACTH Receptor (MC2R) Specificity: What Do We Know About Underlying Molecular Mechanisms? *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00013>
18. Gallo-Payet N, Martinez A, Lacroix A (2017) Editorial: ACTH Action in the Adrenal Cortex: From Molecular Biology to Pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 101. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00101>
19. Yamano Y, Yoshioka M, Toda Y, Oshida Y, Chaki S, Hamamoto K, Morishima I (2004) Regulation of CRF, POMC and MC4R gene expression after electrical foot shock stress in the rat amygdala and hypothalamus. *J Vet Med Sci* 66(11): 1323–1327. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1323>
20. Chaki S, Okuyama S (2005) Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides* 26(10): 1952–1964. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.029>
21. Chaki S, Ogawa S, Toda Y, Funakoshi T, Okuyama S (2003) Involvement of the melanocortin MC4 receptor in stress-related behavior in rodents. *Eur J Pharmacol* 474(1): 95–101. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)02033-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02033-8)
22. Shimazaki T, Chaki S (2005) Anxiolytic-like effect of a selective and non-peptidergic melanocortin 4 receptor antagonist, MCL0129, in a social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 80(3): 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.11.014>
23. Ashmarin IP, Nezavibatko VN, Levitskaya NG, Koshelev VB, Kamensky AA (1995) Design and investigation of an ACTH(4–10) analogue lacking D-amino acids and hydrophobic radicals. *Neurosci Res Commun* 16(2): 105–112.
24. Ашмарин ИП, Незавиба́тко ВН, Мясоедов НФ, Каменский АА, Гривенников ИА, Пономарева-Степная МА, Андреева ЛА, Каплан АЯ, Кошелев ВБ, Рясина ТВ (1997) Ноотропный аналог адреноркортикотропина 4–10 – семакс (15-летний опыт разработки и изучения). *Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова* 47: 420–430. [Asmarin IP, Nezavibat'ko VN, Miasoedov NF, Kamenski'i AA, Grivennikov IA, Ponomareva-Stepnaia MA, Andreeva LA, Kaplan AI, Koshelev VB, Riasina TV (1997) A nootropic adrenocorticotropin analog 4–10 – semax (15 years experience in its design and study). *Zhurn Vyss Nervn Deiatelnosti im IP Pavlova* 47: 420–430. (In Russ)].
25. Виленский ДА, Левицкая НГ, Андреева ЛА, Алфеева ЛЮ, Каменский АА, Мясоедов НФ (2007) Влияние хронического введения семакса на исследовательскую активность и эмоциональное состояние белых крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 93(6): 661–669. [Vilenskii DA, Levitskaia NG, Andreeva LA, Alfeeva LIu, Kamenskii AA, Miasoedov NF (2007) Effects of chronic Semax administration on exploratory activity and emotional reaction in white rats. *Russ J Physiol* 93(6): 661–669. (In Russ)].
26. Yatsenko KA, Glazova NYu, Inozemtseva LS, Andreeva LA, Kamensky AA, Grivennikov IA, Levitskaya NG, Dolotov OV, Myasoedov NF (2013) Heptapeptide Semax Attenuates the Effects of Chronic Unpredictable Stress in Rats. *Dokl Biol Sci* 453: 353–357. <https://doi.org/10.1134/S0012496613060161>
27. Levitskaya NG, Vilenskii DA, Sebentsova EA, Andreeva LA, Kamensky AA, Myasoedov NF (2010) Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol Bull* 37(2): 186–192. <https://doi.org/10.1134/S1062359010020147>
28. Glazova NYu, Sebentsova EA, Manchenko DM, Andreeva LA, Dergunova LV, Levitskaya NG, Limborska SA, Myasoedov NF (2018) The Protective Effect of Semax in a Model of Stress-induced Impairment of Memory and Behavior in White Rats. *Biol Bull* 45(4): 394–399. <https://doi.org/10.1134/S1062359018040040>
29. Ivanova DM, Vilenskii DA, Levitskaya NG, Andreeva LA, Alfeeva LY, Kamenskii AA, Miasoedov NF (2006) Effect of Semax on changes in pain sensitivity and behavior of animals induced by forced swimming. *Dokl Biol Sci* 407: 123–127. <https://doi.org/10.1134/s0012496606020037>
30. Atwal N, Winters BL, Vaughan CW (2020) Endogenous cannabinoid modulation of restraint stress-induced analgesia in thermal nociception. *J Neurochem* 152(1): 92–102. <https://doi.org/10.1111/jnc.14884>
31. Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC (1980) Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science* 208(4444): 623–625. <https://doi.org/10.1126/science.7367889>
32. Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski B (1996) Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. *Physiol Behav* 59(1): 123–132. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02073-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02073-x)

33. *Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D* (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435(7045): 1108–1112. <https://doi.org/10.1038/nature03658>
34. *Lafrance M, Roussy G, Belleville K, Maeno H, Beaudet N, Wada K, Sarret P* (2010) Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience* 166(2): 639–652. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.042>
35. *Terman GW, Shavit Y, Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC* (1984) Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 226(4680): 1270–1277. <https://doi.org/10.1126/science.6505691>
36. *Terman GW, Morgan MJ, Liebeskind JC* (1986) Opioid and non-opioid stress analgesia from cold water swim: importance of stress severity. *Brain Res* 372(1): 167–171. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91472-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91472-1)
37. *Sadowski B, Konarzewski M* (1999) Analgesia in selectively bred mice exposed to cold in helium/oxygen atmosphere. *Physiol Behav* 66(1): 145–151. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00282-0)
38. *Leapo IB, Konarzewski M, Sadowski B* (2003) Analgesia induced by swim stress: interaction between analgesic and thermoregulatory mechanisms. *Pflugers Arch* 446(4): 463–469. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1060-9>
39. *Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T* (1998) Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* 350(1): 21–29. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00223-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00223-4)
40. *Abbasi-Habashi S, Ghaseemzadeh Z, Rezayof A* (2020) Morphine improved stress-induced amnesia and anxiety through interacting with the ventral hippocampal endocannabinoid system in rats. *Brain Res Bull* 164: 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.002>
41. *Farzampard P, Rezayof A, Alijanpour S* (2022) Ventral hippocampal NMDA receptors mediate the effects of nicotine on stress-induced anxiety/exploratory behaviors in rats. *Neurosci Lett* 780: 136649. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136649>
42. *Bershad AK, Miller MA, Norman GJ, de Wit H* (2018) Effects of opioid- and non-opioid analgesics on responses to psychosocial stress in humans. *Horm Behav* 102: 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.009>
43. *Smock T, Fields HL* (1981) ACTH1-24 blocks opiate-induced analgesia in the rat. *Brain Res* 212(1): 202–206. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90052-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90052-4)
44. *Contreras PC, Takemori AE* (1984) Antagonism of morphine-induced analgesia, tolerance and dependence by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 229(1): 21–26.
45. *Ercil NE, Galici R, Kesterson RA* (2005) HS014, a selective melanocortin-4 (MC4) receptor antagonist, modulates the behavioral effects of morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 180(2): 279–285. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2166-x>
46. *Han DJ, He ZG, Yang H* (2018) Melanocortin-4 receptor in subthalamic nucleus is involved in the modulation of nociception. *Am J Clin Exp Immunol* 7(4): 76–80.
47. *Kovalitskaya YA, Zolotarev YA, Kolobov AA, Sadovnikov VB, Yurovsky VV, Navolotskaya EV* (2007) Interaction of ACTH synthetic fragments with rat adrenal cortex membranes. *J Pept Sci* 13(8): 513–518. <https://doi.org/10.1002/psc.873>
48. *Манченко ДМ, Глазова НЮ, Себенцова ЕА, Андреева ЛА, Долотов ОВ, Каменский АА, Мясоедов НФ, Левицкая НГ* (2022) Влияние фрагмента АКГГ15-18 и его аналога АКГГ15-18-Prо-Glu-Prо на последствия острого стрессогенного воздействия. *Журн высш нерв деятелън им ИП Павлова* 72(4): 561–575. [*Manchenko DM, Glazova NYu, Sebentsova EA, Andreeva LA, Dolotov OV, Kamensky AA, Myasoedov NF, Levitskaya NG* (2022) Effects of fragment ACTH15-18 and its analog ACTH15-18-PGP on the consequences of the acute stress exposure. *Zh Vyss Nervn Deiatelnosti im IP Pavlova* 72: 561–575. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044467722040074>
49. *Musazzi L, Tornese P, Sala N, Popoli M* (2018) What Acute Stress Protocols Can Tell Us About PTSD and Stress-Related Neuropsychiatric Disorders. *Front Pharmacol* 9: 758. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00758>
50. *Chakraborty P, Chattarji S* (2019) Interventions after acute stress prevent its delayed effects on the amygdala. *Neurobiol Stress* 10: 100168. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100168>
51. *Filippenkov IB, Stavchansky VV, Glazova NY, Sebentsova EA, Remizova JA, Valieva LV, Levitskaya NG, Myasoedov NF, Limborska SA, Dergunova LV* (2021) Antistress action of melanocortin derivatives associated with correction of gene expression patterns in the hippocampus of male rats following acute stress. *Int J Mol Sci* 22(18): 10054. <https://doi.org/10.3390/ijms221810054>

Effects of Semax in the Models of Acute Stress

**N. Yu. Glazova^{a, b}, D. M. Manchenko^a, D. A. Vilensky^{a, c}, E. A. Sebentsova^{a, b},
L. A. Andreeva^b, A. A. Kamensky^{a, b}, L. V. Dergunova^b, S. A. Limborska^b,
N. F. Myasoedov^b, and N. G. Levitskaya^{a, b, *}**

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

^b *Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

^c *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow, Russia*

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

Acute stress exposure causes a cascade of neurochemical reactions, leading, in particular, to a change in behavior and increased tolerance to pain in humans and animals. ACTH/MSH-like peptides play an important role in regulating the body's response to stressful exposures. The aim of the present study was to assess the effects of the ACTH_{4–10} analogue heptapeptide Semax in various models of acute stress. The effect of intraperitoneal Semax administration at doses of 0.05 and 0.5 mg/kg on changes in behavior and pain sensitivity of Wistar rats in models of inescapable intermittent foot shock stress and forced cold-water swim stress was investigated. To assess the involvement of the endogenous opioid system in the effects of stress, an impact of pretreatment with opioid receptor antagonist naloxone (1 mg/kg) was studied. The stressors used led to an increase in the pain threshold in the paw-pressure test, which indicates the development of stress-induced analgesia (SIA). In addition, rats exposed to stress had a decrease in exploratory behavior and an increase in the anxiety-like behavior in the hole board test. Both Semax and naloxone attenuated SIA in the model of inescapable foot shock stress, but did not affect the value of the pain threshold in the model of forced cold swim stress. Both studied drugs did not affect the behavior of rats in the models of acute stress used. It can be concluded that Semax blocks the opioid form of stress-induced analgesia, but does not affect the behavioral alterations in rats exposed to acute stress.

Keywords: acute stress, Semax, Naloxone, foot shock stress, cold-water swim stress, anxiety, pain sensitivity

ПОПРАВКА

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0869813923240019, EDN: HQKGML

К статье *И. А. Топол, И. С. Полякова, А. В. Елыкова, А. М. Камышный* “Особенности экспрессии регулятора стресса эндоплазматического ретикулума ХВР1 в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани у крыс линии Вистар в условиях хронического стресса” опубликованной в Российском физиологическом журнале им. И.М. Сеченова 2022, том 108, № 10, с. 1279–1290. DOI: 10.31857/S0869813922100119

На стр. 1279 вместо

“© 2022 г. **И. А. Топол¹*, И. С. Полякова¹, А. В. Елыкова¹, А. М. Камышный²**

¹*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия*

²*Тернопольский государственный медицинский университет,
Тернополь, Украина”*

должно быть

“© 2022 г. **И. А. Топол¹*, И. С. Полякова¹, А. В. Елыкова¹**

¹*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия”.*

На стр. 1279 в разделе ВКЛАД АВТОРОВ вместо

“Идея и планирование эксперимента (А.М.К.), сбор данных (И.А.Т., И.С.П., А.В.Е.), обработка данных (И.А.Т., И.С.П., А.В.Е.), написание и редактирование манускрипта (И.А.Т., А.М.К.).”

должно быть

“Сбор данных (И.А.Т., И.С.П., А.В.Е.), обработка данных (И.А.Т., И.С.П., А.В.Е.), написание и редактирование манускрипта (И.А.Т.).”

На стр. 1289 вместо

I. A. Topol^a*, I. S. Polyakova^a, A. V. Elykova^a, and A. M. Kamyshny^b

^a*Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*

^b*Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine*

должно быть

I. A. Topol^a*, I. S. Polyakova^a, and A. V. Elykova^a

^a*Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*