



РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. А. И. ГЕРЦЕНА
HERZEN STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY of RUSSIA

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И. П. ПАВЛОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
PAVLOV INSTITUTE of PHYSIOLOGY, RUSSIAN ACADEMY of SCIENCES

ISSN 2687-1270

**ИНТЕГРАТИВНАЯ
ФИЗИОЛОГИЯ**

INTEGRATIVE PHYSIOLOGY

T. 3 № 3 2022

VOL. 3 No. 3 2022



Российский государственный педагогический университет
им. А. И. Герцена
Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук
Herzen State Pedagogical University of Russia
Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences

ISSN 2687-1270 (online)
intphysiology.ru
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3>
2022. Том 3, № 3
2022. Vol. 3, no. 3

Интегративная физиология

Integrative Physiology

Свидетельство о регистрации СМИ ЭЛ № ФС 77 – 75141,
выдано Роскомнадзором 07.03.2019
Рецензируемое научное издание
Журнал открытого доступа
Учрежден в 2019 году
Выходит 4 раза в год
16+

Mass Media Registration certificate EL No. FS 77 – 75141,
issued by Roskomnadzor on 7 March 2019
Peer-reviewed journal
Open Access
Published since 2019
4 issues per year
16+

Редакция

Главный редактор
А. П. Филаретова (Санкт-Петербург, Россия)
Заместитель главного редактора
Е. А. Никитина (Санкт-Петербург, Россия)
Ответственный редактор
О. А. Любашина (Санкт-Петербург, Россия)

Editorial Team

Editor-in-chief
Lyudmila P. Filaretova (St Petersburg, Russia)
Deputy Editor-in-chief
Ekaterina A. Nikitina (St Petersburg, Russia)
Executive Editor
Olga A. Lyubashina (St Petersburg, Russia)

Редакционная коллегия

В. Г. Александров (Санкт-Петербург, Россия)
Н. М. Бажан (Новосибирск, Россия)
Б. Боназ (Гренобль, Франция)
А. Б. Буравкова (Москва, Россия)
Т. Д. Власов (Санкт-Петербург, Россия)
Дж. Вуд (Колумбус, США)
Н. В. Гуляева (Москва, Россия)
Д. Джезова (Братислава, Словакия)
Н. Н. Дыгало (Новосибирск, Россия)
Н. А. Дюжикова (Санкт-Петербург, Россия)
Д. Зелена (Печ, Венгрия)
В. А. Кашкин (Санкт-Петербург, Россия)
Б. Мачадо (Сан-Паулу, Бразилия)
Е. Н. Михайлов (Санкт-Петербург, Россия)
М. П. Мошкин (Новосибирск, Россия)
П. Е. Мусиенко (Санкт-Петербург, Россия)
М. Покорский (Варшава, Польша)
Е. А. Рыбникова (Санкт-Петербург, Россия)
Ш. Сабо (Ирвайн, США)
С. В. Саранцева (Санкт-Петербург, Россия)
К. Такеучи (Киото, Япония)
И. Таше (Лос-Анджелес, США)
П. Фердинанди (Сегед, Венгрия)
Ж. Хельешь (Печ, Венгрия)
Ю. Е. Шелепин (Санкт-Петербург, Россия)

Editorial Board

Vyacheslav G. Aleksandrov (St Petersburg, Russia)
Nadezhda M. Bazhan (Novosibirsk, Russia)
Bruno Bonaz (Grenoble, France)
Lyudmila B. Buravkova (Moscow, Russia)
Timur D. Vlasov (St Petersburg, Russia)
Jackie Wood (Columbus, USA)
Natalia V. Gulyaeva (Moscow, Russia)
Daniela Jezova (Bratislava, Slovakia)
Nikolai N. Dygalo (Novosibirsk, Russia)
Natalya A. Dyuzhikova (St Petersburg, Russia)
Dora Zelena (Pécs, Hungary)
Vladimir A. Kashkin (St Petersburg, Russia)
Benedito Machado (São Paulo, Brazil)
Evgeny N. Mikhaylov (St Petersburg, Russia)
Mikhail P. Moshkin (Novosibirsk, Russia)
Pavel E. Musienko (St Petersburg, Russia)
Mieczysław Pokorski (Warsaw, Poland)
Elena A. Rybnikova (St Petersburg, Russia)
Sandor Szabo (Irvine, USA)
Svetlana V. Sarantseva (St Petersburg, Russia)
Koji Takeuchi (Kyoto, Japan)
Yvette Taché (Los Angeles, USA)
Peter Ferdinandy (Szeged, Hungary)
Zsuzsanna Helyes (Pécs, Hungary)
Yuri E. Shelepin (St Petersburg, Russia)

Издательство РГПУ им. А. И. Герцена
191186, г. Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, д. 48
E-mail: izdat@herzen.spb.ru
Телефон: +7 (812) 312-17-41

Publishing house of Herzen State Pedagogical
University of Russia
48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia
E-mail: izdat@herzen.spb.ru
Phone: +7 (812) 312-17-41

Объем 10,2 Мб

Подписано к использованию 30.11.2022

Published at 30.11.2022

При использовании любых фрагментов ссылка на журнал
«Интегративная физиология» и на авторов материала
обязательна.

The contents of this journal may not be used in any way without
a reference to the journal “Integrative Physiology” and the author(s)
of the material in question.

Редактор В. М. Махтина
Редактор английского текста И. А. Наговицына
Корректор Д. А. Иванов
Оформление обложки О. В. Рудневой
Верстка А. М. Ходан



Санкт-Петербург, 2022
© Российский государственный
педагогический университет им. А. И. Герцена, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Приветствие главного редактора.....	268
Обзоры	270
<i>Муравец В. О., Лукина Е. А.</i> Роль вкусовых рецепторов T1R в регуляции потребления и метаболизма углеводов у млекопитающих	270
<i>Никитина Е. А.</i> Переливание крови: становление.....	286
<i>Сиваченко И. Б., Любашина О. А.</i> Ресурсная теория и особенности регуляции висцеральных функций в условиях эмоционального напряжения	308
<i>Чихман В. Н., Солнушкин С. Д., Молодцов В. О.</i> Опыт автоматизации физиологических экспериментов.....	318
Экспериментальные статьи	336
<i>Kato D., Jonan S., Sugahara R., Otsuki H., Nakamura S., Amagase K.</i> Efficacy of ginsenoside treatment to alleviate anticancer-drug induced mucoenteritis in mice	336
<i>Rybnikova E. A., Varanova K. A., Zenko M. Yu., Churilova A. V., Stupin K. N.</i> Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance	348
<i>Баранова Е. В., Доница Ж. А.</i> Изменения инспираторного усилия при тяжелой гипоксии на фоне действия интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей	359
<i>Горшкова О. П.</i> Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пиальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс	367
<i>Зачепило Т. Г., Исакова К. В., Прибышина А. К., Камышев Н. Г., Лопатина Н. Г.</i> Влияние магнитных полей на ацетилирование НЗК9/14 в нейронах грибовидных тел медоносной пчелы	378
Краткие сообщения	385
<i>Мошонкина Т. Р., Попова Е. В.</i> Реакция артериального давления на реальные и воображаемые движения	385

CONTENTS

Letter from the Editor-in-Chief.....	268
Reviews.....	270
<i>Murovets V. O., Lukina E. A.</i> T1R taste receptors and the regulation of carbohydrate intake and metabolism in mammals.....	270
<i>Nikitina E. A.</i> Blood transfusion: The genesis.....	286
<i>Sivachenko I. B., Lyubashina O. A.</i> Resource theory and regulation of autonomic function under the emotional stress.....	308
<i>Chikhman V. N., Solnushkin S. D., Molodtsov V. O.</i> Experiences in automating physiological experiments.....	318
Experimental articles.....	336
<i>Kato D., Jonan S., Sugahara R., Otsuki H., Nakamura S., Amagase K.</i> Efficacy of ginsenoside treatment to alleviate anticancer-drug induced mucoenteritis in mice....	336
<i>Rybnikova E. A., Baranova K. A., Zenko M. Yu., Churilova A. V., Stupin K. N.</i> Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance.....	348
<i>Baranova E. V., Donina Zh. A.</i> Changes in inspiratory effort in severe hypoxia against the backdrop of interleukin-6 and tumor necrosis factor.....	359
<i>Gorshkova O. P.</i> Mechanism of NO-mediated dilation of pial arteries in response to acetylcholine in aging rats.....	367
<i>Zachepilo T. G., Isakova K. V., Pribyshina A. K., Kamyshev N. G., Lopatina N. G.</i> Magnetic field effect on H3K9/14 acetylation in neurons of honeybee mushroom bodies.....	378
Brief notes.....	385
<i>Moshonkina T. R., Popova E. V.</i> Blood pressure response to real and imaginary movements.....	385

Приветствие главного редактора

Глубокоуважаемые коллеги!

Перед вами третий в 2022 году номер журнала «Интегративная физиология», одна из важнейших целей которого — способствовать развитию интегративной физиологии. Публикуя обзоры и оригинальные статьи по актуальным вопросам физиологии и физиологических аспектов смежных наук (генетики, молекулярной биологии, биохимии, биофизики, зоологии, анатомии, гистологии, эмбриологии), журнал вносит важный вклад в научное общение. Надеемся на то, что с появлением большего количества публикаций, рассматривающих каждый изучаемый физиологический процесс как часть, интегрированную в функционирование целого организма, естественным путем исчезнет граница между публикациями по «вопросам физиологии» и «по вопросам физиологических аспектов смежных наук». Журнал приветствует подачу статей о механизмах, координирующих взаимодействие систем организма и обеспечивающих его целостность.

Журнал «Интегративная физиология» выступает за укрепление позиций физиологии, одной из важнейших фундаментальных наук, без прогресса которой невозможно представить устойчивое развитие медицины. В третьем номере журнала вниманию читателей предлагаются обзорные статьи, посвященные регуляции потребления и метаболизма углеводов, регуляции висцеральных функций в условиях эмоционального напряжения, анализу опыта автоматизации физиологических экспериментов, а также историческому аспекту вопроса о переливании крови. В экспериментальных статьях номера представлены результаты исследований, направленных на выяснение механизмов регуляции дыхания и кровообращения, на изучение влияния прекондиционирующих гипоксических стимулов, магнитных полей и фармакологических препаратов на функционирование организма.

Приветствуя читателей третьего номера журнала «Интегративная физиология», выражаю надежду на получение рукописей, содержащих новые знания о физиологических процессах организма, ярко иллюстрирующих значимость интегративной физиологии для медицины и здравоохранения.

С благодарностью ко всем, кто сделал реальностью выпуск третьего номера журнала «Интегративная физиология» за 2022 год.

*С уважением,
главный редактор
А. П. Филаретова*

Greeting from the Editor-in-Chief

Dear Colleagues,

This is the third issue of the journal *Integrative Physiology* in 2022. One of the key goals of this issue is to encourage the development of integrative physiology. Our journal makes an important contribution to scientific communication by publishing reviews and original articles on current issues in physiology and physiological aspects of related sciences such as genetics, molecular biology, biochemistry, biophysics, zoology, anatomy, histology, and embryology. We hope that an increase in the number of publications focusing on physiological processes as an integral part of body functioning will blur the boundary between publications on physiology and physiological aspects of related sciences. The Journal welcomes submissions on the mechanisms coordinating body systems and their integrity.

Integrative Physiology supports the strengthening of physiology as one of the most important fundamental sciences whose progress ensures sustainable development of medicine. The third issue of the Journal offers review articles on the regulation of carbohydrate consumption and metabolism, regulation of autonomic functions under the emotional stress, empirical analysis of the automation of physiological experiments, and retrospective analysis of blood transfusion techniques. Experimental articles focus on regulatory mechanisms of respiration and blood circulation. They also explore the effects of preconditioning hypoxic stimuli, magnetic fields and pharmacological drugs on body functioning.

I welcome the readers of the third issue of the journal *Integrative Physiology* and invite manuscripts containing new knowledge about the body's physiological processes that highlights the importance of integrative physiology for medicine and healthcare.

I would like to extend my appreciation to all those who made the third issue of the journal *Integrative Physiology* for 2022 the reality.

*Yours respectfully,
Editor-in-chief
Lyudmila P. Filaretova*



УДК 612.3

EDN VHFKOI

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-270-285>

Роль вкусовых рецепторов T1R в регуляции потребления и метаболизма углеводов у млекопитающих

В. О. Муровец^{✉1}, Е. А. Лукина¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Владимир Олегович Муровец, SPIN-код: 1476-0480, ORCID: 0000-0001-5741-1562, e-mail: murovetsvo@infran.ru

Екатерина Алексеевна Лукина, ORCID: 0000-0001-5702-6541, e-mail: ecaterinalukina@yandex.ru

Для цитирования: Муровец, В. О., Лукина, Е. А. (2022) Роль вкусовых рецепторов T1R в регуляции потребления и метаболизма углеводов у млекопитающих. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 270–285.

<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-270-285> EDN VHFKOI

Получена 13 июля 2022; прошла рецензирование 21 сентября 2022; принята 22 сентября 2022.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Минобрнауки РФ № 075-15-2020-921 от 13.11.2020 для создания НЦМУ Павловский центр «Интегративная физиология — персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».

Права: © В. О. Муровец, Е. А. Лукина (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Вкусовые рецепторы первого типа T1R, кодируемые генами *Tas1*, играют ключевую роль в восприятии вкуса сладкого и аминокислот у позвоночных животных. Существенные различия в пищевых предпочтениях, описанные у разных групп животных, могут быть связаны с прекращением экспрессии какого-либо из генов, кодирующего эти белки. У млекопитающих выявлены многочисленные полиморфизмы этих генов, обнаруженные у человека и мышей, которые приводят к изменению степени предпочтения и уровня потребления сладких веществ и влияют на чувствительность рецептора. Это обуславливает актуальность исследования данной системы в свете современной ситуации с заболеваемостью диабетом и ожирением. Хотя T1R изначально были выявлены во вкусовых клетках, последующие работы существенно расширили представления об их экспрессии, что предполагает их функциональную роль за пределами ротовой полости. Их экспрессия обнаруживается в структурах эндокринной ткани и пищеварительной системы (энтероэндокринные и всасывающие клетки кишечника, α и β -клетки островковой ткани поджелудочной железы), адипоцитах, остеоцитах, печени, в отделах ЦНС, участвующих в регуляции метаболизма и питания, и этот список постоянно расширяется. В то же время проблема метаболических эффектов гена пока остается малоизученной. В настоящем обзоре обобщены новейшие данные, свидетельствующие, что T1R рецепторы не только оказывают влияние на выбор пищи, но и задействованы в управлении гормональными реакциями, которые регулируют поступление и метаболизм углеводов в тканях организма, а также накопление жира.

Ключевые слова: ожирение, вкусовая чувствительность, *Tas1*-гены, рецепторы T1R, бета-клетки, инсулин, поджелудочная железа, метаболизм

T1R taste receptors and the regulation of carbohydrate intake and metabolism in mammals

V. O. Murovets^{✉1}, E. A. Lukina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Vladimir O. Murovets, SPIN: [1476-0480](#), ORCID: [0000-0001-5741-1562](#), e-mail: murovetsvo@infran.ru

Ekaterina A. Lukina, ORCID: [0000-0001-5702-6541](#), e-mail: ecaterinalukina@yandex.ru

For citation: Murovets, V. O., Lukina, E. A. (2022) T1R taste receptors and the regulation of carbohydrate intake and metabolism in mammals. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 270–285. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-270-285> EDN VHFKOI

Received 13 July 2022; reviewed 21 September 2022; accepted 22 September 2022.

Funding: This study was supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of Russia as part of the government programme that supports the creation and development of the world-class research center “Pavlov Center for Integrative Physiology to Medicine, High-Tech Healthcare and Technologies of Stress Resistance”, Grant No. 075-15-2020-921, 13 November 2020.

Copyright: © V. O. Murovets, E. A. Lukina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

Abstract. Taste receptors type 1, T1R, encoded by *Tas1* genes play a key role in sweet and amino acid taste perception in vertebrates. Significant differences in food preferences, described in different groups of animals, could be associated with interruption of expression of some genes encoding these proteins. Numerous polymorphisms of these genes were found in mammals, including humans and mice. These polymorphisms entail an increase in the preference and consumption of sweet substances and affect receptor sensitivity. This makes the study of this system highly relevant in light of the current situation with diabetes and obesity. Although T1Rs were originally cloned in taste cells, the subsequent studies have significantly expanded the understanding of their expression and suggested they had a functional role in parts of the body other than the oral cavity. Their expression is found along the digestive tract and in endocrine tissues (in enteroendocrine and absorptive intestinal cells, α and β -cells of pancreatic islet), liver, adipocytes, in brain structures involved in metabolism and nutrition regulation, osteocytes, and this list is constantly expanding. At the same time, metabolic gene effects still remain poorly understood. This review summarizes the latest data showing that T1R receptors not only influence food choices, but are also involved in controlling hormonal responses that regulate carbohydrate intake and metabolism in body tissues and fat accumulation.

Keywords: obesity, taste sensitivity, *Tas1* genes, T1R receptors, beta cells, insulin, pancreas, metabolism

Введение

Восприятие сладкого вкуса природных сахаров, некоторых аминокислот и искусственных подсластителей вызывает чувство удовольствия и стимулирует эволюционно закрепленный выбор высококалорийной пищи (McCaughy 2008), что рассматривается как один из факторов развития ожирения, диабета II типа, неалкогольной жировой болезни печени, сердечно-сосудистых заболеваний и т. д., обуславливая необходимость углубленного исследования механизмов вкусовой чувствительности (Garcia-Bailo et al. 2009; Liu, Manson 2001). В последнее время достигнут существенный прогресс в понимании механизмов вкусовой рецепции и в более широком смысле — хеморецепции и той роли, которую она играет в поддержании гомеостаза. Выдвигались и до сих пор сосуществуют две основные

концепции чувствительности вкусовых и иных клеток, реагирующих на нутриенты: метаболическая, т. е. связанная с последствиями метаболизма данного вещества, и определяемая специализированным рецептором, который может располагаться на мембране или внутриклеточно (Craig et al. 2008; Herman, Kahn 2006; Hiriart, Aguilar-Bryan 2008; Shuit 2001). Наличие молекулярных рецепторов, непосредственно реагирующих на присутствие веществ сладкого вкуса, предполагалось довольно давно. Само существование мало- или некалорийных сахарозаменителей предполагает наличие рецепции, независимой от метаболизма. В 1960-е гг. были выделены белковые комплексы с сахарами, однако окончательно рецепторы были показаны лишь в XXI веке (Bachmanov et al. 2014). Установлено, что у всех позвоночных животных

главную роль во вкусовом восприятии сахаров и в разной степени аминокислот играет мембранный белковый рецептор T1R, относящийся к рецепторам, связанным с G-белками, кодируемый генами *tas* (от *taste* — вкус) первого типа. На данный момент выявлено не менее пяти подтипов рецептора, из которых у высших позвоночных встречаются 3, *Tas1R1–3* (T1R1–3), исследованию физиологического значения которых посвящен настоящий обзор. Второй, родственной ему тип, *Tas2R* (T2R) отвечает за восприятие вкуса избегаемых веществ, ощущаемых как горькие, гораздо более разнообразный и содержит десятки подтипов (Bachmanov et al. 2014; von Molitor et al. 2021). T1R изначально были выявлены во вкусовых клетках, однако последующие работы показали их широкую экспрессию за пределами ротовой полости, и были выявлены физиологические эффекты в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), поджелудочной железе, гипоталамусе и других тканях (Kojima et al. 2014; 2015; Kokrashvili et al. 2009a; 2009b; Kyriazis et al. 2012; 2014; Laffitte et al. 2014; Medina et al. 2014; Murovets et al. 2014; 2015; 2016; Nakagawa et al. 2009; Reimann et al. 2008; Ren et al. 2009). Все это обосновывает повышенное внимание к данной системе рецепторов.

Физиологические механизмы вкусовой рецепции

Открытие системы T1R рецепторов во многом обязано широкому использованию искусственных сахарозаменителей, не калорийных, но вызывающих ощущение сладкого. В конце 1970-х гг. было показано, что предпочтение растворов сахараина определяется у мышей аллельными вариантами одного аутосомного локуса, названного *Sac* (от *saccharin*). Его доминантная аллель *Sac^b*, первоначально обнаруженная у мышей линии *C57BL/6*, определяет повышенное предпочтение сахараина и, как было затем показано, также и других сладких веществ, а также аминокислот, а рецессивная аллель *Sac^d*, имеющаяся у линий *DBA/2*, *129P3/J* и др., ассоциируется с их меньшим потреблением (Bachmanov et al. 2001a; Fuller 1974; Nelson et al. 2001). Накопленные за годы исследований данные позволили нескольким исследовательским коллективам к началу XXI века независимо показать, что локус *Sac* идентичен гену *Tas1r3* 4-ой хромосомы мыши, кодирующему рецепторный белок T1R3 (Bachmanov et al. 2001b; Li et al. 2001). У человека ортолог этого гена *TAS1R3* находится на коротком плече хромосомы 1 (Bachmanov et al. 2011).

T1R принадлежат к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и имеют типичное для них строение — 7-витковый трансмембранный домен, большой экстраклеточный домен (N-конец) с характерной конфигурацией Venus flytrap, ответственный за рецепторную функцию; внутриклеточный C-конец молекулы обеспечивает взаимодействие с G-белками (Bachmanov et al. 2011; Masubuchi et al. 2013). Функциональным является димер рецепторов, при этом за взаимодействие с лигандом отвечают разные участки рецептора и разные субъединицы. T1R3 является общим компонентом гетеродимерных вкусовых рецепторов сахаров и аминокислот (Chandrashekar et al. 2006). Гетеродимер из субъединиц T1R2 и T1R3 обеспечивает распознавание сладкого и активируется натуральными сахарами, сладкими аминокислотами и спиртами, а также искусственными сахарозаменителями (Nelson et al. 2001). Глюкоза, сахароза, синтетический подсластитель сукралоза, аминокислоты связываются с экстраклеточным доменом рецептора, при этом T1R3 имеет большую аффинность к сахарозе, чем T1R2, к глюкозе же соотношение обратное; цикламат и сладкий пептид монелин взаимодействуют с трансмембранным доменом T1R3 (Nie et al. 2005). Гетеродимер T1R1/T1R3 обеспечивает восприятие вкуса аминокислот (вкус «умами»), прежде всего глутамата, и таких усилителей вкуса, как инозин- и гуанозинмонофосфат, дополняя реакцию других метаболитных рецепторов к глутамату (Bachmanov et al. 2014; Chandrashekar et al. 2006). Наблюдаются также заметные межвидовые различия в чувствительности к сладким веществам (в частности, мыши не реагируют на сахарозаменитель цикламат) и аминокислотам, например, человеческая форма hT1R1/hT1R3 распознает глутаминовую кислоту L-Glu и L-Asp, а мышьяная mT1R1/mT1R3 — другие L-аминокислоты: Ala, Ser, Gln, Thr, Gly, Met, Arg, Asn (Toda et al. 2013).

Гетеродимер T1R1/T1R3 или T1R2/T1R3 связан с гетеротримером G-белков, состоящим из $G\alpha$ субъединицы густуцина $G\alpha_{\text{gust}}$ (*Gat3*, относится к подсемейству *Gai/o*; ген *GNAT3*), который считается специфическим для вкусовой системы; β -субъединицы $G_{\beta 1}$ или $G_{\beta 3}$ (*GNB1/3*) и γ -субъединицы $G\gamma 13$ (*GNG13*) (Sainz et al. 2007; von Molitor et al. 2021).

Канонический вкусовой внутриклеточный сигнальный каскад начинается со взаимодействия рецептора с агонистом, вызывающем конформационные изменения молекулы рецептора, что приводит к диссоциации $G\beta\gamma$ -димера и активации α -густуцина, который активирует фосфо-

липазу C- β 2, расщепляющую мембранный фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2) на две молекулы, инозитол 1,4,5-трифосфат (ИФ3) и диацилглицерол (ДАГ). ИФ3, активируя рианодиновые рецепторы, вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (эндоплазматического ретикулума), далее рост внутриклеточного кальция активирует неселективные катионные каналы транзитного рецепторного потенциала TRPM5, что приводит к поступлению Na^+ в клетку, генерации потенциала действия и выходу медиатора — АТФ из специализированных каналов, сформированных из двух полуканалов белка pannexin 1 (Chandrashekar et al. 2006; Ishimaru 2009; Margolskee 2002; Roper 2007; von Molitor et al. 2021). Образующийся ДАГ также может реализовывать различные физиологические эффекты, например, способствовать активации протеинкиназ C и D, что приводит к секреции инкретиновых пептидов в энтероэндокринных клетках кишечника (Rozenfurt et al. 2006, Sternini et al. 2008). Помимо α -гаструцина, T1R могут быть связаны и с другими α -субъединицами, как представителями $G\alpha i/o$, в частности α -трансдуцином, $G\alpha i2$, $G\alpha i3$, так и других подсемейств — $G\alpha q$, $G\alpha 12/13$ или $G\alpha s$ (Hubbard, Hepler 2006; Margolskee 2002; Sainz et al. 2007; von Molitor et al. 2021; Zhang et al. 2003). В частности, белок $G\alpha 14$ из подсемейства $G\alpha q$ экспрессирован в корневых отделах языка вместо гаструцина (Shindo et al. 2008). За счет этого может обеспечиваться связь с иными внутриклеточными сигнальными каскадами. Так, T1R рецепторы могут активировать и аденилатциклазу, способствуя росту цАМФ (Margolskee 2002; Medina et al. 2014; Nakagawa et al. 2009; 2013; von Molitor et al. 2021). Предполагается, что выполнять сенсорные функции могут и гомодимерные вкусовые рецепторы T1R2/T1R2 или T1R3/T1R3 (Damak et al. 2003; Delay et al. 2006; Kojima et al. 2014; Zhao et al. 2003), а также гетеродимеры с кальциевым рецептором CasR (Hamano et al. 2015).

Эффекты полиморфизма вкусовых рецепторов

Сравнительное исследование вкусовых генов в разных группах позвоночных позволяет реконструировать эволюционные адаптации к изменению рациона питания (Antinucci, Riso 2017), при этом в фокусе внимания оказываются гены с нарушенной функциональностью, т. н. псевдогены, с накопленными мутациями, не позволяющими им правильно функционировать. Исследования экспрессии генов *Tas1*

в таких экологически различающихся таксономических группах, как панды, куриные, китообразные, ластоногие и кошачьи, выявило связь видовых особенностей предпочтений сладкого и вкуса аминокислот с потерей этих генов, либо с их псевдогенизацией (Antinucci, Riso, 2017; Bachmanov et al. 2011; Jiang et al. 2012; Zhao et al. 2003; 2015).

Показано, что удаление генов *Tas2* и *Tas3* у мышей ослабляет нейрональные реакции на сладкие вещества, полностью блокирует поведенческое предпочтение натуральных сахаров и низкокалорийных искусственных сахарозаменителей при анализе в тесте краткого доступа, а при длительной экспозиции к тестируемому веществу исключает потребление некалорийных сахарозаменителей и снижает потребление низких концентраций натуральных сахаров (повышает гедонический порог), но не высоких концентраций (Damak et al. 2003; Glendinning et al. 2005; Murovets et al. 2015; Zhao et al. 2003). Последнее связано с тем, что помимо T1R-опосредованных, существуют и альтернативные пути чувствительности (Ohkuri et al. 2009; von Molitor et al. 2021). Кроме того, постабсорбционные эффекты пищи не менее важны, чем ее первоначальное вкусовое восприятие, и способны обуславливать потребление изначально не предпочитаемой калорийной пищи без выраженного сладкого или иного предпочитаемого вкуса (Sclafani, Ackroff 2012; Sclafani et al. 2010). В то же время удаление *Tas1* несколько изменяет предпочтение аминокислот, но не исключает его полностью, так как имеются другие пути его рецепции, предположительно связанные с mGLUR рецепторами (Bachmanov et al. 2014; Chandrashekar et al. 2006; Maruyama et al. 2006).

Сопоставление предпочтения сахара и выявленных полиморфизмов гена *Tas1r3* у 30 линий мышей показало, что его аллельные варианты определяются тремя несинонимичными единичными нуклеотидными заменами (SNP), среди которых замена T179C, аминокислоты изолейцина на треонин в положении 60 в экстраклеточном N домене белка T1R3, имела наибольшее влияние и, вероятно, является основной причиной наблюдаемых различий между фенотипами *Sac^b* и *Sac^d* (Reed et al. 2004). *In vitro* было показано, что T179C замена сказывается на связывании T1R3 с сахарозой, глюкозой или сукралозой, ограничивая конформационные изменения и снижая аффинность экстраклеточного домена рецептора, что существенно (в 10 раз для сахарозы) увеличивает эффективную дозу (Nie et al. 2005).

В работе Иноэ с соавторами (Inoue et al. 2007) эффекты полиморфизма *Sac* на вкусовые предпочтения и нейрональные ответы исследовали с использованием конгенной линии мышей *129P3/J.C57BL/6—Tas1r3*. Линия была выведена в серии обратных скрещиваний гибридов F_1 *C57BL/6 (B6) × 129P3/J (129)* с родительской линией 129, что сопровождалось селекцией особей, несущих фрагмент хромосомы 4 с геном *B6-Tas1r3*. Было показано, что аллельные варианты оказывают влияние на реакции на сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза), искусственные сахарозаменители (сахарин, ацесульфам калия, сукралоза), некоторые аминокислоты (D-триптофан, D-фенилаланин, L-пролин), но не влияют на восприятие полимеров глюкозы, и таких несладких компонентов, как глутамат натрия, соленых как хлорид натрия, горьких как гидрохлорид хинина. По сравнению с наследственными факторами, влияющими на вкусовое восприятие сладких веществ, генетическая архитектура висцеральной чувствительности к глюкозе и, возможно, к сахарозаменителям представляется гораздо более сложной. При этом влияние полиморфизма T1R2/T1R3, скорее всего, маскируется вариациями фонового генотипа. В частности, потребление сладких веществ гибридами F_2 , полученными от скрещивания линий мышей *C57BL/6 × 129P3/J*, было связано с вариациями *Tas1r3* в значительно меньшей степени (10–35%), чем предпочтение (64–96%) (Vachmanov et al. 1997; Inoue et al. 2004).

Недавно мы (Murovets et al. 2018a; 2018b; 2020) предложили сравнительно простой способ изучения влияния полиморфизма *Tas1r3* на вкусовую чувствительность и метаболизм, основанный на сравнении реакций гибридов F_1 , полученных от скрещивания линии 129 с линией *B6*, либо от скрещивания линии 129 с линией нокаутной по гену *Tas1r3*, *B6-Tas1r3KO*. Эти гибриды, имея идентичный фоновый генотип, различаются лишь набором локусов *Sac*: одни несут как доминантную, так и рецессивную аллель, *Sac^d* и *Sac^b* (гибриды *SacD/B*), другие — только одну рецессивную аллель *Sac^d* (*SacD/0*). В тестах краткого доступа и 48-часовом тесте с произвольным выбором из двух растворов было показано, что наличие доминантной аллели *SacB* у F_1 гибридов *SacD/B* предопределяет увеличение предпочтения низких концентраций сахарозы (1–4%), а также высоких концентраций неметаболизируемых подсластителей (сахарина, сукралозы и ацесульфама К). Контроль эффекта гемизиготности (сравнение реакций у гибридов *B6 × B6-Tas1r3KO (SacB/0)* с роди-

тельской линией *B6*) впервые выявил наличие слабого эффекта *SacB* гаплонедостаточности при длительном предъявлении, но не при краткой экспозиции низких концентраций сахарозы и сахараина. Полученные нами данные свидетельствуют, что у сытых животных наличие доминантной аллели *SacB* предопределяет повышенную толерантность к глюкозе, быструю утилизацию глицерола, увеличение веса тела. Впервые был выявлен эффект гаплонедостаточности *Sac*: отсутствие одной аллели привело к снижению постпрандиального уровня инсулина, увеличению веса тела, окологодного жира и печени, но не повлияло на толерантность к глюкозе и утилизацию глицерола (Murovets et al. 2018a; 2018b; 2020).

В *TAS1R* генах человека также выявлены синонимичные и несинонимичные SNP, равно как и гаплотипы, характерные для отдельных популяций, при этом ген *TAS1R3* более эволюционно консервативен, а максимальная изменчивость характерна для *TAS1R2*, при этом наибольшее число замен выявляется в африканской популяции (Kim et al. 2006). Два выявленных SNP-полиморфизма в промоторе *TAS1R3* (Fushan et al. 2009) определяют разную оценку сладости сахарозы и встречаются в разных регионах Земли с разной частотой, объясняя 16% вариации восприятия сахарозы в популяции. При этом сочетанное проявление С-замен, определяющих повышенную реакцию, встречается во всех регионах за исключением Африки, а частота Т аллели с низкой оценкой наименьшая в европейской популяции. Выявленные полиморфизмы *TAS1R2* влияют на потребление углеводов и пороги различения сахарозы в зависимости от индекса массы тела (Dias et al. 2015; Eny et al. 2010), а также на концентрацию триглицеридов в крови (Ramos-Lopez et al. 2016). Кроме того, показана связь между полиморфизмом *TAS1R2* и *GLUT2* и частотой кариеса зубов (Robino et al. 2015). Полиморфизм локуса *GNAT3*, кодирующего α -гаструцин, также оказывает влияние на потребление сладкого у человека (Fushan et al. 2010).

Избыточное потребление высококалорийных содержащих в большой концентрации сахара продуктов описывается наряду с уменьшением подвижности и наследственными факторами в качестве основной причины глобального распространения ожирения. Гиперфагия и ожирение тесно связаны с рецепцией нутриентов, как вкусовой, так и пост-вкусовой (висцеральной), от которой зависят механизмы обратной связи (Duca, Covasa 2012; Greenberg et al. 1999). Среди хемосенсорных сигналов, возникающих в про-

цессе питания, ведущую роль играет вкусовое восприятие сладкого. Известно, что при ожирении чувствительность к сладкому снижается, что компенсируется усилением пристрастия к концентрированным сахарам (Bartoshuk et al. 2006; Donaldson et al. 2009).

Кормление лабораторных животных диетой с повышенным содержанием жира и углеводов описано как основная модель «западного типа» питания, приводящего к ожирению. В отдельных работах показано, что свободный выбор между стандартным лабораторным кормом и высококалорийной пищей (так называемая «диета кафетерия») провоцирует гиперфагию и набор массы тела, превышающие показатели при потреблении сходной по энергетическому составу диеты без выбора, и является адекватной моделью развития метаболического синдрома у животных (Sampey et al. 2011). Известно, что избыток фруктосодержащих углеводов в пище животных вызывает более тяжелые метаболические нарушения, чем сахароза, а именно, абдоминальное ожирение, резистентность к инсулину, диабет 2 типа, дислипидемию и гипертензию (Bizeau, Pagliassotti 2005; Bremer et al. 2011; Martinez et al. 1994). В связи с этим, механизм, посредством которого фруктоза провоцирует ожирение, привлекает значительный интерес. В большинстве тканей организма фруктоза не включается в обмен веществ из-за отсутствия соответствующего мембранного транспортера GLUT5 (Tarry 2018). Таким образом, ее можно рассматривать как внеклеточный фактор, в основном взаимодействующий с мембранными рецепторами сладкого вкуса T1R2/T1R3 и влияющий на регуляцию продукции инсулина и инкретинов, а также адипогенез (Kokrashvili et al. 2009a; 2009b; Kyriazis et al. 2012; Masubuchi et al. 2013).

Помимо натуральных сахаров, T1R2/T1R3 рецепторы обеспечивают вкусовое восприятие и предпочтение веществ сладкого вкуса, не имеющих метаболической ценности и обладающих комплексным вкусом, таких как искусственные подсластители и соли металлов. Все искусственные сахарозаменители имеют характерный неприятный привкус (металлический, жгучий) со значительным последствием, что осложняет их использование в пищевой промышленности и является одним из главных стимулов к поиску новых веществ. Данный эффект связан с воздействием на хеморецепторы TRPV1 соматосенсорной системы (тройничного нерва в ротовой полости). Показано, что предпочтение низких концентраций солей двухвалентных металлов, таких как FeSO_4 и ZnSO_4 , восприни-

маемых человеком как сладкие, зависит от T1R3 и TRPM5, а отвергание высоких концентраций данных солей и сахарозаменителей — от TRPV1 (Riera et al. 2008; 2009). Вместе с тем искусственные подсластители стимулируют вкусовые рецепторы эффективнее натуральных сахаров, которых они слаще в сотни раз. Данные статистики показывают, что с 1960-х гг. употребление как синтетических некалорийных сахарозаменителей, так и натуральных (фруктозы) испытывало драматический рост, особенно с напитками (Mattes, Popkin 2009), при этом наблюдается хорошая корреляция роста потребления с ростом ожирения (Swithers 2013). Одной из важнейших особенностей сахарозаменителей, которая, как в настоящее время предполагается, может сыграть негативную роль при их систематическом употреблении, является то, что они помимо имитации сладкого вкуса при отсутствии гликемического эффекта вызывают все те же физиологические эндокринные регуляторные реакции, что и калорийные сахароза и глюкоза. Достаточно давно показано, что сахарозаменители могут провоцировать голод и переедание. К примеру, жевание жвачки с некалорийным сахарозаменителем аспартамом вызывает голод (Tordoff, Alleva 1990); доступность сахараина провоцировала большее потребление пищи крысами (Tordoff, Friedman 1989). В настоящее время предполагается, что на уровне организма отсутствие калорийности у сахарозаменителей может привести к разобщению врожденной связи между сладким вкусом потребляемой пищи и ее питательным эффектом (Swithers 2013). Действительно, в опытах на крысах и со здоровыми испытуемыми было продемонстрировано, что употребление неметаболизированных сахарозаменителей может вызывать нарушения энергетического баланса из-за нарушения калорийной компенсации (caloric compensation) (Swithers et al. 2010).

Роль рецепторов в ЖКТ и в поджелудочной железе

T1R3 и α -гаструцин оказывают непосредственное влияние на всасывание сахаров в слизистой оболочке тонкого кишечника, стимулируя экспрессию транспортеров глюкозы: натрий-глюкозного котранспортера-1 (SGLT-1) и транспортера глюкозы-2 (GLUT2) (Mace et al. 2007; Margolskee et al. 2007).

Согласно классической концепции «инкретинового эффекта» пероральный прием глюкозы стимулирует выброс большего количества инсулина, чем внутривенная инфузия, и приво-

дит к более быстрому снижению ее уровня в плазме (Rehfeld 2018). Этот феномен в значительной степени обусловлен двумя инсулинотропными гормонами, выделяемыми энтероэндокринными L- и K-клетками кишечника: глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIP), соответственно, которые стимулируют β -клетки (Drucker 2013; Rehfeld 2018; Sternini et al. 2008). Считается, что совместное действие инкретинов определяет примерно 50% от общего секреторного ответа инсулина после приема пищи. Получены данные, свидетельствующие, что T1R3, α -гаструцин и TRPM5 участвуют в секреции инкретиновых гормонов GLP-1 и PYY в L-клетках (Jang et al. 2007; Kojima, Nakagawa 2011; Kokrashvili et al. 2009a; 2009b; 2014; Rozengurt et al. 2006; Steinert et al. 2011). У *Tas1r3*-нокаутных мышей и в эксплантах их подвздошной кишки выброс GLP-1 в ответ на люминальное введение глюкозы заметно снижен (Kokrashvili et al. 2009a). Сукралоза, добавленная в среду с клеточной линией *GLUTag* мыши и L-клеток *NCI-H716* человека, усиливала выработку GLP-1, которая блокировалась видоспецифическими ингибиторами рецепторов сладкого вкуса, лактизолом и гурмарином, соответственно (Jang et al. 2007; Margolskee et al. 2007). В культуре энтероэндокринных клеток тонкого кишечника мыши блокада T1R2/T1R3 гурмарином прекращала продукцию GLP-1 и GIP (Sigoillot et al. 2012). Вместе с тем, до сих пор нет исчерпывающих доказательств того, что T1R3-зависимые кишечные эндокринные механизмы достаточно мощны, чтобы оказывать существенное регуляторное влияние на уровень глюкозы в крови *in vivo*, как предполагалось рядом авторов (Margolskee et al. 2007). Кроме того, на выраженность инкретинового эффекта могут влиять видовые особенности: доля L-клеток, экспрессирующих вкусовые белки, колеблется от 15% в тощей кишке мыши до 90% в двенадцатиперстной кишке человека (Rozengurt et al. 2006; Steinert et al. 2011; Sutherland et al. 2007).

Получены данные о прямом участии вкусовых рецепторов в секреции инсулина β -клетками панкреатических островков. Экспрессия генов *TAS1R1–3* и элементов внутриклеточного каскада трансдукции вкусового сигнала была выявлена в β -клетках человека и мыши, α -клетках мыши, а также в клетках *MIN6*, глюкозореактивной линии β -клеток инсулиномы мыши (Kojima et al. 2014; Kyriazis et al. 2012; 2014; Medina et al. 2014; Nakagawa et al. 2009; Reimann et al. 2008). В β -клетках экспрессия T1R3 намного превышает T1R2, что свидетельствует в пользу

существования там функционального гомодимера T1R3/T1R3 и/или гетеродимера T1R3 с кальциевым рецептором CaSR (Hamano et al. 2015; Kojima et al. 2014; Medina et al. 2014). В то же время уровень экспрессии *TAS1R1* гена в островковой ткани человека лишь ненамного ниже *TAS1R3* (Kyriazis et al. 2012). Показано, что искусственные подсластители способны стимулировать секрецию инсулина в островках мыши, которая ослабляется T1R3-блокатором гурмарином (Kojima et al. 2014; Kyriazis et al. 2012; Nakagawa et al. 2009). Соответственно, лактизол, аллостерический ингибитор человеческого T1R3, подавляет вызванное фруктозой потенцирование высвобождения инсулина в панкреатических островках человека (Kyriazis et al. 2012). Удаление генов *Tas1r2*, *Tas1r3* и *Trpm5* приводит к существенному снижению влияния подсластителей и фруктозы на выброс инсулина в островках мыши *in vitro* (Kyriazis et al. 2012). Таким образом, ген *Tas1r2*, несмотря на низкий уровень экспрессии, определяет потенцирующий эффект фруктозы (Kyriazis et al. 2012). Получены также первые данные, свидетельствующие о роли рецептора аминокислот T1R1/T1R3 в поджелудочной железе. Так, L-аминокислоты, глутамат и аргинин, стимулировали выделение инсулина в клетках *MIN6*, при этом экспрессия его РНК угнеталась лактизолом (Oya et al. 2011). Было показано влияние метаболического статуса на опосредованную T1R-рецепторами секрецию инсулина. 24-часовое голодание у мышей приводило к резкому увеличению содержания белка T1R3 в бета-клетках при том же уровне мРНК что и до голодания; содержание белка быстро снижалось после кормления. При этом островки Лангерганса, взятые от голодавших мышей, выделяли больше инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, чем от неголодавших, и их реакция сильнее подавлялась T1R3-блокатором гурмарином (Medina et al. 2014). Гипергликемия, напротив, оказывала негативный эффект на экспрессию *Tas1r2* и *Tas1r3* в клетках *MIN6*, а также в островках мышей линии *C57BL/6J*, содержавшихся на диете с повышенным содержанием жиров. Удаление гена *Tas1r2* у мыши или блокада рецепции лактизолом в ткани человека нарушала регуляцию базальной секреции инсулина в островковой ткани при голодании, вызывая его гиперсекрецию (Kyriazis et al. 2014). Интересно, что уровень T1R3 белка также понижен у *ob/ob* и *db/db* линий мышей со склонностью к ожирению (Medina et al. 2014). Известны также данные одного исследования, выявившего высокую степень экспрессии генов *Tas1r2*, *Tas1r3*, *Gnat3* и их белковых продуктов

в аркуатном и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса мыши (структурах ЦНС, участвующих в регуляции метаболизма и питания) и, в несколько меньшей степени, в коре и гиппокампе. Было показано, что уровень экспрессии *Tas1r2* зависит от метаболического статуса — при голодании он увеличивался в два раза и был в 2,5 раза выше у *ob/ob* линии (Ren et al. 2009). Кроме того, авторы *in vitro* с использованием эмбриональных клеток гипоталамуса, экспрессирующих *Tas1r2*, *Tas1r3* и *Gnat3*, показали, что увеличение концентрации глюкозы с 0,1 до 10 мМ в среде, а также добавка сукралозы к среде, уже содержащей глюкозу, угнетает экспрессию *Tas1r2*, но не *Tas1r1* и *Tas1r3* (Ren et al. 2009). К сожалению, данная тема по всей видимости пока не получила должного развития.

В то же время данные оценки функциональной активности вкусовых рецепторов *in vivo* весьма ограничены. Было показано, что нокаут гена, кодирующего α -гаструцин (Kokrashvili et al. 2009a), замедляет секрецию инсулина в ответ на нагрузку глюкозой в глюкозотолерантном тесте. Кириазис с соавторами (Kyriasis et al. 2014) не выявили эффекта удаления *Tas1r2* на толерантность к глюкозе при ее внутрибрюшинном введении у мышей линии *C57BL/6J* после 18-часового голодания. Наши исследования, проведенные на *Tas1r3* нокаутной линии мышей, полученной на основе линии *C57BL/6J* (Damak et al. 2003), впервые *in vivo* показали, что удаление гена при содержании на стандартной диете, помимо нарушения вкусового восприятия сладкого, приводящего к снижению его потребления и предпочтения, снижает толерантность к глюкозе при тестировании с 18-часовым голоданием и без голодания, усиливает инсулинорезистентность, нарушает глюконеогенез, способствует увеличению массы тела и жирового депо и вызывает дислипидемию, что может рассматриваться как модель метаболического синдрома (Murovets et al. 2014; 2015; 2016). Оценка инкретинового эффекта, проведенная нами, показала, что у мышей в эугликемическом состоянии рецепция глюкозы кишечником, опосредованная T1R-рецепторами, не играет такой важной роли в поддержании регуляции гомеостаза глюкозы, и секреция инкретинов у мышей по всей видимости в гораздо большей степени определяется классическим механизмом K_{ATP} -зависимой метаболической детекции (см. ниже).

Таким образом, на основе анализа литературных и собственных данных мы можем заключить, что в основном влияние экстраоральных вкусовых рецепторов T1R3 на метаболизм

глюкозы осуществляется путем регуляции секреции инсулина в бета-клетках, где они выполняют роль мембранных детекторов экстраклеточной глюкозы и других лигандов, включая сахара, искусственные некалорийные сахарозаменители и аминокислоты.

Соотношение механизмов, опосредованных вкусовыми рецепторами, с классическим механизмом метаболической детекции остается важным дискуссионным вопросом. Метаболическая детекция глюкозы в целом сводится к последовательности процессов, включающих перенос глюкозы внутрь клетки низкоаффинным транспортером GLUT2, ее фосфорилирование с помощью специализированной глюкокиназы (гексокиназа IV; ГК) и гликолиз, в результате которого увеличивается внутриклеточное отношение АТФ/АДФ (Craig et al. 2008; Herman, Kahn 2006; Hiriart, Aguilar-Bryan 2008; Shuit 2001). Повышение концентрации АТФ стимулирует закрытие АТФ-чувствительных мембранных калиевых каналов (K_{ATP}), вызывающее деполяризацию мембраны и вход в цитоплазму ионов Ca^{2+} , после чего следует реакция клетки (Herman, Kahn 2006; Hiriart, Aguilar-Bryan 2008). Данный $GK-K_{ATP}$ -зависимый механизм в значительной мере контролирует секрецию инсулина в β -клетках поджелудочной железы (Schuit et al. 2001), GLP-1 и GIP в энтероэндокринных клетках слизистой оболочки ЖКТ (Reimann et al. 2008; Wang et al. 2003), а также опосредует реакцию глюкосенсорных нейронов гипоталамуса (Miki et al. 2001). Тем не менее уже на начальном этапе исследований K_{ATP} механизма появлялись данные, что метаболическая детекция не может являться единственным механизмом глюкорцепции в поджелудочной железе, кишечнике и в центральной нервной системе (Fioramonti et al. 2004; Gembal et al. 1992; Straub, Sharp 2002; Wang et al. 2003). Исследования, показавшие новую роль T1R рецепторов в островковых клетках и энтероцитах, подтвердили важность и метаболических механизмов. В культивируемых островках мыши положительное влияние фруктозы или некалорийных подсластителей на секрецию инсулина требует наличия оптимального уровня глюкозы в среде. Резкое снижение концентрации глюкозы в среде островков отменяло потенцирующий эффект фруктозы (Kyriasis et al. 2012), а также стимулирующую активность некалорийных подсластителей (Nakagawa et al. 2009) в клетках MIN6. С другой стороны, рецепторы сладкого вкуса были неэффективны после максимальной деполяризации β -клеток высокими дозами толбуотида, ингибитора K_{ATP} -каналов (Kyriasis et al. 2012).

Тем не менее мы показали, что в отсутствие голодания, когда β -клетки должны быть частично деполяризованы за счет K_{ATP} -зависимых механизмов (Kyriasis et al. 2012; Yee et al. 2011) и поддерживают базальный уровень секреции инсулина, делеция T1R3 вызывает значительное нарушение толерантности к глюкозе как при ее внутривенном, так и при пероральном введении (Murovets et al. 2014; 2015; 2016).

Можно предположить, что метаболическая детекция глюкозы создает необходимую деполяризацию клетки, на фоне которой нутриенты, а также неметаболизируемые сахарозаменители могут усиливать продукцию инсулина через T1R-опосредованный сигнальный путь. Широкий набор данных, полученных за прошедшие десятилетия, подтверждает такую возможность. Следовательно, у значительного числа позвоночных, включая человека и грызунов, во всех специализированных клетках, чувствительных к сладким веществам, сосуществуют два молекулярных механизма рецепции, один из которых (T1R2/T1R3-опосредованный) определяет наличие лиганда, а другой — его метаболическую ценность. Оба механизма метаболической и специфической рецепции действуют синергично (Straub, Sharp 2002). При этом отсутствие одного из них лишь до некоторой степени может быть скомпенсировано оставшимся.

Влияние T1R на внутриклеточные регуляторные системы (mTOR и ERK1/2) и островковую ткань поджелудочной железы

Снижение секреции инсулина вследствие потери массы β -клеток или нарушения функции β -клеток и повышенная инсулинорезистентность считаются двумя основными факторами, приводящими к нарушению толерантности к глюкозе у пожилых людей (Maedler et al. 2006; Szoke et al. 2008). В связи с этим особый интерес представляют первые данные об участии T1R-опосредованной рецепции аминокислот в регуляции активности mTOR — внутриклеточного мультимолекулярного сигнального комплекса мишени рапамицина у млекопитающих, активность которого регулирует рост, деление, синтез белка, аутофагию и выживание клетки. Данный комплекс зависит от информации со многих входов, интегрируя системные сигналы (факторы роста и гормоны, включая инсулин) с локальными сигналами о доступности аминокислот, глюкозы и кислорода и собственном метаболическом состоянии клетки. Ограничение доступности аминокислот стимулирует аутофагию клеток посредством угнетения mTORC1,

активация данного комплекса завершает данный процесс (Meijer et al. 2015; Wauson et al. 2012; 2015; Zhou et al. 2016). Установлено, что активация mTORC1 у мышей способствует пролиферации β -клеток и в то же время усиливает их апоптоз, стимулирует их гипертрофию, увеличение площади островковой ткани и среднего размера островка, улучшает толерантность к глюкозе (Balcazar et al. 2009; Ding et al. 2017; Mori et al. 2009).

In vitro оперативное выключение рецептора аминокислот T1R1/T1R3 с помощью siRNA в культурах клеток (*MIN6*, *HeLa*, *H9C2*) снижало собственную активность mTOR и его способность реагировать на присутствие аминокислот в среде, при этом на 50% снижалось содержание инсулина в клетках *MIN6* и наблюдалось усиление аутофагии. Блокатор T1R2/T1R3 лактизол также подавлял активацию mTORC1 аминокислотами у клеток *HeLa*. Было показано, что T1R1/T1R3 опосредует реакции MAP-киназы ERK1/2, еще одного регуляторного белка, который в β -клетках опосредует транскрипцию гена инсулина в ответ на присутствие нутриентов (Wauson et al. 2012; 2015). Также и на культуре миоцитов *C2C12* было показано, что T1R1/T1R3-опосредованная рецепция аминокислоты метионина приводит к активации mTORC1 (Zhou et al. 2016). Нокаут *Tas1r3* приводил к снижению степени фосфорилирования mTOR в скелетной и сердечной мышце (Wauson et al. 2012).

Проведенное нами исследование с использованием *Tas1r3*-ген нокаутной линии мышей впервые выявило роль белка T1R3 в регуляции развития островков Лангерганса поджелудочной железы мыши. Удаление гена *Tas1r3* привело к снижению числа островков и их среднего размера, а также степени апоптоза, что может свидетельствовать о сниженной пролиферативной активности ткани. Полученные нами данные свидетельствуют, что отсутствие T1R3 приводит к дистрофии островковой ткани поджелудочной железы и сопряжено с развитием патологических изменений поджелудочной железы, характерных для развития диабета 2 типа и ожирения у человека (Murovets et al. 2019).

Влияние T1R на рост и дифференцировку жировой ткани

Данные о роли T1R в липидном обмене в целом немногочисленны, однако, они свидетельствуют, что рецептор T1R3 не только экспрессируется в жировой ткани, но и имеет определенное функциональное значение. Экспрессия гена *Tas1r3* была выявлена в адипоци-

тах из разных отделов жировой ткани у мышей линий C57BL/6 и линии с ожирением *Lep^{rd/ab}*, содержащихся на стандартной диете (Masubuchi et al. 2013; Simon et al. 2013). По данным Масубучи с соавторами (Masubuchi et al. 2013), в зрелых адипоцитах мыши экспрессия *Tas1r3* в десятки раз превышает таковую во вкусовых сосочках языка и в сотни раз превосходит экспрессию *Tas1r2*, что предполагает гомодимер T1R3/T1R3 как активную форму рецептора или гетеродимер с иным типом рецептора, связанного с G-белками (например, CaSR); при этом здесь он связан с *Gαs* — субъединицей G-белка, а не α -гастдуцина, как во вкусовых рецепторах рта. Исследования *in vitro* на культурах клеток: 3T3-L1 — эмбриональных фибробластов мыши, способных дифференцироваться в адипоциты и *eMSC* — мезенхимальных стволовых клеток, взятых из уха мыши, выявило у них экспрессию *Tas1r2* и *Tas1r3*, которая нарастала при дифференцировке в зрелые адипоциты (Simon et al. 2013). По данным Саймон с соавторами (Simon et al. 2013; 2014) ацесульфам калия и сахарин способствуют дифференцировке этих клеток, а также стромальных васкулярных клеток подкожного жира человека (*hSVC*) в адипоциты, однако, оно не зависит от *Tas1r2* и *Tas1r3*, поскольку наблюдается и у *eMSC*-клеток, взятых от соответствующих ген-нокаутных мышей. В то же время другая группа авторов выявила негативный эффект сукралозы и сахарина на дифференцировку 3T3-L1 и накопление ими триглицеридов, при этом данный эффект снимался сайленсингом *Tas1r3* с помощью ShRNA (Masubuchi et al. 2013; 2017). Предполагаемый механизм такой негативной регуляции связан со активацией T1R3/T1R3 белка $G\alpha_s$, который стимулирует разборку микротрубочек пока неустановленным независимым от цАМФ путем (возможно напрямую стимулируя тубулиновую ГТФазу), что вызывает активацию RhoA/ROCK каскада, подавляющего адипогенные транскрипционные факторы Akt и FoxO1 (Masubuchi et al. 2017).

Имеющиеся данные, полученные *in vivo*, многочисленны и отчасти противоречивы. Была выявлена устойчивость T1R3-нокаутных животных к ожирению, вызванному специальными диетами, провоцирующими ожирение (Glendinning et al. 2012). Так, при кормлении высококалорийной диетой с повышенным содержанием сахарозы у *Tas1r3*-нокаутных мышей отмечалось замедление набора веса и жирового депо, несмотря на высокий уровень потребления раствора сахарозы (Glendinning et al. 2012; Larsson et al. 2015). По данным Саймон с соавторами,

при кормлении специальной диетой, провоцирующей ожирение (содержащей сахарозу и повышенный уровень жиров, т. н. western diet), мыши с нокаутом гена *Tas1r3* не отличались от дикого типа по массе тела, однако, имели меньшую массу жира (по данным магнитной томографии) и размер адипоцитов при общем росте их числа; нокаут гена *Tas1r2* также приводил к снижению массы жировых депо и уменьшению размера адипоцитов (Simon et al. 2014). При этом непрямая калориметрия не выявила заметных сдвигов в метаболизме жиров и углеводов; не различался уровень инсулина, свободных жирных кислот в крови и объем потребления диеты. Таким образом, наличие гена у мышей дикого типа или никак не влияло на дифференцировку адипоцитов, или, напротив, действительно ограничивало дифференцировку преадипоцитов, но в то же время способствовало накоплению триглицеридов в них за счет угнетения липолиза, или же нокаут гена способствовал их дифференцировке, но мешал накоплению липидов. Стоит отметить разницу в экспериментальных подходах, так при исследованиях на культурах клеток использовали низкокалорийные сахарозаменители, а в опытах с диетами — натуральные сахара, чьи эффекты на метаболизм могут реализоваться гораздо большим количеством путей. Саймон с соавторами (Simon et al. 2014) предположили, что основное влияние на адипогенез и липолиз оказывают T1R3 рецепторы поджелудочной железы и эпителия кишечника, а не жировой ткани.

В ряде исследований показано, что дефицит рецепторного белка T1R3 приводит к нарушению липидного обмена при питании стандартной диетой. Хотя делеция T1R2 или T1R3 не влияла на вес тела у животных, получавших нормокалорийную диету (Murovets et al. 2016; Treesukosol et al. 2011), у мышей линии *B6-Tas1r3KO* наблюдались как увеличение массы околгонадного жира, так и заметные проявления дислипидемии, включая повышение уровня триглицеридов в плазме крови в сытом и в голодном состоянии и повышение концентрации глицерола у сытых (Murovets et al. 2016). Это в целом согласуется с *in vitro* данными Масубучи с соавторами (Masubuchi et al. 2013). Можно предположить, что в случае диеты, провоцирующей ожирение, повышенная стимуляция всех систем сахарами будет способствовать накоплению жира у мышей дикого типа как T1R-зависимыми, так независимыми механизмами, что снимает кажущееся противоречие между данными двух исследовательских групп.

Заключение

Исследование вкусовых генов *Tas1* и их белковых продуктов — мембранных рецепторов T1R позволило существенно расширить понимание механизмов восприятия вкуса натуральных сахаров и аминокислот, а также установить основы восприятия вкуса и физиологических эффектов искусственных некалорийных сахарозаменителей. Полученные данные послужили обоснованием существования системы хемосенсорных мембранных рецепторов, непосредственно реагирующих на наличие вкусовых веществ во внеклеточной среде, действующих относительно независимо от их клеточного метаболизма. Предположение, что данная рецепторная система действует синергично с основным универсальным механизмом метаболической детекции глюкозы, опосредованным глюкокиназой и АТФ-чувствительными К каналами, получило серьезное подтверждение. За последние два десятилетия было также установлено, что T1R не только влияют на выбор пищи, но и широко задействованы в управлении гормональными реакциями, которые регулируют всасывание и метаболизм углеводов в тканях организма, а также накопление жира. Кроме того, установлено, что они оказывают непосредственное влияние на метаболизм, рост и выживание клеток ряда тканей. Однако необходимы дальнейшие исследования, особенно в ряде направлений, в частности определено недостаточно исследована их роль в жировой ткани и особенно в головном мозге.

Таким образом, весь объем экспериментальных данных, накопленных к настоящему времени, показывает, что *Tas* гены не только широко участвуют во вкусовой чувствительности к сладким веществам и аминокислотам, но и способствуют их метаболизму на клеточном и организменном уровне.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Исследования были проведены полностью в соответствии с этическими принципами. Все исследования авторов, цитируемые в тексте, прошли проверку и одобрение Этического комитета Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (Animal Welfare Assurance no. A5952-01).

Ethics Approval

The research was conducted in full accordance with ethical principles. All the investigations of the authors cited in text were approved by the Animal Care and Use Committee of the Pavlov Institute of Physiology (Animal Welfare Assurance No. A5952-01).

Вклад авторов

Авторы декларируют равный вклад в написание данной рукописи.

Author Contributions

Authors declare equal contribution to the manuscript.

Благодарности

Мы благодарим доктора Р. Ф. Маргольского за предоставление линии ген-нокаутных мышей *C57BL/6J-Tas1r3^{tm1Rfm}*, использованной в наших экспериментах, цитированных здесь; И. Е. Богатыреву за содержание колонии мышей и весь коллектив лаборатории физиологии пищеварения Института физиологии им. И. П. Павлова, где проводили все экспериментальные работы.

Acknowledgements

We thank Dr. R. F. Margolskee for providing *C57BL/6J-Tas1r3^{tm1Rfm}* gen-knockout strain of mice used in our experiments, Mrs. I. E. Bogatyrova for managing the mouse colony, and all the staff of the Laboratory of Physiology of Digestion of Pavlov Institute of Physiology where we conducted all the experiments.

References

- Antinucci, M., Risso, D. (2017) A matter of taste: Lineage-specific loss of function of taste receptor genes in Vertebrates. *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 4, article 81. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00081> (In English)
- Bachmanov, A. A., Bosak, N. P., Floriano, W. B. et al. (2011) Genetics of sweet taste preferences. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 26, no. 4, pp. 286–294. <https://doi.org/10.1002/ffj.2074> (In English)

- Bachmanov, A. A., Bosak, N. P., Lin, C. et al. (2014) Genetics of taste receptors. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, no. 16, pp. 2669–2683. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990566> (In English)
- Bachmanov, A. A., Li, X., Reed, D. R. et al. (2001a) Positional cloning of the mouse saccharin preference (*Sac*) locus. *Chemical Senses*, vol. 26, no. 7, pp. 925–933. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.7.925> (In English)
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Ninomiya, Y. et al. (1997) Sucrose consumption in mice: Major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses. *Mammalian Genome*, vol. 8, no. 8, pp. 545–548. <https://doi.org/10.1007/s003359900500> (In English)
- Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., Beauchamp, G. K. (2001b) Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chemical Senses*, vol. 26, no. 7, pp. 905–913. <https://doi.org/10.1093/chemse/26.7.905> (In English)
- Balcazar, N., Sathyamurthy, A., Elghazi, L. et al. (2009) mTORC1 Activation regulates β -cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 12, pp. 7832–7842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807458200> (In English)
- Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Hayes, J. E. et al. (2006) Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: Problems, solutions and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 361, no. 1471, pp. 1137–1148. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1853> (In English)
- Bizeau, M. E., Pagliassotti, M. J. (2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism*, vol. 54, no. 9, pp. 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.04.004> (In English)
- Bremer, A. A., Stanhope, K. L., Graham, J. L. et al. (2011) Fructose-fed rhesus monkeys: A nonhuman primate model of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. *Clinical and Translational Science*, vol. 4, no. 4, pp. 243–252. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00298.x> (In English)
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N., et al. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, vol. 444, pp. 288–294. <https://doi.org/10.1038/nature05401> (In English)
- Craig, T. J., Ashcroft, F. M., Proks, P. (2008) How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *Journal of General Physiology*, vol. 132, no. 1, pp. 131–144. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709874> (In English)
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K. et al. (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, vol. 301, no. 5634, pp. 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1087155> (In English)
- Delay, E. R., Hernandez, N. P., Bromley, K., Margolskee, R. F. (2006) Sucrose and monosodium glutamate taste thresholds and discrimination ability of T1R3 knockout mice. *Chemical Senses*, vol. 31, no. 4, pp. 351–357. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjj039> (In English)
- Dias, A. G., Eny, K. M., Cockburn, M. et al. (2015) Variation in the TAS1R2 gene, sweet taste perception and intake of sugars. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, vol. 8, no. 2, pp. 81–90. <https://doi.org/10.1159/000430886> (In English)
- Ding, L., Yin, Y., Han, L. et al. (2017) TSC1-mTOR signaling determines the differentiation of islet cells. *Journal of Endocrinology*, vol. 232, no. 1, pp. 59–70. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0276> (In English)
- Donaldson, L. F., Bennett, L., Baic, S., Melichar, J. K. (2009) Taste and weight: Is there a link? *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 90, no. 3, pp. 800S–803S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462Q> (In English)
- Drucker, D. J. (2013) Incretin action in the pancreas: Potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diabetes*, vol. 62, no. 10, pp. 3316–3323. <https://doi.org/10.2337/db13-0822> (In English)
- Duca, F. A., Covasa, M. (2012) Current and emerging concepts on the role of peripheral signals in the control of food intake and development of obesity. *British Journal of Nutrition*, vol. 108, no. 5, pp. 778–793. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000529> (In English)
- Eny, K. M., Wolever, T. M., Corey, P. N., El-Soehy, A. (2010) Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 92, no. 6, pp. 1501–1510. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29836> (In English)
- Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., Pénicaud, L. (2004) A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes*, vol. 53, no. 11, pp. 2767–2775. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.11.2767> (In English)
- Fuller, J. L. (1974) Single-locus control of saccharin preference in mice. *Journal of Heredity*, vol. 65, no. 1, pp. 33–36. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108452> (In English)
- Fushan, A. A., Simons, C. T., Slack, J. P. et al. (2009) Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Current Biology*, vol. 19, no. 15, pp. 1288–1293. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.015> (In English)
- Fushan, A. A., Simons, C. T., Slack, J. P., Drayna, D. (2010) Association between common variation in genes encoding sweet taste signaling components and human sucrose perception. *Chemical Senses*, vol. 35, no. 7, pp. 579–592. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq063> (In English)
- Garcia-Bailo, B., Toguri, C., Eny, M., El-Soehy, A. (2009) Genetic variation in taste and its influence on food selection. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 69–80. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0031> (In English)
- Gembal, M., Gilon, P., Henquin, J. C. (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse β -cells. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 89, no. 4, pp. 1288–1295. <https://doi.org/10.1172/JCI115714> (In English)
- Glendinning, J. I., Chyou, S., Lin, I. (2005) Initial licking responses of mice to sweeteners: Effects of Tas1r3 polymorphisms. *Chemical Senses*, vol. 30, pp. 601–614. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji054> (In English)
- Glendinning, J. I., Gillman, J., Zamer, H. et al. (2012) The role of T1r3 and Trpm5 in carbohydrate-induced obesity in mice. *Physiology and Behavior*, vol. 107, no. 1, pp. 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.05.023> (In English)

- Greenberg, D., McCaffery, J., Potack, J. Z. et al. (1999) Differential satiating effects of fats in the small intestine of obesity-resistant and obesity-prone rats. *Physiology and Behavior*, vol. 66, no. 4, pp. 621–626. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00336-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00336-9) (In English)
- Hamano, K., Nakagawa, Y., Ohtsu, Y. et al. (2015) Lactisole inhibits the glucose-sensing receptor T1R3 expressed in mouse pancreatic β -cells. *Journal of Endocrinology*, vol. 226, no. 1, pp. 57–66. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0102> (In English)
- Herman, M. A., Kahn, B. B. (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 7, pp. 1767–1775. <https://doi.org/10.1172/JCI29027> (In English)
- Hiriart, M., Aguilar-Bryan, L. (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 295, no. 6, pp. E1298–E1306. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90493.2008> (In English)
- Hubbard, K. B., Hepler, J. R. (2006) Cell signalling diversity of the Gq α family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling*, vol. 18, no. 2, pp. 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.08.004> (In English)
- Inoue, M., Glendinning, J. I., Theodorides, M. L. et al. (2007) Allelic variation of the *Tas1r3* taste receptor gene selectively affects taste responses to sweeteners: Evidence from 129.B6-*Tas1r3* congenic mice. *Physiological Genomics*, vol. 32, no. 1, pp. 82–94. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00161.2007> (In English)
- Inoue, M., Reed, D. R., Li, X. et al. (2004) Allelic variation of the *Tas1r3* taste receptor gene selectively affects behavioral and neural taste responses to sweeteners in the F2 hybrids between C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 9, pp. 2296–2303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-03.2004> (In English)
- Ishimaru, Y. (2009) Molecular mechanisms of taste transduction in vertebrates. *Odontology*, vol. 97, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10266-008-0095-y> (In English)
- Jang, H.-J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M. J. et al. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 38, pp. 15069–15074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706890104> (In English)
- Jiang, P., Josue, J., Li, X. et al. (2012) Major taste loss in carnivorous mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 13, pp. 4956–4961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118360109> (In English)
- Kim, U.-K., Wooding, S., Riaz, N. et al. (2006) Variation in the human *TAS1R* taste receptor genes. *Chemical Senses*, vol. 31, no. 7, pp. 599–611. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji065> (In English)
- Kojima, I., Nakagawa, Y. (2011) The role of the sweet taste receptor in enteroendocrine cells and pancreatic β -cells. *Diabetes and Metabolism Journal*, vol. 35, no. 5, pp. 451–457. <https://doi.org/10.4093/dmj.2011.35.5.451> (In English)
- Kojima, I., Nakagawa, Y., Hamano, K. et al. (2015) Glucose-sensing receptor T1R3: A new signaling receptor activated by glucose in pancreatic β -cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 38, no. 5, pp. 674–679. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00895> (In English)
- Kojima, I., Nakagawa, Y., Ohtsu, Y. et al. (2014) Sweet taste-sensing receptors expressed in pancreatic β -cells: Sweet molecules act as biased agonists. *Endocrinology and Metabolism*, vol. 29, no. 1, pp. 12–19. <http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2014.29.1.12> (In English)
- Kokrashvili, Z., Mosinger, B., Margolskee, R. F. (2009a) T1R3 and α -gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1170, no. 1, pp. 91–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04485.x> (In English)
- Kokrashvili, Z., Mosinger, B., Margolskee, R. F. (2009b) Taste signaling elements expressed in gut enteroendocrine cells regulate nutrient-responsive secretion of gut hormones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 90, no. 3, pp. 822S–825S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462T> (In English)
- Kokrashvili, Z., Yee, K. K., Ilegems, E. et al. (2014) Endocrine taste cells. *British Journal of Nutrition*, vol. 111, no. 1, pp. S23–S29. <https://doi.org/10.1017/s0007114513002262> (In English)
- Kyriazis, G. A., Smith, K. R., Tyrberg, B. et al. (2014) Sweet taste receptors regulate basal Insulin secretion and contribute to compensatory insulin hypersecretion during the development of diabetes in male mice. *Endocrinology*, vol. 155, no. 6, pp. 2112–2121. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2015> (In English)
- Kyriazis, G. A., Soundarapandian, M. M., Tyrberg, B. (2012) Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 8, pp. E524–E532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115183109> (In English)
- Laffitte, A., Neiers, F., Briand, L. (2014) Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 17, no. 4, pp. 379–385. <https://doi.org/10.1097/MCO.000000000000058> (In English)
- Larsson, M. H., Håkansson, P., Jansen, F. P. et al. (2015) Ablation of TRPM5 in mice results in reduced body weight gain and improved glucose tolerance and protects from excessive consumption of sweet palatable food when fed high caloric diets. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 9, article e0138373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138373> (In English)
- Li, X., Inoue, M., Reed, D. R., Huque, T. et al. (2001) High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal chromosome 4. *Mammalian Genome*, vol. 12, no. 1, pp. 13–16. <https://doi.org/10.1007/s003350010236> (In English)

- Liu, S., Manson, J. E. (2001) Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, vol. 12, no. 4, pp. 395–404. <https://doi.org/10.1097/00041433-200108000-00005> (In English)
- Mace, O. J., Affleck, J., Patel, N., Kellett, G. L. (2007) Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *The Journal of Physiology*, vol. 582, no. 1, pp. 379–392. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130906> (In English)
- Maedler, K., Schumann, D. M., Schulthess, F. et al. (2006) Aging correlates with decreased β -cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: A potential role for Fas and pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes*, vol. 55, no. 9, pp. 2455–2462. <https://doi.org/10.2337/db05-1586> (In English)
- Margolskee, R. F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 1, pp. 1–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100054200> (In English)
- Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z. et al. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 38, pp. 15075–15080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706678104> (In English)
- Martinez, F. J., Rizza, R. A., Romero, J. C. (1994) High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension*, vol. 23, no. 4, pp. 456–463. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.4.456> (In English)
- Maruyama, Y., Pereira, E., Margolskee, R. F. et al. (2006) Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 8, pp. 2227–2234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4329-05.2006> (In English)
- Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Ma, J. et al. (2013) A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, article e54500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054500> (In English)
- Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Medina, J. et al. (2017) Correction: T1R3 homomeric sweet taste receptor regulates adipogenesis through Gas-mediated microtubules disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 7, article e0181293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181293> (In English)
- Mattes, R. D., Popkin, B. M. (2009) Nonnutritive sweetener consumption in humans: Effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, no. 1, pp. 1–14. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26792> (In English)
- McCaughey, S. A. (2008) The taste of sugars. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 32, no. 5, pp. 1024–1043. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.002> (In English)
- Medina, A., Nakagawa, Y., Ma, J. et al. (2014) Expression of the glucose-sensing receptor T1R3 in pancreatic islet: Changes in the expression levels in various nutritional and metabolic states. *Endocrine Journal*, vol. 61, no. 8, pp. 797–805. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej14-0221> (In English)
- Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaert, E. F., Codogno, P. (2015) Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*, vol. 47, pp. 2037–2063. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1765-4> (In English)
- Miki, T., Liss, B., Minami, K. et al. (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience*, vol. 4, no. 5, pp. 507–512. <https://doi.org/10.1038/87455> (In English)
- Mori, H., Inoki, K., Opland, D. et al. (2009) Critical roles for the TSC-mTOR pathway in β -cell function. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 297, no. 5, pp. E1013–E1022. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00262.2009> (In English)
- Murovets, V. O., Bachmanov, A. A., Travnikov, S. V. et al. (2014) Uchastie retseptornogo belka TAS1R3 v regulyatsii obmena glyukozy u myshej pri raznykh urovnyakh glikemii [Involvement of Tas1R3 receptor protein in control of the metabolism of glucose at different levels of glycemia in mice]. *Zhurnal Evolyutsionnoj Biokhimii i Fiziologii*, vol. 50, no. 4, pp. 296–304. (In Russian)
- Murovets, V. O., Bachmanov, A. A., Zolotarev, V. A. (2015) Impaired glucose metabolism in mice lacking the Tas1r3 taste receptor gene. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 6, article e0130997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130997> (In English)
- Murovets, V. O., Lukina, E. A., Sozontov, E. A. et al. (2020) Allelic variation of the *Tas1r3* taste receptor gene affects sweet taste responsiveness and metabolism of glucose in F1 mouse hybrids. *PLoS ONE*, vol. 15, no. 7, article e0235913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235913> (In English)
- Murovets, V. O., Lukina, E. A., Zolotarev, V. A. (2018a) The effect of *Tas1r3* gene polymorphism on preference and consumption of sucrose and low-calorie sweeteners in interstrain hybrid mice of the first filial generation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 54, no. 3, pp. 221–233. <https://doi.org/10.1134/S0022093018030079> (In English)
- Murovets, V. O., Sozontov, E. A., Andreeva, Yu. V. et al. (2016) Vliyanie retseptornogo belka T1R3 na glyukoneogenez i zhirovoj obmen u myshej [Effect of T1R3 receptor protein deletion on gluconeogenesis and lipid metabolism in mice]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 102, no. 6, pp. 668–679. (In Russian)
- Murovets, V. O., Sozontov, E. A., Andreeva, Yu. V. et al. (2018b) Vliyanie polimorfizma gena *Tas1r3* na metabolizm glyukozy i lipidov u mezhlnejnykh gibridov myshej [Effects of *Tas1r3* gene polymorphisms on glucose and lipid metabolism in between strain hybrids of mice]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 104, no. 3, pp. 338–350. (In Russian)

- Murovets, V. O., Sozontov, E. A., Zachepilo, T. G. (2019) Vliyanie vkusovogo retseptornogo belka T1R3 na razvitie ostrovkoy tkani podzheludochnoj zhelezy myshi [Effect of taste receptor protein T1R3 on the development of islet tissue of the murine pancreas]. *Doklady Akademii Nauk*, vol. 484, no. 1, pp. 117–120. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841117-120> (In Russian)
- Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Mogami, H. et al. (2013) Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: Generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocrine Journal*, vol. 60, no. 10, pp. 1191–1206. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej13-0282> (In English)
- Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S. et al. (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 4, article e5106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005106> (In English)
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J. et al. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, vol. 106, no. 3, pp. 381–390. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00451-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00451-2) (In English)
- Nie, Y., Vignes, S., Hobbs, J. R. et al. (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Current Biology*, vol. 15, no. 21, pp. 1948–1952. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.037> (In English)
- Ohkuri, T., Yasumatsu, K., Horio, N. et al. (2009) Multiple sweet receptors and transduction pathways revealed in knockout mice by temperature dependence and gurmarin sensitivity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 296, no. 4, pp. R960–R971. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91018.2008> (In English)
- Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y. et al. (2011) Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells. *Genes to Cells*, vol. 16, no. 5, pp. 608–616. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01509.x> (In English)
- Reed, D. R., Li, S., Li, X. et al. (2004) Polymorphisms in the taste receptor gene (*Tas1r3*) region are associated with saccharin preference in 30 mouse strains. *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 4, pp. 938–946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1374-03.2004> (In English)
- Rehfeld, J. F. (2018) The origin and understanding of the incretin concept. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 9, article 387. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00387> (In English)
- Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G. et al. (2008) Glucose sensing in L cells: A primary cell study. *Cell Metabolism*, vol. 8, no. 6, pp. 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.11.002> (In English)
- Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R. et al. (2009) Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, vol. 3, article 12. <https://doi.org/10.3389/neuro.07.012.2009> (In English)
- Riera, C. E., Vogel, H., Simon, S. A. et al. (2008). The capsaicin receptor participates in artificial sweetener aversion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 376, no. 4, pp. 653–657. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.029> (In English)
- Riera, C. E., Vogel, H., Simon, S. A. et al. (2009) Sensory attributes of complex tasting divalent salts are mediated by TRPM5 and TRPV1 channels. *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 8, pp. 2654–2662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4694-08.2009> (In English)
- Robino, A., Bevilacqua, L., Pirastu, N. et al. (2015) Polymorphisms in sweet taste genes (TAS1R2 and GLUT2), sweet liking, and dental caries prevalence in an adult Italian population. *Genes & Nutrition*, vol. 10, no. 5, article 34. <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0485-z> (In English)
- Roper, S. D. (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflügers Archiv—European Journal of Physiology*, vol. 454, no. 5, pp. 759–776. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0247-x> (In English)
- Rozengurt, N., Wu, S. V., Chen, M. C. et al. (2006) Colocalization of the α -subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 291, no. 5, pp. G792–G802. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2006> (In English)
- Sainz, E., Cavenagh, M. M., LopezJimenez, N. D. et al. (2007) The G-protein coupling properties of the human sweet and amino acid taste receptors. *Developmental Neurobiology*, vol. 67, no. 7, pp. 948–959. <https://doi.org/10.1002/dneu.20403> (In English)
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M. et al. (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*, vol. 19, no. 6, pp. 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18> (In English)
- Schuit, F. C., Huypens, P., Heimberg H. et al. (2001) Glucose sensing in pancreatic β -cells: A model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*, vol. 50, no. 1., pp. 1–11. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.1.1> (In English)
- Sclafani, A., Ackroff, K. (2012) Role of gut nutrient sensing in stimulating appetite and conditioning food preferences. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative*, vol. 302, no. 10, pp. R1119–R1133. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00038.2012> (In English)
- Sclafani, A., Glass, D. S., Margolskee, R. F., Glendinning, J. I. (2010) Gut T1R3 sweet taste receptors do not mediate sucrose-conditioned flavor preferences in mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative*, vol. 299, no. 6, pp. R1643–R1650. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00495.2010> (In English)
- Shindo, Y., Miura, H., Carninci, P. et al. (2008) G α 14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 376, no. 3, pp. 504–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.035> (In English)

- Sigoillot, M., Brockhoff, A., Meyerhof, W., Briand, L. (2012) Sweet-taste-suppressing compounds: Current knowledge and perspectives of application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 96, no. 3, pp. 619–630. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4387-3> (In English)
- Simon, B. R., Parlee, S. D., Learman, B. S. et al. (2013) Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 45, pp. 32475–32489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514034> (In English)
- Simon, B. R., Learman, B. S., Parlee, S. D. et al. (2014) Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, article e86454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086454> (In English)
- Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E. (2008) Enteroendocrine cells: A site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 15, n. 1, pp. 73–78. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f43a73> (In English)
- Steinert, R. E., Gerspach, A. C., Gutmann, H. et al. (2011) The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clinical Nutrition*, vol. 30, no. 4, pp. 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.01.007> (In English)
- Straub, S. G., Sharp, G. W. (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 18, no. 6, pp. 451–463. <https://doi.org/10.1002/dmrr.329> (In English)
- Sutherland, K., Young, R. L., Cooper, N. J. et al. (2007) Phenotypic characterization of taste cells of the mouse small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 292, no. 5, pp. G1420–G1428. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00504.2006> (In English)
- Swithers, S. E. (2013) Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 24, no. 9, pp. 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.005> (In English)
- Swithers, S. E., Martin, A. A., Davidson, T. L. (2010) High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology and Behavior*, vol. 100, no. 1 pp. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.12.021> (In English)
- Szoke, E., Shrayyef, M. Z., Messing, S. et al. (2008) Effect of aging on glucose homeostasis: Accelerated deterioration of β -cell function in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, vol. 31, no. 3, pp. 539–543. <https://doi.org/10.2337/dc07-1443> (In English)
- Tappy, L. (2018) Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *Journal of Experimental Biology*, vol. 221, no. 1, article jeb164202. <https://doi.org/10.1242/jeb.164202> (In English)
- Toda, Y., Nakagita, T., Hayakawa, T. et al. (2013) Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 52, pp. 36863–36877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494443> (In English)
- Tordoff, M. G., Alleva, A. M. (1990) Oral stimulation with aspartame increases hunger. *Physiology and Behavior*, vol. 47, no. 3, pp. 555–559. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90126-o](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90126-o) (In English)
- Tordoff, M. G., Friedman, M. I. (1989) Drinking saccharin increases food intake and preference-I. Comparison with other drinks. *Appetite*, vol. 12, no. 1, pp. 1–10. [https://doi.org/10.1016/0195-6663\(89\)90064-0](https://doi.org/10.1016/0195-6663(89)90064-0) (In English)
- Treesukosol, Y., Smith, K. R., Spector, A. C. (2011) The functional role of the T1R family of receptors in sweet taste and feeding. *Physiology and Behavior*, vol. 105, no. 1, pp. 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.030> (In English)
- Von Molitor, E., Riedel, K., Krohn, M. et al. (2021) Sweet taste is complex: Signaling cascades and circuits involved in sweet sensation. *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 15, article 667709. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.667709> (In English)
- Wang, S. Y., Chi, M. M.-Y., Li, L. et al. (2003) Studies with GIP/Ins cells indicate secretion by gut K cells is KATP channel independent. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 284, no. 5, pp. E988–E1000. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2002> (In English)
- Wauson, E. M., Guerra, M. L., Dyachok, J. et al. (2015) Differential regulation of ERK1/2 and mTORC1 through T1R1/T1R3 in MIN6 cells. *Molecular Endocrinology*, vol. 29, no. 8, pp. 1114–1122. <https://doi.org/10.1210/ME.2014-1181> (In English)
- Wauson, E. M., Zaganjor, E., Lee, A-Y. et al. (2012) The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy. *Molecular Cell*, vol. 47, no. 6, pp. 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.001> (In English)
- Yee, K. K., Sukumaran, S. K., Kotha, R. et al. (2011) Glucose transporters and ATP-gated K^+ (K_{ATP}) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 13, pp. 5431–5436. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100495108> (In English)
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J. et al. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, vol. 112, no. 3, pp. 293–301. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00071-0) (In English)
- Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A. et al. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, vol. 115, no. 3, pp. 255–266. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00844-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00844-4) (In English)
- Zhao, H., Li, J., Zhang, J. (2015) Molecular evidence for the loss of three basic tastes in penguins. *Current Biology*, vol. 25, no. 4, pp. R141–R142. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.026> (In English)
- Zhou, Y., Ren, J., Song, T. et al. (2016) Methionine regulates mTORC1 via the T1R1/T1R3-PLC β -Ca²⁺-ERK1/2 signal transduction process in C2C12 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 10, article 1684. <https://doi.org/10.3390/ijms17101684> (In English)



УДК 616.15 + 616.092

EDN VNUXZC

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-286-307>

Переливание крови: становление

Е. А. Никитина ^{✉1,2}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,
191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

Сведения об авторе

Екатерина Александровна Никитина, SPIN-код: 7844-8621, Scopus AuthorID: 56603106300, ResearcherID: L-5761-2014, ORCID: 0000-0003-1897-8392, e-mail: 21074@mail.ru

Для цитирования: Никитина, Е. А. (2022) Переливание крови: становление. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 286–307. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-286-307> EDN VNUXZC

Получена 6 августа 2022; прошла рецензирование 23 августа 2022; принята 26 августа 2022.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема 63.1).

Права: © Е. А. Никитина (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. XIX век — время становления переливания крови, история которого уходит вглубь веков. В этот период после полуторавекового забвения вновь возрождается интерес к гемотрансфузии, в чем ключевую роль сыграл Эдинбургский университет, именно с его выпускниками связано становление переливания крови. Среди них прежде всего необходимо выделить Джеймса Бланделла, осуществившего в 1818 г. первое переливание от человека к человеку. Работы Бланделла представляли одно из первых систематических исследований в области переливания крови и положили начало новой эре трансфузионной медицины. Им и его последователями, многие из которых незаслуженно забыты, была доказана опасность гетерологичного переливания крови; выявлено, что венозная кровь так же подходит для переливания, как и артериальная; разработаны подходы к предотвращению свертывания крови, в том числе подогревание, дефибринирование и использование антикоагулянтов; усовершенствованы методические приемы, применяемые при трансфузиях инструменты и устройства; отмечено, что в них не должен попадать воздух. Одновременно с развитием гемотрансфузии проводились исследования внутривенного введения различных жидкостей и газов, способствовавшие развитию внутривенной терапии. Однако переливание крови внедрялось в медицинскую практику довольно медленно, так как нередко приводило к гибели пациентов. Это было обусловлено как несовершенством процедуры и инструментария, так и непознанностью причин несовместимости человеческой крови. Данный обзор отражает основные направления развития переливания крови в XIX веке в зарубежной физиологии и медицине.

Ключевые слова: кровообращение, переливание крови, история физиологии, история медицины, Джеймс Бланделл

Blood transfusion: The genesis

E. A. Nikitina✉^{1,2}¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia² Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

Author

Ekaterina A. Nikitina, SPIN: 7844-8621, Scopus AuthorID: 56603106300, ResearcherID: L-5761-2014, ORCID: 0000-0003-1897-8392, e-mail: 21074@mail.ru

For citation: Nikitina, E. A. (2022) Blood transfusion: The genesis. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 286–307. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-286-307> EDN VNUXZC

Received 6 August 2022; reviewed 23 August 2022; accepted 26 August 2022.

Funding: This study was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019-2030) (63.1).

Copyright: © E. A. Nikitina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The 19th century witnessed the genesis of blood transfusion, whose history goes back several centuries. Then, after a century and a half of oblivion, an interest in blood transfusion revived again. The major contribution to the development of blood transfusion was made by the graduates of the University of Edinburgh. High among them was James Blundell, who performed the first human-to-human transfusion in 1818. His contribution is one of the first systematic studies in this field and ushered in a new era of transfusion medicine. He, along with his followers, many of whom are undeservedly forgotten, proved the danger of heterologous blood transfusions, found that venous blood was as suitable as arterial blood, developed approaches to preventing blood clotting (warming, defibrination, anticoagulants), improved transfusion techniques and equipment, and noted it was important to avoid air inside the transfusion set. The development of blood transfusion encouraged research into the intravenous injection of various liquids and gases contributing to the development of intravenous therapy. However, blood transfusion was being introduced into the medical practice slowly, as it often led to the death of patients. This was due to the imperfection of the procedure and tools and unawareness of human blood incompatibility. This review explores the key advances in the development of blood transfusion in foreign physiology and medicine in the 19th century.

Keywords: blood circulation, blood transfusion, history of physiology, history of medicine, James Blundell

*ибо душа всякого тела есть кровь его
Левит, 17:14*

Введение

С древнейших времен понятия кровь и жизнь неразделимы. Идеи о лечении различных заболеваний с помощью крови и о перемещении крови из одного организма в другой возникли много веков назад (Nikitina 2012). Ранние страницы истории переливания крови, яркие, неожиданные, драматичные, а порой и трагичные, рассмотрены нами прежде (Nikitina 2020). Сейчас же обратимся к периоду становления переливания крови — веку девятнадцатому в зарубежной физиологии и медицине. Российские страницы истории трансфузионной медицины заслуживают отдельного дальнейшего рассмотрения.

Возрождение идей о переливании крови

После запретительного эдикта Папы Римского на переливание крови (1679 г.) работы

в этой области замерли более чем на 100 лет. Интерес к подобным исследованиям возрождается на стыке XVIII–XIX вв. Колыбелью этого возрождения стала Великобритания. И тут нужно особо отметить роль Эдинбургского университета. В тот период он пользовался огромной популярностью, обусловленной отсутствием религиозных ограничений и сравнительно невысокой платой за обучение. Лекции в университете читали на английском языке, что привлекало большое число студентов не только из Старого, но и из Нового света. В XVIII веке 117 американских студентов получили степень доктора медицины в Эдинбургском университете, именно эдинбургская модель образования была применена при создании медицинских школ в Филадельфии, Нью-Йорке и Монреале (Schmidt 2004). Возрождение интереса к гемотрансфузии основывалось на традициях этой прославленной медицинской школы (Shifman, Filippovich 2006). Становление переливания крови в XIX веке связано прежде всего с ее питомцами.

В 1796 г. Эразм Дарвин (1731–1802) (рис. 1), изучавший медицину в Эдинбургском университете, выступил за переливание крови в случаях, связанных с недостаточным питанием (Hajdu 2003). В знаменитой книге «Zoonomia» (1794–1796) он предложил причудливое оборудование для переливания крови в виде двух гусиных перьев, соединенных кишечником курицы, которое, впрочем, никогда не использовал (Maluf 1954).

В Эдинбургском университете обучался медицине и Уильям Торнтон (1759–1828) (рис. 2), родившийся на Тортоле (Виргинские острова). 15 декабря 1799 г. в Вирджинии Уильям Торнтон предложил использовать кровь ягненка для лечения американского президента Джорджа Вашингтона, хотя это предложение было несколько запоздалым. Джордж Вашингтон проснулся рано утром 14 декабря 1799 г. с охриплостью горла. В 6 часов утра у него началась лихорадка, он задыхался. По настоянию пациента ему было проведено обильное кровопускание (около 18 унций крови, что составляет

примерно 530 мл). Затрудненное дыхание было, очевидно, вызвано бактериальной инфекцией надгортанника. Были вызваны врачи Джеймс Крейк и Густав Браун (оба закончили Эдинбургский университет), и еще дважды было проведено кровопускание. Во второй половине дня доктор Элиша Дик порекомендовал трахеотомию, но другие врачи не имели опыта проведения этой процедуры и отказались. Вашингтону в четвертый раз было проведено кровопускание, в результате он потерял около 2,5 л крови. Задыхаясь, он вскоре умер. К полудню следующего дня прибыла миссис Лоу, внучка президента Вашингтона, вместе с доктором Уильямом Торнтоном. Торнтон на месте констатировал, что Вашингтон умер от потери крови и недостатка воздуха. Он полагал, что переливание крови могло бы спасти президента (Schmidt 2002). Стоит отметить, что медициной Торнтон занимался эпизодически, в силу широкого разброса интересов и увлечений, включавших в том числе живопись, поэзию, философию, астрономию, архитектуру, судостроение. Известность

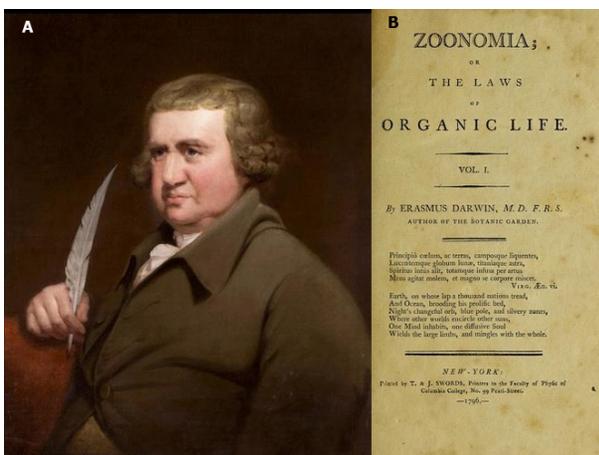


Рис. 1. Эразм Дарвин. А — Портрет Эразма Дарвина. Джозеф Райт из Дерби, 1750–1797 г.

Собрание Художественной галереи Вулверхэмптона, Великобритания (Источник: https://www.wolverhamptonart.org.uk/collections/getrecord/WAGMU_OP528).

В — Титульная страница «Zoonomia or the Laws of Organic Life» (Источник: <https://openlibrary.org/books/OL6313445M/Zoonomia>)

Fig. 1. Erasmus Darwin. A—Portrait of Erasmus Darwin. Joseph Wright of Derby, 1750–1797. Collection

of the Wolverhampton Art Gallery, UK (URL: https://www.wolverhamptonart.org.uk/collections/getrecord/WAGMU_OP528).

B—Title page of Zoonomia; or the Laws of Organic Life (URL: <https://openlibrary.org/books/OL6313445M/Zoonomia>)

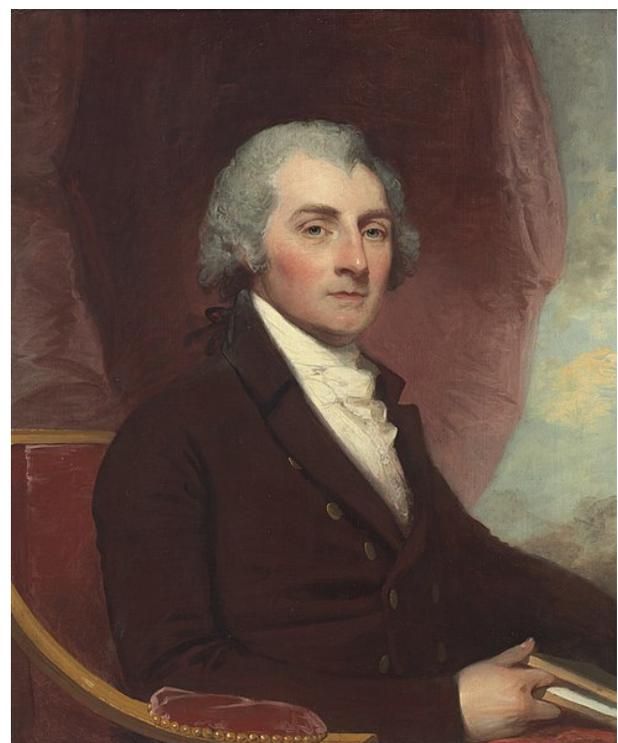


Рис. 2. Портрет Уильяма Торнтона. Гилберт Стюарт, 1804 г.

Собрание Национальной галереи искусства, Вашингтон, США (Источник: <https://www.nga.gov/collection/art-object-page.1119.html>)

Fig. 2. Portrait of William Thornton. Gilbert Stuart, 1804. Collection of the National Gallery of Art, Washington, USA (URL: <https://www.nga.gov/collection/art-object-page.1119.html>)

он приобрел прежде всего тем, что был первым архитектором Капитолия в Вашингтоне, в 1793 г. его проект победил в конкурсе из 17 предложенных. Как тут не вспомнить Кристофера Рена, заложившего основы внутривенной терапии и перестроившего центр Лондона после пожара 1666 г. В 1802 г. президент США Томас Джефферсон назначил Уильяма Торнтон комиссаром по вопросам патентов (Shifman, Filippovich 2006).

Выдающуюся роль в развитии учения о переливании крови сыграл Джон Генри Ликокк, также обучавшийся медицине в Эдинбурге. Семья Ликокков была в числе ранних поселенцев на Барбадосе, прибывших туда в 1635 г. (Schmidt, Leacock 2002). В экспериментальных переливаниях в Эдинбурге Ликокк в качестве реципиентов использовал собак и кошек, а в качестве доноров — собак и овец. Ликокк писал, что кровь от «животного того же вида является достаточной для поддержания жизни», но кровь от животного другого вида «судя по всему, не отвечает цели» (Schmidt, Leacock 2002, 1486). Проведенный им в 1816 г. ряд экспериментов по переливанию крови между животными завершил эмпирический этап в развитии учения о гемотрансфузии. Предшествующие исследователи переливали кровь между животными разных видов. Переливаемая людям кровь животных вызывала многочисленные, в том числе и смертельные, осложнения. Однако отсутствие системного подхода и явная недостаточность имевшихся знаний не позволяли предположить существование межвидовой несовместимости крови (Schmidt, Leacock 2002; Shifman, Filippovich 2006). Революционный постулат о необходимости использования при переливании крови животных одного вида был впервые изложен Джоном Генри Ликокком в своей диссертационной работе, опубликованной в 1817 г. (McLoughlin 1959). Он скептически относился к крайне распространенному в то время способу лечения практически всех болезней — кровопусканию, вопрошая: «Если мы пытаемся лечить болезни кровопусканием, то почему мы не имеем права применять лечение абсолютно противоположным способом, а именно гемотрансфузией?» (Schmidt, Leacock 2002, 1485).

Итак, мы вплотную подошли к важнейшей вехе в истории переливания крови — переливанию от человека к человеку. Первую трансфузию крови от человека к человеку приписывают Филиппу Сингу Физику (1768–1837) (рис. 3). Он родился в Филадельфии (штат Пенсильвания, США), окончил в 1785 г. медицинскую школу Пенсильванского университета, первую

медицинскую школу, основанную в североамериканских колониях в 1765 г. (Cooper 2000). После трех лет работы под началом известного врача Адама Кюна (1741–1817) Физик уехал в Лондон, где еще три года в госпитале св. Георга перенимал азы мастерства у знаменитого хирурга и анатома Джона Хантера (1728–1793), для которого он стал любимым учеником (Sheldon 2012). После этого Физик продолжил свое образование на медицинском факультете Эдинбургского университета, закончив его в 1792 г. с получением степени доктора медицины. Вернувшись в США в сентябре того же года, он приступил к практической медицинской деятельности, достигнув столь значимых успехов, что его зачастую называют «отцом американской хирургии» (Middleton 1929; Shifman, Filippovich 2006). Помимо врачебной деятельности, он внес неоценимый вклад в развитие

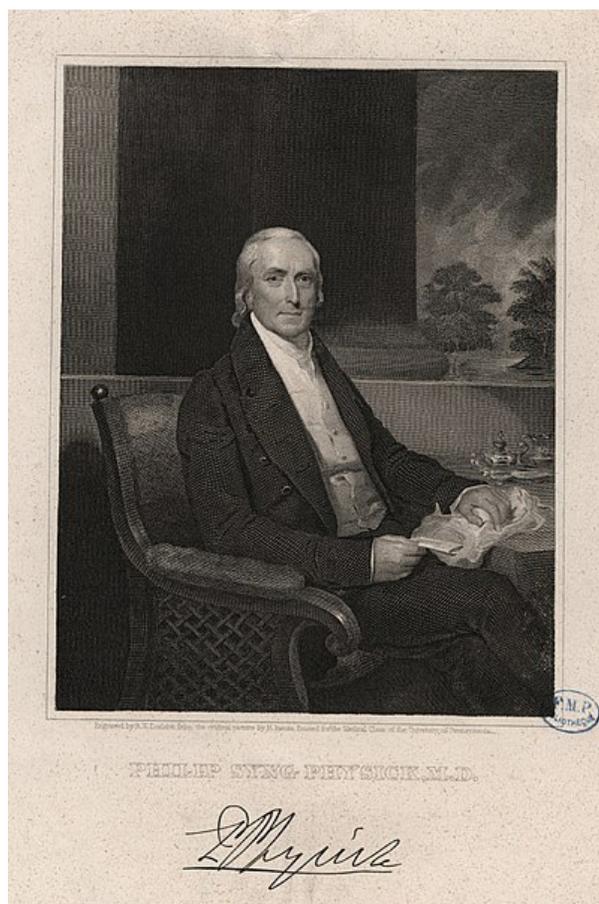


Рис. 3. Портрет Филиппа Синга Физика. Генри Инман, 1785 г. Собрание Межуниверситетской библиотеки здоровья, Париж, Франция (Источник: <https://u-paris.fr/bibliotheques/>)

Fig. 3. Portrait of Philip Syng Physick. Henry Inman, 1785 Collection of the Inter-University Health Library, Paris, France (URL: <https://u-paris.fr/bibliotheques/>)

американского медицинского образования, возглавив в 1805 г. первую в США кафедру хирургии в Пенсильванском университете. Его лекции легли в основу первого в США учебника по хирургии (Smythe 2003).

Несомненно, знаменитого хирурга, также окончившего Эдинбургский университет, интересовали вопросы гемотрансфузии. По некоторым данным первое переливание крови от человека к человеку было произведено Физиком в США уже в 1795 г. Однако информация об этом нигде не опубликована (Schmidt, Leacock 2002; Sturgis 1942). Поэтому пальма первенства на этом важнейшем поприще по праву принадлежит еще одному выпускнику Эдинбургского университета Джеймсу Бланделлу.

Джеймс Бланделл — переливание крови от человека к человеку

Именно английский акушер и хирург Джеймс Бланделл (1790–1878) вошел в историю физиологии и медицины как врач, впервые проведший успешное переливание крови от человека к человеку (рис. 4). Он родился в 1790 г. в Лондоне и был племянником Джона Хейтона (1755–1823), врача, физиолога, ученика уже упомянутого Джона Хантера (Muyhre 1995). Дядя привил юному Бланделлу неподдельный интерес к физиологии и медицине. Позднее Бланделл с присущим филигранным литературным мастерством писал о нем: «Доктору Хейтону я обязан всем, чем может быть обязан человек, как наставлениями, так и примером... Он был человеком с добрейшим сердцем и великодушным характером, образцом безупречной нравственности, выдающимся физиологом своего времени, великолепным анатомом, чутким и талантливым врачом, щепетильным в вопросах истины, что делало его наблюдения достоверными, кристально честным, что позволяло безоговорочно ему доверять» (Young 1964, 159).

В 1813 г. Джеймс Бланделл окончил медицинский факультет Эдинбургского университета, представив в качестве дипломной работы исследование различий в слуховом восприятии музыки. Год спустя он вернулся в Лондон и приступил к преподаванию физиологии и акушерства в объединенных медицинских школах больниц св. Фомы и Гая, где когда-то учился сам. А девять лет спустя после смерти дяди, возглавлявшего в этих школах кафедру физиологии и акушерства, сменил его на этом посту (Jones, Mackmull 1928). В 1818 г. стал лицензиатом Королевского колледжа врачей (Young 1964).

Лекции Джеймса Бланделла, опубликованные в журнале *Lancet*, легли в основу учебника «Принципы и практика акушерства», изданного в 1834 г. (Shifman, Filippovich 2006).

В этот период Бланделл всерьез заинтересовался гемотрансфузионными исследованиями. На зарождение этого интереса повлияли как ранние эксперименты его дяди Джона Хейтона, так и незаслуженно забытые идеи Джона Генри Ликокка, о чем неоднократно упоминал сам Бланделл (Muyhre 1995). Хотя на тот момент история переливания крови уже насчитывала много красочных страниц, господствующим все еще оставалось представление о «жизненности» крови. Джон Хантер в 1817 г. писал: «Одно из великих доказательств того, что кровь обладает жизнью, зависит от обстоятельств, влияющих на ее коагуляцию. Если бы в крови не было жизненных основ, она была бы для тела посторонним веществом» (Jones, Mackmull 1928, 243).



Рис. 4. Портрет Джеймса Бланделла. Генри Рум, Джон Кокран, 1847 г. Частная коллекция (Источник: <https://www.bridgemanimages.com/en/room/james-blundell-engraved-by-j-cochran-from-the-national-portrait-gallery-volume-ii-published-c-1820/nomedium/asset/285316>)

Fig. 4. Portrait of James Blundell. Henry Room, John Cochran, 1847. Private collection (URL: <https://www.bridgemanimages.com/en/room/james-blundell-engraved-by-j-cochran-from-the-national-portrait-gallery-volume-ii-published-c-1820/nomedium/asset/285316>)

В 1818 г. Джеймса Бланделла попросили посетить женщину, страдавшую от послеродового кровотечения. Несмотря на все усилия врачей, она умерла в течение двух часов. Размышляя об этом печальном случае, он предположил, что пациентку можно было бы спасти путем переливания крови. Бланделл полагал, что неудачи при переливаниях обусловлены техническими проблемами и для успешного проведения трансфузии необходимо создание специального инструментария (Blundell 1818).

Он решил повторить эксперименты Ликокка на собаках, существенно усовершенствовав методику проведения. В первой серии экспериментов Бланделл использовал собак в качестве доноров и реципиентов, переливания были успешными. Во второй серии он решает перелить собакам кровь других организмов. Памятуя о неудачах Ликокка, использовавшего в качестве донорской кровь ягнят, Бланделл переливает человеческую кровь. Три собаки, которым была

перелита человеческая кровь, погибли; одна через несколько минут, другая — через несколько часов. Относительно третьей собаки были надежды, что она выживет, однако и это животное умерло через несколько дней после процедуры. Эксперименты отличались еще и тем, что Ликокк переливал животному-реципиенту артериальную кровь, Бланделл — венозную. И наконец, главное отличие, по мнению Бланделла: «особое внимание нужно обратить, что [Ликокк] не применял при переливании шприц» (Blundell 1818, 63), а напрямую соединял сосуды донора и реципиента, используя шестидюймовый мочеточник вола (Schmidt, Leacock 2002). Бланделл же использовал либо простой шприц, в который набирал кровь из вены донора и затем впрыскивал в вену реципиента (рис. 5), либо специальное устройство для трансфузии, которое состояло из четырех частей: шприца, чашки, трубки и рамки (рис. 6). Пользуясь медным шприцем и чашкой для сбора донорской крови,

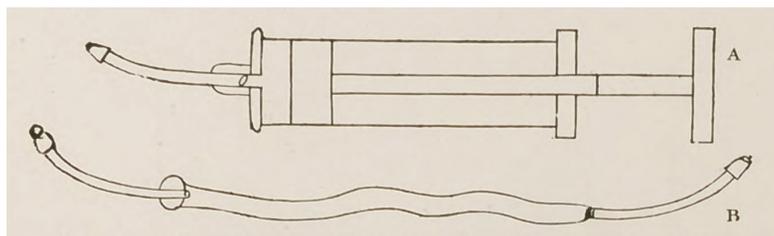


Рис. 5. Инструменты для переливания крови. А — шприц, В — трубка для прямого переливания (Jones, Mackmull 1928)

Fig. 5. Blood transfusion tools. A—a syringe. B—direct transfusion tube (Jones, Mackmull 1928)

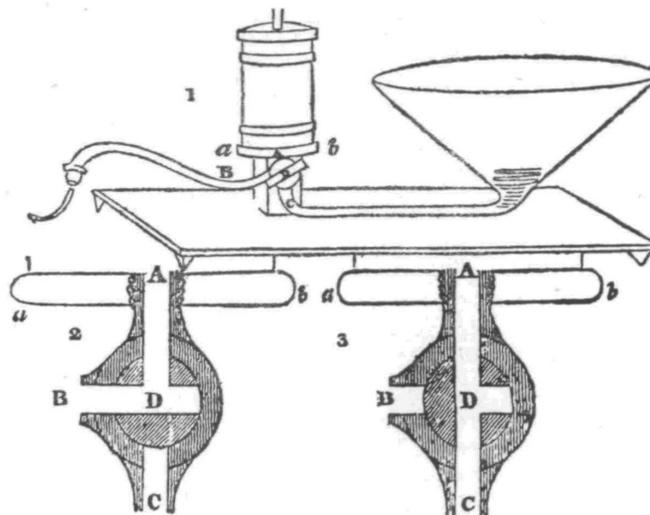


Рис. 6. Устройство Джеймса Бланделла для переливания крови. 1 — шприц, 2, 3 — двухходовый кран. A a b — головка шприца. A D B (2) — канал, по которому кровь изгоняется, когда ADC закрыт. A D C (3) — канал, по которому кровь поступает, когда ADB закрыт (Blundell 1818)

Fig. 6. James Blundell's blood transfusion apparatus. 1—the syringe, 2, 3—the double way cock. A a b—the head of the syringe. A D B (2)—the channel by which the blood is expelled while ADC is closed. A D C (3)—the channel by which the blood enters while ADB is closed (Blundell 1818)

Бланделл в своих экспериментах переливал кровь не сразу после ее забора у донора, а задерживая на некоторое время в чашке, определяя таким образом необходимый отрезок времени, чтобы успеть перелить кровь реципиенту, пока она не свернулась. Тщательно описывая ход экспериментов, Бланделл подробно записывал симптомы, наблюдавшиеся у собак после трансфузии, особенно выделяя те, после появления которых животное погибало (неровный пульс, затрудненное дыхание, изменения температуры, дрожь, рвота и т. д.) (Blundell 1818).

При рассмотрении результатов этих экспериментов Бланделл приходит к следующим выводам: 1) использование шприца позволяет вводить человеческую кровь в вены; 2) неудачи при переливании могут быть обусловлены коагуляцией крови. Также он указывает на эффективность при лечении кровопотери как венозной, так и артериальной крови: «Важно отметить, что венозная кровь оживляет животное так же, как и артериальная» (Blundell 1818, 64). При переливании крови с помощью шприца существует риск попадания воздуха в сосуды. Бланделл замечает, что «бесспорно, малое количество воздуха может попадать в сосуды без ущерба для жизни» (Blundell 1818, 66). Большое же количество попавшего воздуха может повлечь гибель реципиента, как наблюдалось в экспериментах доктора Хейтона на лошадях. Стоит упомянуть лондонских производителей инструментов, таких как Лонди и Ллойд, обеспечивших производство шприцев без риска воздушной эмболии (Dzik 2018). Крайне важным является суждение Бланделла о наибольшей эффективности и безопасности переливания крови организмов одного вида.

После проведения серии экспериментов на животных Бланделл решает на переливание крови от человека к человеку. Это положило начало современной эре трансфузионной медицины (Giangrande 2000). Первую трансфузию человеческой крови он выполнил 25 сентября 1818 г. мужчине 30–40 лет по имени Бразье, пациенту больницы Гая, страдавшему от рака желудка. Состояние его было крайне тяжелым, трансфузия была единственным шансом в борьбе за жизнь. Бланделл в присутствии многих других врачей больницы Гая перелил больному с помощью шприца 12–14 унций (одна унция равняется 29,574 мл) крови в течение 30–40 минут, ассистировал доктор Генри Клайн. При этом шприц был подогрет, так как Бланделл в экспериментах на собаках заметил, что кровь при высокой температуре сворачивается медленнее, чем при низкой. Поначалу пациент

почувствовал улучшение, однако на третий день после переливания ему стало хуже, конечности похолодели, пульс стал прерывистым, сознание помутилось, и в 11 часов вечера 27 сентября Бразье скончался. Несмотря на неудачный исход, Бланделл провел подробный анализ этого случая, отмечая, что сама процедура переливания легко осуществима, и задаваясь вопросом, при каких заболеваниях она применима (Blundell 1819).

Бланделл не оставляет своих попыток. Он проводит второе переливание крови родильнице. Однако после переливания 16 унций крови молодая женщина умерла в течение 5–6 минут. Третий безуспешный случай также связан с большой кровопотерей после родов, после переливания четырех унций крови женщина умерла. В четвертом случае Бланделл переливает женщине с послеродовой лихорадкой шесть унций крови, пациентка также скончалась (Jones, Mackmull 1928).

Еще во время экспериментов над животными Бланделл отметил, что задержка с переливанием крови от донора может привести к свертыванию переливаемой крови. Чтобы решить эту проблему, в 1824 г. он усовершенствовал аппарат для переливания крови, сконструировав так называемый Impellor, в котором кровь переливалась под давлением (рис. 7, 8). Аппарат был прикручен к стулу с помощью винтов.



Рис. 7. Аппарат Impellor, готовый для переливания крови (Blundell 1824)

Fig. 7. The Impellor ready for transfusion (Blundell 1824)

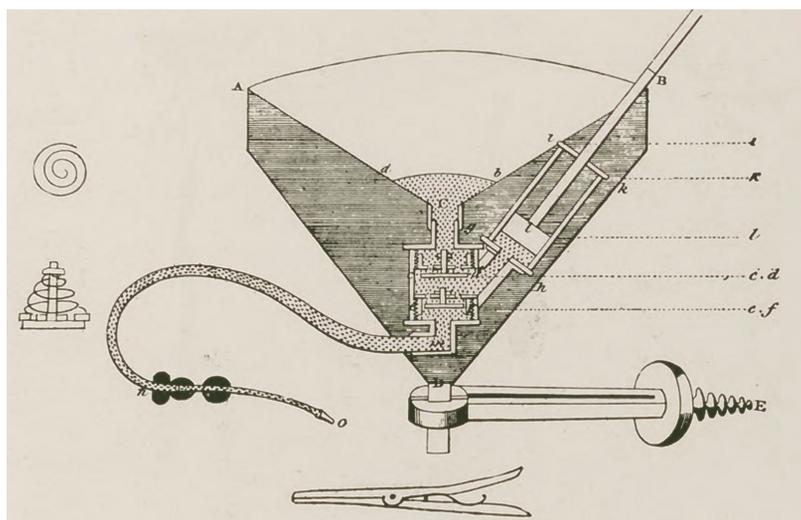


Рис. 8. Перпендикулярное сечение аппарата Impellor. A C B — внутренняя чашка. A D B — внешняя чашка, наполненная водой. D E — тиски. *a b* — линия на внутренней чашке, выше которой не должна подниматься кровь. *c d* — верхний клапан, снабженный двумя или тремя складками мягкой квасцовой кожи. *e f* — нижний клапан, так же. *g h i k* — шприц. *l* — пробка. *m n* — гибкая трубка. *n o* — венозная трубка (Blundell 1824)

Fig. 8. Perpendicular section of the Impellor. A C B—the inner cup. A D B—the outer cup full of water. D E—the vice. *a b*—a line on the inner cup above which the blood should not be suffered to rise. *c d*—the upper valve armed with two or three folds of soft alum leather. *e f*—the under valve, idem. *g h i k*—the syringe. *l*—the plug. *m n*—the flexible tube. *n o*—the venous tubule (Blundell 1824)

Внешняя чашка была наполнена теплой водой (96°F) таким образом, чтобы исключить попадание воздуха. Вену на предплечье пациента вскрывали и вводили трубку. Лигатуры не использовали, трубки удерживал ассистент. Донор сидел в кресле, вену вскрывали ланцетом, и кровь стекала в чашку. Кровь поступала в вену реципиента короткими резкими толчками (Blundell 1824).

Особенность методики, примененной Бланделлом, заключалась в том, что в специально сконструированном аппарате кровь подогревалась и тем самым замедлялась ее свертываемость. С использованием этого аппарата была проведена трансфузия 16 унций крови молодому мужчине с кровотечением вследствие разрыва артерии. Однако он скончался в течение 3–4 минут (Blundell 1824).

И, наконец, удача — первое успешное переливание крови от человека к человеку! Оно состоялось в августе 1825 г. Доктор Джесс из Манчестера попросил доктора Чарльза Уоллера осмотреть пациентку с сильнейшим маточным кровотечением. Ее состояние было крайне тяжелым, и Уоллер, решив, что единственная надежда — это гемотрансфузия, обратился к Джеймсу Бланделлу. После осмотра Бланделл и Уоллер оставили женщину на час, чтобы принять решение. По возвращении они

уже не надеялись увидеть ее живой, столь плачевно было ее положение. Однако женщина, хотя и была очень слаба, еще боролась за жизнь. Бланделл с помощью шприца перелил ей четыре унции крови, в качестве донора выступил муж родильницы. После этого она постепенно стала чувствовать себя лучше, и через несколько дней выздоровела. Высказывались сомнения, что количество перелитой крови было недостаточно для восстановления пациентки, но Бланделл утверждал, что поскольку никакой другой терапии (кроме чайной ложки касторки на четвертый день после процедуры) не применяли, то выздоровление обусловлено именно гемотрансфузией (Waller 1825).

Следующее переливание также было удачным — 28 сентября 1825 г. оно было проведено миссис Коклин 29 лет. Миссис Коклин родила девочку, после чего у нее началось сильное маточное кровотечение. Принимавший роды доктор Франк вызвал доктора Даблдея, который поняв серьезность положения, немедленно отправился за Джеймсом Бланделлом. К счастью, муж пациентки не только согласился на переливание, но и стал донором (Pelis 1997). Женщине перелили с помощью шприца 14 унций крови, при этом ассистировавший Бланделлу Эдвард Даблдей сообщает, что после переливания шести унций она сказала: «Я чувствую себя сильной

как бык» (Doubleday 1825, 382). После проведения гемотрансфузии пульс нормализовался, женщина почувствовала себя лучше и уснула, а впоследствии благополучно выздоровела. Доктор Эдвард Даблдей указывает, что «два последовательных успешных случая переливания крови, конечно, не показывают, что операция полностью безопасна; но они могут вызвать у нас разумную надежду на то, что это может быть применено в дальнейшем» (Doubleday 1825, 385).

Еще одной пациентке с маточным кровотечением было произведено переливание 12 унций крови с использованием усовершенствованного аппарата Impellor, после чего она также выздоровела. В этом случае Бланделл наложил 12 пиявок женщине на руку в ожидании воспаления, которое, к счастью, не возникло (Jones, Mackmull 1928).

Под влиянием Бланделла переливание крови постепенно стало входить в медицинскую и особенно акушерскую практику. Джон Брэкстон Хикс после попытки переливания крови с устройством Бланделла (вероятно, Impellor) заметил: «Коагуляция крови была самой большой проблемой, мешавшей проведению процедуры. Инструмент нужно было промывать два или три раза из-за коагуляции ... но я считаю, что никакого сгустка не было введено в вену» (Jones, Mackmull 1928, 246).

В 1828 г. Бланделл сконструировал еще один прибор для переливания крови — Gravitator, с помощью которого трансфузия осуществлялась под действием силы тяжести (рис. 9). Так же, как и в предыдущих приборах, в приемник крови наливали теплую воду (лучше теплее



Рис. 9. Аппарат Gravitator, готовый к использованию (Blundell 1828)

Fig. 9. The Gravitator ready for use (Blundell 1828)

молоко), запорный кран при этом закрыт. Если процедуру необходимо приостановить, всю кровь из аппарата нужно удалить, промыть трубки теплой водой и начать переливание заново. На протяжении процедуры в приемнике должно находиться только небольшое количество крови для предотвращения ее сворачивания. Уровень крови не должен подниматься выше ограничительной линии, как и в Impellor (количество крови в приемнике при этом составляет около двух унций). У пациентов, которым требуется гемотрансфузия, работа сердечно-сосудистой системы угнетена, вследствие чего чрезмерно быстрое переливание крайне опасно. В аппарате Gravitator эта проблема решена с помощью системы гибких кронштейн-опор, что позволяет размещать аппарат на разных уровнях над рукой пациента, регулируя таким образом скорость притока крови (рис. 10). Скорость притока крови также могла быть отрегулирована с помощью запорного крана. Кроме того, для применения аппарата необходимы шприц, скальпель, ланцет и серебряный зонд для забора крови у донора. Крайне важно на протяжении всей процедуры внимательно наблюдать за состоянием пациента (Blundell 1828).

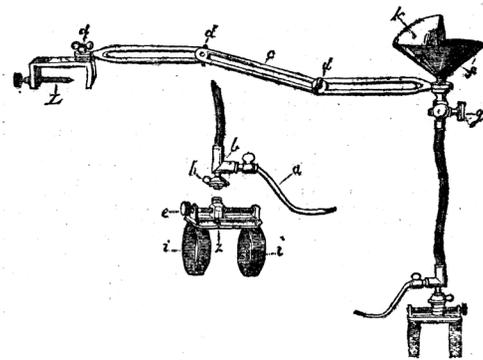


Рис. 10. Устройство аппарата Gravitator. а — венозная трубка, б — угловая латунная трубка, с — серебряные гибкие кронштейн-опоры, d — гайки кронштейн-опор, e — винт, f — приемник, g — запорный кран, h — шар и колпачок, i — браслет или пружинный зажим, k — козырек, L — винт или прочный зажим, z — винт (Blundell 1828)

Fig. 10. The Gravitator device. a—the venous tubule, b—the angular brass tube, c—the silver flexible arm-support, d—the nuts of the flexible arm-support, e—the screw, f—the receiver, g—the stop-cock, h—the ball and the cap, i—the bracelet or the spring clasp, k—the hood, L—the strong clamp or the vice, z—the screw (Blundell 1828)

С использованием аппарата Gravitator Бланделлом было произведено еще две гемотрансфузии. С помощью этого устройства была спасена жизнь мальчика, умиравшего от вторичного кровотечения после ампутации ноги. Также успешным было переливание восьми унций крови в течение трех часов женщине с маточным кровотечением (Jones, Mackmull 1928).

Итак, Джеймс Бланделл со своими ассистентами провел 10 переливаний крови при помощи шприца и усовершенствованных устройств для гемотрансфузии, из них пять были успешными, а остальные пять — неудачными. В то время большинство гемотрансфузий осуществляли не в больницах, а в домашних условиях, так как зачастую эти процедуры были связаны с послеродовыми кровотечениями. Уильям Тайлер Смит (1815–1873), основатель Лондонского акушерского общества, писал: «Роды — это драма, весьма болезненная для женщины ... в большинстве случаев оканчивающаяся благополучно, однако может иметь и трагический финал» (Kibbie 2019, 16). При этом поиск доноров составлял немалую проблему. В качестве доноров крови выступали мужья и родственники пациенток или же сами врачи (Baskett 2002), а то и родственники врачей и добросердечные соседи. Так, Чарльз Уоллер описывает, что однажды донором выступил его племянник, которого он взял с собой к пациентке (Kibbie 2019).

Величайший вклад Джеймса Бланделла в становление и развитие переливания крови неоспорим. Гуго Вильгельм фон Цимсен (1829–1902) отмечает, что Бланделл сделал первое подлинное переливание после Жана-Батиста Дени. Современник Бланделла Джон Рассел Рейнольдс (1828–1896), автор капитального труда «Система медицины», писал: «Со времен трудов Бланделла переливание никогда не упускали из виду в Англии или других странах» (Jones, Mackmull 1928, 247). Джеймс Бланделл был одним из первых, кто исследовал переливание крови с научных позиций; разработал инструменты, послужившие прототипом современных устройств; показал, что кровь не теряет своих свойств, пройдя через трансфузионный прибор; установил принцип, согласно которому необходимо использовать только кровь одного и того же вида; выявил, что венозная кровь так же подходит для переливания, как и артериальная; отметил, что кровь не следует вводить слишком быстро; выяснил, что воздух не должен попадать в устройство для трансфузии; обнаружил, что переливание того же количества крови, которое было потеряно, является не только ненужным, но и нежелательным. При трансфузиях зачастую

количество перелитой крови было невелико — четыре–шесть унций, что эквивалентно 100–150 мл (Learoyd 2012).

Бланделл признавал, что переливание крови является потенциально рискованным, и указывал, что его необходимо проводить только в тех случаях, когда другой надежды на выздоровление пациента нет (Blundell 1828). Следует особо отметить, что он тщательно и подробно описывал все случаи гемотрансфузии, что позволило выявить важнейшие детали и закономерности и описать клинические симптомы гемотрансфузионных осложнений. Так, в некоторых случаях после вливаний первых порций крови у больного наступало беспокойство, подергивание губ и век, дрожь, тошнота. Он рекомендовал при появлении этих признаков переливание крови сразу же прекращать (Ivanov, Petrenko 2012).

После увольнения из больницы Гая в 1834 г. Джеймс Бланделл успешно занимался частной практикой. Днем он проводил консультации, а поздним вечером отправлялся с визитами к пациентам в известной всему Лондону желтой коляске, оснащенной специальной лампой, позволявшей читать. Бланделл написал руководство по нормальной и патологической физиологии, три руководства по акушерству, гинекологии и педиатрии. В 1847 г. он прекратил медицинскую деятельность, посвятив последние 30 лет своей жизни изучению произведений античной литературы и коллекционированию редких книг по акушерству и гинекологии, которые завещал Акушерскому обществу Лондона (Baskett 2002; Ellis 2007).

Развитие переливания крови в XIX веке

Помимо Бланделла и другие английские акушеры оставили заметный след в развитии переливания крови в первой половине XIX века. Прежде всего, нужно еще раз упомянуть его коллег и ассистентов — Клайна, Уоллера, Даблдея. Об Эдварде Даблдее (1810–1849), хирурге Королевского лазарета для детей, и Чарльзе Уоллере, акушере и преподавателе акушерства в больнице св. Томаса, Бланделл писал: «Их заслуги не нуждаются в моем упоминании, но мне бы хотелось отметить, что преимуществам этой операции [переливанию крови], человечество будет в значительной степени обязано им» (McLoughlin 1959, 508).

Предотвращение свертывания крови

Джон Брэкстон Хикс (1823–1897), также служивший в больнице Гая, впервые добавил

к донорской крови фосфорную соду для предотвращения коагуляции. Хикс растворял три унции фосфорной соды в одной пинте воды, нагревал раствор, который кристаллизовался при комнатной температуре, до 100°F перед использованием и добавлял в кровь в соотношении 1:4. В 1869 г. он описал четыре случая применения этого подхода, которые, однако, закончились летальным исходом вследствие очень тяжелого акушерского кровотечения (Baskett 2002). Хикс не учел взаимодействия фосфорной соды с кальцием.

Эта новая методика, которая значительно упростила переливание, позже стала широко распространена. Она была введена в использование в Эдинбурге в 1884 г. Джозефом Монтегю Коттериллом (1851–1933), помощником хирурга при Королевском лазарете, впоследствии ставшем президентом Королевского колледжа хирургов Эдинбурга. Он отмечал, что использование антикоагулянтов позволяет избежать большинства трудностей и опасностей переливания (McLoughlin 1959). В 1886 г. Джон Дункан, еще один хирург Эдинбургского королевского лазарета, также использовал этот метод. Имея дело с травмами, зачастую с ампутациями, он собирал кровь из раны во время операции в чашку, содержащую солевой раствор Хикса. В конце операции эту кровь повторно вводили в вену. Дункан выступал за этот метод, поскольку он устранял необходимость поиска донора в короткие сроки, не подозревая о том, что такой подход, кроме того, позволял избегать несовместимости (Duncan 1886).

Предположение о связи кальция со свертываемостью крови впервые выдвинул в 1890 г. Николас Морис Артюз (1862–1945), профессор физиологии и микробиологии швейцарского университета во Фрибуре. Вместе с Пейджсом он обнаружил, что кровь не сворачивается при добавлении растворимых солей щавелевой кислоты. В 1894 г. сэр Алмрот Эдвард Райт (1861–1947), английский бактериолог и иммунолог, создатель системы противотифной вакцинации, сообщил об увеличении времени свертывания крови у животных при введении небольших количеств цитратов, предвосхитив использование цитратов при трансфузиях более чем на 20 лет (Wright 1894).

Хотя большинство исследований проводилось в Британии, переливание крови развивалось и в других европейских странах, прежде всего, Франции и Германии. Как отмечает Бланделл в своем обзоре иностранных исследований, в экспериментах Жана-Батиста Андре Дюма (1800–1884)

и Жана-Луи Прево (1790–1850), кстати, тоже выпускника Эдинбургского университета, гемотрансфузия для животных одного вида в большинстве случаев приводила к выздоровлению, для животных разных видов в основном вызывала ухудшение состояния и смерть. При переливании крови овец уткам исследователи наблюдали сильнейшие конвульсии и немедленную гибель (Blundell 1828). Прево и Дюма обнаружили, что взбивание крови приводит к отложению фибрина на сбивающем инструменте и предотвращает свертывание. Они отметили, что дефибрированная кровь может быть использована при реанимации истекающих кровью животных так же, как и необработанная кровь. Им же принадлежит наблюдение, что добавление небольшого количества каустической соды снижает коагуляцию крови (Maluf 1954).

Метод дефибрирования предполагал взбивание крови после сбора в чашке проволочным венчиком или стеклянным пестиком, а затем процеживание через сито из конского волоса для удаления мелких частиц фибрина. Это требовало времени, что представляло собой недостаток при использовании в ходе трансфузии, зачастую носившей срочный характер.

Под влиянием экспериментов Прево и Дюма Иоганн Фридрих Диффенбах (1792–1847), хирург больницы Шарите в Берлине, в 1830 г. перелил новорожденному с асфиксией две унции дефибрированной крови, однако ребенок скончался. В 1832 г. Блазиус повторил эту процедуру, но также безуспешно. Беннеке в 1867 г. вернул к жизни новорожденного с асфиксией при помощи гемотрансфузии, однако другой младенец после аналогичного переливания умер (Maluf 1954). Сэр Томас Смит в 1873 г. в госпитале св. Варфоломея перелил дефибрированную кровь младенцу, страдавшему гемолитической болезнью новорожденного (Leagoyd 2012).

Теодор Людвиг Вильгельм фон Бишофф (1807–1882), анатом и физиолог из Гейдельберга, иностранный член-корреспондент Петербургской академии наук, вливал животным, умиравшим от кровопотери, их собственную дефибрированную кровь, что приводило к выздоровлению. Он полагал, что смерть при переливании гетерологичной крови обусловлена наличием фибрина в переливаемой крови. Фон Бишофф предположил, что человеку желательно переливать человеческую предварительно дефибрированную и подогретую кровь. Как и анатом Иоганн Петер Мюллер (1801–1858), к слову, также иностранный член-корреспондент

Петербургской академии наук, фон Бишофф обнаружил, что дефибринирование крови не нарушает структуру эритроцитов (Zimmerman, Howell 1932).

Французский физиолог Франсуа Мажанди (1783–1855) придерживался мнения, что переливание крови от одного животного к другому одного и того же вида безопасно. Он показал, что при переливании млекопитающим крови птиц или амфибий эритроциты вливаемой крови быстро разрушаются (Coley 2001). Подтвердил выводы Мажанди Шарль Эдуар Броун-Секар (1818–1894), известный французский невролог, интересовавшийся и вопросами трансфузии (Aminoff 2017). В 1858 г. он провел оригинальное исследование, пытаясь обнаружить в крови реципиента чужеродные эритроциты. Через 15 минут после переливания их еще удавалось найти, а через час выявить было уже невозможно. Однако он утверждал, что видел чужеродные эритроциты в крови реципиента снова через месяц после переливания, на основании чего высказал предположение, что они могут мигрировать через капилляры. Леонард Ландау не смог обнаружить эллиптические эритроциты рыб, земноводных и птиц в крови млекопитающих через день после гетерологичного переливания (Maluf 1954).

Датский физиолог Петер Людвиг Панум (1820–1885) в 1863 г. заместил практически всю кровь собаки дефибринированной собачьей же кровью и не обнаружил никаких изменений в поведении животного. Он рекомендовал использовать дефибринированную кровь для переливания людям и отказаться от гетерологичных трансфузий как весьма опасных,

за исключением таких, по его мнению, близких животных, как корова и овца или лошадь и осел. Панум предлагал сохранять кровь на льду, предвосхищая идею создания криобанков (Roper-Hall, Jorgensen 2008).

Согласно мнению Уильяма Хантера, успешность переливания крови зависела от двух факторов: количества переливаемой крови и предотвращения свертывания во время трансфузии. Он полагал, что количество переливаемой крови не должно превышать 5% от общего количества крови в организме (Hunter 1889).

Аппараты для переливания крови

Помимо поиска путей предотвращения свертывания крови, развитие переливания крови шло и в направлении совершенствования методики и инструментария.

Чарльз Уоллер в 1860 г. сконструировал собственный аппарат для переливания крови. Он был гораздо проще по конструкции, чем Impellor или Gravitator и состоял из латунного шприца, внутривенной канюли с соединительной трубкой и сосуда для сбора крови донора (рис. 11). Как и Бланделл, Уоллер применял переливание с особой осторожностью, в качестве крайней меры в случаях тяжелого кровотечения. Он считал, что в большинстве случаев для переливания достаточно четырех унций крови, но полагал безопасным переливание до 12 унций (McLoughlin 1959).

В 1865 г. Грейли Хьюитт (1828–1893), помощник врача-акушера в больнице св. Марии, а позже профессор акушерства в Университетском колледже, представил свой трансфузионный аппарат, в котором цилиндр шприца

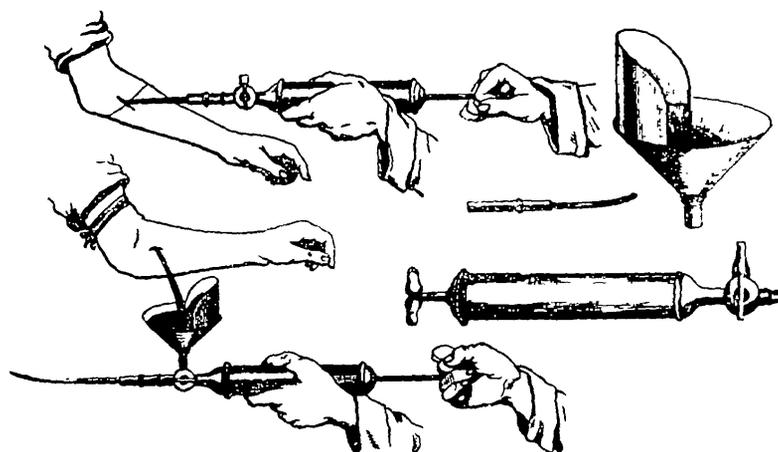


Рис. 11. Аппарат Ч. Уоллера для переливания крови (McLoughlin 1959)

Fig. 11. Waller's transfusion apparatus (McLoughlin 1959)

использовался в качестве емкости для сбора донорской крови (рис. 12), что снижало риск коагуляции. Шприц с канюлей и скальпель были упакованы в чехол для переноски, и Хьюитт советовал носить их в акушерском мешке, чтобы иметь всегда под рукой в случае чрезвычайной ситуации (McLoughlin 1959).

В 1870 г. Роберт Макдоннелл (1828–1889), хирург больницы доктора Стивенса в Дублине, предложил простой трансфузионный аппарат. Он состоял из стеклянной пипетки, стеклянной колбы, вмещавшей шесть унций крови, длинной резиновой трубки со стеклянной вставкой для обнаружения пузырьков воздуха и серебряной внутривенной канюли (рис. 13).

Макдоннелл был сторонником метода дефибрирования. Он утверждал, что все важные элементы крови (сыворотка, соли, эритроциты) при этом сохраняются. Признавая, что потеря времени при дефибрировании зачастую неоправданна, в случаях, требующих срочного переливания крови, Макдоннелл предлагал использовать антикоагулянтный раствор Хикса (McLoughlin 1959).

В 1871 г. Альфред Хиггинсон (1808–1884), хирург Южной больницы в Ливерпуле, представил отчет о проведении 13 гемотрансфузий в период с 1848 г. 10 из этих 13 случаев были акушерскими, включая тяжелые послеродовые кровотечения, выкидыш и внематочную

беременность. Четверо пациенток выздоровели после переливания. Хиггинсон, как и Бланделл, отмечал опасность свертывания крови и попадания воздуха при переливании. Хиггинсон известен, прежде всего, как изобретатель клизменного шприца. На основе данного цилиндрического резинового шприца, соединенного с системой клапанов, он сконструировал аппарат для трансфузии. Аппарат состоял из металлической чашки для сбора крови, вмещавшей до шести унций; внешнего корпуса, функционировавшего как водяная баня; эластичного резинового стакана емкостью в одну унцию, при необходимости закрывавшегося пробкой;



Рис. 12. Аппарат Г. Хьюитта для переливания крови (McLoughlin 1959)

Fig. 12. Hewitt's transfusion apparatus (McLoughlin 1959)

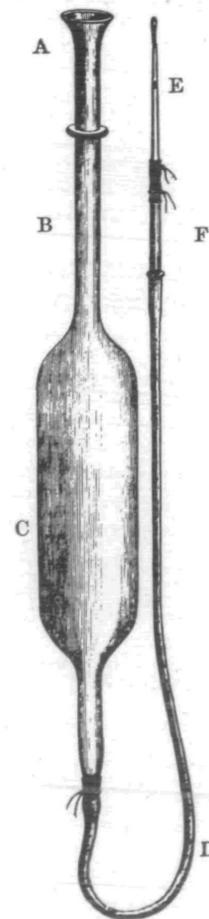


Рис. 13. Аппарат Р. Макдоннелла для переливания крови. АВ — стеклянная пипетка, С — стеклянная колба, D — резиновая трубка, F — стеклянная трубка, E — серебряная канюля (McLoughlin 1959)

Fig. 13. McDonnell's transfusion apparatus. AB—the glass pipette, C—the glass bulb, D—the rubber tube, F—the glass tube, E—the silver cannula (McLoughlin 1959)

резиновой трубки, заканчивающейся металлической внутривенной канюлей (рис. 14). Шаровые клапаны были расположены в верхнем и нижнем отверстиях резинового стакана, закрывая верхнее отверстие при необходимости, однако оставляя нижнее всегда открытым. Описывая подготовку к трансфузии, Хиггинсон указывал, что прибор и трубку нужно погрузить в умывальник, наполненный горячей водой, открыть винт, заполнить внешний корпус и резиновую трубку и закрыть пробку. Когда кровь донора была собрана, канюлю вставляли в вену реципиента, центральный стакан сжимали

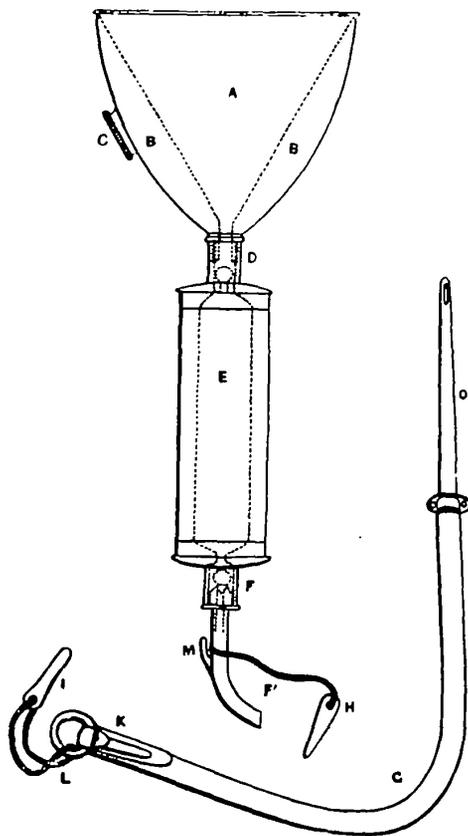


Рис. 14. Аппарат А. Хиггинсона для переливания крови. А — чашка для сбора крови, В — внешний корпус, С — винт, D — шаровой клапан, E — резиновый стакан, H — пробка, F — отверстие стакана, G — резиновая трубка, I — пробка, K — отверстие трубки, L, M — крепления пробки, O — внутривенная канюля (McLoughlin 1959)

Fig. 14. Higginson's transfusion apparatus. A—a cup for collecting blood, B—an outer casing, C—a screw, D—a ball valve, E—a rubber barrel, H—a plug, F—an aperture, G—a rubber tube, I—a plug, K—a tube opening, L, M—fastenings of plugs, O—an intravenous cannula (McLoughlin 1959)

один или два раза, затем прибор работал под действием силы тяжести (McLoughlin 1959).

В 1884 г. Уильям Уолтер, хирург больницы св. Марии для женщин и детей и Манчестере предложил трансфузионный аппарат на основе модификации устройств Макдоннелла и Хиггинсона. Его аппарат состоял из стеклянной трубки, вмещавшей четыре унции крови, соединенной с резиновой трубкой, по форме напоминавшей очень маленький шприц Хиггинсона; резиновая трубка оканчивалась внутривенной канюлей (рис. 15) (Walter 1884).

Джеймс Хобсон Авелинг (1828–1892), основавший в 1870 г. в Лондоне вместе с Барнсом и Чемберсом больницу Челси для женщин, пытаясь избежать коагуляции крови, изобрел простое устройство для прямого переливания крови от донора. Он носил его с собой целых восемь лет, до тех пор, пока не подвернулся случай для использования. В 1872 г. с помощью этого приспособления Авелинг перелил около 250 мл крови женщине с послеродовым кровотечением, используя в качестве донора семейного кучера, после чего та выздоровела. Устройство состояло из двух серебряных канюль, вставляемых в вену донора и реципиента, соединенных резиновой трубкой со сжимаемой грушей посередине для регулирования тока крови, служившей, по словам Авелинга,

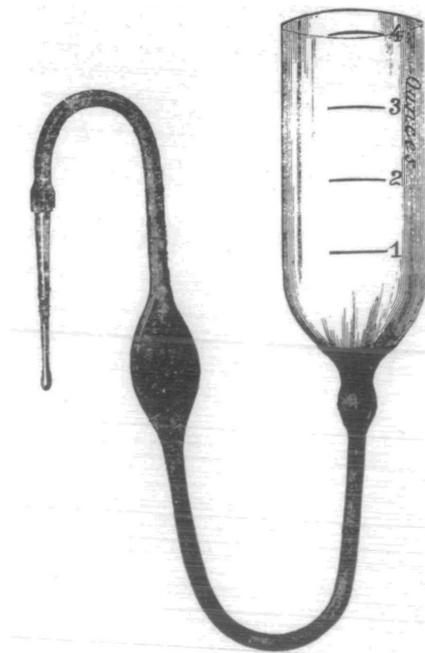


Рис. 15. Аппарат У. Уолтера для переливания крови (Walter 1884)

Fig. 15. Walter's transfusion apparatus (Walter 1884)

вспомогательным сердцем (рис. 16) (Aveling 1873). После этого случая Авелинг модифицировал свой аппарат, добавив стопорный кран на каждом конце трубки. Всего с помощью этого аппарата он провел семь гемотрансфузий.

Немецкий гинеколог Эдуард Мартин в 1859 г. перелил дефибрированную кровь при помощи

стеклянного шприца, в отличие от металлического шприца, используемого Бланделлом (Maluf 1954).

Незаурядна история коммерческого успеха устройства для прямого переливания крови, изобретенного в 1864 г. швейцарским врачом Жозефом-Антуаном Русселем (1837–1901) (рис. 17). В декабре 1865 г. Руссель осуществил



Рис. 16. Аппарат Дж. Х. Авелинга для прямого переливания крови (Aveling 1873)

Fig. 16. Aveling's apparatus for direct blood transfusion (Aveling 1873)

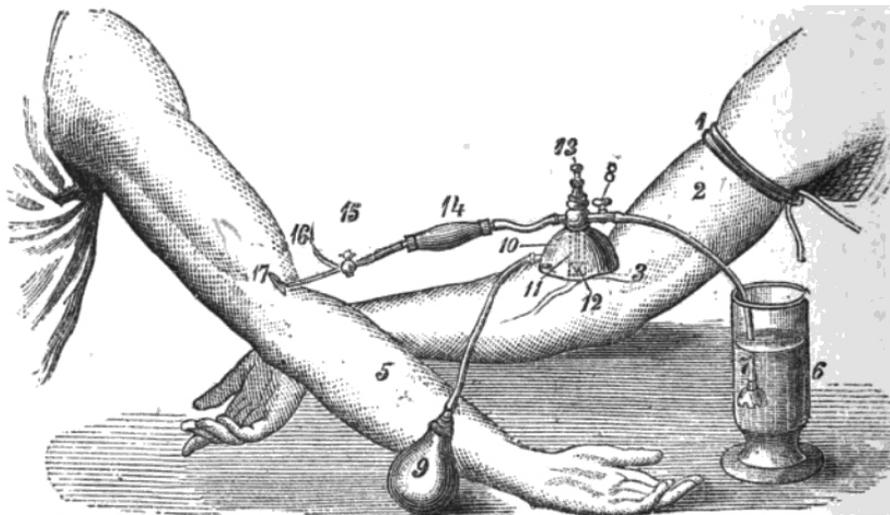


Рис. 17. Аппарат Дж.-А. Русселя для переливания крови. 1 — жгут, 2 — рука донора, 3 — вена донора, 4 — вена реципиента, 5 — рука реципиента, 6 — сосуд с водой, 7 — колокол аспиратора, 8 — запорный кран, 9 — шарик для регулирования чашки, 10 — наружный корпус чашки, 11 — внутренний цилиндр в чашке, 12 — ланцет внутри цилиндра, 13 — винт, регулирующий ланцет, 14 — насос, 15 — точка бифуркации, 16 — канюля для выхода воды, 17 — канюля, вставленная в руку пациента (Roussel 1877)

Fig. 17. J.-A. Roussel's apparatus for blood transfusion. 1—bandage for bleeding, 2—arm which supplies the blood, 3—vein swollen for bleeding, 4—patient's vein, 5—arm which receives the blood, 6—vessel containing water, 7—bell of the aspirator, 8—tap which shuts the water off, 9—round balloon to regulate the cupping-cup, 10—external envelope of the cupping-cup, 11—internal cylinder in the cupping-cup, 12—lancet inside the cylinder, 13—screw which regulates the lancet, 14—balloon pump of the transfuser, 15—tap at the bifurcation, 16—canula by which the water escapes, 17—canula inserted into the patient's arm (Roussel 1877)

с его помощью успешное переливание крови женщине с послеродовым кровотечением. Впоследствии он сообщал, что использовал аппарат при 50 переливаниях (26 из которых привели к полному выздоровлению) (Roussel 1877).

В 1867 г. Руссель представил аппарат на Парижской международной выставке, однако он не привлек большого внимания. Военные кампании в 1870 гг. характеризовались скоротечностью боевых столкновений и многочисленными смертями от кровотечений в результате ранений. Руссель понял, что наиболее перспективной областью для массового применения его изобретения является военная медицина. В 1873 г. на Венской всемирной ярмарке Руссель представил свой аппарат как новое устройство, необходимое для военно-санитарных целей и провел его первые публичные демонстрации. Международная медицинская комиссия признала аппарат «идеальным устройством для прямого переливания крови» и рекомендовала его для использования в военной хирургии. В 1873–1876 гг. изобретатель активно гастролировал по европейским городам, организовывая публичные демонстрации переливания крови и пропагандируя изобретенное им устройство, в результате Русселю удалось организовать

его поставку армиям Австро-Венгрии (1874 г.), России (1874 г.), Бельгии (1876 г.). Французские и немецкие власти не закупали аппараты Русселя ни для гражданских больниц, ни для армейских медицинских служб (Sergeeva, Panova 2021). Однако нет официальных сведений об использовании аппарата Русселя в военной медицине, особенно на поле боя (Bernier 2020). Переливание крови как сложный хирургический метод, требовавший особых условий, не гарантировало благоприятного исхода операции и не получило широкого применения в военной медицине XIX века.

Между тем некоторые исследователи все еще ратовали за трансфузии крови животных. Так, Франц Гезелиус, хирург Королевского общества врачей Вильно, в 1873 г. и Оскар Хассе, врач из Нордхаузена в Германии, в 1874 г. опометчиво выступили с одобрением использования овечьей крови для переливания (Roux et al. 2007). Гезелиус был против использования дефибрированной крови, полагая, что это лишает кровь жизненно важных функций. Он придумал оригинальный, но очевидно травматичный аппарат для получения капиллярной крови, прокалывавший кожу донора во многих точках (рис. 18). Кровь капала в контейнер, окруженный

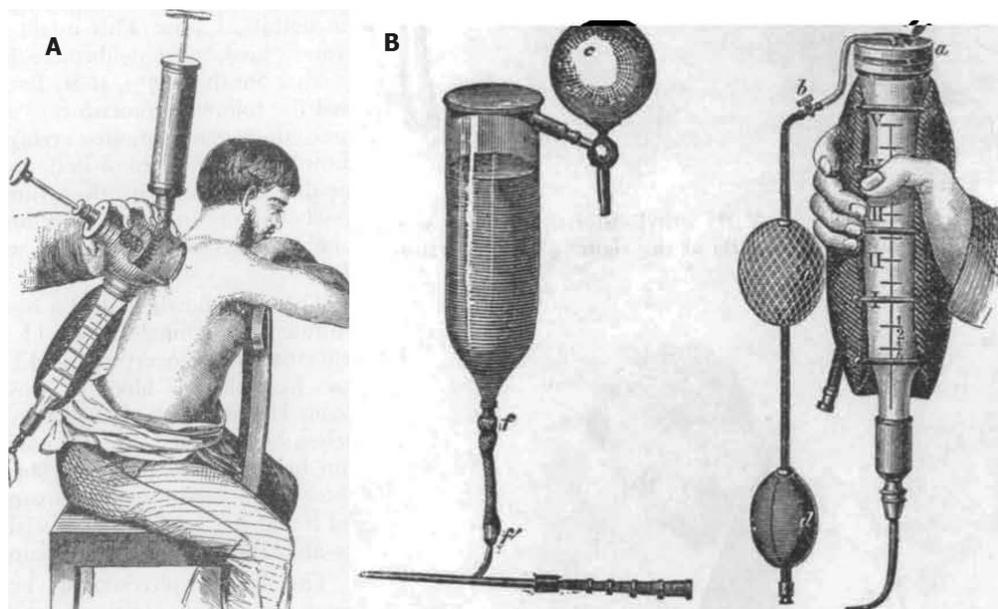


Рис. 18. Аппарат Ф. Гезелиуса для переливания крови. А — методика получения капиллярной крови от донора; насос создает вакуум, многочисленные иглы вызывают множественные проколы. В — слева колба, соединенная с канюлей для вливания в вену реципиента; справа колба с прикрепленными резиновыми насосами и муфтой с теплой водой (Maluf 1954)

Fig. 18. F. Gesellius's apparatus for blood transfusion. A—technique for drawing capillary blood from a donor; the pump creates vacuum and multiple spicules cause multiple bleeding points. B—figure on the left shows a flask connected to a cannula in readiness for infusion into the vein of a recipient; figure on the right shows a flask with rubber pumps and a jacket of warm water attached (Maluf 1954)

муфтой с теплой водой, а затем ее переливали реципиенту как можно быстрее (Maluf 1954).

Хассе описал 15 переливаний овечьей крови человеку (Bernier 2020). Типичная реакция включала одышку, цианоз, сильную боль в спине, недомогание, бессознательное состояние, судороги, сильный озноб, рвоту, диарею, кашель, в некоторых случаях — смерть. Хассе объяснял судороги чрезмерной активацией пациента свежими соками животного, а кровавую мочу — разрушением эритроцитов пациента и выступал за использование овечьей крови при «неизлечимых болезнях» (Maluf 1954).

Эмиль Понфик (1844–1913), патологоанатом из Ростка (позже работал в Университете Бреслау) и Леонард Ландуа (1837–1902), профессор физиологии Грайфсвальдского университета, представили обширные данные о пагубных последствиях переливания крови организмов разных видов. Понфик переливал овечью кровь собакам, кошкам и кроликам, что при больших дозах переливаемой крови приводило к гибели животных. 28 мая 1874 г. Понфик с помощником доктором Бамбергом представил Ассоциации балтийских врачей результаты своих исследований, показывая опасность гетерологичного переливания крови (Roux et al. 2007). Понфик первым выяснил, что кровавая моча — результат не гематурии, а гемоглинурии, источник же гемоглобина в моче — эритроциты донора, а не реципиента.

Внедрение в медицинскую практику

Эти примеры наглядно иллюстрируют, что идеи Бланделла не были безоговорочно приняты медицинским сообществом. Многие считали процедуру опасной и, возможно, повлекшей смерть некоторых пациентов (Learoyd 2012). Несмотря на очевидные успехи, переливание крови внедрялось в медицинскую практику довольно медленно. В 1849 г. Чарльз Генри Феликс Роут (1822–1909) рассмотрел все опубликованные до 11 августа того года случаи переливания крови в статье под названием «Замечания, статистические и общие о переливании крови». Ему удалось обнаружить только 48 зарегистрированных случаев переливания крови (из них 24 при послеродовом кровотечении), из которых 18 имели летальный исход. Таким образом, смертность составляла примерно 1 из 3, что, по словам Роута, было скорее меньше, чем у грыжи, или примерно так же, как при ампутации (Thompson, Strandenes 2020). В 1852 г. Джон Соден смог собрать 36 случаев послеродового кровотечения, при которых было проведено переливание крови, 29 из них привели к выздо-

влению пациенток. При этом он обращает внимание как на количество переливаемого (от 1 до 24,5 унций), так и на его качество (в некоторых случаях смешивали кровь нескольких доноров — от двух до четырех). Согласно подсчетам доктора Черчилля, пожалуй, самым полным, из 630 случаев переливания крови при послеродовом кровотечении умерло 111 родильниц, что составляет около 1 из 5,5 (Soden 1852). Почти одновременно с работами Понфика, Ландуа в 1875 г. опубликовал свою монографию «Переливание крови». Он смог собрать статистику по 478 случаям переливаний до конца 1874 г. Из них 129 были выполнены от животного к человеку, из которых 42 пациента выздоровели; 62 — умерли, по 25 были описаны сомнительные результаты. Также в этом списке было 347 переливаний человека человеку: 150 пациентов выздоровели, 180 — умерли, в 12 случаях результаты были сомнительны, три — неизвестны, два пациента умерли во время переливания крови (Maluf 1954). Чарльз Эгертон Дженнингс в 1883 г. приводит данные о 243 случаях переливаний, из них 143 были успешными (Jennings 1883).

Осложнения при переливании крови различные исследователи объясняли по-разному. Панум и Ландуа считали, что их причиной является разрыв капилляров, Понфик объяснял осложнения неравномерностью вливания крови. В 1877 г. Армин Келер пролил свет на истинную природу таких осложнений, предположив, что различные патологические изменения с сопутствующими симптомами являются результатом обширного капиллярного тромбоза (Hunter 1889).

Для более подробного исследования вопросов гемотрансфузии в 1872 г. Лондонским акушерским обществом был создан комитет под председательством Джона Холла Дэвиса, акушера больницы Мидлсекса, просуществовавший до 1878 г. Почетный секретарь комитета Генри Мэдж в 1874 г. сообщил об основных направлениях работы комитета и обратился к исследователям, имевшим опыт переливания, призывая их представить свои выводы (Madge 1874). Этот комитет должен был анализировать информацию о различных аспектах гемотрансфузии. При скорбно, что его выводы, представляющие огромный исторический интерес, по-видимому, никогда не публиковались.

Мэдж кратко описывает различные подходы к осуществлению трансфузии, отмечая, что возможно переливание как из вены в вену, так из артерии в вену. Зачастую предполагается, что внутриартериальное переливание является

современной процедурой. Однако еще Карл Хютер (1838–1882), профессор хирургии в Грайфсвальде, где Ландуа был профессором физиологии, выступал за инъекцию дефибринированной крови периферически в лучевые или задние большеберцовые артерии, что позволяет вливаемой крови достигать сердца медленно и равномерно (Zimmerman, Howell 1932). Ландуа сообщил об экспериментальных испытаниях внутриартериального переливания собакам в 1875 г. Американский хирург Уильям Стюарт Холстед (1852–1922) применял его при переливаниях в конце XIX века (Maluf 1954).

Упоминания о переливании крови в XIX веке в Новом Свете редки. Описаны случаи гемотрансфузии, проведенные Джорджем Макклелланом в 1832 г. и Уильямом Хаммондом в Нью-Мексико в 1849 г. (Schmidt 1968). В 1854 г. был опубликован анонимный доклад о переливании крови, выполненном в Новом Орлеане (Learoyd 2012).

Переливание крови при заболеваниях

Соден также отмечает, что переливание крови может быть применено при потере крови из-за различных причин: как вследствие ран и операций, чему доктор Роут приводит многочисленные примеры, так и при заболеваниях. Притчардом и Кларком описан случай переливания 16 унций крови при диспепсии и непрекращающейся рвоте, в результате чего пациент через три месяца выздоровел. Доктор Роут предполагал возможность применения гемотрансфузии при тифе и диарее (Soden 1852).

Использование гемотрансфузии при заболеваниях и отравлениях — еще одно направление развития переливания крови. Вилли Кюн (1837–1900) из Гамбурга применял переливание крови собак при отравлении угарным газом. Фрайдберг из клиники Траубе больницы Шарите в Берлине перелил пациенту, отравившемуся угарным газом, восемь унций дефибринированной крови. Пациенту стало лучше, однако к вечеру того же дня он умер. Аналогичная попытка спасти 13-летнего мальчика после отравления угарным газом с помощью переливания шести унций крови также не увенчалась успехом (Maluf 1954).

Леонард Ландуа продемонстрировал вместе с Альбертом Эйленбургом (1840–1917), немецким психиатром и фармакологом, эффективность применения переливания крови у собак, отравленных угарным газом, хлороформом, эфиром, стрихнином, морфином и фосфором. Вебер и Блазиус предприняли попытку переливания крови в случае лейкемии, к сожалению, безуспешную (Maluf 1954).

В 1840 г. описан первый случай применения гемотрансфузии при гемофилии. В середине августа в Лондоне Сэмюэл Армстронг Лейн (1802–1892), преподаватель анатомии и хирургии в Медицинской школе больницы св. Джорджа, оперировал 11-летнего мальчика по имени Джордж Фирмин для исправления косоглазия. Лейн описал своего пациента как страдающего «геморрагическим диатезом» (т. е. расстройством кровотечения), его описание Фирмина точно соответствует классической картине гемофилии. После операции мальчик был отправлен домой, но в тот же вечер Лейна вызвали к нему в связи с послеоперационным кровотечением из глаза. С незначительными перерывами кровотечение продолжалось еще пять ночей и шесть дней, несмотря на все попытки его остановить. Состояние мальчика было крайне тяжелым, он был при смерти. В этих обстоятельствах Лейн решился на переливание крови как единственную возможность спасения жизни. Прежде чем приступить к процедуре, он подробно проконсультировался с Джеймсом Бланделлом. Для трансфузии Лейн использовал медный шприц, снабженный двухходовым запорным краном между воронкой для сбора донорской крови и венозной трубкой. Для замедления коагуляции Лейн перелил пять с половиной унций крови в четыре приема, промывая в перерывах аппарат в теплой воде. После трансфузии не было рецидива кровотечения из глаза, и рана на руке зажила примерно через десять дней. Через три недели мальчик окончательно поправился. Джорджу Фирмину несомненно повезло, но факт остается фактом — шестидневное кровотечение прекратилось после однократного переливания всего 150 мл свежей цельной крови (Farr 1981; Poon, Card 2019).

Становление внутривенной терапии

В XIX веке наряду с опытами по переливанию крови проводили исследования по изучению эффектов внутривенного введения различных жидкостей и газов. Было достаточно распространено введение солевых растворов в качестве заменителя крови (Hajdu 2003).

Интересны эксперименты французского врача Пьера Юбера Нистена (1771–1818) по введению различных газов в сосуды. Введение больших объемов атмосферного воздуха неизменно приводило к гибели животного, вызывая крайнее растяжение правого желудочка. Введение же небольшого объема атмосферного воздуха в сонную артерию не вызывало никакого эффекта. Кислород, введенный в больших

объемах в вены, приводил к гибели животного, малые порции не вызвали значимых последствий. Введение азота, даже в небольших количествах, неизменно приводило к смерти, артериальная кровь в таких случаях приобретала коричневый цвет. Оксид азота быстро адсорбировался кровью, его введение не влекло за собой никаких эффектов. Угольная кислота также абсорбировалась кровью, введение ее небольших объемов животные переносили легко, а вот большие дозы вызывали боли и в конечном итоге смерть. Введение в сонные артерии углекислого водорода вызывало практически немедленную смерть, инъекция малых доз водорода и сернистого водорода также приводила к гибели. Нистен на основании многочисленных экспериментов пришел к выводу, что часть вводимого газа выводится легкими во время выдоха, большая же часть остается в сосудистой системе (Blundell 1828).

Франсуа Мажанди полагал, что инъекция в вены является лучшим средством введения раствора. В его экспериментах на собаках было показано, что морфин, опиум, кротонное масло и синильная кислота вызывали те же эффекты при инъекции, что и при проглатывании. Мажанди пробовал вводить после кровотечения чуть теплую воду, однако это приводило к судорогам и гибели собак (Blundell 1828). Перси и Лоран утверждали, что вылечили столбняк путем инъекции насыщенного отвара дурмана. В экспериментах Гаспара инъекция солей ртути в вены приводила к гибели, но не сразу, смерть наступала на фоне симптомов тяжелой пневмонии. При этом не наблюдалось различий между плотоядными и травоядными животными. Введение насыщенного отвара коры дуба вызывало сильную одышку и смерть, если же отвар был слабым, он почти не производил действия. Инъекция семенной жидкости человека приводила к дисфагии, диспноэ, рвоте, слюно- и мочеотделению, однако, животные в итоге выздоравливали. Практически те же эффекты наблюдались при инъекции желчи травоядным животным; однако, для плотоядных ее введение обычно приводило к смерти. Кроме того, Гаспар экспериментировал с введением ацетата свинца (13 гранул убивали собаку немедленно), отвара спорыньи (полторы унции вызывали потерю аппетита, рвоту, диспноэ и смерть через сутки после инъекции), молока и сыворотки (Ansell 1840). Инъекция большей части вышеупомянутых веществ в небольшие артерии приводила к воспалению.

И тут не обошлось без выпускников Эдинбургского университета. Женевский врач Жан-

Франсуа Коиндэ (1774–1834), окончивший в 1797 г. Эдинбургский университет, показал, что введение крепкого алкоголя в вены собакам приводило к их гибели, инъекции же разбавленного спирта вызывали интоксикацию (Blundell 1828). Доктор Симпсон из Эдинбурга пытался адаптировать проведенные им переливания солевого раствора при холере для случаев маточного кровотечения, однако три подобных трансфузии повлекли за собой гибель пациенток (Soden 1852).

Во второй половине XIX века в Северной Америке проводили эксперименты по переливанию коровьего и козьего молока в качестве заменителя крови. Внутривенная инъекция молока человеку впервые была предпринята Джеймсом Бовеллом (1817–1880) и Эдуардом Малберри Ходдером (1810–1878) в Торонто, Канада, во время эпидемии холеры в июле 1854 г. Они перелили 12 унций коровьего молока 40-летнему мужчине, а через два дня еще одному пациенту, оба выздоровели. Но двое других реципиентов после трансфузии умерли. В 1873 г. в Нью-Йорке Джозеф Хоу перелил полторы унции козьего молока больному туберкулезом, который скончался. Аналогичное вливание молока другому пациенту с туберкулезом также привело к смерти. Наибольшим приверженцем молочных инъекций был доктор Т. Г. Томас из Нью-Йорка. В 1875 г. он перелил шесть унций коровьего молока женщине с тяжелым маточным кровотечением, пациентка выздоровела. В течение трех лет Томас провел подобные переливания семи пациентам. Его поддерживали Дж. Прут и Дж. Бринтон из Нью-Йорка, А. Хэмлин из штата Мэн, Дж. Брисон из Сент-Луиса. Однако французские физиологи Роберт Мутард-Мартин (1850–1926) и Шарль Роберт Рише (1850–1935) в 1879 г., как и У. Т. Гельмут в США пришли к выводу, что такие инъекции бесполезны и опасны и должны быть абсолютно запрещены. В 1880 г. Хоу после безуспешной попытки переливания женского молока заключил, что оно так же непригодно для трансфузии, как коровье или козье, и согласился, что эта процедура опасна и ни в коем случае не обладает ценностью переливания крови. Окончательный отказ от переливания молока наступил с появлением изотонических солевых растворов для внутривенного введения (Oberman 1969).

И снова приходят на память опыты Кристофера Рена по внутривенным введениям собакам различных растворов, получившие продолжение спустя сто лет. Таким образом, параллельно

со становлением переливания крови происходило и развитие внутривенной терапии.

Заключение

Деятнадцатый век ознаменовался существенными достижениями в области переливания крови. Осуществлено и введено в медицинскую практику переливание крови от человека к человеку; доказана опасность гетерологичного переливания крови, выявлен лизис эритроцитов донора при подобных гемотрансфузиях; показано высвобождение калия из лизированных эритроцитов и опасность гиперкалиемии; переливание крови животных людям прекращено; описаны и охарактеризованы гемоглобинемия и гемоглобинурия; признана важность кальция; разработаны подходы к предотвращению свертывания крови, в том числе подогревание, дефибрирование и использование антикоагулянтов; усовершенствованы методические приемы и применяемые при трансфузиях инструменты и устройства. В этот период уже было широко распространено учение об иммунитете, согласно которому при попадании в организм

чужеродных белков (антигенов) происходит образование защитных веществ (антител) с последующей фиксацией и склеиванием антигенов. Бельгийский бактериолог лауреат Нобелевской премии Жюль Жан Батист Венсан Борде (1870–1961) заметил, что инъекция эритроцитов животного другого вида вызывает образование антител в сыворотке и гемолиз эритроцитов (Hajdu 2003). Оказалось, что склеивание (агломинация) эритроцитов перелитой крови и есть одно из проявлений иммунитета — защиты организма от проникновения чужеродных белков. Наука вплотную подошла к выяснению причин несовместимости человеческой крови.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The author declares that there is no conflict of interest, either existing or potential.

References

- Aminoff, M. J. (2017) The life and legacy of Brown-Sequard. *Brain*, vol. 140, no. 5, pp. 1525–1532. <https://doi.org/10.1093/brain/awx071> (In English)
- Ancell, H. (1840) Course of lectures of the physiology and pathology of the blood. Lecture XVII. *Lancet*, vol. 2, pp. 471–476. (In English)
- Aveling, J. H. (1873) Immediate transfusion in England: Seven cases, and the author's method of operating. *Obstetrical Journal of Great Britain and Ireland*, vol. 5, pp. 289–311. (In English)
- Baskett, T. F. (2002) James Blundell: The first transfusion of human blood. *Resuscitation*, vol. 52, no. 3, pp. 229–233. [https://doi.org/10.1016/s0300-9572\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/s0300-9572(02)00013-8) (In English)
- Berner, B. (2020) *Strange blood. The rise and fall of lamb blood transfusion in 19th century medicine and beyond*. Bielefeld: Transcript Verlag, 217 p. (In English)
- Blundell, J. (1818) Experiments on the transfusion of blood by the syringe. *Medico-Chirurgical Transactions*, vol. 9, no. 1, pp. 56–92. PMID: [20895353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20895353/) (In English)
- Blundell, J. (1819) Some account of a case of obstinate vomiting, in which an attempt was made to prolong life by the injection of blood into the veins. *Medico-Chirurgical Transactions*, vol. 10, no. 2, pp. 296–311. PMID: [20895389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20895389/) (In English)
- Blundell, J. (1824) *Researches physiological and pathological*. London: E. Cox and Sons Publ., 146 p. (In English)
- Blundell, J. (1828) Observations on transfusion of blood by Dr. Blundell with a description of his Gravitator. *Lancet*, vol. 2, pp. 321–324. (In English)
- Coley, N. G. (2001) Early blood chemistry in Britain and France. *Clinical Chemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 2166–2178. PMID: [11719488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11719488/) (In English)
- Cooper, D. Y. (2000) The evolution of orthopaedic surgeons from bone and joint surgery at the University of Pennsylvania. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 374, pp. 17–35. <https://doi.org/10.1097/00003086-200005000-00004> (In English)
- Doubleday, E. (1825) Case of uterine hemorrhage, successfully treated by the operation of transfusion. *London Medical and Physical Journal*, vol. 54, no. 321, pp. 380–386. PMID: [30494774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30494774/) (In English)
- Duncan, J. (1886) On re-infusion of blood in primary and other amputations. *British Medical Journal*, vol. 1, no. 1309, pp. 192–193. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.1309.192> (In English)
- Dzik, S. (2018) James Blundell, obstetrical hemorrhage, and the origins of transfusion medicine. *Transfusion Medicine Reviews*, vol. 32, no. 4, pp. 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.08.003> (In English)

- Ellis, H. (2007) James Blundell, pioneer of blood transfusion. *British Journal of Hospital Medicine*, vol. 68, no. 8, p. 447. <https://doi.org/10.12968/hmed.2007.68.8.24500> (In English)
- Farr, A. D. (1981) Treatment of haemophilia by transfusion: The first recorded case. *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 74, no. 4, pp. 301–305. PMID: [7014901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7014901/) (In English)
- Giangrande, P. L. (2000) The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*, vol. 110, no. 4, pp. 758–767. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x> (In English)
- Hajdu, S. I. (2003) Blood transfusion from antiquity to the discovery of the Rh factor. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 33, no. 4, pp. 471–473. PMID: [14584763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14584763/) (In English)
- Hunter, W. (1889) Summary of three lectures on transfusion: Its physiology, pathology and practice. *British Medical Journal*, vol. 2, no. 1493, pp. 305–309. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.1493.305> (In English)
- Ivanov, D. O., Petrenko, Yu. V. (2012) Etapy perelivaniya krovi v akusherstve i pediatrii [Stages of the history of blood transfusion in obstetrics and pediatrics]. *Problemy zhenskogo zdorov'ya*, vol. 7, no. 2, pp. 79–87. (In Russian)
- Jennings, C. E. (1883) *Transfusion: Its history, indications, and modes of application*. London: Leonard & Comp. Publ., 69 p. (In English)
- Jones, H. W., Mackmull, G. (1928) The influence of James Blundell on the development of blood transfusion. *Annals of Medical History*, vol. 10, no. 3, pp. 242–248. PMID: [33943586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33943586/) (In English)
- Kibbie, A. L. (2019) *Blood and sympathy in the nineteenth-century literary imagination*. Charlottesville: University of Virginia Press, 294 p. (In English)
- Learoyd, P. (2012) The history of blood transfusion prior to the 20th century. Pt. 2. *Transfusion Medicine*, vol. 22, no. 6, pp. 372–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01189.x> (In English)
- Madge, H. M. (1874) On transfusion of blood. *British Medical Journal*, vol. 1, no. 680, pp. 42–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.680.42> (In English)
- Maluf, N. S. (1954) History of blood transfusion. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 59–107. <https://doi.org/10.1093/jhmas/ix.1.59> (In English)
- McLoughlin, G. (1959) The British contribution to blood transfusion in the nineteenth century. *British Journal of Anaesthesia*, vol. 31, pp. 503–516. (In English)
- Middleton, W. S. (1929) Philip Syng Physick: Father of American surgery. *Annals of Medical History*, vol. 1, no. 5, pp. 562–582. PMID: [33944299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33944299/) (In English)
- Myhre, B. A. (1995) James Blundell—pioneer transfusionist. *Transfusion*, vol. 35, no. 1, pp. 74–78. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1995.35195090668.x> (In English)
- Nikitina, E. A. (2012) *Nasledovanie grupp krovi [The inheritance of blood groups]*. Saint Petersburg: Herzen State Pedagogical University of Russia Publ., 105 p. (In Russian)
- Nikitina, E. A. (2020) Perelivanie krovi: nachalo [Blood transfusion: The beginning]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 169–180. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-3-169-180> (In Russian)
- Oberman, H. A. (1969) Early history of blood substitutes: Transfusion of milk. *Transfusion*, vol. 9, no. 2, pp. 74–77. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1969.tb04920.x> (In English)
- Pelis, K. (1997) Blood clots: The nineteenth-century debate over the substance and means of transfusion in Britain. *Annals of Science*, vol. 54, no. 4, pp. 331–360. <https://doi.org/10.1080/00033799700200271> (In English)
- Poon, M.-Ch., Card, R. T. (2019) Samuel Armstrong Lane's first successful treatment of haemophilia with blood transfusion in 1840: Could this also be the first successful bypassing therapy? *Haemophilia*, vol. 25, no. 1, pp. e45–e47. <https://doi.org/10.1111/hae.13645> (In English)
- Roper-Hall, G, Jorgensen, H. (2008) Historical vignette: Peter Ludvig Panum (1820–1885), danish physician and physiologist. *American Journal of Orthopedics*, vol. 58, pp. 99–107. <https://doi.org/10.3368/aoj.58.1.99> (In English)
- Roux, F. A., Sai, P., Deschamps, J. Y. (2007) Xenotransfusions, past and present. *Xenotransplantation*, vol. 14, no. 3, pp. 208–216. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2007.00404.x> (In English)
- Roussel, J.-A. (1877) *Transfusion of human blood by the method of J. Roussel (of Geneva)*. London: J. & A. Churchill Publ., 96 p. (In English)
- Schmidt, P. J. (1968) Transfusion in America in the eighteenth and nineteenth centuries. *New England Journal of Medicine*, vol. 279, no. 24, pp. 1319–1320. <https://doi.org/10.1056/NEJM196812122792406> (In English)
- Schmidt, P. J. (2002) Transfuse George Washington! *Transfusion*, vol. 42, no. 2, pp. 275–277. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00033.x> (In English)
- Schmidt, P. J. (2004) Edinburgh and early transfusion in the New World. *Vox Sanguinis*, vol. 87, no. 2, pp. 81–83. <https://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00458.x> (In English)
- Schmidt, P. J., Leacock, A. G. (2002) Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados. *British Medical Journal*, vol. 325, no. 7378, pp. 1485–1487. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7378.1485> (In English)
- Sergeeva, M. S., Panova, E. L. (2021) Brilliant promotion for a doubtful invention: The blood transfusion device of doctor Joseph-Antoine Roussel (1837–1901) in European medical science and practice in 1860–1880. *Bylye Gody*, vol. 16, no. 1, pp. 244–252. (In English)

- Sheldon, G. F. (2012) To the shade of John Hunter: Philip Syng Physick of Philadelphia, “the father of American Surgery”—Hunter’s favorite American trainee. *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 215, no. 5, pp. 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2012.05.036> (In English)
- Shifman, E. M., Filippovich, G. V. (2006) Dzhejms Blandell i “Edinburgskij sled” v razvitii gemotransfusii (sobstvennoe issledovanie) [James Blundell and the Edinburg trace in the development of hemotransfusion (the authors’ own study)]. *Obshchaya reanimatologiya — General Reanimatology*, vol. 2, no. 3, pp. 61–66. (In Russian)
- Smythe, W. R. (2003) The first American textbook of surgery. *Annals of Surgery*, vol. 237, no. 4, pp. 580–590. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000059993.87288.7E> (In English)
- Soden, J. (1852) A Case of Hæmorrhage from Inversion of the Uterus in which the Operation of Transfusion was successfully performed, with remarks on the employment of transfusion generally. *Medico-Chirurgical Transactions*, vol. 35, pp. 413–435. PMID: [20895989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20895989/) (In English)
- Sturgis, C. C. (1942) The history of blood transfusion. *Bulletin of the Medical Library Association*, vol. 30, no. 2, pp. 105–112. PMID: [16016531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16016531/) (In English)
- Thompson, P., Strandenes, G. (2020) The history of fluid resuscitation for bleeding. In: P. Spinella (ed.). *Damage Control Resuscitation*. Switzerland: Springer Publ., pp. 3–29. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20820-2_1 (In English)
- Waller, C. (1825) Case of uterine hemorrhage, in which the operation of transfusion was successfully performed. *London Medical and Physical Journal*, vol. 54, no. 320, pp. 273–277. PMID: [30494818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30494818/) (In English)
- Walter, W. (1884) Portable transfusion apparatus. *British Medical Journal*, vol. 2, no. 1251, pp. 1233. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.1251.1233> (In English)
- Wright, A. E. (1894) Remarks on methods of increasing and diminishing the coagulability of the blood, with especial reference to their therapeutic employment. *British Medical Journal*, vol. 2, no. 1750, pp. 57–61. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.1750.57> (In English)
- Young, J. H. (1964) James Blundell (1790–1878): Experimental physiologist and obstetrician. *Medical History*, vol. 8, no. 2, pp. 159–169. <https://doi.org/10.1017/s0025727300029409> (In English)
- Zimmerman, L. M., Howell, K. M. (1932) History of blood transfusion. *Annals of Medical History*, vol. 4, no. 5, pp. 415–433. PMID: [33944186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33944186/) (In English)



УДК 37.032:796

EDN IYFQSF

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-308-317>

Ресурсная теория и особенности регуляции висцеральных функций в условиях эмоционального напряжения

И. Б. Сиваченко^{✉1}, О. А. Любашина¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Иван Борисович Сиваченко, SPIN-код: 4049-8950, Scopus AuthorID: 55882139900, ResearcherID: AAC-8883-2022, ORCID: 0000-0001-8548-8823, e-mail: avans_d@mail.ru

Ольга Анатольевна Любашина, SPIN-код: 5257-4057, Scopus AuthorID: 6505777191, ResearcherID: A-6241-2017, ORCID: 0000-0002-6296-4628, e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Для цитирования: Сиваченко, И. Б., Любашина, О. А. (2022) Ресурсная теория и особенности регуляции висцеральных функций в условиях эмоционального напряжения. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 308–317. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-308-317> EDN IYFQSF

Получена 8 августа 2022; прошла рецензирование 5 сентября 2022; принята 6 сентября 2022.

Финансирование: Исследование не имело финансовой поддержки.

Права: © И. Б. Сиваченко, О. А. Любашина (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Интерес к регуляции висцеральных систем в различных функциональных состояниях определяется их важной ролью в обеспечении не только жизненно важных функций человека в предъявляемых условиях, но и эффективности его деятельности, в том числе профессиональной. Статья представляет собой теоретический обзор современных взглядов на процесс регуляции висцеральных функций человека в условиях формирующегося эмоционального напряжения при выполнении сложных когнитивных задач. Рассмотренные в статье особенности висцеральных реакций в условиях воздействия внешних факторов могут выступать системным индикатором вызываемых этими факторами изменений в психических и психомоторных процессах, являться интегративными характеристиками изменений функционального состояния. В работе выделены и оценены критерии психофизиологических реакций в условиях эмоционального напряжения, отражающие оптимизацию взаимодействия функциональных систем организма. Обосновывается рациональность объяснения такой оптимизации и интерпретации психофизиологических реакций в условиях эмоционального напряжения с позиций ресурсной теории. Положения теории отражают вопросы о сущности ресурсов и резервов организма и особенностях их расхода. Применение ресурсной теории в объяснении процессов регуляции висцеральных функций человека в периоды актуализации различных функциональных состояний может быть полезным в практической деятельности психофизиологов.

Ключевые слова: эмоциональное напряжение, саморегуляция, висцеральная регуляция, ресурсная теория, ресурсы, функциональное состояние

Resource theory and regulation of autonomic function under the emotional stress

I. B. Sivachenko^{✉1}, O. A. Lyubashina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Ivan B. Sivachenko, SPIN: 4049-8950, Scopus AuthorID: 55882139900, ResearcherID: AAC-8883-2022, ORCID: 0000-0001-8548-8823, e-mail: avans_d@mail.ru

Olga A. Lyubashina, SPIN: 5257-4057, Scopus AuthorID: 6505777191, ResearcherID: A-6241-2017, ORCID: 0000-0002-6296-4628, e-mail: lyubashinaoa@infran.ru

For citation: Sivachenko, I. B., Lyubashina, O. A. (2022) Resource theory and regulation of autonomic function under the emotional stress. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 308–317. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-308-317> EDN IYFQSF

Received 8 August 2022; **reviewed** 5 September 2022; **accepted** 6 September 2022.

Funding: The study did not receive any external funding.

Copyright: © I. B. Sivachenko, O. A. Lyubashina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. An interest in the regulation of human autonomic functions in various functional states has been abiding. This is due to the important role they have in ensuring proper body functioning and effective performance (inter alia, in a professional setting) under different conditions. The article contains a review of modern theories of the regulation of autonomic functions under the emerging emotional stress. Visceral reactions in response to external factors can be viewed as a major indicator of temporary changes in mental and psychomotor processes as well as systemic characteristics of changes in the functional state. The analytical review identified and evaluated the criteria of psychophysiological reactions under the emotional stress. They reflect the optimization of the interaction of functional systems. Optimization and interpretation of psychophysiological reactions under the emotional stress is done from the perspective of the resource theory. The theory focuses on the nature of resources and body reserves and their consumption. The resource theory is deemed a useful tool for psychophysiologicalists as it explains how human autonomic functions are regulated during various functional states.

Keywords: emotional stress, self-regulation, autonomic regulation, resource theory, resources, functional state

Проблемой психических состояний человека занимаются уже достаточно давно (Бодров 2006; Маклаков 2001; Мясищев 1996). За это время выделились несколько ключевых позиций в отношении концепции психического состояния, а также ряда фундаментальных понятий, среди которых: функциональное состояние, эмоциональное напряжение, регуляция функциональных систем и т. д.

Одной из современных и практико-ориентированных позиций в объяснении процессов оптимизации психофизиологических реакций в условиях воздействия внешних факторов может быть применение положений ресурсной теории, сформулированных представителями научных школ психологии и физиологии труда.

В связи с актуальностью проблемы, связанной с влиянием эмоционального напряжения на эффективность деятельности специалистов

разных сфер, в том числе операторов, профессиональных спортсменов, сотрудников МЧС, военнослужащих, автором данной статьи выполнено диссертационное исследование (Сиваченко 2022) с целью выявления и интерпретации особенностей динамики психофизиологических характеристик в условиях эмоционального напряжения, обусловленного когнитивной нагрузкой.

Данная статья является изложением представленных в указанном диссертационном исследовании сведений о значении ресурсной теории в интерпретации физиологических реакций в условиях эмоционального напряжения.

Эмоциональное напряжение и его отражение на уровне регуляции висцеральных функций

Понятие «эмоциональное напряжение» используется в первую очередь в физиологии

труда как состояние мобилизации физиологических функций организма, возникающее в условиях решения трудной задачи или в опасной ситуации. Напряжение — состояние системы, характеризующееся нарушением равновесия. Впоследствии понятие «эмоциональное напряжение» стало использоваться в физиологии и психологии труда как синоним понятия нервно-психическое напряжение (Джебраилова 2005; Крючкова 2007; Прокопенко, Черцова 2016).

Эмоциональное напряжение как форма психического состояния формируется в результате выполнения человеком сложной задачи. Оно представляет собой неспецифическую реакцию мобилизации организма и личности в ответ на предъявляемые условия сложной ситуации. Эмоциональное напряжение зависит от следующих факторов: характера условий; степени восприимчивости к ним конкретного человека; индивидуальных особенностей собственного отражения ситуации человеком и регуляции формы поведения (Бодров, Орлов 1998).

В деятельности человека основное внимание привлекает проблема воздействия значительных нагрузок на функциональную активность и итоговую результативность работы (Журавлев 2009; Кузнецова 2009). Состояние эмоционального напряжения возникает вследствие помех для осуществляемой деятельности, приводит к появлению ошибок, отказов и т. д. Наибольшее количество аварийных ситуаций возникает в период развития непосредственной реакции на предъявляемые нагрузки. На первом этапе реакции развивающееся эмоциональное напряжение играет роль дезорганизатора поведения, особенно в случае несоответствия эмоций целям и задачам деятельности. Происходит нарушение процесса оценки и формирования деятельности, выбора оптимальной ее стратегии.

Физиологические проявления эмоционального напряжения затрагивают почти все системы органов человека, в том числе сердечно-сосудистую, дыхательную и пищеварительную (Щербатых 2006). Все объективные процессы находят отражение в субъективных, внутренних переживаниях человека, испытывающего предъявляемые нагрузки. Человек, находясь в состоянии эмоционального напряжения, может испытывать различные проявления дискомфорта в теле, в том числе: затруднение дыхания, скованность в мышцах, неприятные висцеральные ощущения и даже боли различной степени и локализации. Согласно результатам научных исследований (Булгакова 2010; Парин 2001; Семенова 2016; Щербатых 2006) эмоциональное напряжение и, как следствие, возбуждение

нервных центров, обеспечивающих висцеральные функции, является звеном патогенетической цепи, в которой активизация нейрогуморальной системы регуляции может привести к структурным изменениям в органах и тканях. Эти изменения, в свою очередь, оказывают влияние на психоэмоциональную сферу человека и опосредуют дисбаланс в работе физиологических и биохимических систем, что может приводить к повышению утомляемости, ухудшению качества жизни и здоровья, изменению массы тела и др. (Булгакова 2010).

Слабовыраженное эмоциональное напряжение краткосрочно и протекает бесследно. Сильное и продолжительное напряжение может вызвать достаточно длительные неблагоприятные последствия (Журавлев 2009). Эмоциональное напряжение определяется как нормальная адаптационная реакция человека. Оно позволяет мобилизовать физиологические функции человека для достижения лучшего результата деятельности (Джебраилова 2005). При этом сильное или продолжительное эмоциональное напряжение может способствовать дезорганизации деятельности (Немчин 1983; Izard 1983) и формировать предпосылки к нарушению механизмов саморегуляции наиболее слабых функциональных систем, теряя адаптивную роль и становясь причиной патогенеза некоторых психосоматических заболеваний.

Информативность психофизиологических показателей при оценке механизмов регуляции физиологических функций

Согласно сведениям Н. И. Наенко (1976) и Т. А. Немчина (1983), состояние напряжения, развивающееся в условиях дефицита времени и информации при предъявлении повышенных требований к качеству и объему результатов деятельности, характеризуется тремя уровнями: слабое, умеренное (классическое напряжение) и выраженное (скорее напряженность). Слабая форма напряжения определяется условно, так как, в сущности, в этом случае признаки напряжения либо не наблюдаются, либо их проявления настолько незначимы, что респонденты не склонны считать свое состояние напряжением. В результате, при исследовании соматических систем и психической сферы испытуемых характеристики их состояния не отличаются от повседневных. Характеристики второй степени напряжения более отчетливы. Отмечается мобилизация психической деятельности, повышение физической активности, появляется ощущение общего подъема морально-психических, душевных и физических сил. При этом

в психической деятельности может возрастать эффективность основных процессов внимания, наблюдаться изменения в динамике нервных процессов, которые в целом можно расценивать как усиление (Натаров, Немчин 1988).

В сложной или экстремальной ситуации формирование эмоционального напряжения сопровождается изменениями физиологических показателей, которые отражают перестройку взаимодействия функциональных систем. Изменения проявляются в висцеральных реакциях, а именно: в увеличении частоты сердечных сокращений, уменьшении вариабельности сердечного ритма, повышении интенсивности внешнего дыхания, выраженности кожно-гальванической реакции и др. Показанные физиологические сдвиги сопровождаются изменениями результативности интеллектуальной деятельности, а также определенными особенностями поведения (Джебраилова 2005). Имеются сведения, что в состоянии эмоционального напряжения увеличение частоты сердечных сокращений составляет $17,2 \pm 1,6\%$ (Деваев, Суворов 2010). Эти результаты подтверждаются другими авторами (Щербатых 2006), также отмечающими изменение частоты сердечных сокращений при предъявлении условий стресса, отражающее активацию симпатической системы. Изменение тонической формы кожно-гальванической реакции при эмоциональном напряжении может варьировать в достаточно широком диапазоне (от 300–600 кОм до 1–0,1 кОм сопротивления).

Структурно-функциональные особенности выраженного напряжения проявляются в следующих реакциях:

- реорганизация психической деятельности;
- изменения со стороны процессов висцеральной регуляции, в частности влияние на деятельность дыхательной, сердечно-сосудистой и выделительной систем;
- существенные отклонения в психомоторике;
- значительные сдвиги в нейродинамических характеристиках и ярко проявляющееся чувство общего психофизического дискомфорта;
- снижение когнитивных способностей.

В. Н. Григорьева подразделила уровень выраженного напряжения на эмоциональное перенапряжение и истощение, соответствующие «деструктивному» состоянию и определяемые специфическим набором признаков дезадаптации (Григорьева, Тхостов 2009).

Анализ публикаций современных авторов позволяет определить основные физиологиче-

ские корреляты эмоционального напряжения. Есть мнение (Парин 2001), что эмоциональное напряжение, стресс и шок — это не принципиально разные процессы (согласно современным литературным сведениям), а психофизиологическое состояние различной степени и силы выраженности. Физиологические механизмы вовлечены в разной степени, однако их структура одинакова для каждого процесса.

Д. В. Бердников с коллегами (Бердников, Бобынцев 2012) провели серии собственного исследования на выборке из 122 добровольцев (88 женщин и 34 мужчины) возрастной группы 18–26 лет. Они выделили корреляции между особенностями регуляции функциональных систем, реакциями вегетативной нервной системы и восприятием поступающей информации. Авторы показали, что активация вегетативной нервной системы обеспечивает реактивность функциональных систем, высокую пластичность регуляции. Согласно данным клинических наблюдений (Щербатых 2006; Brenner et al. 1998; Karmakar et al. 2010) и экспериментальных работ (Ахмедова 2015; Гаврилова 2014; Щербатых 2006), сердечно-сосудистая система в первую очередь реагирует на нагрузки, а также становится одной из первых мишеней эмоционального напряжения на физиологическом уровне.

Влияние нагрузки на состояние сердечно-сосудистой системы на данный момент изучено достаточно подробно, как в отношении частоты сердечного ритма, так и формы кардиоциклов. При длительном избыточном влиянии симпатического компонента вегетативной нервной системы на сердечно-сосудистую систему формируется патологический алгоритм управления ею (Ахмедова 2015). Это проявляется в фиксации повышенного артериального давления в сосудах, снижении эластичности капилляров и стенок более крупных сосудов. Имеется связь между интенсивностью, продолжительностью, пиковыми характеристиками сложных внешних условий и степенью их влияния на сердечно-сосудистую и другие системы организма. Как фактор основной опасности и риска обозначается длительность нагрузки. Резкие пики эмоциональной нагрузки не являются столь значимыми для организма, сколь длительные.

В исследованиях Т. Д. Джебраиловой (Джебраилова 2005) представлены результаты оценки проявлений эмоционального напряжения у школьников в условиях когнитивной нагрузки. Результативность выполнения заданий оценивали по вариабельности ритма сердца и вызванной активности тета-ритма ЭЭГ. У 77% школьников показано изменение характеристик

кардиоритма, а именно: снижение длительности и коэффициента вариации R-R-интервалов, рост индекса напряжения на первом этапе работы (не обусловлено формированием утомления). Автор работы провела корреляционный и регрессионный анализ, который позволил выявить связи параметров сердечного ритма у школьников с различным уровнем эмоционального напряжения в условиях выполнения умственной задачи с исходными показателями кожно-гальванической реакции и электроэнцефалограммы. У школьников с низкой степенью эмоционального напряжения значения показателей ритма сердца сопровождалась меньшей выраженностью кожно-гальванической реакции и не коррелировали с параметрами тета-ритма фоновой электроэнцефалограммы. При этом взаимосвязь с исходными значениями показателей сердечного ритма не обнаружена.

В работе А. А. Северова (Северов 2009) представлены данные кожно-гальванической реакции обследуемых на моделируемое эмоциогенное воздействие — снижение электрического сопротивления кожи. Однонаправленные реакции отмечены и по показателям вегетативной регуляции при эмоциональном напряжении. Это проявлялось в возрастании индекса напряжения регуляторных систем, что свидетельствует о преобладании симпатического вегетативного реагирования у обследуемых. Увеличение значений электрической проводимости кожи рассматривается разными авторами как маркер разноплановых изменений: возникновения эмоции, мобилизации организма на восприятие нового раздражителя, активации организма при значительном воздействующем стимуле, возникновения внутреннего возбуждения, повышения уровня энергообмена, «эмоционального» решения задачи, формирования ситуативной тревожности, формирования паттернов поведения приготовления к интенсивным физическим или интеллектуальным усилиям, а также множества когнитивных и эмоциональных процессов, вызываемых стимулом (Колбенева 2014).

Согласно результатам исследования А. С. Климова и соавторов (Климов и др. 2012), характеристики частоты сердечных сокращений, кожно-гальванической реакции, состояния стенки сосудов и реакции дыхания ожидаемо меняются в зависимости от степени, интенсивности и качественных особенностей предъявляемых психологических или физических факторов. Изменения могут происходить не только в процессе непосредственного преодоления сложившейся ситуации, воздействующего фактора, решения непростой умственной задачи,

но и на этапе подготовки или ожидания. В первую очередь увеличивается частота сердечных сокращений. В наиболее значимые периоды нагрузки снижается электрическое сопротивление кожных покровов, увеличивается тонус сосудов, учащается дыхание. Однако, реакции на предъявление дозированной нагрузки не были одинаковыми в выборке испытуемых. Соотношение лиц с выраженной реакцией повышения частоты сердечных сокращений в период ознакомления с инструкцией (подготовки) и в период непосредственного выполнения заданий составляла 74,2% к 25,8%. Восстановление частоты сердечных сокращений к концу процедуры тестирования отмечалось только у 36,5% участников против 63,5% лиц. У последних значения итоговых показателей были достоверно выше исходных.

Таким образом, особенности висцеральных реакций в условиях воздействия внешних факторов могут являться интегративными характеристиками изменений функционального состояния, а также выступать системными индикаторами изменений в психических и психомоторных процессах при реализации той или иной когнитивной деятельности.

Ресурсная теория в интерпретации физиологических реакций в условиях эмоционального напряжения

Оптимизация психофизиологических реакций в условиях эмоционального напряжения может быть объяснена положениями ресурсной теории. Среди научных школ и отдельных ученых существуют разные трактовки и классификации «ресурсов», а также разные концепции развития, актуализации и истощения ресурсов. В теориях преодоления стресса «ресурс» часто рассматривается как функциональный потенциал, обеспечивающий устойчивый уровень реализации активности человека и достижения ее заданных параметров на протяжении определенного отрезка времени (Водопьянова 2015).

В работе А. С. Кузнецовой (Кузнецова 2009) описан подход к интерпретации функционального состояния посредством соотношения результата и ресурсов, затраченных для его достижения. Баланс механизмов актуальной регуляции может являться маркером «цены» эффективной деятельности. Эта идея является важным и новым методическим подходом, основанным на качественном и количественном выражении обеспечения деятельности независимо от периода времени. Это структурно-интегративный подход для оценки модулирующих

щих возможностей системы регуляторных механизмов.

Р. Хокки и П. Хамильтон (Бодров 2006) на основании анализа данных источников литературы и результатов проведенных собственных исследований среди процессов, лежащих в основе развития состояния эмоционального напряжения, обозначили концептуальные принципы, которые в общем виде можно представить так:

- умственные процессы обеспечиваются определенными ресурсами;
- ресурсы определяют скоростные характеристики физиологических (психических) процессов, а также потенциал и возможности;
- интегральный высший центр контроля обеспечивает управление и перераспределение ресурсов;
- автоматизация процесса вовлечения необходимых и достаточных ресурсов для эффективного выполнения деятельности;
- при фоновом состоянии обеспечиваются длительные стабильные показатели;
- эмоциональное напряжение влияет на динамические особенности.

Указанные ресурсы человека могут рассматриваться как количественно измеряемый резерв, использование которого в предъявляемой ситуации позволит компенсировать неблагоприятное воздействие возникших обстоятельств. В ресурсной модели взаимосвязи предъявляемой актуальной нагрузки с висцеральными реакциями ценной является возможность оценить уровень эмоционального напряжения через категории «расход ресурсов», «затраты», «потери» (Бодров 2006; Зотов и др. 2009; Криволапчук, Чернова 2016). Однако, в ресурсной теории остается «черным ящиком» роль исходного уровня ресурсов, перераспределение ресурсов, состав требуемых ресурсов в различных условиях формирования эмоционального напряжения.

В психологии спорта, а также психологии труда, ресурсы и резервы организма анализировали как фактор успешности профессиональной деятельности. Ресурсы и резервы отражают «цену» деятельности и позволяют оценить как психические, психологические «затраты» человека на достижение целей, так и условные «доходы» от достижений. В плане функциональных состояний проблема ресурсов достаточно подробно исследована В. А. Бодровым (Бодров 2006). Автор выделяет «резервы», связывая их с физиологическими возможностями организма, а ресурсы с особенностями информационных

процессов, уровнем развития профессионально ориентированных функций. Автор полагает, что ресурсы составляют некоторый функциональный потенциал, обеспечивающий реализацию актуальной деятельности с необходимой результативностью. Тем самым постулируется системная организация резервов и ресурсов.

В частности, динамика показателей сердечного ритма во время экзаменационного процесса и в период между сессиями (Алексеева и др. 2010; Murberg, Bru 2007) отражает выраженное смещение регуляции с автономных механизмов на центральный контур, что проявляется в усилении симпатических влияний, вовлечении надсегментарных механизмов регуляции сердечной деятельности. При этом происходит увеличение дефицита энергетического обеспечения. Указанные процессы демонстрируют и фактически являются маркерами влияния экзаменационного процесса как стрессогенного фактора. Возрастают значения показателей таких, как частота сердечных сокращений, индекс напряжения (по Баевскому), систолическое и диастолическое давление, состояние сосудов (ширина просвета). Показано, что ваготоники характеризуются высокими значениями индекса напряжения в условиях экзамена (рост относительно межсессионного периода в 2,9 раза). При этом у лиц с нормотонией индекс напряжения увеличивается на 41% по сравнению с исходными значениями. Указанные значительные изменения у ваготоников демонстрируют выраженное напряжение регуляторных систем и актуализацию имеющихся функциональных ресурсов. Таким образом, эти маркеры также характеризуют индивидуальные резервы конкретного человека.

В публикации Ю. А. Ханина о перераспределении функциональных резервов в организме (обзор в: Ханин 1983) автор описывает избирательное понижение психологических показателей по мере накопления у летчиков утомления и развития состояния напряжения. В первую очередь ухудшаются мало связанные с выполняемой деятельностью показатели — качество выполняемых параллельно тестовых заданий. Затем снижались показатели результативности их основных задач, при этом летчики еще хорошо справлялись с согласованием действий по пилотированию самолета. Как показало исследование, существует некая форма избирательности в динамике психологических показателей. Дольше сохраняются те качества, которые имеют большее мотивационное подкрепление.

В другом исследовании (обзор в: Ханин 1983) в процессе проведения учебно-тренировочных

занятий в лыжных видах спорта проводили психологическое тестирование и оценку физической подготовки спортсменов. Значительные нагрузки в течение десятидневного периода на фоне роста результативности вызвали у участников существенные висцеральные реакции, свидетельствующие о формировании эмоционального напряжения. Так по результатам пробы «степ-тест» у ряда добровольцев понизились итоговые показатели, выявлялись случаи лимфопении и эозинопении, отмечено резкое снижение веса. В группе лыжников к концу цикла отмечено ухудшение когнитивных процессов, а именно снижение на 15% показателей памяти. В то же время улучшились показатели точности движений, двигательной памяти, соразмерности усилий, то есть показателей-индикаторов эффективности выполняемой профессионально значимой деятельности. Особый интерес представляет то, что при улучшении двигательной памяти снизилась результативность других нейтральных тестов, т. е. на фоне реакций на воздействие внешнего фактора произошло перераспределение резервных возможностей (одного за счет другого).

Таким образом, критерии психофизиологических реакций могут являться индикаторами висцеральной регуляции в условиях эмоционального напряжения, эффективности взаимодействия функциональных систем и перераспределения резервов и ресурсов с точки зрения ресурсной теории. Применение положений

ресурсной теории для объяснения процессов регуляции висцеральных функций человека в периоды актуализации различных функциональных состояний может быть полезным в практической деятельности психофизиологов в области инженерной психологии, эргономики, психологии и физиологии труда, в частности при оценке надежности человека-оператора, предупреждения ошибочных действий.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

- a. Иван Борисович Сиваченко — поиск и анализ источников, подготовка рукописи;
- b. Ольга Анатольевна Любашина — редактирование и корректировка рукописи.

Author Contributions

- a. Ivan B. Sivachenko—selected and analyzed the sources, drafted the manuscript;
- b. Olga A. Lyubashina—proofread and edited the manuscript.

Литература

- Алексеева, Э. А., Шантанова, Л. Н., Петунова, А. Н., Иванова, И. К. (2010) Оценка функционального состояния организма студентов в период экзаменационного стресса. *Вестник Бурятского государственного университета*, № 12, с. 108–113.
- Ахмедова, К. С. (2015) Физиологические механизмы действия стресса на сердечно-сосудистую систему. *Вестник Чеченского государственного университета*, № 3 (19), с. 71–78.
- Бердников, Д. В., Бобынцев, И. И. (2012) Вегетативные корреляты саморегуляции функциональных систем восприятия. *Экология человека*, № 5, с. 25–31.
- Бодров, В. А. (2006) *Психологический стресс: развитие и преодоление*. М.: ПЕР СЭ, 528 с.
- Бодров, В. А., Орлов, В. Я. (1998) *Психология и надежность: человек в системах управления техникой*. М.: Институт психологии РАН, 288 с.
- Булгакова, О. С. (2010) Особенности механизма психофизиологического гомеостатического регулирования при стрессе. *Международный журнал экспериментального образования*, № 7, с. 100.
- Водопьянова, Н. Е. (2015) Современные концепции ресурсов субъекта профессиональной деятельности. *Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Серия 16: Психология. Педагогика*, № 1, с. 45–54.
- Гаврилова, Е. А. (2014) *Ритмокардиография в спорте*. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 164 с.
- Григорьева, В.Н., Тхостов, А.Ш. (2009) *Психологическая помощь в неврологии*. Нижний Новгород: Нижегородская государственная медицинская академия, 444 с.
- Деваев, Н. П., Суворов, В. В. (2010) Влияние психоэмоционального стресса на регуляцию сердечного ритма у студентов. *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*, № 1. с. 1–4.
- Джебраилова, Т. Д. (2005) *Индивидуальные особенности взаимодействия функциональных систем при целенаправленной деятельности человека в условиях эмоционального напряжения. Диссертация на соискание степени доктора биологических наук*. М., Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАМН, 242 с.

- Журавлев, Д. В. (2009) *Психологическая регуляция и оптимизация функциональных состояний спортсмена*. М.: [б. и.], 120 с.
- Зотов, М. В., Шостак, В. И., Петрукович, В. М. (2009) Физиологические показатели устойчивости человека к воздействию информационного стресса. *Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Серия 12. Психология. Социология. Педагогика*, № 4, с. 255–261.
- Климов, А. С., Булка, А. П., Булка, К. А. (2012) Общие закономерности психофизиологических реакций организма на воздействие дозированных стрессорных факторов. В кн. *Психофизиология профессионального здоровья человека: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 15-летию кафедры военной психофизиологии*. СПб.: Изд-во Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, с. 212–218.
- Колбенева, М. Г. (2014) Изменения электрического сопротивления кожи при актуализации опыта, связанного с различными органами чувств. *Вопросы психологии*, № 2, с. 93–106.
- Криволапчук, И. А., Чернова, М. Б. (2016) Функциональное состояние школьников 6–7 лет при когнитивной нагрузке. *Новые исследования*, № 2 (47), с. 36–44.
- Крючкова, Г. Н. (2007) Особенности психофизиологических механизмов эмоционального напряжения. *Фундаментальные исследования*, № 11, статья 85.
- Кузнецова, Е. П. (2009) *Психофизиологические корреляты стрессоустойчивости оператора. Автореферат диссертации на соискание степени кандидата биологических наук*. М., Институт медико-биологических проблем РАН, 22 с.
- Маклаков, А. Г. (2001) *Общая психология*. СПб.: Питер, 592 с.
- Мясищев, В. Н. (1996) Психические состояния и отношения человека. *Обзор психиатрии и медицинской психологии им. В. М. Бехтерева*, № 1, с. 8–14.
- Наенко, Н. И. (1976) *Психическая напряженность*. М.: Изд-во МГУ, 112 с.
- Натаров, В. И., Немчин, Т. А. (1988) Нервно-психическое напряжение и психопрофилактика состояний здоровья студентов. *Психологический журнал*, т. 8, № 3, с. 87–92.
- Немчин, Т. А. (1983) *Состояние нервно-психического напряжения*. Л.: Изд-во ЛГУ, 165 с.
- Парин, С. Б. (2001) Нейрохимические и психофизиологические механизмы стресса и шока. *Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Серия: Социальные науки*, № 1, с. 20–28.
- Прокопенко, Л. А., Черцова, А. И. (2016) Психопрофилактика эмоционального напряжения студентов вуза. *Международный журнал экспериментального образования*, № 12–2, с. 225–227.
- Северов, А. А. (2009) *Особенности психофункциональных реакций на стрессогенные воздействия и их направленная коррекция у молодых людей. Диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук*. Волгоград, Волгоградский государственный медицинский университет, 154 с.
- Семенова, С. А. (2016) Разработка коррекционно-профилактических программ на основе положений активационной терапии. *Вестник спортивной науки*, № 5, с. 28–32.
- Сиваченко, И. Б. (2022) *Регуляция вегетативных функций в условиях эмоционального напряжения у мужчин молодого возраста с различной целевой ориентацией на занятия физической активностью. Диссертация на соискание степени кандидата психологических наук*. СПб., Институт психологии РАН, 152 с.
- Ханин, Ю. Л. (сост.). (1983) *Стресс и тревога в спорте: Международный сборник научных статей*. М.: Физкультура и спорт, 288 с.
- Щербатых, Ю. В. (2006) *Психология стресса и методы коррекции*. СПб.: Питер, 256 с.
- Brenner, I. K. M., Thomas, S., Shephard, R. J. (1998) Autonomic regulation of the circulation during exercise and heat exposure. Inferences from heart rate variability. *Sports Medicine*, vol. 26, no. 2, pp. 85–99. <https://doi.org/10.2165/00007256-199826020-00003>
- Izard, C. E. (1993) Four systems for emotion activation: Cognitive and noncognitive processes. *Psychological Review*, vol. 100, no. 1, pp. 68–90. <https://doi.org/10.1037/0033-295x.100.1.68>
- Karmakar, C., Khandoker, A., Palaniswami, M. (2010) Heart rate asymmetry in altered parasympathetic nervous system activity. *Computing in Cardiology*, vol. 37, pp. 601–604.
- Murberg, T. A., Bru, E. (2007) The role of neuroticism and perceived school-related stress in somatic symptoms among students in Norwegian junior high schools. *Journal of Adolescence*, vol. 30, no. 2, pp. 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2006.02.001>

References

- Akhmedova, K. S. (2015) Fiziologicheskie mekhanizmy dejstviya stressa na serdechno-sosudistuyu sistemu [Physiological mechanisms of the effect of stress on the cardiovascular system]. *Vestnik Chechenskogo gosudarstvennogo universiteta — Chechen State University Bulletin*, no. 3 (19), pp. 71–78. (In Russian)
- Alekseeva, E. A., Shantanova, L. N., Petunova, A. N., Ivanova, I. K. (2010) Otsenka funktsional'nogo sostoyaniya organizma studentov v period ekzamenatsionnogo stressa [Estimation of the functional state of students' organism during the examination stress]. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta — The Buryat State University Bulletin*, no. 12, pp. 108–113. (In Russian)

- Berdnikov, D. V., Bobyntsev, I. I. (2012) Vegetativnye korrelyaty samoregulyatsii funktsional'nyh sistem vospriyatiya [Self-regulation vegetative correlates of comprehension functional systems]. *Ekologiya cheloveka — Human Ecology*, no. 5, pp. 25–31. (In Russian)
- Bodrov, V. A. (2006) *Psikhologicheskij stress: razvitie i preodolenie [Psychological stress: Development and overcoming]*. Moscow: PER SE Publ., 528 p. (In Russian)
- Bodrov, V. A., Orlov, V. Ya. (1998) *Psikhologiya i nadezhnost': chelovek v sistemakh upravleniya tekhnikoj [Psychology and reliability: Man in control systems of equipment]*. Moscow: RAS Institute of Psychology Publ., 288 p. (In Russian)
- Brenner, I. K. M., Thomas, S., Shephard, R. J. (1998) Autonomic regulation of the circulation during exercise and heat exposure. Inferences from heart rate variability. *Sports Medicine*, vol. 26, no. 2, pp. 85–99. <https://doi.org/10.2165/00007256-199826020-00003> (In English)
- Bulgakova, O. S. (2010) Osobennosti mekhanizma psikhofiziologicheskogo gomeostaticeskogo regulirovaniya pri stresse [Features of the mechanism of psychophysiological homeostatic regulation under stress]. *Mezhdunarodnyj zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya — International Journal of Experimental Education*, no. 7, p. 100. (In Russian)
- Devaev, N. P., Suvorov, V. V. (2010) Vliyanie psikhoemotsional'nogo stressa na regulyatsiyu serdechnogo ritma u studentok [Influence of the psycho-emotional stress on the heart rhythm regulation of the female students]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*, no. 1, pp. 1–4. (In Russian)
- Dzhebrailova, T. D. (2005) *Individual'nye osobennosti vzaimodejstviya funktsional'nykh sistem pri tselenapravlennoj deyatel'nosti cheloveka v usloviyakh emotsional'nogo napryazheniya [Individual features of the interaction of functional systems during purposeful human activity under conditions of emotional stress]*. PhD dissertation (Biology). Moscow, Research Institute of Normal Physiology named after P. K. Anokhin, 242 p. (In Russian)
- Gavrilova, E. A. (2014) *Ritmokardiografiya v sporte [Rhythmocardiography in sports]*. Saint Petersburg: North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov Publ., 164 p. (In Russian)
- Izard, C. E. (1993) Four systems for emotion activation: Cognitive and noncognitive processes. *Psychological Review*, vol. 100, no. 1, pp. 68–90. <https://doi.org/10.1037/0033-295x.100.1.68> (In English)
- Grigor'eva V.N., Thostov A.SH. (2009) *Psihologicheskaya pomoshch' v nevrologii*. N.Novgorod: Privolzhsky Research Medical University, 444 p. (in Russian)
- Izard, C. E. (1993) Four systems for emotion activation: Cognitive and noncognitive processes. *Psychological Review*, vol. 100, no. 1, pp. 68–90. <https://doi.org/10.1037/0033-295x.100.1.68> (In English)
- Karmakar, C., Khandoker, A., Palaniswami, M. (2010) Heart rate asymmetry in altered parasympathetic nervous system activity. *Computing in Cardiology*, vol. 37, pp. 601–604. (In English)
- Khanin, Yu. L. (comp.). (1983) *Stress i trevoga v sporte: Mezhdunarodnyj sbornik nauchnykh statej [Stress and anxiety in sports: An International collection of scientific papers]*. Moscow: Fizkul'tura i sport Publ., 288 p. (In Russian)
- Klimov, A. S., Bulka, A. P., Bulka, K. A. (2012) Obshchie zakonomernosti psikhofiziologicheskikh reaksij organizma na vozdeystvie dozirovannykh stressornykh faktorov [General patterns of psychophysiological reactions of the organism to the effects of dosed stressors]. In: *Psikhofiziologiya professional'nogo zdorov'ya cheloveka: materialy IV Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoj 15-letiyu kafedry voennoj psikhofiziologii [Psychophysiology of professional human health: Materials of the IV All-Russian Scientific-Practical Conference dedicated to the 15th anniversary of the department of military psychophysiology]*. Saint Petersburg: Military Medical Academy named after S. M. Kirov Publ., pp. 212–218. (In Russian)
- Kolbeneva, M. G. (2014) Izmeneniya elektricheskogo soprotivleniya kozhi pri aktualizatsii opyta, svyazannogo s razlichnymi organami chuvstv [Variation of the electric resistance of the skin during actualization of experience from different senses]. *Voprosy psikhologii*, no. 2, pp. 93–106. (In Russian)
- Krivolapchuk, I. A., Chernova, M. B. (2016) Funktsional'noe sostoyanie shkol'nikov 6–7 let pri kognitivnoj nagruzke [Functional state of 6–7-year-old school children under cognitive load]. *Novye issledovaniya*, no. 2 (47), pp. 36–44. (In Russian)
- Kryuchkova, G. N. (2007) Osobennosti psikhofiziologicheskikh mekhanizmov emotsional'nogo napryazheniya [Features of psychophysiological mechanisms of emotional stress]. *Fundamental'nye issledovaniya — Fundamental Research*, no. 11, article 85. (In Russian)
- Kuznetsova, E. P. (2009) *Psikhofiziologicheskie korrelyaty stressoustojchivosti operatora [Psychophysiological correlates of operator stress tolerance]*. PhD dissertation (Biology). Moscow, Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, 22 p. (In Russian)
- Maklakov, A. G. (2001) *Obshchaya psikhologiya [General psychology]*. Saint Petersburg: Piter Publ., 592 p. (In Russian)
- Murberg, T. A., Bru, E. (2007) The role of neuroticism and perceived school-related stress in somatic symptoms among students in Norwegian junior high schools. *Journal of Adolescence*, vol. 30, no. 2, pp. 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.adolescence.2006.02.001> (In English)

- Myasishchev, V. N. (1996) Psikhicheskie sostoyaniya i otnosheniya cheloveka [Mental states and human relationships]. *Obzrenie psikhiatrii i meditsinskoj psikhologii im. V. M. Bekhtereva — V. M. Bekhterev Review of Psychiatry and Medical Psychology*, no. 1, pp. 8–14. (In Russian)
- Naenko, N. I. (1976) *Psikhicheskaya napryazhennost' [Mental tension]*. Moscow: Moscow State University Publ., 112 p. (In Russian)
- Natarov, V. I., Nemchin, T. A. (1988) Nervno-psikhicheskoe napryazhenie i psikhoprofilaktika sostoyanij zdorov'ya studentov [Nervous-psychic stress and psychoprophylaxis of students' health conditions]. *Psikhologicheskij zhurna — Psychological Journal*, vol. 8, no. 3, pp. 87–92. (In Russian)
- Nemchin, T. A. (1983) *Sostoyanie nervno-psikhicheskogo napryazheniya [State of neuropsychic stress]*. Leningrad: Leningrad State University Publ., 165 p. (In Russian)
- Parin, S. B. (2001) Nejrokhimicheskie i psikhofiziologicheskie mekhanizmy stressa i shoka [Neurochemical and psychophysiological mechanisms of stress and shock]. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N. I. Lobachevskogo. Seriya: Sotsial'nye nauki — Vestnik of Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. Series: Social Sciences*, pp. 20–28. (In Russian)
- Prokopenko, L. A., Chertsova, A. I. (2016) Psikhoprofilaktika emotsional'nogo napryazheniya studentov vuza [Psychoprophylaxis of emotional stress students]. *Mezhdunarodnyj zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya — International Journal of Experiential Education*, no. 12–2, pp. 225–227. (In Russian)
- Semenova, S. A. (2016) Razrabotka korrektsionno-profilakticheskikh programm na osnove polozhenij aktivatsionnoj terapii [Development of health programs on the basis of the activation therapy]. *Vestnik sportivnoj nauki — Sports Science Bulletin*, no. 5, pp. 28–32. (In Russian)
- Severov, A. A. (2009) *Osobennosti psikhofunktional'nykh reaksij na stressogennye vozdeystviya i ikh napravlennaya korrektsiya u molodykh lyudej [Features of psychofunctional reactions to stressful influences and their directed correction in young people]*. PhD dissertation (Medical Sciences). Volgograd, Volgograd State Medical University, 154 p. (In Russian)
- Sivachenko, I. B. (2022) *Regulyatsiya vegetativnykh funktsij v usloviyakh emotsional'nogo napryazheniya u muzhchin molodogo vozrasta s razlichnoj tselevoj orientatsiej na zanyatiya fizicheskoj aktivnost'yu [Regulation of vegetative functions in conditions of emotional stress in young men with different target orientation to physical activity]*. PhD dissertation (Psychology). Moscow, Institute of Psychology of Russian Academy of Sciences, 152 p. (In Russian)
- Shcherbatykh, Yu. V. (2006) *Psikhologiya stressa i metody korrektsii [Psychology of stress and methods of correction]*. Saint Petersburg: Piter Publ., 256 p. (In Russian)
- Vodopyanova, N. E. (2015) Sovremennye kontseptsii resursov sub'ekta professional'noj deyatel'nosti [Modern concepts of the resources of a subject of professional activity]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 16: Psikhologiya. Pedagogika — Vestnik of Saint Petersburg University. Series 16: Psychology and Education*, no. 1, pp. 45–54. (In Russian)
- Zhuravlev, D. V. (2009) *Psikhologicheskaya regulyatsiya i optimizatsiya funktsional'nykh sostoyanij sportsmena [Psychological regulation and optimization of the functional states of an athlete]*. Moscow: [s. n.], 120 p. (In Russian)
- Zotov, M. V., Shostak, V. I., Petrukovich, V. M. (2009) Fiziologicheskie pokazateli ustojchivosti cheloveka k vozdeystviyu informatsionnogo stressa [Physiological indicators of human resistance to the effects of information stress]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 12. Psikhologiya. Sotsiologiya. Pedagogika — Vestnik of Saint-Petersburg University. Series 12. Psychology. Sociology. Education*, no. 4, pp. 255–261. (In Russian)



Check for updates

Обзоры

УДК 621.317+612.8

EDN JDXUFA

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-318-335>

Опыт автоматизации физиологических экспериментов

В. Н. Чихман^{✉1, 2}, С. Д. Солнушкин¹, В. О. Молодцов^{1, 2}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, д. 5

Сведения об авторах

Валерий Николаевич Чихман, SPIN-код: 2405-9435, ORCID: 0000-0002-4955-4608, e-mail: chikhmanvn@infran.ru

Сергей Дмитриевич Солнушкин, ORCID: 0000-0003-4009-6716, e-mail: solnushkin@list.ru

Владимир Олегович Молодцов, e-mail: vom1944.molodtsov@yandex.ru

Для цитирования: Чихман, В. Н., Солнушкин, С. Д., Молодцов, В. О. (2022) Опыт автоматизации физиологических экспериментов. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 318–335. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-318-335>
EDN JDXUFA

Получена 8 июня 2022; прошла рецензирование 23 июля 2022; принята 24 июля 2022.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134-2019-0005.

Права: © В. Н. Чихман, С. Д. Солнушкин, В. О. Молодцов (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. В статье описывается опыт разработки, реализации и внедрения систем автоматизации физиологического эксперимента, накопленный в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН на протяжении последних десятков лет. Рассмотрены примеры создания аппаратных средств измерения сигналов, преобразования их в цифровую форму, ввода и накопления в памяти ЭВМ с целью их применения в составе ЭВМ общего назначения, а также в комплексе появившихся по мере развития вычислительной техники миниЭВМ, микроЭВМ, ПЭВМ и заказных проблемно-ориентированных аппаратных модулей для автоматизации физиологических экспериментов по основным направлениям физиологических научных исследований, проводимых в ИФ РАН. Освещены вопросы разработки концепции проблемно-ориентированного программного обеспечения, использования системы управления базами данных (СУБД), графического отображения результатов. Рассмотрен ряд примеров разработки аппаратных и программных модулей для различных физиологических экспериментов. В частности, для использования в системе оценки функционального состояния дыхательных мышц человека, исследования сократительной функции сосудов и узлов кровеносной и лимфатической систем, для контроля изменения частоты импульсной активности нейронов, для организации управляемого электрического воздействия на лабораторное животное в поведенческих экспериментах, для измерения параметров жизнедеятельности лабораторных животных в экспериментах по исследованию механизмов висцеральной боли.

Ключевые слова: автоматизация научных исследований, аппаратно-программное обеспечение, автоматизированный физиологический эксперимент, обработка электрофизиологических сигналов

Experiences in automating physiological experiments

V. N. Chikhman^{✉1}, S. D. Solnushkin¹, V. O. Molodtsov^{1,2}

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", 5 Professora Popova Str., Saint Petersburg 197022, Russia

Authors

Valeriy N. Chikhman, SPIN: 2405-9435; ORCID: 0000-0002-4955-4608, e-mail: chikhmanvn@infran.ru

Sergey D. Solnushkin, ORCID: 0000-0003-4009-6716, e-mail: solnushkin@list.ru

Vladimir O. Molodtsov, e-mail: vom1944.molodtsov@yandex.ru

For citation: Chikhman, V. N., Solnushkin, S. D., Molodtsov, V. O. (2022) Experiences in automating physiological experiments. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 318–335. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-318-335> EDN JDXUFA

Received 8 June 2022; reviewed 23 July 2022; accepted 24 July 2022.

Funding: This study was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP "Scientific and Technological Development of the Russian Federation" (2019–2030), No. 0134-2019-0005.

Copyright: © V. N. Chikhman, S. D. Solnushkin, V. O. Molodtsov (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. The article describes experiences accumulated over the past decades by I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS. They are related to the development and implementation of automation systems for physiological experiments. The article provides examples of developing hardware tools for measuring signals, converting them into digital form, data entry and accumulation to be used on general-purpose computers as well as systems of mini-computers, micro-computers, personal computers and custom-made problem-oriented hardware modules for automating physiological experiments in the main areas of research conducted at Pavlov Institute of Physiology. The article also focuses on the conceptual development of problem-oriented software, data base management systems, and graphical display of results. In particular, it discusses several cases of the development of hardware and software modules for various physiological experiments: modules used in the system for the assessment of the functional state of human respiratory muscles, the examination of contractile function of blood vessels and nodes of the circulatory and lymphatic systems, for monitoring changes in the frequency of impulse activity of neurons, for organizing a controlled electrical effect on a laboratory animal in behavioral experiments, for measuring the vital parameters of laboratory animals in experiments on the mechanisms of visceral pain.

Keywords: automation of scientific research, hardware and software, automated physiological experiment, processing of electrophysiological signals

Введение

Под автоматизацией физиологического эксперимента нами понимается организация вычислительных процессов и разработка аппаратно-программных средств вычислительной техники, обеспечивающая повышение эффективности научных физиологических исследований. Автоматизация физиологических экспериментов в первую очередь включает вопросы съема сигналов с объекта исследования, измерения и регистрации сигналов, хранения для дальнейшей цифровой обработки, формирования управляющих воздействий на объект исследования.

Целью данной статьи является краткое описание аппаратно-программных средств, разработанных для автоматизации ряда лабора-

торных электрофизиологических экспериментов, которые обеспечивают методическое единство многоплановых работ, проводимых в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН. Обеспечивается техническая сторона интегративного подхода к исследованию функционирования целостного организма.

Следует отметить, что большое количество проблемно-ориентированных разработок было выполнено для экспериментального исследования сенсорных систем, особенно для исследования зрительного восприятия, однако вследствие значительного объема описание примеров разработки аппаратно-программных средств для этих систем является предметом отдельной публикации.

Краткий исторический экскурс

Представляемый опыт разработки систем автоматизации физиологического эксперимента накапливался нами в течение нескольких десятков лет, начиная с использования для этого ЭВМ общего назначения (мэйнфрейма), организации работы экспериментального оборудования в так называемом режиме «на линии с ЭВМ (on line)». В таком режиме, например, были автоматизированы физиологические эксперименты по исследованию механизмов терморегуляции, информационных характеристик импульсной активности нейронов при исследовании зрительной системы, изучению естественных речевых сигналов с целью выявления полезных признаков восприятия речи, проведения психофизиологических экспериментов с синтезированными речеподобными сигналами и др. (Венцов и др. 1990; Глезер 1993; Иванов, Клещев 1975; Першин, Чихман 1978; Подвигин и др. 1986; Чистович и др. 1981; Чихман 1975; 1979; Чихман и др. 1974; Шелепин 1982). При использовании ЭВМ общего назначения («Днепр-21», «М4030») были разработаны и организованы вычислительные процессы для автоматизации экспериментов, проводимых в рамках основных направлений физиологической науки — изучение высшей нервной деятельности, исследование интегративных молекулярно-клеточных и генетических основ адаптивного поведения, исследование механизмов распознавания сенсорных образов, преобразования сенсорной информации на уровне органов чувств, нервных механизмов деятельности внутренних органов.

По мере интенсивного развития вычислительной техники, появления малых ЭВМ, а затем и микроЭВМ, распространился класс ЭВМ, основанных на микропроцессорах, ставших основой современных информационных технологий. В Институте физиологии им. И. П. Павлова в 1980-е годы были выполнены приоритетные разработки систем автоматизации физиологического эксперимента, базирующиеся на миниЭВМ СМ-4 (Вершинина и др. 1991; Данилов и др. 1984; 1987; Дудкин, Гаузельман 1979; Жаков и др. 1984; Копейкин и др. 1988; Орел и др. 1988), а также двух типов выпускаемых в то время промышленностью микроЭВМ «Электроника 60», «ДЗ-28» и аппаратуры КАМАК (Дик и др. 1993; Шелепин и др. 1985).

В эти годы была разработана и принята концепция построения проблемно-ориентированных

систем автоматизации эксперимента, обеспечивающая на базе новой архитектуры миниЭВМ с реализацией механизма прерываний преобразование и ввод в компьютер сигналов, их обработку, сохранение в базе данных, графическое представление результатов, диалог с экспериментатором с помощью удобного интерфейса (Молодцов и др. 1999).

В 2000-е годы появились микросхемы с программируемой логикой, специализированные средства разработки схмотехнических решений на их базе. Появление микросхем с программируемой логикой ознаменовало собою начало важнейшего направления развития цифровой компонентной базы, в рамках которого стало экономически возможным применение микросхем высокого уровня интеграции в проектах умеренной тиражности. Разработка большой интегральной схемы (ИС) с программируемой структурой привела к новым эффективным средствам создания специализированных ИС, например, таким как: CPLD (Complex Programmable Logic Devices). Устройства программируемой логики (PLD—Programmable Logic Device) наряду с SMD компонентами (Surface Mounted Device) минимизируют число элементов, увеличивают надежность оборудования.

В то время нами был разработан и реализован ряд аппаратных модулей, встраиваемых в вычислительные системы на базе IBM PC. Это аналого-цифровые преобразователи (АЦП) различной разрядности и быстродействия для шины ISA (MD42, MD142, MD70, MD88, MD93, MD32), разнообразие усилители сигналов (MD90, MD95, MD42U), блок ввода межимпульсных интервалов (MD79), кнопочный пульт ввода ответов испытуемых в психофизических зрительных экспериментах (MD74). Модули характеризовались высокими метрологическими характеристиками. Усилители биопотенциалов обеспечивали усиление сигналов амплитудой до 25 мВ в частотном диапазоне до 15 кГц. В блоке управляемых фильтров на переключаемых конденсаторах были реализованы фильтры восьмого порядка Бесселя, Чебышева, Баттерворта с программной перестройкой частоты среза в диапазоне от 30 Гц до 10 кГц. Выносной пульт с кнопками, удаляемый от компьютера на расстояние до 50 м, имел эффективную систему подавления дребезга контактов.

На основе этих разработок были реализованы, например, системы для исследований

биоэлектрической активности переживающих срезов мозга, анализа динамики мембранно-связанного кальция в нервных клетках мозга с помощью спектрофотометрического метода; реализована регистрация несформированной импульсной активности и управлением стимуляторами (Ермолин и др. 1992; Иванов и др. 2000; Кузнецова и др. 2007; Любимов и др. 2001; Пантелеев и др. 1996).

Организация вычислительных процессов для автоматизированного эксперимента

В соответствии с разработанной ранее концепцией было реализовано обслуживание устройств под управлением операционной среды Windows, реализованы драйверы с использованием механизма прерываний и прямого доступа в память, с информационной стыковкой «защищенного» и «реального» режима работы процессора ЭВМ, обеспечивающие максимальные характеристики, реализованные в аппаратуре. Были созданы программные модули для настройки параметров и калибровки автоматизированного эксперимента в интерактивном режиме; визуализации вводимых, обработанных и хранящихся в памяти сигналов с возможностью изменения масштабов по амплитуде и по времени, возможностью просмотра через плавающее окно, маркирования отображаемых сигналов.

Для хранения и манипуляции экспериментальными данными существует два способа: хранение данных в файлах и организация базы данных (БД), которая представляет собой набор организованных данных. Основные различия между базой данных и файлами следующие. Базы данных имеют преимущества перед файловыми системами. БД обеспечивает большую гибкость в хранении и извлечении информации, тогда как файл обеспечивает меньшие возможности. Файловая система приводит к таким проблемам, как целостность данных, несогласованность данных, их безопасность. БД позволяет избежать этих проблем. В отличие от файловой системы базы данных эффективны, потому что построчное чтение не требуется и существуют определенные механизмы управления. Разница между файловой системой и базой данных заключается в том, что файловая система управляет только физическим доступом, тогда как база данных управляет как физическим, так и логическим

доступом к данным. Система управления базами данных (СУБД) обеспечивает согласованность данных, тогда как файл не может обеспечить это. База данных более безопасна по сравнению с файлами. СУБД обеспечивает меньшую избыточность данных. При использовании медиафайлов (видео, звуковые файлы) БД включает теги для связывания «внешних больших двоичных объектов» с записями в БД.

Таким образом, для хранения экспериментальной информации в разработанных нами системах автоматизации физиологического эксперимента было решено использовать СУБД. Отличительная особенность построенных нами БД состояла в том, что отсчеты сигналов и сопроводительная информация — индексы, ключевые слова, протокол эксперимента составляли разные, в том числе двоичные поля таблицы реляционной базы данных, что обеспечило экономию дискового пространства и оперативной памяти для загружаемого тела программы, уменьшило время доступа к информации, повышая тем самым быстродействие и реактивность системы за счет отсутствия преобразования чисел из символьного вида во внутренний формат ЭВМ, что обычно использовалось при реализации файловых систем.

Схема, отражающая взаимодействие программных модулей систем автоматизации эксперимента в различных режимах работы и пути экспериментальных данных в соответствии с разработанной концепцией представлена на рисунке 1. Разработанные программы характеризуются одинаковой структурой ядра, обеспечивающей сопровождение баз данных, хранящих информацию об испытуемых, тестовых изображениях, параметрах их предъявления и ответы испытуемых на предъявления изображений-стимулов. Компоненты графического интерфейса программ (окна, кнопки и т. п.) предоставляют возможность управления параметрами эксперимента, отображают информацию об испытуемых, сигналах, параметрах предъявления, ответах испытуемых.

Проблемно-ориентированные аппаратно-программные модули

Рассмотрим примеры последних разработок проблемно-ориентированных аппаратно-программных средств автоматизации физиологического эксперимента.

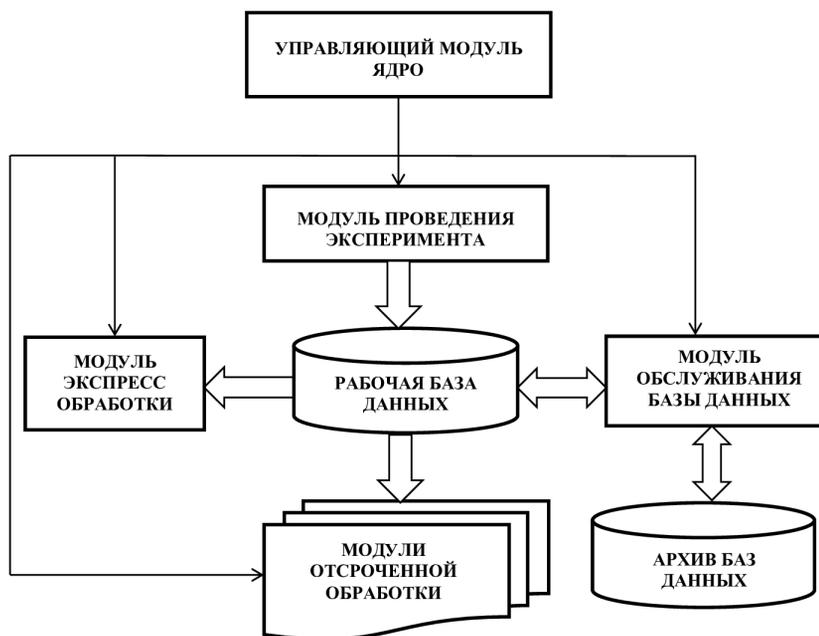


Рис. 1. Структурная схема организации вычислительных процессов, взаимодействия программных модулей и путей данных. Управляющий модуль — головная программа, управляющая модулями более низкого уровня. Модуль проведения эксперимента реализует методику конкретного эксперимента. Модуль экспресс обработки выполняет обработку сигналов в реальном времени по ходу эксперимента. Модуль обслуживания базы данных отвечает за сохранение и извлечение информации, хранящейся в рабочей базе данных и в архиве. Модуль отсроченной обработки выполняет оффлайн математическую обработку информации

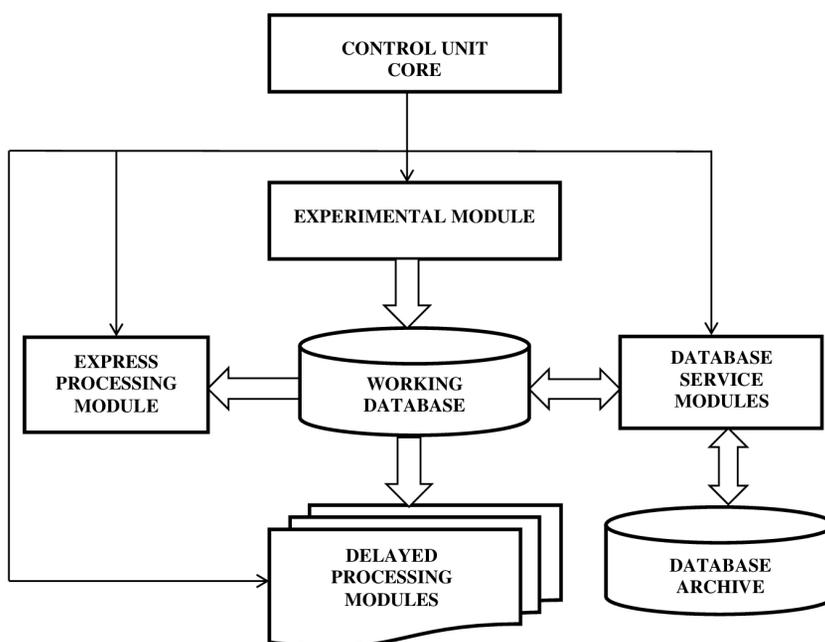


Fig. 1. A Structure diagram of computing processes, the interaction of software modules and data paths. The control unit is the head program that controls the lower level modules. The experimental module implements the methodology of a particular experiment. The express processing module performs real-time signal processing during the experiment. The database service modules are responsible for saving and retrieving information stored in the working database and in the archive. The delayed processing module performs offline mathematical processing of information

Модуль MD155

Устройство MD155 (рис. 2) предназначено для измерения и преобразования в цифровой код сигналов от низкоуровневых датчиков напряжения по восьми каналам, а также для ввода и вывода дискретных сигналов с уровнями 5В КМОП логики. Основным элементом устройства является микросхема сигма-дельта АЦП AD7731 (Analog Devices). Особенностью сигма-дельта АЦП является большой динамический диапазон, существенное увеличение отношения сигнала к шуму квантования по сравнению с другими видами АЦП за счет функции цифровой фильтрации. Управление устройством осуществляется с помощью микроконтроллера ATMEGA (Atmel). Со стороны компьютера управление устройством реализовано через интерфейс USB.

На базе устройства MD155 была реализована система проведения экспериментов по исследованию сократительной функции сосудов и узлов кровеносной и лимфатической систем (Панькова и др. 2011). В ходе эксперимента осуществляли измерение биопотенциала и силы сокращения гладких мышц, температуры физиологического раствора. Элементы программного графического интерфейса позволяли выбирать параметры аналогово-цифрового преобразования по каждому каналу (диапазон сигнала, частота дискретизации), устанавливать масштаб графического отображения процессов по временной оси и оси амплитудных значений. Была обеспечена возможность выделения «областей интереса», отображающих поведение регистрируемых процессов при определенных

внешних воздействиях, например, введении биологически активных химических препаратов (норадреналин, ацетилхолин и др.). Программа эксперимента включала процедуры цифровой фильтрации для удаления высокочастотных шумов, подсчета локальных максимумов, изменения масштаба осей (нормальный — логарифмический), определения выборочных участков графического отображения процессов.

Модуль MD226

Устройство MD226 измеряет сигналы с передачей результата по радиоканалу в компьютер. MD226 представляет собой восьмиканальный 24-разрядный сигма-дельта АЦП, управляемый со стороны компьютера через интерфейс Bluetooth. Модуль MD226 создан на базе АЦП ADS1298 (Texas Instruments), ориентированного на медико-биологическое применение. АЦП состоит из восьми независимых каналов, состоящих из аналогового мультиплексора, входного усилителя с программируемым коэффициентом усиления и сигма-дельта преобразователя. Усилитель позволяет усилить входной сигнал в 1, 2, 3, 4, 6, 8 или 12 раз. Измерения могут производиться со скоростью 250, 500 или 1000 раз в секунду. В качестве управляющего контроллера применен микроконтроллер ATtiny167 (Atmel). Микроконтроллер принимает команды от компьютера, управляет режимами работы АЦП (сброс, старт измерений, остановка измерений), передает АЦП команды от компьютера, передает в компьютер данные от АЦП. Устройство имеет малые габариты, что позволяет размещать его на подвижном объекте исследования (Молодцов и др. 2013а).



Рис. 2. Внешний вид устройства MD155

Fig.2. MD155 device

Модуль MD236

Устройство MD236 предназначено для контроля изменения частоты импульсной активности нейронов при воздействии на биологический объект (Молодцов и др. 2013b). Устройство подсчитывает импульсы, которые имеют амплитуду большую порогового напряжения, поступившие на вход за определенный промежуток времени. Входные импульсы подаются на пороговый дискриминатор. Пороговое напряжение вырабатывается управляемым дельта-сигма модулятором с выходным фильтром низких частот. Выход компаратора подключен к микросхеме CPLD EPM570T100C5 (Altera), на которой выполнены основные узлы

устройства. Пользователь может задавать пороговое напряжение дискриминатора, запускать и останавливать подсчет импульсов. Для связи устройства с ЭВМ через USB используется преобразователь USB-FIFO FT245RL (FTDI). Структурная схема устройства MD236 представлена на рисунке 3.

Разработаны программные средства, обеспечивающие проведение на базе MD236 нейроэкспериментов по исследованию фармакологии синаптической передачи в рецепторах вестибулярного аппарата лягушки (Рыжова и др. 2016; Солнушкин, Чихман 2015). Данные исследования предполагают анализ изменения частоты импульсной активности нервных

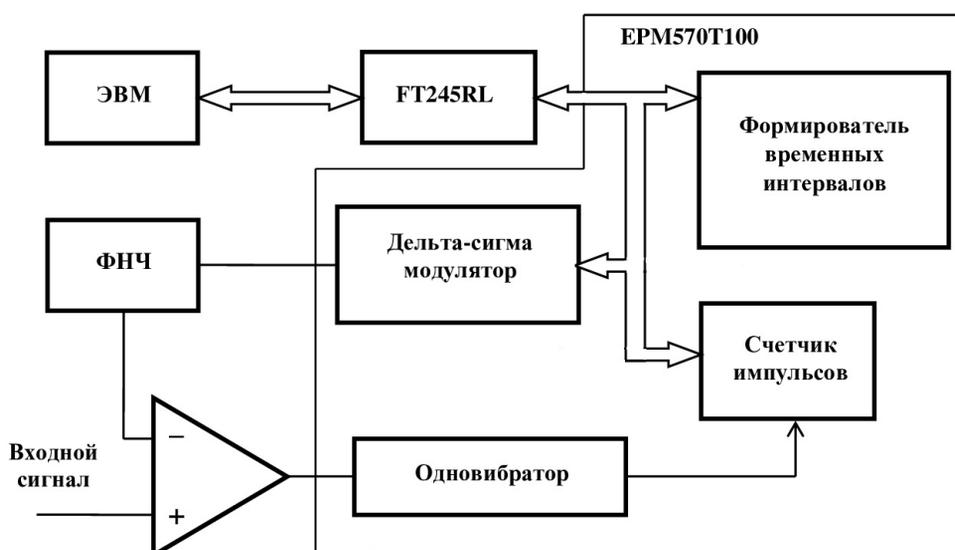


Рис. 3. Структурная схема устройства MD236

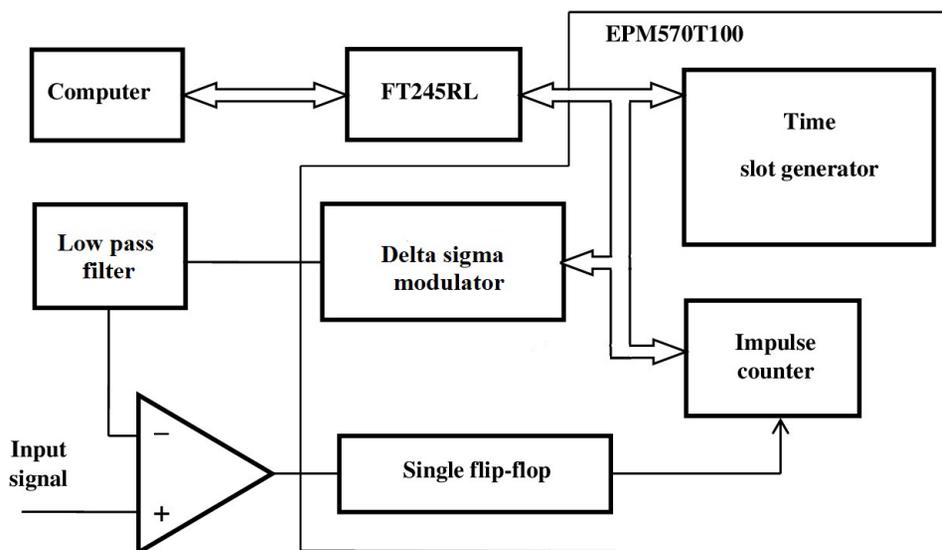


Fig. 3. A structure diagram of MD236 device

волокон в зависимости от воздействия на исследуемый объект определенного биохимического вещества. В ходе экспериментов выполняется контроль изменения частоты импульсной активности нейронов с одновременной регистрацией нескольких биохимических воздействий на объект.

В программе выделяется три режима работы: «эксперимент», «обработка результатов», «работа с архивами». В режиме «эксперимент» устанавливаются параметры измерений (амплитудный порог импульсов; величина временного интервала для подсчета импульсов; величина интервала отображения результатов). В программе обеспечена возможность выделения участков регистрируемых процессов, соответствующих моментам внешних биохимических воздействий (например, норадреналин, ацетилхолин и др.) на исследуемый объект. Реализована возможность фиксации графических меток начала и конца фармакологического воздействия в виде цветных горизонтальных линий на графике

изменения частоты нейрональной импульсации. В режиме «обработка результатов» (рис. 4) исходные данные для выполнения измерений извлекаются из базы данных. На дисплее отображаются временные моменты нанесения фармакологических воздействий, выводится график изменения частоты входных импульсов и вертикальные реперы, обозначающие начало и конец определенных фармакологических воздействий. Реализовано управление фильтрацией графиков (низкочастотная — вычитание постоянной составляющей, удаление артефактов — неправдоподобных значений). На графике можно выделить «области интереса». Для более подробного рассмотрения «области интереса» вынесены в отдельные графические окна в увеличенном масштабе.

Модуль MD228

Устройство MD228 представляет собой программируемый четырехканальный генератор прямоугольных импульсов, который используется для отладки и тестирования аппаратных

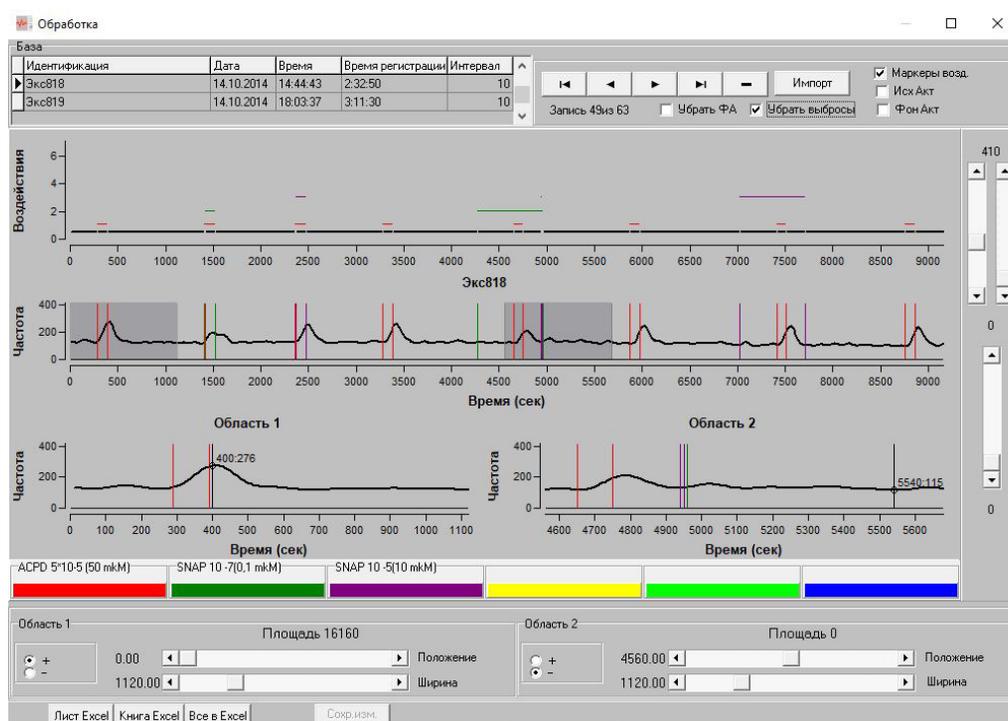


Рис. 4. Пример графического интерфейса программы в режиме «обработка результатов».

В верхнем графическом поле экрана отображены временные моменты нанесения фармакологических воздействий. В среднем поле — график изменения частоты входных импульсов и вертикальные реперы, обозначающие начало и конец определенных фармакологических воздействий. В нижнем левом и правом полуполях показаны более подробно выделенные области на среднем поле (серое)

Fig. 4. An example of the graphical interface of the program in the Results Processing mode.

The upper graphical field of the screen displays the time of pharmacological interventions.

The middle field is a graph of changes in the frequency of input pulses and vertical benchmarks.

It indicates the beginning and end of certain pharmacological interventions. The lower left and right half-fields provide a more detailed view of the middle field (highlighted gray)

модулей ввода сигналов. Цифровая часть устройства выполнена на микросхеме FPGA семейства Cyclone II EP2C5T144C7 (Altera). Пользователь может задавать напряжение верхнего и нижнего уровней импульсов (от -5В до $+5\text{В}$), период следования и длительность импульсов (от 10 нс до $16,78\text{ мс}$ с шагом 10 нс). Имеется возможность модуляции верхнего уровня линейно изменяющимся напряжением (ЛИН). Для генератора ЛИН можно задать скорости нарастания и спада напряжения, а также верхнюю и нижнюю границы изменения напряжения. Устройство управляется со стороны компьютера через интерфейс USB посредством микросхемы преобразователя USB-FIFO FT245RL (FTDI). Внешний вид устройства MD228 представлен на рисунке 5.

Модуль MD245

Устройство MD245 предназначено для использования в системе оценки функционального состояния дыхательных мышц человека. Цифровая часть устройства выполнена на микросхеме CPLD EPМ570Т100С5 (Altera). Устройство имеет две основных функции: снятие показаний с датчика давления MPX53GP (Freescale Semiconductor) встроенного в прибор для медико-физиологических исследований дыхания, а также управление электромагнитным клапаном перекрытия воздушного потока. Измерение давления осуществляется с помощью сигма-дельта АЦП AD7192 (Analog Devices) с последующей выдачей цифрового результата по интерфейсу USB в компьютер.

На рисунке 6 представлен внешний вид устройства с прибором для исследования дыхания.

Для экспериментов по исследованию дыхания разработано программное обеспечение, которое осуществляет графическое отображение регистрируемого давления во времени, определение различных временных параметров дыхательного цикла, сохранение параметров эксперимента и регистрируемых сигналов в базе данных, вычисление ряда специфических показателей (Александрова и др. 2013; Солнушкин, Чихман 2017). В режиме «эксперимент» осуществляется регистрация экспериментальных данных в реальном времени, т. е. измерение давления в дыхательном тракте во время этапа свободного дыхания, этапа окклюзии (перекрытия воздушного потока в первые 100 мс вдоха) и этапа с применением специальных условий дыхания (маневр Мюллера). Вначале устанавливаются временные интервалы, соответствующие разным этапам исследования дыхания в течение эксперимента: длительности в секундах вышеназванных трех этапов — спокойное дыхание, окклюзия, маневр Мюллера; количество циклов спокойного дыхания перед выполнением маневра Мюллера. На этапе «дыхание с перекрытием» (окклюзия) программа выдает управляющие сигналы на клапанный механизм перекрытия инспираторного канала (через 50 мс после начала выдоха клапан закрывается и через 100 мс после начала вдоха клапан открывается). Во время маневра Мюллера клапан закрывается через 50 мс после начала выдоха, а открывается через 50 мс после достижения максимального давления в инспираторном канале. В базе данных сохраняется запись, содержащая зарегистрированный инспираторный сигнал на всех этапах исследования дыхания, временные значения моментов открытия и закрытия клапана, сопроводительная информация (дата, время,



Рис. 5. Внешний вид устройства MD228 со снятой крышкой

Fig. 5. MD228 device with the cover removed

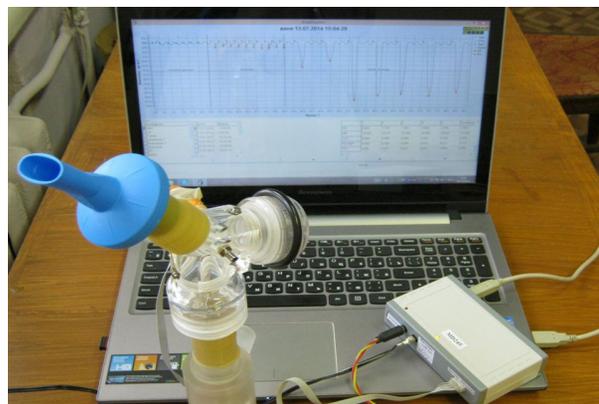


Рис. 6. Внешний вид устройства MD245

Fig. 6. MD245 device

комментарий). В режиме «обработка измерений» выполняется математический расчет функциональных оценок дыхания по данным, накопленным в базе. При вызове из базы записи, соответствующей определенному субъекту и определенному эксперименту с этим субъектом, появляется общая картина измерения инспираторного сигнала на всех этапах исследования с отмеченными временными моментами и таблицей вычисленных оценок (рис. 7).

В таблице приводятся значения оценок, на основании которых можно оперативно судить о функциональном состоянии инспираторных мышц (Сегизбаева, Александрова 2014).

T_i — средняя длительность вдоха; T_t — средняя длительность дыхательного цикла; $P_{0.1}$ — среднее значение ротового давления при вдохе в момент окклюзии в первые 100 мс после начала вдоха; MIP — максимальное ротовое давление при вдохе во время маневра Мюллера (максимальное инспираторное усилие); отношение показателей, характеризующих работу дыхательной системы: T_i / T_t , $P_{0.1} / MIP$; $TT_{0.1}$ — индекс напряжение-время, рассчитанный на основе измерения окклюзионного ротового давления $P_{0.1}$, $TT_{0.1} = P_{0.1} / MIP \times T_i / T_t$; TT_m — индекс напряжение-время, рассчитанный на основе измерения инспираторного ротового

давления, $TT_m = P_m / MIP \times T_i / T_t$, где P_m — среднее значение ротового давления при вдохе на этапе свободного дыхания; $TT_i = (5 \times P_{0.1} \times T_i) / MIP \times (T_i / T_t)$ индекс напряжение-время, отражающий выносливость диафрагмы при резистивных нагрузках (tention-time index).

Модуль MD280

В поведенческих физиологических экспериментах применяют электрическое воздействие на лабораторное животное путем подачи электрического напряжения на металлические прутья пола экспериментальной клетки.

Необходимо обеспечить создание электрических импульсов с определенными параметрами, т. е. с заданной амплитудой, длительностью и частотой следования, подачу импульсов на прутья клетки.

С этой целью было разработано и реализовано устройство MD280, содержащее электронные ключи, регистр управления ключами, управляемый источник постоянного напряжения. Каждый электронный ключ в устройстве соединен с определенным разрядом регистра, а каждый прут пола клетки через электронный ключ соединен с управляемым источником постоянного

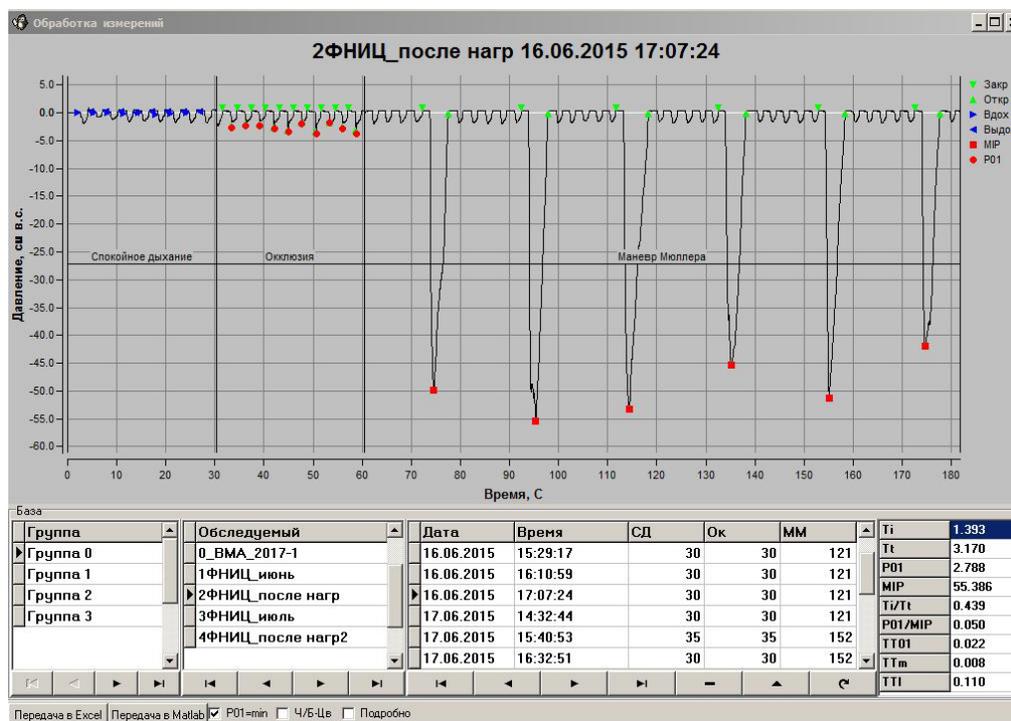


Рис. 7. Запись эксперимента из базы данных в режиме «обработка измерений» («снимок экрана»)

Fig. 7. Record of the experiment from the database in the Processing Measurements mode (a screenshot)

напряжения. На рисунке 8 показан общий вид экспериментальной поведенческой установки с устройством MD280 (Чихман и др. 2019). В реализованном варианте подачи раздражающих импульсов на каждый прут клетки подаются импульсы с частотой 1 Гц с длительностью импульса 125 мс.

Взаимодействие с устройством осуществляется с помощью компьютера с интерфейсом USB 2.0 Full-Speed.



Рис. 8. Общий вид экспериментальной поведенческой установки с устройством MD280

Fig. 8. General view of the experimental behavioral equipment with MD280 device

Разработана программа, обеспечивающая на базе устройства MD280 проведение исследований пороговой болевой чувствительности крыс.

Графический интерфейс программы (рис. 9) позволяет в начале работы проводить выбор параметров проведения эксперимента: варианта электростимулирующего воздействия (постоянное, импульсное, фазированное и т. д.), установку значений параметров воздействия (амплитуда напряжения, длительность импульса, частота), способа изменения параметров (автоматически или в ручном режиме).

Впоследствии были созданы модификации устройства, разработаны модули MD286 с увеличенным значением напряжения, подаваемого на прутья клетки и MD287, построенного на основе генераторов тока, обеспечивающего стабильный ток при изменении внешних условий (Чихман и др. 2020).

Для проводимых в Институте экспериментов, в которых изучаются механизмы обработки и модуляции висцеральных болевых сигналов в ядрах ствола мозга (Любашина и др. 2021), желательна, наряду с регистрацией нейронной активности, параллельно осуществлять контроль уровня системного артериального давления и дыхательных движений. Предпочтительно реализовать возможность оценки в реальном времени изменений этих параметров

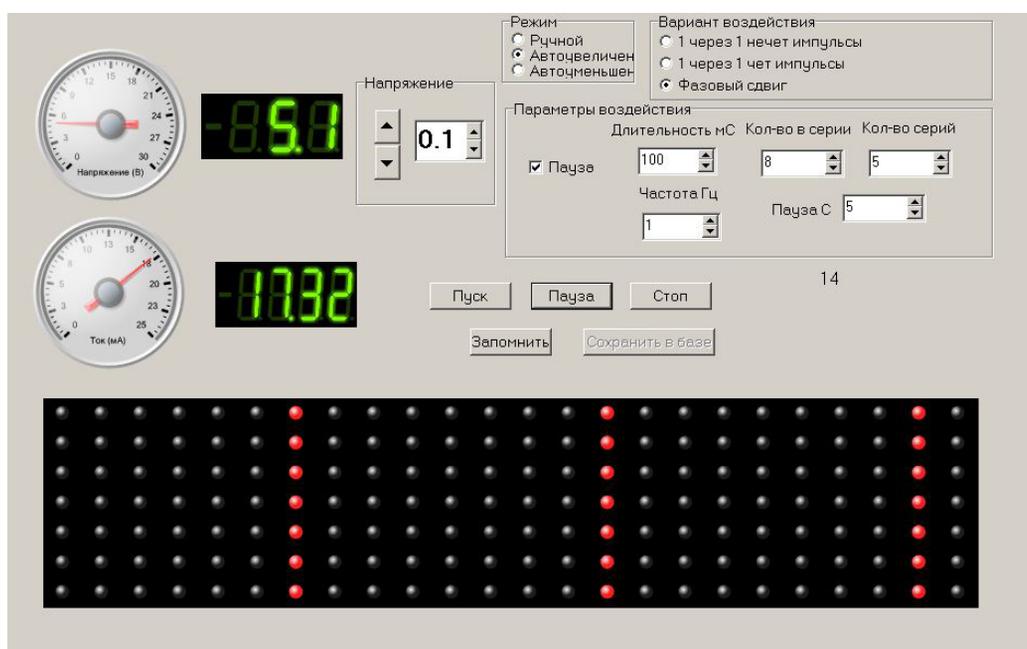


Рис. 9. Графический интерфейс эксперимента по исследованию пороговой болевой чувствительности («снимок экрана»)

Fig. 9. Graphical interface of the experiment as part of the research in threshold pain sensitivity (a screenshot)

при висцеральном болевом воздействии и электростимуляции разных структур мозга.

Модуль MD300

Для измерения параметров жизнедеятельности лабораторных животных в ходе эксперимента на существующей действующей установке разработано и реализовано устройство MD300, содержащее два канала для регистрации сигналов, снимаемых с мостовых датчиков давления, и выходной канал формирования импульса для запуска стимулятора (рис. 10).

Для регистрации артериального давления нами использован датчик MLT0670 (ADInstruments, Australia), а для регистрации параметров дыхания — датчик MPX53GP (Freescale Semiconductor, USA), устанавливаемый в дыхательном тракте крысы (трахеостомической трубке). Устройство MD300 кроме измерения сигналов давления обеспечивает формирование и выдачу по команде компьютера импульса управления для запуска специализированного электростимулятора А320 (World Precision Instruments, USA). Сигналы, снимаемые с датчиков давления, в устройстве MD300 дискретизируются одновременно с частотой 125 Гц. Для дискретизации сигналов использован 8-канальный сигма-дельта АЦП ADS131M08 (Texas Instruments, USA), имеющий набор коэффициентов усиления от 1 до 128 (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128), что обеспечивает работу с датчиком MLT0670 с чувствительностью 16,5 мкВ/мм рт. ст. Наличие в каждом канале АЦП ADS131M08 отдельного усилителя позволяет при дискрети-



Рис. 10. Устройство MD300 в комплексе экспериментального оборудования

Fig. 10. MD300 device in the system of experimental equipment

зации не переключаться между каналами (т. е. реализовать режим Simultaneous sampling) и избежать временной задержки установки рабочего режима сигма-дельта модулятора. Основным узлом устройства MD300 является микроконтроллер STM32F042F4 (STM, Switzerland), обеспечивающий передачу выходных кодов АЦП в компьютер в соответствии с протоколом интерфейса USB. Микрокод для функционирования микроконтроллера разработан на языке C++ в среде IAR Embedded Workbench for ARM (IAR, Швеция) с использованием библиотеки USB, созданной фирмой STM.

Для связи с компьютером MD300 представляет собой USB Custom HID устройство, обмен данными, с которым осуществляется путем отправки и получения отчетов (HID_Reports) в режиме запрос-ответ. Для операционной системы это стандартный класс USB устройств, не требующих специальных драйверов. Для регистрации импульсной активности нейронов (максимальная частота импульсации не более 1 кГц) используется микрофонный вход звуковой карты компьютера, обеспечивающий без потери информации дискретизацию входного сигнала с задаваемыми разрешением и частотой.

Разработана программа, обеспечивающая на базе устройства MD300 проведение эксперимента по исследованию механизмов висцеральной боли. Блок регистрации позволяет выполнять настройку общих параметров проведения эксперимента и задавать начальные установочные значения для преобразования сигналов. На рисунке 11 показан графический интерфейс блока регистрации сигналов.

Блок просмотра зарегистрированных сигналов (рис. 12) служит для отображения накопленной во внутренней базе экспериментальной информации.

Графический интерфейс включает три окна, отображающих сигналы нейронной активности, давления и дыхания. В графическом окне «активность» в полном объеме времени регистрации представлен зарегистрированный в базе сигнал нейрональной активности. В графических окнах «давление» и «дыхание» — зарегистрированные сигналы с датчиков (левое графическое поле) и амплитудно-частотный спектр соответствующего сигнала (правое

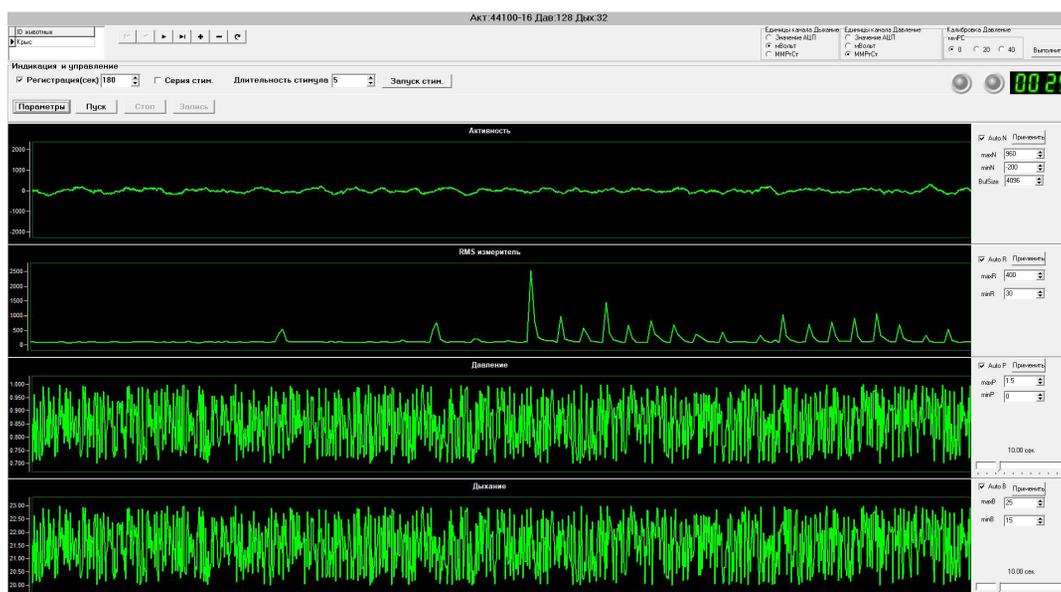


Рис. 11. Графический интерфейс блока регистрации сигналов («снимок экрана»)

Fig. 11. Graphical interface of the signal registration block (a screenshot)

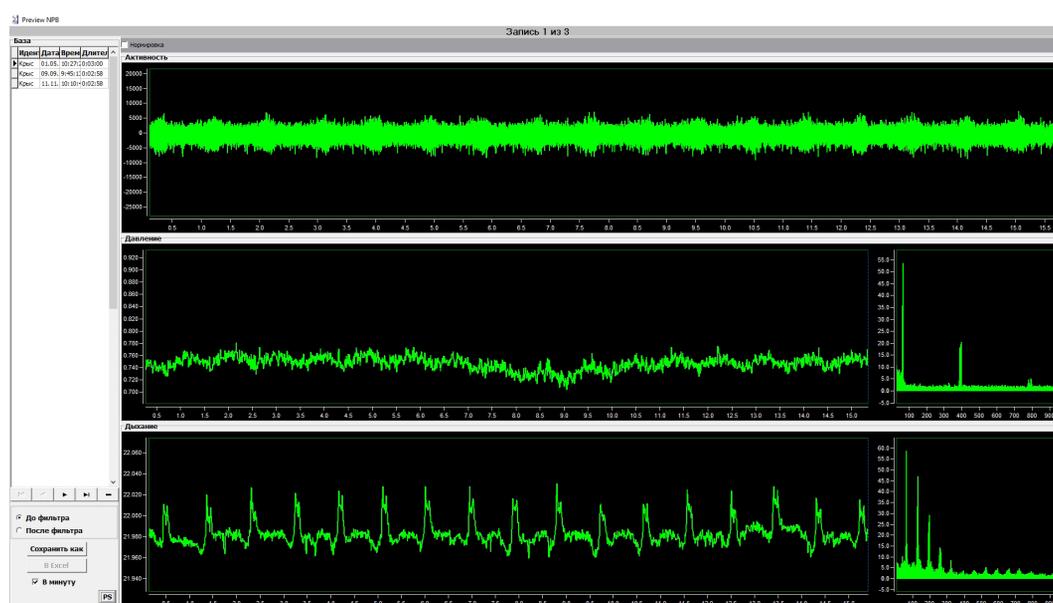


Рис. 12. Окно блока предварительной обработки и просмотра зарегистрированных сигналов («снимок экрана»)

Fig. 12. A window of the pre-processing block and display of registered signals (a screenshot)

графическое поле), вычисление и отображение спектров сигналов на экране позволяет экспериментатору оперативно оценить динамику дыхательного ритма (вдох-выдох), частоту пульса, что является показательным при обработке биологических сигналов.

Заключение

Разработка электрических схем вышеперечисленных устройств, проектирование и раз-

водка печатных плат выполнена согласно известным апробированным схемотехническим решениям с помощью средств проектирования CAD Altium Designer (Altium Europe GmbH).

Вышеописанные примеры разработки проблемно-ориентированных программ были выполнены в среде Delphi v.7.0 с использованием библиотеки функций Windows API и DirectX, библиотеки компонентов JEDI VCL, реализующих доступ к HID совместимым USB устройствам. Для вывода графиков использована компонента

SL Score из распространяемой свободно библиотеки визуальных компонентов Mitov Software.

Рассмотренные выше разработанные аппаратно-программные средства успешно используются для автоматизации физиологического эксперимента в лабораториях и обеспечивают методическое единство многоплановых экспериментальных исследований, проводимых в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН. Тем самым обеспечивается техническая сторона интегративного подхода к исследованию функционирования целостного организма.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Исследования с участием животных соответствуют принципам международной этики. Эксперименты с использованием описываемого нами оборудования проводили на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург). Все процедуры работы с животными проводили в соответствии с принципами Базельской декларации; протоколы опытов утверждены Биоэтическим комитетом Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. При проведении опытов учитывали приказ Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н «Об утверж-

дении правил надлежащей лабораторной практики».

Ethics Approval

The authors state that all international ethical principles relevant to research that includes animal subjects have been duly followed. Experiments with the use of the equipment described in the article were carried out on animals from the Center for Collective Use “Biocollection of the Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences for the Study of Integrative Mechanisms of the Activity of the Nervous and Visceral Systems” (Saint Petersburg, Russia). All the procedures with animals were carried out in accordance with the Basel Declaration; the protocols of the experiments were approved by the Bioethical Committee of the Pavlov Institute of Physiology RAS. The experiments also followed the Order of the Ministry of Health of Russia, April 1, 2016 No. 199n “On approval of the rules of good laboratory practice”.

Вклад авторов

- a. Валерий Николаевич Чихман — разработка аппаратных средств, написание статьи;
- b. Сергей Дмитриевич Солнушкин — разработка программного обеспечения, написание статьи;
- c. Владимир Олегович Молодцов — разработка аппаратных модулей.

Author Contributions

- a. Valeriy N. Chikhman developed the hardware, drafted the article;
- b. Sergey D. Solnushkin developed the software, drafted the article;
- c. Vladimir O. Molodtsov developed the hardware.

Список условных сокращений

АЦП — аналого-цифровой преобразователь, БД — база данных, ЛИН — линейно изменяющееся напряжение, СУБД — система управления базами данных, CPLD — complex programmable logic devices, PLD — programmable logic device, SMD компоненты — surface mounted device.

Abbreviations

ADC—analog-to-digital converter, CPLD—complex programmable logic devices, DB—data base, DBMS—database management system, LVV—linearly varying voltage, PLD—programmable logic device, SMD— surface mounted device.

Литература

Александрова, Н. П., Погодин, М. А., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (2013) *Прибор для оценки функционального состояния дыхательных мышц пациента. Патент по заявке № 122865 от 03.07.2012.* СПб., Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН.

- Венцов, А. В., Надпорожская, Е. В., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1990) Исследование восприятия речи: Организация интерактивного режима обработки речевых сигналов. *Сенсорные системы*, т. 4, № 3, с. 327–330.
- Вершинина, Е. А., Данилов, Ю. П., Орел, Е. Л. и др. (1991) Использование ритмографического метода для контроля состояния животного. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 77, № 7, с. 99–103.
- Глезер, В. Д. (1993) *Зрение и мышление*. Л.: Наука, 284 с.
- Данилов, Ю. П., Жаков, М. Л., Солнушкин, С. Д. и др. (1984) Автоматизация электрофизиологического эксперимента. *Управляющие системы и машины*, № 4, с. 83–87.
- Данилов, Ю. П., Новиков, Г. И., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1987) Автоматизированная система для исследования рецептивных полей нейронов зрительной системы. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 73, № 4, с. 551–554.
- Дик, И. Г., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н., Штром, В. Ф. (1993) Организация аппаратно-программных средств для автоматизации исследований по физиологии кровообращения. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 79, № 2, с. 115–120.
- Дудкин, К. Н., Гаузельман, В. И. (1979) *Автоматизация нейрофизиологического эксперимента*. Л.: Наука, 159 с.
- Ермолин, С. И., Семенов, Д. Г., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1992) *Информационный листок Центра научно-технической информации № 656–92. Автоматизация флюорометрических исследований*. СПб.: [б. и.].
- Жаков, М. Л., Першин, Ж. А., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1984) Организация многомашинного комплекса для автоматизации лабораторных исследований. *Управляющие системы и машины*, № 1, с. 23–26.
- Иванов, К. П., Арокина, Н. К., Волкова, М. Ф. и др. (2000) Физиологическая блокада механизмов холодового паралича. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 86, № 6, с. 692–702.
- Иванов, К. П., Клещев, А. С. (1975) *Биологический вычислительный центр*. Л.: Наука, 140 с.
- Копейкин, М. А., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1988) Модуль «селектор-формирователь» для обработки на ЭВМ импульсной активности нейронов. В кн.: *Средства автоматизации физиологических исследований*. Л.: Наука, с. 46–50.
- Кузнецова, Т. Г., Радченко, М. В., Родина, Е. А. и др. (2007) Сравнительный анализ вариабельности сердечного ритма ребенка 4–5 лет и шимпанзе в процессе целедостижения. *Вестник СамГУ. Естественно-научная серия*, № 2 (52), с. 189–203.
- Любашина, О. А., Сиваченко, И. Б., Бусыгина, И. И. (2021) Амигдалофугальная модуляция висцеральной ноцицептивной трансмиссии в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга крысы в норме и при кишечном воспалении. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 107, № 10, с. 1–16. <https://doi.org/10.31857/S086981392110006X>
- Любимов, Я. А., Изварина, Н. А., Емельянов, Н. А. и др. (2001) Влияние различных концентраций кортиколиберина на долговременную потенциацию срезов обонятельной коры мозга крыс. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 87, № 4, с. 543–548.
- Молодцов, В. О., Чихман, В. Н., Солнушкин, С. Д. (1999) Аппаратно-программное обеспечение АРМ физиолога. *Приборы и системы управления*, № 3, с. 15–19.
- Молодцов, В. О., Смирнов, В. Ю., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (2013а) Измерительное устройство с радиоканалом передачи данных. *Приборы и техника эксперимента*, № 5, с. 136–137. <https://doi.org/10.7868/S0032816213050212>
- Молодцов, В. О., Смирнов, В. Ю., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (2013б) Устройство для измерения частоты спайков. *Приборы и техника эксперимента*, № 6, с. 88–89. <https://doi.org/10.7868/S0032816213060062>
- Орел, Е. Л., Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (1988) Взаимодействие экспериментатора с ЭВМ в автоматизированном физиологическом эксперименте. В кн.: *Автоматизированные системы реального времени для эргономических исследований*. Тарту: [б. и.], с. 66–68.
- Пантелеев, С. С., Чихман, В. Н., Молодцов, В. О. (1996) Автоматизированная электрофизиологическая установка для исследования моторной функции желудочно-кишечного тракта анестезированной крысы. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 82, № 4, с. 135–140.
- Панькова, М. И., Лобов, Г. И., Чихман, В. Н., Солнушкин, С. Д. (2011) Эффекты гистамина на сократительную активность капсулы лимфатических узлов. Роль NO. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 97, № 6, с. 633–640.
- Першин, Ж. А., Чихман, В. Н. (1978) Система накопления и обработки экспериментальных данных. В кн.: *Автоматизация экспериментальных физиологических исследований*. Л.: [б. и.], с. 76–80.
- Подвигин, Н. Ф., Макаров, Ф. Н., Шелепин, Ю. Е. (1986) *Элементы структурно-функциональной организации зрительно-глазодвигательной системы*. Л.: Наука, 185 с.
- Рыжова, И. В., Ноздрачев, А. Д., Тобиас, Т. В. и др. (2016) Метаботропные глутаматные рецепторы как мишень нейромодулирующего влияния оксида азота. *Доклады Академии Наук*, т. 469, № 1, с. 116–118. <https://doi.org/10.7868/S0869565216190300>
- Сегизбаева, М. О., Александрова, Н. П. (2014) Применение индекса «напряжение–время» для оценки функционального состояния инспираторных мышц. Нормальная и патологическая физиология. *Ульяновский медико-биологический журнал*, № 2, с. 78–84.

- Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (2015) Программные средства для анализа импульсной активности в нейроэксперименте. *Биомедицинская радиоэлектроника*, № 6, с. 35–39.
- Солнушкин, С. Д., Чихман, В. Н. (2017) Организация вычислительных процессов для физиологических исследований дыхания. *Биомедицинская радиоэлектроника*, № 3, с. 48–54.
- Чистович, Л. А., Чихман, В. Н., Огородникова, Е. А. (1981) Новый подход к определению фонетической близости стимулов и его проверка в автоматизированном эксперименте. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 67, № 5, с. 704–711.
- Чихман, В. Н. (1975) Ввод в ЭВМ «Днепр-21» импульсной активности нейронов с цифровой адаптацией. *Управляющие системы и машины*, № 1, с. 135–137.
- Чихман, В. Н. (1979) Система ввода-вывода речевых сигналов на ЭВМ М4030 для экспериментальных исследований восприятия речи. *Управляющие системы и машины*, № 2, с. 91–94.
- Чихман, В. Н., Макаревич, А. В., Першин, Ж. А., Гехман, Б. И. (1974) Работа ЭВМ Днепр-21 в реальном масштабе времени. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 60, № 4, с. 644–647.
- Чихман, В. Н., Солнушкин, С. Д., Молодцов, В. О. и др. (2019) Способ определения порога болевой чувствительности лабораторных животных и устройство для его осуществления. Патент по заявке № 2687866 от 16.05.2019. СПб., Институт физиологии им. И. П. Павлова. РАН.
- Чихман, В. Н., Солнушкин, С. Д., Молодцов, В. О., Смирнов, В. Ю. (2020) Устройство для электрораздражения лабораторных животных на основе использования генератора тока. *Приборы и техника эксперимента*, № 2. с. 161–162. <https://doi.org/10.31857/S0032816220010206>
- Шелепин, Ю. Е. (1982) Пространственно-частотные характеристики и ориентационная избирательность полей нейронов зрительной коры. В кн.: *Переработка информации в зрительной системе. Высшие зрительные функции*. Л.: Наука, с. 28–35.
- Шелепин, Ю. Е., Колесникова, Л. И., Левкович, Ю. И. (1985) *Визоконтрастометрия*. Л.: Наука, 103 с.

References

- Aleksandrova, N. P., Pogodin, M. A., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (2013) *Pribor dlya otsenki funktsional'nogo sostoyaniya dyhatel'nykh myshts patsienta. Patent po zayavke 122865 ot 03.07.2012 [Device for assessing the functional state of the patient's respiratory muscles. Patent No. 122865 of 3 July, 2012]. Saint Petersburg, I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS.* (In Russian)
- Chikhman, V. N. (1975) Vvod v EVM "Dnepr-21" impul'snoj aktivnosti neyronov s tsifrovoy adaptatsiej [Input of pulse activity of neurons with digital adaptation into "Dnepr-21" computer]. *Upravlyayushchie sistemy i mashiny*, no. 1, pp. 135–137. (In Russian)
- Chikhman, V. N. (1979) Sistema vvoda-vyvoda rechevykh signalov na EVM M4030 dlya eksperimental'nykh issledovaniy vospriyatiya rechi [Speech signal input-output system on the M4030 computer for experimental studies of speech perception]. *Upravlyayushchie sistemy i mashiny*, no. 2, pp. 91–94. (In Russian)
- Chikhman, V. N., Makarevich, A. V., Pershin, Zh. A., Gekhman, B. I. (1974) Rabota EVM Dnepr-21 v real'nom mashtabe vremeni [Operation of the Dnepr-21 computer in real time]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 60, no. 4, pp. 644–647. (In Russian)
- Chikhman, V. N., Solnushkin, S. D., Molodtsov, V. O. et al. (2019) *Sposob opredeleniya poroga bolevoy chuvstvitel'nosti laboratornykh zhivotnykh i ustrojstvo dlya ego osushchestvleniya. Patent po zayavke № 2687866 ot 16.05.2019 [A method for determining the pain sensitivity threshold of laboratory animals and a device for its implementation. Patent No. 2687866 from 16 May, 2019]. Saint Petersburg, Pavlov Institute of Physiology RAS.* (In Russian)
- Chikhman, V. N., Solnushkin, S. D., Molodtsov, V. O., Smirnov, V. Yu. (2020) Ustrojstvo dlya elektrorazdrasheniya laboratornykh zhivotnykh na osnove ispol'zovaniya generatora toka [A device for electrical stimulation of laboratory animals based on the use of a current generator]. *Pribory i tekhnika eksperimenta*, no. 2. pp. 161–162. <https://doi.org/10.31857/S0032816220010206> (In Russian)
- Chistovich, L. A., Chikhman, V. N., Ogorodnikova, E. A. (1981) Novyj podkhod k opredeleniyu foneticheskoy blizosti stimulov i ego proverka v avtomatizirovannom eksperimente [A new approach to determining the phonetic proximity of stimuli and its verification in an automated experiment]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 67, no. 5, pp. 704–711. (In Russian)
- Danilov, Yu. P., Zhakov, M. L., Solnushkin, S. D. et al. (1984) Avtomatizatsiya elektrofiziologicheskogo eksperimenta [Automation of electrophysiological experiment]. *Upravlyayushchie sistemy i mashiny*, no. 4, pp. 83–87. (In Russian)
- Danilov, Yu. P., Novikov, G. I., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1987) Avtomatizirovannaya sistema dlya issledovaniya retseptivnykh polej neyronov zritel'noj sistemy [Automated system for studying the receptive fields of neurons of the visual system]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 73, no. 4, pp. 551–554. (In Russian)
- Dik, I. G., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N., Shtrom, V. F. (1993) Organizatsiya apparatno-programmnykh sredstv dlya avtomatizatsii issledovaniy po fiziologii krovoobrashcheniya [Organization of hardware and software for automation of research on the physiology of blood circulation]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 79, no. 2, pp. 115–120. (In Russian)

- Dudkin, K. N., Gauzelman, V. I. (1979) *Avtomatizatsiya nefrofiziologicheskogo eksperimenta [Automation of neurophysiological experiment]*. Leningrad: Nauka Publ., 159 p. (In Russian)
- Ermolin, S. I., Semenov, D. G., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1992) *Informatsionnij listok Tsentra nauchno-tehnicheskoy informatsii № 656–92. Avtomatizatsiya flyuorometricheskikh issledovanij [Newsletter of the Center for Scientific and Technical Information No. 656-92. Automation of fluorometric studies]*. Saint Petersburg: [s. n.]. (In Russian)
- Glezer, V. D. (1993) *Zrenie i myshlenie [Vision and mind]*. Leningrad: Nauka Publ., 284 p. (In Russian)
- Ivanov, K. P., Arokina, N. K., Volkova, M. F. et al. (2000) Fiziologicheskaya blokada mekhanizmov kholodovogo paralicha [Physiological blockade of the mechanisms of cold paralysis]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 86, no. 6, pp. 692–702. (In Russian)
- Ivanov, K. P., Kleshchev, A. S. (1975) *Biologicheskij vychislitel'nyj tsestr [Biological Computing Center]*. Leningrad: Nauka Publ., 140 p. (In Russian)
- Kopejkin, M. A., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1988) Modul' "selektor-formirovatel' " dlya obrabotki na EVM impul'snoj aktivnosti nejronov [Module "selector-shaper" for computer processing of impulse activity of neurons]. In: *Sredstva avtomatizatsii fiziologicheskikh issledovanij [Devices of automation of physiological research]*. Leningrad: Nauka Publ., pp. 46–50. (In Russian)
- Kuznetsova, T. G., Radchenko, M. V., Rodina, E. A. (2007) Sravnitel'nyj analiz variabel'nosti serdechnogo ritma rebenka 4–5 let i shimpanze v protsesse tseledostizheniya [Comparative analysis of heart rate variability in a 4–5-year old child and a chimpanzee in the process of goal achievement]. *Vestnik Samarskogo universiteta. Estestvennonauchnaya seriya — Vestnik of Samara University. Natural Science Series*, no. 2 (52), pp. 189–203. (In Russian)
- Lyubashina, O. A., Sivachenko, I. B., Busygina, I. I. (2021) Amigdalofugal'naya modulyatsiya vistseral'noj notsitseptivnoj transmissii v kaudal'noj ventrolateral'noj retikulyarnoj oblasti prodolgovatogo mozga krysy v norme i pri kishhechnom vospalenii [Amygdalofugal modulation of visceral nociceptive transmission in the rat caudal ventrolateral medulla in normal conditions and under intestinal inflammation]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 107, no. 10, pp. 1–16. <https://doi.org/10.31857/S086981392110006X> (In Russian)
- Lyubimov, Ya. A., Izvarina, N. L., Emel'yanov, N. A. et al. (2001) Vliyanie razlichnykh kontsentratsij kortikoliberina na dolgovremennuyu potentsiatsiyu srezov obonyatel'noj kory mozga krysy [Influence of different concentrations of corticoliberin on long-term potentiation of sections of the olfactory cortex of the rat brain]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 87, no. 4, pp. 543–548. (In Russian)
- Molodtsov, V. O., Chikhman, V. N., Solnushkin, S. D. (1999) Apparavno-programmnoe obespechenie ARM fiziologa [Physiologist's workstation hardware and software]. *Pribory i sistemy upravleniya*, no. 3, pp. 15–19. (In Russian)
- Molodtsov, V. O., Smirnov, V. Yu., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (2013a) Izmeritel'noe ustrojstvo s radiokanalom peredachi dannykh [Measuring device with radio data transmission channel]. *Pribory i tekhnika eksperimenta*, no. 5, pp. 136–137. <https://doi.org/10.7868/S0032816213050212> (In Russian)
- Molodtsov, V. O., Smirnov, V. Yu., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (2013b) Ustrojstvo dlya izmereniya chastoty spajkov [A device for measuring the spike frequency]. *Pribory i tekhnika eksperimenta*, no. 6, pp. 88–89. <https://doi.org/10.7868/S0032816213060062> (In Russian)
- Orel, E. L., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1988) Vzaimodejstvie eksperimentatora s EVM v avtomatizirovannom fiziologicheskom eksperimente [Interaction of an experimenter with a computer in an automated physiological experiment]. In: *Avtomatizirovannye sistemy real'nogo vremeni dlya ergonomicheskikh issledovanij [Automated real-time systems for ergonomic research]*. Tartu: [s. n.], pp. 66–68. (In Russian)
- Pan'kova, M. I., Lobov, G. I., Chikhman, V. N., Solnushkin, S. D. (2011) Effekty gistamina na sokratitel'nyuyu aktivnost' kapsuly limfaticeskikh uzlov. Rol' NO [Effects of histamine on the contractile activity of the lymph node capsule. The role of NO]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 97, no. 6, pp. 633–640. (In Russian)
- Panteleev, S. S., Chikhman, V. N., Molodtsov, V. O. (1996) Avtomatizirovannaya elektrofiziologicheskaya ustanovka dlya issledovaniya motornoj funktsii zheludochno-kishhechnogo trakta anezirovannoj krysy [Automated electrophysiological unit for studying the motor function of the gastrointestinal tract of an anesthetized rat]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 82, no. 4, pp. 135–140. (In Russian)
- Pershin, Zh. A., Chikhman, V. N. (1978) Sistema nakopleniya i obrabotki eksperimental'nykh dannykh [System of accumulation and processing of experimental data]. In: *Avtomatizatsiya eksperimental'nykh fiziologicheskikh issledovanij [Automation of experimental physiological research]*. Leningrad: [s. n.], pp. 76–80. (In Russian)
- Podvigin, N. F., Makarov, F. N., Shelepin, Yu. E. (1986) *Elementy strukturno-funksional'noj organizatsii zritel'no-glazodvigatel'noj sistemy [Elements of the structural and functional organization of the visual-oculomotor system]*. Leningrad: Nauka Publ., 185 p. (In Russian)
- Ryzhova, I. V., Nozdrachev, A. D., Tobias, T. V. et al. (2016) Metabotropnye glutamatnye retseptory kak mishen' nejromoduliruyushchego vliyaniya oksida azota [Metabotropic glutamate receptors as targets of neuromodulatory influence of nitric oxide]. *Doklady Akademii Nauk*, vol. 469, no. 1, pp. 116–118. <https://doi.org/10.7868/S0869565216190300> (In Russian)

- Segizbaeva, M. O., Aleksandrova, N. P. (2014) Primenenie indeksa "napryazhenie–vremya" dlya otsenki funktsional'nogo sostoyaniya inspiratornykh myshts. Normal'naya i patologicheskaya fiziologiya [The evaluation of inspiratory muscle function by measuring of «tension–time» index]. *Ul'yanovskij mediko-biologicheskij zhurnal — Ulyanovsk Medico-biological Journal*, no. 2, pp. 78–84. (In Russian)
- Shelepin, Yu. E. (1982) Prostranstvenno-chastotnye kharakteristiki i orientatsionnaya izbiratel'nost' polej neyronov zritel'noj kory [Spatial-frequency characteristics and orientational selectivity of neuron fields in the visual cortex]. In: *Pererabotka informatsii v zritel'noj sisteme. Vysshie zritel'nye funktsii [Processing information in the visual system. Higher visual functions]*. Leningrad: Nauka Publ., pp. 28–35. (In Russian)
- Shelepin, Yu. E., Kolesnikova, L. I., Levkovich, Yu. I. (1985) *Vizokontrastometriya [Visocontrastometry]*. Leningrad: Nauka Publ., 103 p. (In Russian)
- Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (2015) Programmnye sredstva dlya analiza impul'snoj aktivnosti v nejroeksperimente [Software for analysis of impuls activity in neuroexperiment]. *Biomeditsinskaya radioelektronika — Biomedicine Radioengineering*, no. 6, pp. 35–39. (In Russian)
- Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (2017) Organizatsiya vychislitel'nykh protsessov dlya fiziologicheskikh issledovaniy dykhaniya [Organization of computational processes for physiological studies of respiration]. *Biomeditsinskaya radioelektronika — Biomedicine Radioengineering*, no. 3, pp. 48–54. (In Russian)
- Ventsov, A. V., Nadporozhskaya, E. V., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1990) Issledovanie vospriyatiya rechi: Organizatsiya interaktivnogo rezhima obrabotki rechevykh signalov [Study of speech perception: Organization of an interactive mode of processing speech signals]. *Sensornye sistemy — Sensory Systems*, vol. 4, no. 3, pp. 327–330. (In Russian)
- Vershinina, E. A., Danilov, Yu. P., Orel, E. L. et al. (1991) Ispol'zovanie ritmograficheskogo metoda dlya kontrolya sostoyaniya zhivotnogo [Using the rhythmographic method to control the state of the animal]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 77, no. 7, pp. 99–103. (In Russian)
- Zhakov, M. L., Pershin, Zh. A., Solnushkin, S. D., Chikhman, V. N. (1984) Organizatsiya mnogomashinnogo kompleksa dlya avtomatizatsii laboratornykh issledovaniy [Organization of a multi-machine complex for laboratory research automation]. *Upravlyayushchie sistemy i mashiny*, no. 1, pp. 23–26. (In Russian)



УДК 615.246

EDN AVBDRL

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-336-347>

Efficacy of ginsenoside treatment to alleviate anticancer-drug induced mucoenteritis in mice

Daisuke Kato¹, Shizuka Jonan¹, Ryo Sugahara¹, Hikaru Otsuki¹, Seikou Nakamura², Kikuko Amagase^{✉1}

¹ Laboratory of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Shiga 525-8577, Japan

² Department of Pharmacognosy, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607-8412, Japan

Authors

Daisuke Kato, ORCID: [0000-0003-3069-3285](https://orcid.org/0000-0003-3069-3285), e-mail: donkybsl@gmail.com

Shizuka Jonan, ORCID: [0000-0003-4885-7663](https://orcid.org/0000-0003-4885-7663), e-mail: gr0476fr@ed.ritsumei.ac.jp

Ryo Sugahara, ORCID: [0000-0003-0094-6683](https://orcid.org/0000-0003-0094-6683), e-mail: ph0140vs@ed.ritsumei.ac.jp

Hikaru Otsuki, ORCID: [0000-0003-1699-0478](https://orcid.org/0000-0003-1699-0478), e-mail: ph0121kp@ed.ritsumei.ac.jp

Seikou Nakamura, ORCID: [0000-0003-3172-299X](https://orcid.org/0000-0003-3172-299X), e-mail: naka@mb.kyoto-phu.ac.jp

Kikuko Amagase, ORCID: [0000-0002-7767-5028](https://orcid.org/0000-0002-7767-5028), e-mail: amagase@fc.ritsumei.ac.jp

For citation: Kato, D., Jonan, S., Sugahara, R., Otsuki, H., Nakamura, S., Amagase, K. (2022) Efficacy of ginsenoside treatment to alleviate anticancer-drug induced mucoenteritis in mice. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 336–347. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-336-347> EDN AVBDRL

Received 31 May 2022; reviewed 3 June 2022; accepted 5 June 2022.

Funding: This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science (18K06692, Grant to K. Amagase) and Research Promotion Program for Acquiring Grants-in-Aid for Scientific Research from Ritsumeikan University.

Copyright: © D. Kato, S. Jonan, R. Sugahara, H. Otsuki, S. Nakamura, K. Amagase (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. 5-fluorouracil (5-FU), which is widely used as an anticancer drug, causes enteritis due to disruption of mucosal tissue, resulting in diarrhoea and body weight loss. Ginsenoside Rd (GRd) and ginsenoside Re (GRe) are two of the saponins contained in carrots. Their anti-inflammatory effects on the digestive system have been reported, but their effects on small intestinal mucositis have not been studied much. This study investigated the effect of GRd and GRe on 5-FU-induced mucoenteritis. GRd and GRe did not affect weight loss or exacerbation of diarrhoea due to 5-FU administration in mice. Histopathological observations showed that 5-FU reduced the shortening of intestinal villi and the number of crypts and cells compared to the vehicle group. However, co-administration of GRd and GRe, significantly suppressed the decrease in the number of small intestinal crypts and cells in the crypt by 5-FU treatment. It indicates that 5-FU-induced enteritis is attenuated by the co-administration of GRd and GRe. The expression of NF- κ B was increased by 5-FU administration and this increase was clearly suppressed in the group that was co-administered GRd. Although the anti-inflammatory effects of GRd and GRe have been reported based on various mechanisms in many models, the mechanism of their enteritis-suppressing action in anticancer drug-induced enteritis has not been clarified. It was reported that the anti-inflammatory effect of GRd was due to the suppression of NF- κ B expression; we concluded that NF- κ B may be one of the molecules involved in the suppression of 5-FU-induced enteritis.

Keywords: 5-fluorouracil, anticancer drug, Ginsenoside, mucositis, enteritis, NF- κ B

Introduction

5-Fluorouracil (5-FU) is the most widely used antimetabolite anticancer drug in cancer chemotherapy. Its main mechanism of action is to exert antitumor effects by inhibiting thymidylate synthase (TS) and disrupting the intracellular deoxynucleotide pool required for DNA replication. In addition, it is said to act on RNA uptake, inhibition of RNA synthesis thereafter and fragmentation by uptake into DNA (Vodenkova et al. 2020). 5-FU is widely indicated for gastric cancer, colorectal cancer, breast cancer and pancreatic cancer. In fact, according to the National Database of Health Insurance Claims and Specific Health Checkup of Japan (NDB) in FY2018, the number of prescriptions for 5-FU treatment was 1,273,300, including the forerunner and generic products, making it the most prescribed drug among antimetabolites, and its sales reached 672,860,362 JPY.

However, 5-FU acts not only on cancer cells but also on normal cells with high growth rates, such as intestinal mucosal epithelial cells, hair root cells and blood cells. As such, patients treated with 5-FU have side effects such as stomatitis, leukopenia, thrombocytopenia and intestinal mucositis, with intestinal mucositis occurring in 50–80% of patients (Benson et al. 2004). Intestinal mucositis is problematic because it causes vomiting, abdominal distension and diarrhoea, which interferes with treatment. Indeed, dose reduction and discontinuation of treatment is often required, as well as increases in medical expenses due to extended hospital stays (Dranitsaris et al. 2005).

Anticancer drugs can cause early- or late-onset diarrhoea. Early-onset diarrhoea occurs within hours of drug administration through stimulation of parasympathetic nerves with topoisomerase inhibitors such as irinotecan and activating intestinal peristalsis. Late-onset diarrhoea occurs about one week after drug administration due to intestinal mucosal damage caused by 5-FU as well as other chemotherapeutic agents such as doxorubicin, cisplatin, etc. In addition, diarrhoea caused by immune checkpoint inhibitors such as nivolumab and pembrolizumab, which have been attracting attention recently, occurs about 2 weeks after drug administration, but the mechanism of onset remains unclear.

Although the molecular mechanism of 5-FU-induced intestinal mucositis has not been clarified yet, it has been reported that apoptosis is involved, in addition to inhibition of cell proliferation, resulting in shortening of small intestinal villi and destruction of intestinal crypts (Benson et al. 2004; Duncan, Grant 2003; Hamouda et al. 2017; Inomata et al.

2002). Villous epithelial cells are made up of crypt cells and move upwards in a spiral. Since the villi are worn by the passage of food, destruction of intestinal crypts causes the villi to shorten and the function of the villi deteriorates, causing diarrhoea and bleeding.

It was reported that traditional Kampo medicines such as Hangeshashinto were used to prevent side effects of anticancer drug treatment and alleviate diarrhoea in patients treated with irinotecan (Mori et al. 2003). The reduction of 5-FU-induced stomatitis (Ozawa et al. 2020) and preventive effect on cisplatin-induced small intestinal mucosal damage (Mori et al. 2003) were studied too. Many Kampo medicines such as Hangeshashinto, Daikenchuto and Rikkunshito contain ginseng, which is a crude drug, and ginsenoside is a saponin glycoside extracted from ginseng. Ginsenosides have a sugar moiety structure bound to the structure of oleanane and dammarane and are classified into protopanaxadiol (PPD) and protopanaxatriol (PPT) according to the position of the carbon bond of the sugar chain. Among ginsenosides, Ra1, 2, Rb1, 2, 3, Rc, Rd, Rf2, Rg3, Rh2 are classified as PPD and Re, Rf, Rg1, 2, Rh1 are classified as PPT. It was reported that ginsenoside Rd (GRd) had a protective effect in DSS-induced colitis models and TNBS-induced colitis models and balances the intestinal flora in autoimmune disease model mice (Jin et al. 2020; Liu et al. 2018; Yang et al. 2012). In addition, it was reported that ginsenoside Re (GRe) had an anti-neuroinflammation effect in addition to a protective effect against colitis (Lee et al. 2012; Zhang et al. 2016). Natural compounds in Kampo medicines attract attention as therapeutic agents for diseases with high efficacy and low toxicity (Khan et al. 2019; Yin et al. 2019).

In this study, we developed a mouse enteritis model and investigated the effects of GRd and GRe on 5-FU induced enteritis to evaluate their usefulness in the prevention and treatment of anticancer drug-induced enteritis, particularly small intestinal mucositis.

Materials and methods

Animals

Eight-week-old male C57BL/6N mice (20 to 25 g) (Japan SLC, Inc.) were used. In all experiments, 4 to 6 animals were used per group. All animals were housed in cages with free access to food and water and kept at 22 ± 1 °C with a 12-h:12-h light/dark cycle. The experimental protocol was carried out in strict accordance with guidelines for experiments involving animals.

Drugs

5-FU (Sigma) was dissolved in physiological saline, while GRd and GRe obtained from natural product library of Kyoto Pharmaceutical University were suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose CMC (Nacalai Tesque, Japan) before use. 5-FU, GRd and GRe were prepared immediately before use, in readiness to intraperitoneally or orally administer a volume of 0.1 mL/10 g body weight.

Preparation of 5-FU-induced enteritis

Enteritis was induced by intraperitoneally administering 5-FU (50 mg/kg) once daily for 7 or 8 days (day 0–6 or 7) to the mice. GRd (60 and 100 mg/kg) and GRe (100 mg/kg) were orally administered 30 min before 5-FU administration. The body weight of the animals was measured, and extent of diarrhoea was daily observed, throughout the period of 5-FU administration. The degree of diarrhoea was assigned a 5-point score, specifically one of 0: Normal stool, 1: Soft stool, 2: Severely soft stool, 3: Diarrhoea and 4: Severe diarrhoea.

Hematoxylin & Eosin stain

Twenty-four hours after the last 5-FU dose, the mice were euthanised, their small intestines removed and washed with physiological saline. The small intestine was incised along the opposite side of the mesentery and fixed overnight in 10% formalin solution. The small intestinal tissue was dehydrated with a tissue dehydration solution (Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) and the alcohol in the tissue was replaced with xylene (Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) as an intermediate solvent. After replacing the intermediate solvent in the tissue with paraffin (Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), a paraffin block was prepared and sliced to a thickness of 4 μ m using a microtome (Leica, Germany). H&E staining was performed, and the small intestinal tissue was observed under an optical microscope (40 X to 400 X Olympus, Japan) to measure the length of villi, the number of intestinal crypts and the number of cells in the intestinal crypts.

Measurement of MPO activity

Twenty-four hours after the last 5-FU dose, the mice were euthanised, their small intestines removed and washed with ice-cooled physiological saline, before cryopreserving approx. 5 mm of small intestinal tissue sections in a freezer (-30°C). Then, the small intestinal tissue sections were homogenised

in 50 mM phosphate buffer containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (pH 6.0; Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and subjected to 3 rounds of freeze-thawing before centrifuging (at 20°C and 3,000 rpm). The resulting supernatant was used as samples. Sample volumes of 5 μ L were placed in a 96-well microplate. Thereafter, 95 μ L of 10 mM phosphate buffer and 50 μ L of 20 mM o-dianisidine hydrochloride: 0.44 M hydrogen peroxide were added. The changes in absorption at a wavelength of 450 nm were measured using a microplate reader (CORONA Electric Co., Ltd.). The protein level in the sample was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo). The MPO activity was calculated using the following equation: MPO activity (nmol H_2O_2 /min/mg protein) = (OD/min) / (OD/min H_2O_2) \times mg protein.

Quantitative analysis of TNF- α mRNA expression

Twenty-four hours after the last 5-FU dose, the mice were euthanised, their small intestines removed and washed with ice-cooled physiological saline. Approximately 5 mm of small intestinal tissue section was cryopreserved in a deep freezer (-80°C). Then, small intestinal tissue sections were homogenised in Sepasol–RNA I (Nacalai Tesque) and centrifuged at 20°C and 12,000 rpm for 15 minutes to extract total RNA. The extracted total RNA was mixed with PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara) and complementary DNA (cDNA) was synthesised using a thermal cycler (Takara Thermal Cycler Dice Touch). The cDNA was mixed with Power Up™ SYBR Green Master Mix (Thermo) and primers and the mRNA expression levels were measured by real-time PCR (Step OnePlus Real-Time PCR System; Applied Biosystems). The primers used in this experiment are shown. [TNF- α ; forward: 5'-ACTCCAGGCG-GTGCCATATGT-3'; reverse: 5'-GTGAGGGTCT-GGGCCATAGAA-3', GAPDH; forward: 5'-TGT-GTCCGTCGTGGATCTGA-3' reverse: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3']. The mRNA expression level in each group was standardised by the expression level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in each group and further expressed as a ratio to the mRNA expression level in the vehicle group.

Immunohistochemical staining

Twenty-four hours after the last 5-FU dose, the mice were euthanised, their small intestines removed and washed with ice-cooled physiological

saline. A 2 cm section of small intestinal tissue was fixed overnight in 4% paraformaldehyde/phosphate buffer (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Moisture in the tissue was replaced with 10, 20 and 30% sucrose phosphate buffers. The tissue was then embedded in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Japan) and cryostat (Leica) was used to prepare frozen slices with 15 μ m thickness. The localisation of NF- κ B p65 in the small intestinal tissue was studied using mouse monoclonal NF- κ B p65 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, US) as the primary antibody. After blocking with a mouse IgG blocking reagent (goat serum), the primary antibody reacted at 20 °C for 30 min and then the biotin-labeled anti-mouse IgG antibody was used as the secondary antibody. A Mouse on Mouse (M.O.M.) Immunodetection Kit (Vector) was used as the blocking reagent and secondary antibody. Nuclear staining was performed using the Mounting Medium with DAPI (Vector). Localisation of NF- κ B was observed under a confocal laser scanning microscope (FV10i; Olympus).

Statistical analysis

The data are shown as a sample mean \pm standard error (SEM) for 4 to 6 animals per group. Statistical

significance was determined with GraphPad Prism software version 8 (San Diego, CA) using the Student's t-test and results were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of GRd on 5-FU-induced enteritis

Body weight and diarrhoea

The body weight decreased over time by continuous administration of 5-FU and a significant decrease was observed from day 4 as compared with the vehicle group. The body weight at day 8 of continuous 5-FU administration was $82.9 \pm 0.9\%$ of the body weight before 5-FU administration. The animals co-administered GRd (60 and 100 mg/kg) also showed progressive weight loss from day 4 of continuous 5-FU administration. The body weight of the GRd (60 mg/kg) group on day 8 of continuous 5-FU administration was $84.0 \pm 0.6\%$ of the weight before 5-FU administration, while that in the GRd (100 mg/kg) group was $84.6 \pm 1.6\%$ of the weight before 5-FU administration (Fig. 1A).

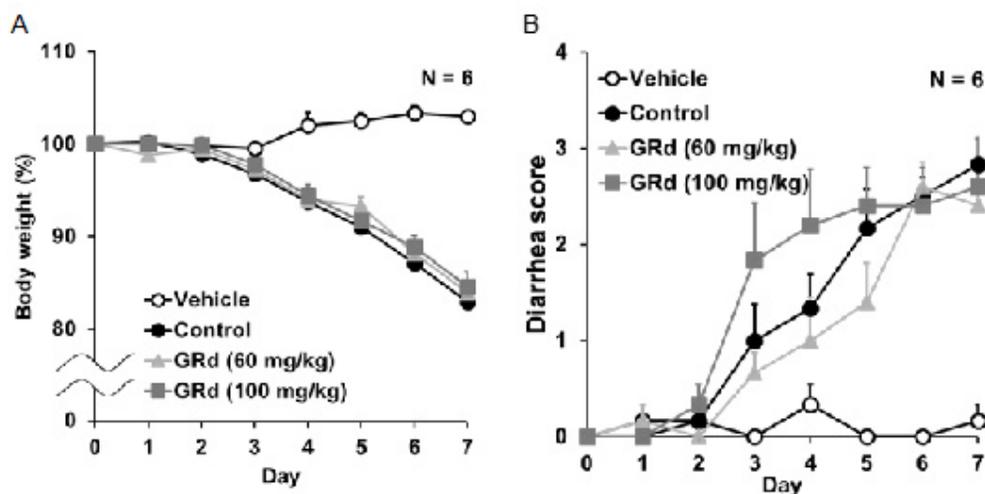


Fig. 1. Effect of co-administered GRd on body weight loss, and diarrhoea due to 5-fluorouracil (5-FU). Animals received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg 5-FU once daily for 8 days (days 0–7), with 60 mg/kg GRd ($n = 6$) and 100 mg/kg GRd ($n = 6$) co-administered once daily. Control animals were administered 5-FU with 0.5 % CMC (vehicle for GRd). Body-weight was measured daily (A), while diarrhoea was scored daily using a 5-point scale (0–4) (B). Data are expressed as a mean \pm S.E.M.

Continuous 5-FU administration also showed progressive exacerbation of diarrhoea, and a significant at $p < 0.05$ exacerbation of diarrhoea was noted in the 5-FU-treated groups from day 4 of continuous administration relative to the vehicle group. The degree of diarrhoea score on day 8 of continuous 5-FU administration was 2.8 ± 0.3 . The degree of diarrhoea was noted on day 4 of continuous 5-FU administration even in the GRd groups. On day 8 of continuous 5-FU administration, the diarrhoea score was 2.4 ± 0.5 in the GRd (60 mg/kg) group and 2.6 ± 0.5 in the GRd (100 mg/kg) group (Fig. 1B).

Histological assessment

The length of the small intestinal villi in the vehicle group was $203.2 \pm 13.6 \mu\text{m}$. The length of the small intestinal villi on day 8 of continuous

5-FU administration was $115.0 \pm 10.4 \mu\text{m}$, which was significantly shorter than that in the vehicle group. When GRd was co-administered, the length of the small intestinal villi on day 8 of continuous 5-FU administration was $134.0 \pm 8 \mu\text{m}$ in the GRd (100 mg/kg) group, which was significantly shorter than that in the vehicle group (Fig. 2A, B).

The number of intestinal crypts in the vehicle group was 18.2 ± 1.4 crypts/mm. The number of intestinal crypts on day 8 of continuous 5-FU administration was 7.7 ± 0.6 crypts/mm, which was significantly at $p < 0.05$ less than in the vehicle group. When GRd was co-administered, the number of intestinal crypts on day 8 of continuous 5-FU administration was 8.7 ± 0.5 crypts/mm in the GRd (60 mg/kg) group and 10.7 ± 1.0 crypts/mm in the GRd (100 mg/kg) group, both significantly lower than in the vehicle group. Compared to the animals

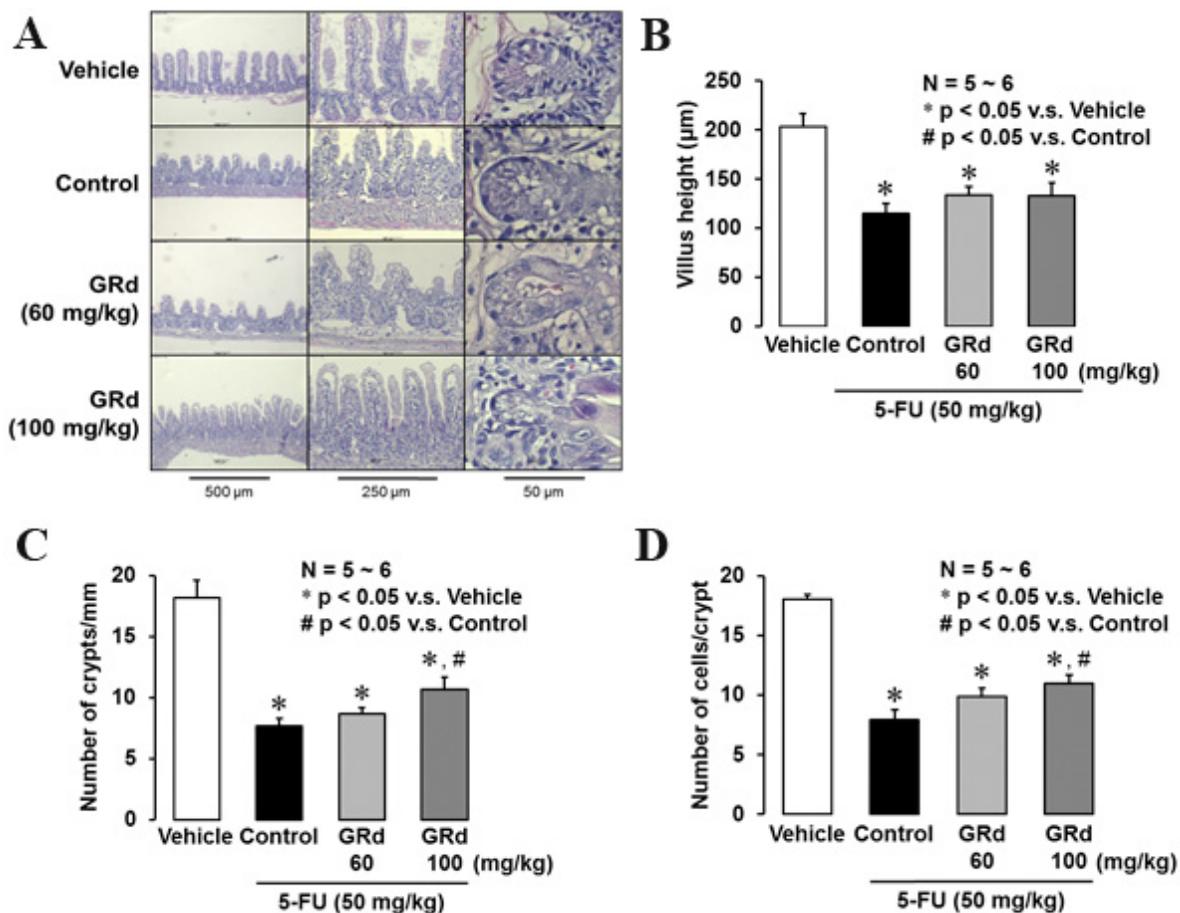


Fig. 2. Effect of co-administered GRd on intestinal mucositis due to 5-fluorouracil (5-FU). Animals received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg 5-FU once daily for 8 days (days 0–7), with 60 mg/kg GRd ($n = 6$) and 100 mg/kg GRd ($n = 6$) co-administered once daily. Jejunum tissues collected on day 7 were stained with hematoxylin/eosin and imaged at $\times 40$, $\times 100$, and $\times 400$ (A). The height from the top of the villus to the villus-crypt junction (B), the number of crypts per millimeter (C) and cells per crypt (D) were measured by light microscopy. * $p < 0.05$ versus untreated animals from vehicle (not treated with 5-FU, $n = 6$); # $p < 0.05$ versus animals treated with 5-FU only ($n = 6$).

administered only 5-FU, those co-administered with GRd (100 mg/kg) showed significant suppression of the reduction in the number of intestinal crypts by 5-FU (Fig. 2C).

The number of cells in the intestinal crypts was 18.0 ± 0.4 cells/crypt in the vehicle group. In addition, the number of cells in the intestinal crypts on day 8 of continuous 5-FU administration was 7.9 ± 0.8 cells/crypt, which was significantly lower than in the vehicle group. When GRd was co-administered, the number of cells in the intestinal crypts on day 8 of continuous 5-FU administration was 9.9 ± 0.7 cells/crypt in the GRd (60 mg/kg) group and 11.0 ± 0.7 cells/crypt in the GRd (100 mg/kg) group, both significantly lower than in the vehicle group. Compared to the animals administered only 5-FU, those co-administered with GRd (100 mg/kg) showed significant suppression of the reduction in the number of intestinal crypt cells by 5-FU (Fig. 2D).

Changes in MPO activity

The MPO activity in the vehicle group was 21.7 ± 3.5 (nmol H_2O_2 /min/mg protein). The MPO activity 24 h after the last 5-FU dose increased to 45.8 ± 3.0 (nmol H_2O_2 /min/mg protein) and significantly increased relative to the vehicle group. When GRd was co-administered, the MPO activity on day 8 of continuous 5-FU administration was

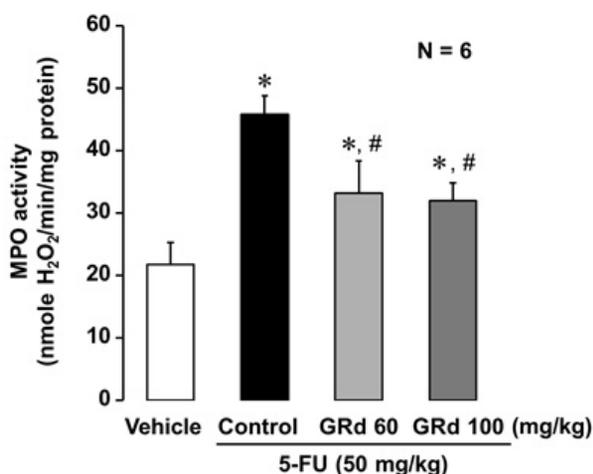


Fig. 3. Effect of co-administered GRd on 5-fluorouracil (5-FU)-induced increase in intestinal myeloperoxidase (MPO) activity. The animals received 50 mg/kg 5-FU by intraperitoneal injection once daily for 8 days (days 0–7), with 100 mg/kg GRd (n = 6) co-administered once daily. The jejunum was obtained on day 7. The MPO activity was measured with o-dianisidine. Data are expressed as a mean \pm S.E.M. *p < 0.05 versus vehicle (not treated with 5-FU, n = 6); #p < 0.05 versus the animals treated with 5-FU only (n = 6).

33.1 ± 5.3 (nmol H_2O_2 /min/mg protein) in the GRd (60 mg/kg) group and 31.9 ± 2.9 (nmol H_2O_2 /min/mg protein) in the GRd (100 mg/kg) group. The animals co-administered GRd (100 mg/kg) had a significant increase in the MPO activity compared to the animals administered only 5-FU (Fig. 3).

TNF- α mRNA expression

The TNF- α mRNA expression 24 h after the last 5-FU dose was increased to 1.4 ± 0.2 -fold that of the vehicle group; however, it was not significant statistically. When GRd (100 mg/kg) was administered, the TNF- α mRNA expression was 0.7 ± 0.3 -fold that of the vehicle group, which meant there was a significant suppression of the increase in the TNF- α mRNA expression compared to the animals that were administered only 5-FU (Fig. 4).

NF- κ B localisation

There was a clear increase in the expression of NF- κ B in the small intestine 24 h after the last 5-FU dose compared to the vehicle group. When GRd (100 mg/kg) was co-administered, there was a clear suppression of the increase in the NF- κ B expression relative to the group of animals administered only 5-FU. The NF- κ B expression in the 5-FU monotherapy group particularly remarkably increased around the intestinal crypts,

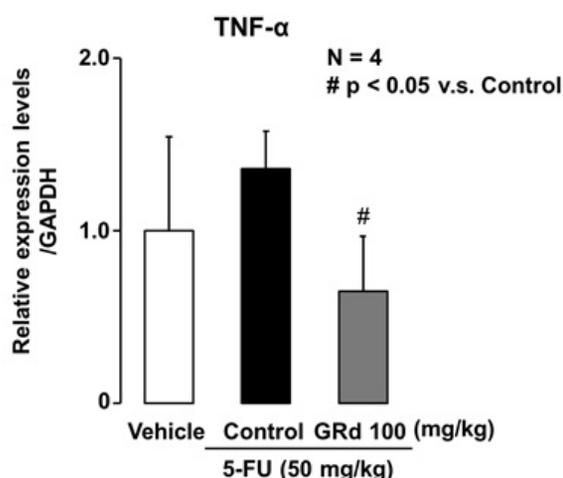


Fig. 4. Effect of co-administered GRd on 5-fluorouracil (5-FU)-induced increase in intestinal TNF- α mRNA expression. The animals received 50 mg/kg 5-FU by intraperitoneal injection once daily for 8 days (days 0–7), with 100 mg/kg GRd (n = 4) co-administered once daily. The jejunum was obtained on day 7. The TNF- α expression was quantified by real-time RT-PCR. The expression was normalised to GAPDH and to the mean value in the vehicle mice not treated with 5-FU. Data are expressed as a mean \pm S.E.M. #p < 0.05 versus animals treated with 5-FU only (n = 4).

and co-administration of GRd (100 mg/kg) was suppressing this increase (Fig. 5).

Effect of GRe on 5-FU-induced enteritis

Body weight and diarrhoea

The body weight decreased over time by continuous administration of 5-FU, and a significant decrease was observed from day 2 as compared to the vehicle group. The body weight at day 7 of continuous 5-FU administration was $84.9 \pm 1.4\%$ of the body weight before 5-FU administration. When GRe (100 mg/kg) was

co-administered, there was a gradual decrease in the body weight from day 2 of 5-FU administration, and the body weight on day 7 of 5-FU administration was $86.2 \pm 0.2\%$ of the body weight before the start of 5-FU administration (Fig. 6A).

Exacerbation of diarrhoea was noted from day 2 of 5-FU administration, with the degree of the diarrhoea score being 2.7 ± 0.3 . Even in the animals that were administered GRe at 100 mg/kg, diarrhoea was observed from day 2 of 5-FU administration, with a score of 2.6 ± 0.2 (Fig. 6B). Diarrhoea was observed on day 3 in the GRe group; therefore, GRe administration delayed the diarrhoea.

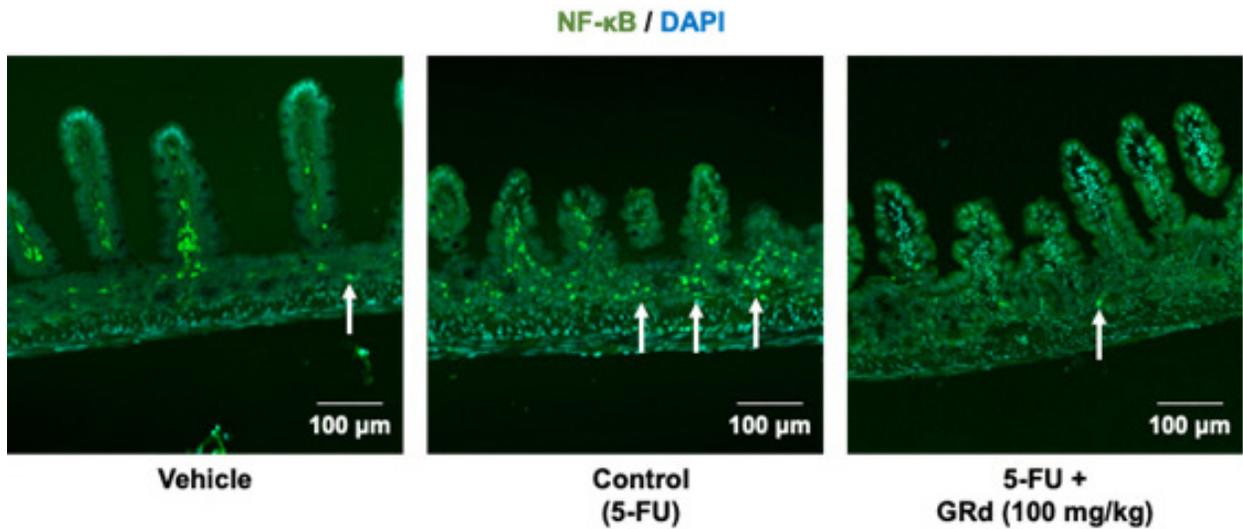


Fig. 5. Immunostaining of NF-κB in the small intestinal mucosa with or without 5-FU and GRd. NF-κB was determined immunohistochemically using anti-NF-κB antibody 24 h after 5-FU injection. Immunohistochemical images of stained intestinal tissues were observed. Arrows show NF-κB positive cells.

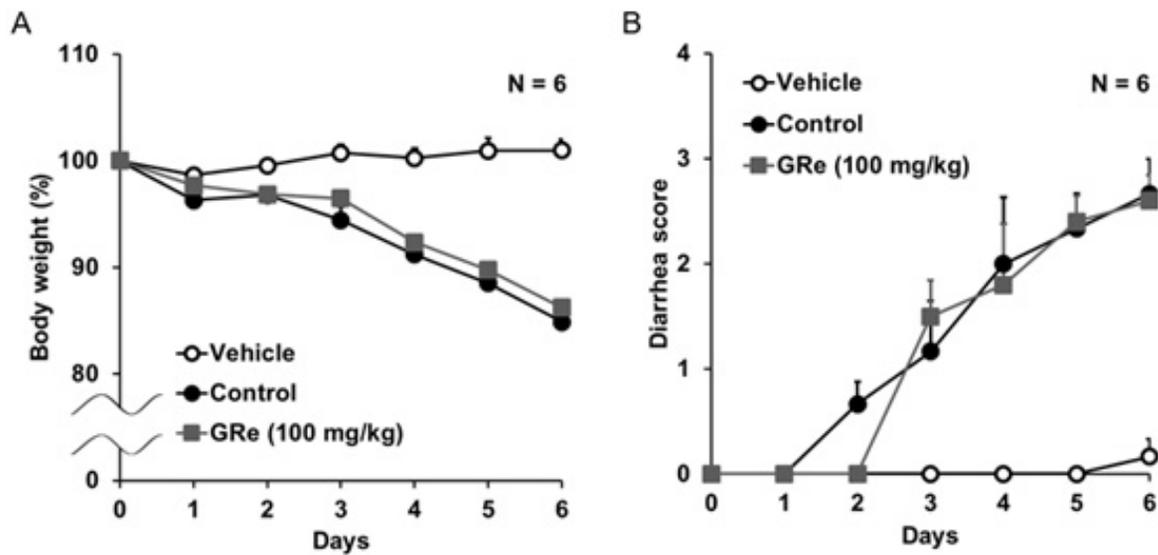


Fig. 6. Effect of co-administered GRe on body weight loss, and diarrhoea due to 5-fluorouracil (5-FU). The animals received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg 5-FU once daily for 7 days (days 0–6), with 100 mg/kg GRe (n = 6) co-administered once daily. The control animals were administered 5-FU with 0.5 % CMC (vehicle for GRe). The body-weight was measured daily (A), while diarrhoea was scored daily using a 5-point scale (0–4) (B). Data are expressed as a mean \pm S.E.M.

Histological assessment

The length of the small intestinal villi in the vehicle group was $180.6 \pm 14.1 \mu\text{m}$. The length of the small intestinal villi on day 7 of 5-FU administration was $102.2 \pm 9.1 \mu\text{m}$, which was significantly shorter than that in the vehicle group. When GRe was co-administered, the length of the small intestinal villi on day 7 of 5-FU administration was $168.7 \pm 10.8 \mu\text{m}$ in the GRe (100 mg/kg) group, and the shortening of villi was significantly suppressed compared to the 5-FU monotherapy group (Fig. 7A, B).

The number of intestinal crypts in the vehicle group was 14.7 ± 0.8 crypts/mm. The number of intestinal crypts on day 7 of 5-FU administration was 9.5 ± 0.6 crypts/mm, which was significantly lower than in the vehicle group. When GRe (100 mg/kg) was co-administered, the number of intestinal crypts on day 7 of 5-FU administration was 11.7 ± 0.8 crypts/mm, which was significantly lower than in the vehicle group (Fig. 7C).

The number of cells in the intestinal crypts in the vehicle group was 17.9 ± 1.0 cells/crypt. Furthermore, the number of cells in the intestinal crypts on day 7 of 5-FU administration was 9.7 ± 0.5 cells/crypt, which was significantly lower than in the vehicle group. When GRe (100 mg/kg) was co-administered, the number of cells in the intestinal crypts on day 7 of 5-FU administration was 10.7 ± 0.8 cells/crypt, which was significantly lower than in the vehicle group (Fig. 7D).

Changes in MPO activity

The MPO activity in the vehicle group was 28.6 ± 1.3 (nmol H_2O_2 /min/mg protein). Furthermore, the MPO activity 24 h after the last 5-FU dose was 85.8 ± 9.9 (nmol H_2O_2 /min/mg protein). When GRe (100 mg/kg) was co-administered, the MPO activity 24 h after the last 5-FU dose was 58.9 ± 6.0 (nmol H_2O_2 /min/mg protein) and significantly (at $p < 0.05$) lower than in the vehicle group as well as showing

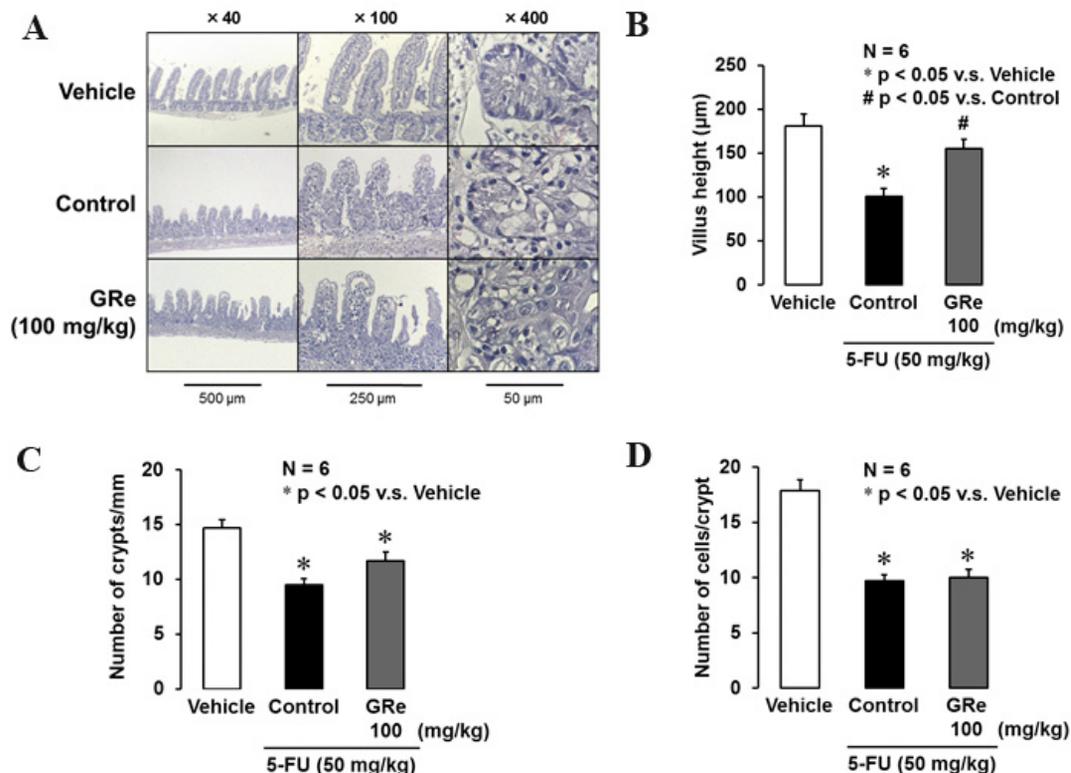


Fig. 7. Effect of co-administered GRe on intestinal mucositis due to 5-fluorouracil (5-FU). The animals received an intraperitoneal injection of 50 mg/kg 5-FU once daily for 7 days (days 0–6), with 100 mg/kg GRe (n = 6) co-administered once daily. Jejunum tissues collected on day 6 were stained with hematoxylin/eosin and imaged at $\times 40$, $\times 100$, and $\times 400$ (A). The height from the top of the villus to the villus–crypt junction (B), the number of crypts per millimeter (C) and cells per crypt (D) were measured by light microscopy. * $p < 0.05$ versus the untreated animals from vehicle (not treated with 5-FU, n = 6); # $p < 0.05$ versus the animals treated with 5-FU only (n = 6).

a significant suppression in the increase in the MPO activity relative to the 5-FU monotherapy group (Fig. 8).

Discussion

Previous studies reported that administration of 5-FU caused weight loss and diarrhoea (Benson et al. 2004; Hamouda et al. 2017). The mechanism of anticancer drug-induced enteritis has not been elucidated yet, but in addition to the inhibitory effect of anticancer drugs on cell proliferation, it was reported that apoptosis is involved and causes enteritis by shortening the villi of the small intestine and destroying the intestinal crypts (Duncan, Grant 2003; Hamouda et al. 2017; Inomata et al. 2002).

In this study, continuous administration of 5-FU reduced the body weight of the mice over time. In clinical practice, side effects of 5-FU include anorexia due to nausea and vomiting (Shih et al. 2007). Anticancer drugs are known to stimulate the secretion of 5-HT and substance P proteins in the gastrointestinal tract which bind to 5-HT₃ and NK1 receptors to generate nerve impulses; these signals are transmitted to the vomiting centre to cause a vomiting reaction (Xi et al. 2021). The weight loss of mice by 5-FU administration observed in this experiment was considered to be due to the decrease in food intake caused by anorexia.

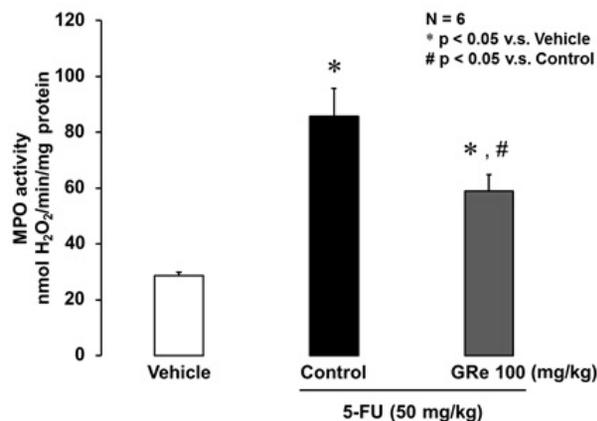


Fig. 8. Effect of co-administered GRe on 5-fluorouracil (5-FU)-induced increase in intestinal myeloperoxidase (MPO) activity. The animals received 50 mg/kg 5-FU by intraperitoneal injection once daily for 7 days (days 0–6), with 100 mg/kg GRe (n = 6) co-administered once daily. The jejunum was obtained on day 6. The MPO activity was measured with o-dianisidine. Data are expressed as a mean ± S.E.M. *p < 0.05 versus vehicle (not treated with 5-FU, n = 6); #p < 0.05 versus the animals treated with 5-FU only (n = 6).

The occurrence of diarrhoea was associated with abnormal intestinal and intestinal water secretion and reabsorption. Aquaporin (AQP) is a family of water channel membrane proteins with a molecular weight of approximately 30 kDa. There are 13 AQP subtypes (AQP 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) involved in water secretion and absorption pathways (Lv et al. 2022). Abnormal AQP expression causes impaired water absorption and secretion in the intestine, which affects intestinal membrane permeability and fluid transport, resulting in diarrhoea (Engevik et al. 2018). In fact, there are reports that the expression of AQP4 and AQP8 was reduced in the transverse and distal colons of mice in the 5-FU-induced diarrhoea model (Sakai et al. 2013). In this study, the co-administration of GRd and GRe did not affect the occurrence and exacerbation of diarrhoea due to continuous administration of 5-FU, but there is no report focusing on the relationship between ginsenosides and AQP in the small intestine. It is necessary to investigate the AQP expression level in the small intestine when 5-FU and ginsenosides are used in combination.

It was histopathologically confirmed that continuous administration of 5-FU shortened the villi of the small intestine and reduced the number of intestinal crypts and the number of cells in the intestinal crypts. Villous epithelial cells are made up of crypt cells and move upwards in a spiral. Since the villi are worn by the passage of food, destruction of intestinal crypts causes the villi to shorten, resulting in deteriorating functioning of the villi. The co-administration of GRd and GRe significantly improved the destruction of intestinal mucosal tissue structure, which is considered to be due to the anti-inflammatory action of GRd and GRe. In addition, GRd and GRe did not affect weight loss due to continuous administration of 5-FU, but the intestinal absorption capacity decreased due to the destruction of the intestinal mucosal tissue structure by 5-FU such that the protective effect of GRd and GRe may have decreased. Therefore, it is necessary to consider prophylactic administration of GRd and GRe before treatment with 5-FU.

There is a report which suggests that continuous administration of 5-FU to mice upset the balance of intestinal flora, reduced the abundance of gram-positive *phylum Bacillota* and increased the abundance of gram-negative *phyla Bacteroides* and *Verrucomicrobia* (Hamouda et al. 2017). The intestinal flora is involved in many functions such as maintenance of immune homeostasis and improvement of metabolic capacity and it is said that its imbalance will adversely affect health (Frank et al. 2007). *Akkermansia muciniphila*, which belongs

to the *phylum Verrucomicrobia*, was reported to break down mucin (Derrien et al. 2011) and it is possible that the enteritis caused by the administration of 5-FU was associated with a decrease in the intestinal epithelial barrier due to a decrease in mucus volume and lipopolysaccharide (LPS) derived from Gram-negative bacteria. GRd was reported to balance the intestinal flora in an autoimmune disease model in mice (Jin et al. 2020). In this study, the MPO activity that increased after the continuous administration of 5-FU was significantly suppressed by co-administration of GRd and GRe. This suggests that ginsenosides may be involved in improving the balance of intestinal flora.

Continuous administration of 5-FU increased the TNF- α mRNA expression. According to the report by Chang et al. (2012), the expression of NF- κ B was increased by administering 5-FU to mice and in this study, the expression of NF- κ B was also confirmed by immunohistological examination. When NF- κ B is activated by LPS or cytokines, it increases inflammatory cytokines such as TNF- α which further activate NF- κ B. The deterioration of inflammation from this repetition is thought to destroy crypt cells and cause enteritis. The co-administration of GRd suppressed the increase in the TNF- α mRNA and NF- κ B expression by 5-FU. It was reported that GRd exhibited an anti-inflammatory effect by blocking the NF- κ B signalling pathway in a carrageenan footpad oedema model (Wang et al. 2012), while GRe suppressed the inflammatory cytokine expression and activation of NF- κ B, their transcription factor, by binding competitively to the TLR4 receptor on macrophages (Lee et al. 2012). Taken together, the data suggest that the NF- κ B pathway may be involved in the suppression (by GRd and GRe) of the inflammatory response caused by continuous administration of 5-FU seen in these experiments. By conducting a detailed study on the expression and localisation of NF- κ B and its related molecules I κ B, TLR4 and MyD88 involved in signal transduction in the pathophysiology of 5-FU-induced enteritis, the mechanism of enteritis and the action mechanisms of drugs that protect against it may be clarified.

The anti-inflammatory effects of dexamethasone, a synthetic steroid, are associated with reduced levels of NF- κ B (p65) and decreased levels of TNF- α in gastrointestinal disorders (Yousefi-Manesh et al. 2020). In addition, dexamethasone regulates several signalling pathways, including NF- κ B, TLR4, and IRAK-M signalling (Ribeiro et al. 2017). It is suggested that corticosterone could contribute

to the suppression of the 5-FU-induced inflammatory response by GRd and GRe.

On the other hand, it is also possible that the protective action of GRd and GRe observed in this experiment is due to the attenuation of the anticancer effect of 5-FU or the inhibition of uptake. However, a report indicated that GRd suppressed tumour angiogenesis through increased coverage of pericytes around micro-vessels and decreased the VEGF expression in vivo and enhanced antitumor effects when used in combination with 5-FU (Zhong et al. 2020).

The results obtained in this study suggest that GRd and GRe show an anti-inflammatory effect against 5-FU-induced enteritis and that NF- κ B is involved in their action.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Ethics Approval

All procedures involving animals were approved by the Committees for Animal Research of Ritsumeikan University Institutional Animal Care and Use Committee.

Author Contributions

a. Daisuke Kato—conducted experiments, contributed to the interpretation of the results, drafted the original manuscript, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content;

b. Shizuka Jonan—conducted experiments, contributed to the interpretation of the results, drafted the original manuscript, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content;

c. Ryo Sugahara—conducted experiments, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content;

d. Hikaru Otsuki—conducted experiments, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content;

e. Seikou Nakamura—conceived the idea of the study, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content;

f. Kikuko Amagase—conceived the idea of the study, supervised the conduct of this study, reviewed the manuscript draft and revised it critically on intellectual content.

References

- Benson, A. B., Ajani, J. A., Catalano, R. B. et al. (2004) Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, no. 14, pp. 2918–2926. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.04.132> (In English)
- Chang, C.-T., Ho, T.-Y., Lin, H. et al. (2012) 5-fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and *in vivo* bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, article e31808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031808> (In English)
- Derrien, M., van Baarlen, P., Hooiveld, G. et al. (2011) Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, article 166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166> (In English)
- Dranitsaris, G., Maroun, J., Shah, A. (2005) Severe chemotherapy-induced diarrhea in patients with colorectal cancer: A cost of illness analysis. *Supportive Care in Cancer*, vol. 13, no. 5, pp. 318–324. <https://doi.org/10.1007/s00520-004-0738-7> (In English)
- Duncan, M., Grant, G. (2003) Oral and intestinal mucositis—causes and possible treatments. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 18, no. 9, pp. 853–874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01784.x> (In English)
- Engevik, A. C., Kaji, I., Engevik, M. A. et al. (2018) Loss of MYO5B leads to reductions in Na⁺ absorption with maintenance of CFTR-dependent Cl⁻ secretion in enterocytes. *Gastroenterology*, vol. 155, no. 6, pp. 1883–1897. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.025> (In English)
- Frank, D. N., Amand, A. L. St., Feldman, R. A. et al. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 34, pp. 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104> (In English)
- Hamouda, N., Sano, T., Oikawa, Y. et al. (2017) Apoptosis, dysbiosis and expression of inflammatory cytokines are sequential events in the development of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, vol. 121, no. 3, pp. 159–168. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12793> (In English)
- Inomata, A., Horii, I., Suzuki, K. (2002) 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: What determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? *Toxicology Letters*, vol. 133, no. 2-3, pp. 231–240. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00204-7) (In English)
- Jin, B., Zhang, C., Geng, Y., Liu, M. (2020) Therapeutic effect of Ginsenoside Rd on experimental autoimmune encephalomyelitis model mice: Regulation of inflammation and Treg/Th17 cell balance. *Mediators of Inflammation*, vol. 2020, article 8827527. <https://doi.org/10.1155/2020/8827527> (In English)
- Khan, I., Ullah, N., Zha, L. et al. (2019) Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome. *Pathogens*, vol. 8, no. 3, article 126. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030126> (In English)
- Lee, I.-A., Hyam, S. R., Jang, S. E. et al. (2012) Ginsenoside Re ameliorates inflammation by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to TLR4 on macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 38, pp. 9595–9602. <https://doi.org/10.1021/jf301372g> (In English)
- Liu, C., Wang, J., Yang, Y. et al. (2018) Ginsenoside Rd ameliorates colitis by inducing p62-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in mice. *Biochemical Pharmacology*, vol. 155, pp. 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.010> (In English)
- Lv, H., Li, Y., Xue, C. et al. (2022) Aquaporin: Targets for dietary nutrients to regulate intestinal health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 106, no. 1, pp. 167–180. <https://doi.org/10.1111/jpn.13539> (In English)
- Mori, K., Kondo, T., Kamiyama, Y. et al. (2003) Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 51, no. 5, pp. 403–406. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0585-0> (In English)
- Ozawa, N., Onda, T., Hayashi, K. et al. (2020) Effects of topical Hangeshashinto (TJ-14) on chemotherapy-induced oral mucositis. *Cancer Management and Research*, vol. 12, pp. 1069–1078. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S238306> (In English)
- Ribeiro, S. B., de Araujo, A. A., de Araujo Junior, R. F. et al. (2017) Protective effect of dexamethasone on 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 10, article e0186511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186511> (In English)
- Sakai, H., Sagara, A., Matsumoto, K. et al. (2013) 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, article e54788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054788> (In English)
- Shih, Y.-C. T., Xu, Y., Elting, L. S. (2007) Costs of uncontrolled chemotherapy-induced nausea and vomiting among working-age cancer patients receiving highly or moderately emetogenic chemotherapy. *Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 678–685. <https://doi.org/10.1002/cncr.22823> (In English)
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K. et al. (2020) 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 206, article 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447> (In English)

- Wang, L., Zhang, Y., Wang, Z. et al. (2012) Inhibitory effect of ginsenoside-Rd on carrageenan-induced inflammation in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 90, no. 2, pp. 229–236. <https://doi.org/10.1139/y11-127> (In English)
- Xi, S., Zhai, X., Wang, Y. et al. (2021) The Ciji-Hua'ai-Baosheng II formula attenuates chemotherapy-induced anorexia in mice with H₂₂ hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, article 715824. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.715824> (In English)
- Yang, X. L., Guo, T. K., Wang, Y. H. et al. (2012) Ginsenoside Rd attenuates the inflammatory response via modulating p38 and JNK signaling pathways in rats with TNBS-induced relapsing colitis. *International Immunopharmacology*, vol. 12, no. 2, pp. 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.014> (In English)
- Yin, W., Zhong, G., Fan, H., Xia, H. (2019) The effect of compound *Sophora* on fluorouracil and oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2019, article 7564232. <https://doi.org/10.1155/2019/7564232> (In English)
- Yousefi-Manesh, H., Dejbani, P., Mumtaz, F. et al. (2020) Risperidone attenuates acetic acid-induced colitis in rats through inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 42, no. 5, pp. 464–472. <https://doi.org/10.1080/08923973.2020.1808987> (In English)
- Zhang, X., Wang, Y., Ma, C. et al. (2016) Ginsenoside Rd and ginsenoside Re offer neuroprotection in a novel model of Parkinson's disease. *American Journal of Neurodegenerative Diseases*, vol. 5, no. 1, pp. 52–61. PMID: [27073742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27073742/) (In English)
- Zhong, C., Jiang, C., Ni, S. et al. (2020) Identification of bioactive anti-angiogenic components targeting tumor endothelial cells in Shenmai injection using multidimensional pharmacokinetics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 10, no. 9, pp. 1694–1708. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.011> (In English)



УДК 616-092.9; 612.017.2

EDN CQYTGO

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-348-358>

Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance

E. A. Rybnikova^{✉1}, K. A. Baranova¹, M. Yu. Zenko¹, A. V. Churilova¹, K. N. Stupin¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Elena A. Rybnikova, SPIN-CODE RSCI: 9663-4704, Scopus AuthorID: 6603870901, ResearcherID: N-1801-2017, ORCID: 0000-0002-8956-726X, e-mail: rybnikovaEA@infran.ru

Kseniya A. Baranova, SPIN-CODE RSCI: 2648-7415, Scopus AuthorID: 24480664800, ResearcherID: F-5235-2015, ORCID: 0000-0002-2746-2040, e-mail: ksentippa@mail.ru

Mikhail Yu. Zenko, SPIN-CODE RSCI: 6632-3116, Scopus AuthorID: 57192699858, ResearcherID: G-5748-2019, ORCID: 0000-0002-9868-0598, e-mail: zenkomichail@mail.ru

Anna V. Churilova, SPIN-CODE RSCI: 6562-7572, Scopus AuthorID: 24480804400, ORCID: 0000-0002-3368-9612, e-mail: annch05@mail.ru

Konstantin N. Stupin, ORCID: 0000-0003-4737-0271, e-mail: k.stypin@yandex.ru

For citation: Rybnikova, E. A., Baranova, K. A., Zenko, M. Yu., Churilova, A. V., Stupin, K. N. (2022) Comparative analysis of various modes of preconditioning to increase high altitude tolerance. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 348–358. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-348-358> EDN CQYTGO

Received 22 August 2022; reviewed 14 September 2022; accepted 15 September 2022.

Funding: The work was funded by the Russian Science Foundation, grant No. RSF-22-25-00781.

Copyright: © E. A. Rybnikova, K. A. Baranova, M. Yu. Zenko, A. V. Churilova, K. N. Stupin (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. Hypoxic preconditioning (HPC) represents an effective tool to increase high altitude tolerance but requires rather severe conditions of hypoxic interventions. We aim to investigate the possibility to reduce the intensity of the HPC factor without losing its effectiveness. Adult male rats were divided as follows: one group was subjected to severe hypoxia (SH); other groups before SH were treated with: three trials of HPC at 5,000 m “altitude” for 2 hours daily (originally proven effective mode); HPC with three trials at 5,000 m “altitude” for 1 hour; HPC with three trials at 3,500 m for 2 hours; HPC with one trial at 5,000 m for 2 hours; HPC with one trial at 5,000 m “altitude” for 2 hours on the background of glucocorticoid administration. In addition, the effects of the non-hypoxic preconditioning with two injections of sodium valproate (a histone deacetylase inhibitor) were studied in a separate group. The survival rate of animals, neuronal loss, neurological status, and behavioral and hormonal reactions were assessed. It was found that all tested modes improved the survival of the rats and their neurological status to a varying degree, but only one trial of HPC in combination with glucocorticoid injection was comparable in efficacy with the original mode of preconditioning proposed by us earlier and produced no side effects. Based on the experimental findings, we suggest a new effective mode of HPC based on a single exposure to the altitude of 5,000 m combined with an injection of dexamethasone.

Keywords: glucocorticoids, high altitude, hypobaric hypoxia, hypoxic tolerance, preconditioning, Wistar rats

Introduction

Preconditioning is a pre-exposure to brief or mild repetitive episodes of hypoxia or ischemia to increase brain and body resistance to more severe hypoxic or ischemic insults (Murry et al. 1986). Numerous techniques of preconditioning have been elaborated, including different protocols of subliminal ischemic episodes produced by transient artery occlusions interrupting the blood flow (Gempp, Blatteau 2010; Salvador et al. 2016; Vinciguerra et al. 2018), normobaric hypoxic treatments by inhalation of reduced oxygen gas mixtures (Hobbins et al. 2017; Serebrovskaya et al. 2013) or remote ischemia (Heusch et al. 2015). Application of ischemic preconditioning techniques in humans has stalled due to considerable risk factors. In particular, ischemic preconditioning by artery occlusion requires surgery and is potentially risky itself, whereas a relatively safe remote ischemic preconditioning by compression of a limb has comparatively low efficacy (Berger et al. 2015; Hausenloy et al. 2015). The hypoxic preconditioning (HPC) techniques lack these disadvantages, but still rather severe hypoxia (SH) is needed to achieve notable and sustained protective effects, which might provoke undesirable pathological processes or be accompanied by subjective feelings of ill health. Thus, both the efficacy and safety depend on the dose of hypoxia, and a very important practical challenge is to decrease the dose without reducing the benefits (Navarrete-Opazo, Mitchell 2014; Serebrovska et al. 2016).

In our studies, we developed a highly effective mode of HPC by three 2 h episodes of hypobaric hypoxia corresponding to the altitude of 5,000 m simulated in a barochamber. Such exposure improved survival of rats in conditions of SH (5% of oxygen), prevented neuronal injury and loss as well as behavioral and hormonal abnormalities in surviving animals (Rybnikova et al. 2006; 2008). In addition, such HPC induced development of cross-tolerance to psychoemotional and traumatic stress (Rybnikova et al. 2007; 2008).

Although the exposure of humans to the altitude of 5,000 m is relatively safe, it can be tolerated poorly and produce unwanted side-effects including headache, chest pain associated with decreased blood flow to the heart, palpitations, and dizziness (Farinelli et al. 1994). For these reasons we continue to search for milder but effective preconditioning techniques. The aim of the present study was to decrease a dose of hypoxia by reducing the "altitude", duration, or a number of HPC sessions in our model of hypobaric hypoxia. We also considered administration of a histone deacetylase inhibitor

sodium valproate as a preconditioning factor since epigenetic regulation processes are involved in the processes of adaptation to high altitude (Julian 2017). We also revealed that activation of histone acetylation processes represents a key mechanism of neuroprotective HPC action on vulnerable brain neurons (Samoilov et al. 2016). In the present study, we test whether activation of histone acetylation is sufficient to confer neuronal protection from the SH. Another hypothesis is based on our earlier study which demonstrated that the effective three-trial HPC compared to the non-effective one trial HPC had significantly higher peak amplitude of the corticosterone response to SH (Rybnikova et al. 2008). Taking this into account, we hypothesise that addition of exogenous glucocorticoids to the one-trial HPC in order to reach peak levels of three-trial HPC could increase the efficacy of the one-trial HPC mode. To test this hypothesis, we combine the one-trial HPC with injection of glucocorticoid in a dose calculated as a subtraction of the peak concentrations observed in the effective and non-effective modes of HPC. Summarising the above, the aim of the present study was to examine several preconditioning modes including milder hypoxic exposures, or administration of pharmacological agents, or combining both approaches.

Materials and methods

The study was performed on Wistar male rats weighting 220–250 g. The rats were divided into eight groups, including the control group and seven experimental ones (Fig. 1).

The animals of Group 1 were subjected to severe hypobaric hypoxia (SH) for 3 hours in a flow-type pressure chamber (180 mmHg, 3 hours, equivalent to altitude of 11,000 m). Such parameters were used successfully in our previous studies as a valid rat model of SH (Rybnikova et al. 2006). The rats of Group 2 were preconditioned by pre-exposure to three episodes of moderate hypobaric hypoxia (2 hours at 5,000 m, 360 mmHg, spaced at 24 hours) (the effective protocol). The new HPC modes for testing were designed to decrease the dose of the hypoxic factor by reducing the "altitude", duration, or the number of HPC trials in our model of hypobaric hypoxia. Consequently, they included HPC with three trials at 5,000 m "altitude" lasting for 1 hour (Group 3, shorter duration), HPC with three trials at 3,500 m "altitude" for 2 hours (Group 4, lower "altitude"), HPC with one trial at 5,000 m "altitude" for 2 hours (Group 5, fewer trials), HPC with one trial at 5,000 m "altitude" for 2 hours in combination with administration of glucocorticoid (dexamethasone, 4 mg/kg, i. p.) immediately

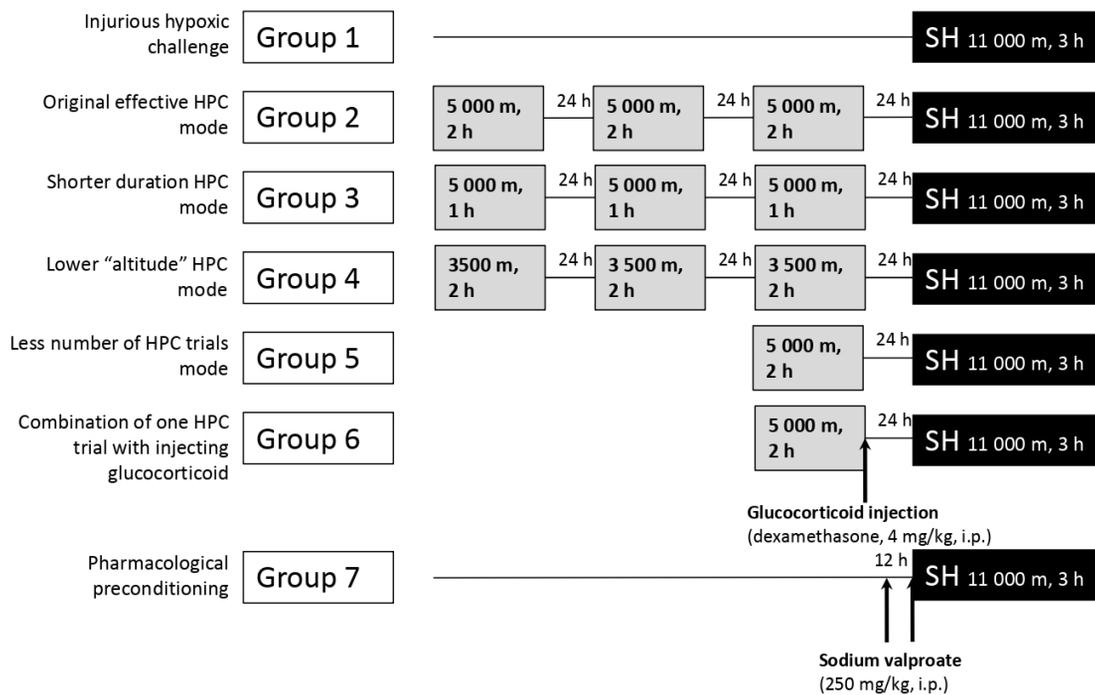


Fig. 1. The experimental design of the study. Groups 1–7, the experimental groups of rats subjected to different treatments. Grey boxes represent preconditioning hypoxic trials with parameters of hypobaric hypoxia (altitude and duration). Black boxes represent severe injurious hypoxia (SH), applied to test the level of tolerance. The arrows indicate timing of the injections. Control group with no treatments is not shown

after the HPC trial (Group 6). In addition, in Group 7 we applied pharmacological preconditioning which consisted of two injections of sodium valproate (250 mg/kg, one in 12 hours and another just before SH). The control group included the rats placed in the barochamber for 3 hours without hypoxia. In all experimental groups the survival rates after SH, post-SH neurological status of rats, their behavioral reactions as well as blood levels of corticosterone were analysed. Each experimental group consisted of 12 animals.

Neurological test

The neurological status was evaluated using the Julon-Courvoisier pull-up test that makes it possible to assess the ability of an animal to hold on a horizontal rope with its forepaws and pull the hanging hind limbs onto the rope (Boissier et al. 1960), which reflects muscle strength and coordination. A rope with a diameter of 0.5 cm was placed horizontally at a height of 70 cm from a cloth hammock. The front legs of an animal were placed on the rope and its hind limbs were released. The number of successful pull-ups out of three attempts when the animal pulled both hind limbs onto the rope was counted.

Behavioral tests

Testing in the elevated plus maze was applied to assess the level of anxiety of animals (Pellow et al. 1985). On the fifth day after SH the rats were tested one at a time for 5 min in the maze apparatus, located at a height of 75 cm above the floor, and consisting of two open illuminated and two enclosed arms with exits. The time spent by an animal inside and outside the closed arms, the number of transitions between the arms, and the dynamics of the "peeping" behavior were evaluated. The anxiety behavior of the animal is characterised by the preference for the closed arms over the open ones and over the centre of the maze (Pellow et al. 1985; Walf, Frye 2007).

The open-field test, as a classical method of assessing the level of locomotor activity of rodents in an unfamiliar environment (Hall 1936), was carried out in a 90 × 90 × 45 cm chamber without a roof whose floor was divided into 15 × 15 cm squares and lit from above with a 60 W lamp. On the sixth day after the final trial with SH in each tested mode a rat was placed in the centre of the open field, and the latent period before the start of its movement, the number of crossed lateral and

central squares, and the duration of rearing, grooming, and freezing were recorded during 5 minutes.

Blood corticosterone assay

Evaluation of the levels of circulating glucocorticoid hormones (corticosterone as a rat analogue of cortisol in humans) in the blood was performed on days 1 and 7 after SH. The corticosterone levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay with Corticosterone-ELISA reagent kits (Hema, Russia) in two parallel samples.

Histology

To assess the extent of neuronal damage and loss, animals were decapitated on the seventh day after SH and their brains were quickly removed. The hippocampal regions with the adjacent areas were isolated, fixed in 4% buffered paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Brain sections were made and stained according to the classical Nissl protocol. The cresyl violet stained paraffin sections were analysed using an image analysis system (VideoTest Master Morphology, VideoTest Ltd., Russia). The number of pyramidal neurons with clear undamaged morphology in the CA1 hippocampal field (area of 350 μm in length) was counted.

Statistics

Statistical processing was performed using the ANOVA one-way analysis of variance (Statistica 7.0) with a posterior comparison using the Fisher method if the distribution of the sample was normal and the group variances were equal. Otherwise, the non-parametric Kraskel-Wallis ANOVA test was used. Differences between groups were

considered significant at $p \leq 0.05$. The results for the experimental subgroups are expressed as a percentage of the average value of the control group, taken as $100\% \pm$ standard error of the mean.

Results

Average data on survival of rats in the experimental groups were, respectively, 8% in the SH group, 83% in Group 2 (the initial mode), 92% in Group 6, 50% in Group 5 and Group 3, 17% in Group 4 and 42% in Group 7 (Table 1). Thus, judging by the survival rate, only the HPC mode of Group 6 (the combination of a single HPC trial with the dexamethasone injection) was comparable in efficacy with the effective protocol (Group 2). All other tested modes of preconditioning, including the pharmacological one (Group 7), improved rat survival after SH to some extent compared to the non-preconditioned animals. Lowering the altitude was the least protective mode.

The histological analysis revealed that SH resulted in injury and loss of more than 30% of the CA1 neurons, which was a statistically significant difference to control (Fig. 2, Fig. 3). All the preconditioning modes improved neuronal survival except for the mode in Group 4, which showed the same statistically significant neuronal loss as the non-preconditioned Group 1. However, only two modes prevented the neuronal death completely—the original effective mode (Group 2) and exposure to one HPC trial combined with glucocorticoid administration (Group 6). In these two experimental groups the injurious effects of SH were prevented totally and statistically significantly.

Table 1. Survival rates for the groups exposed to SH

Experimental groups	% of survived rats	Number of survived rats
SH	8%	1
3PC + SH	83%	10
3PC(1 h) + SH	50%	6
3PC(3.5 km) + SH	17%	2
1PC + SH	50%	6
1PC + GC + SH	92%	11
2Valp + SH	42%	5

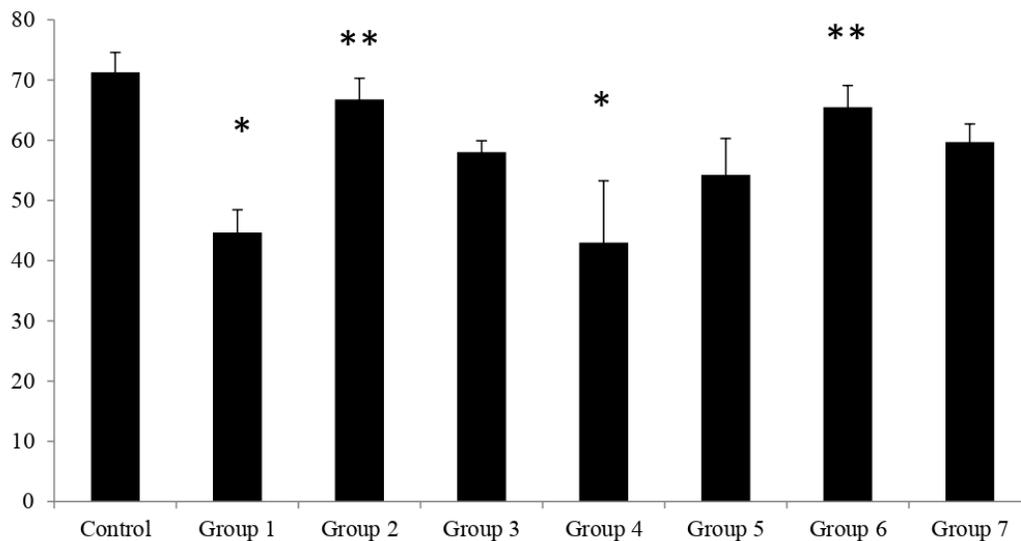


Fig. 2. The number of neurons in the CA1 field of the hippocampus seven days after SH. OY axis indicates the number of pyramidal neurons with unaffected morphology in a randomly selected area of 350 μm . Data presented as mean \pm SEM; *—changes are significant compared to control, $p \leq 0.05$; **—changes are significant compared to the non-preconditioned SH group, $p \leq 0.05$

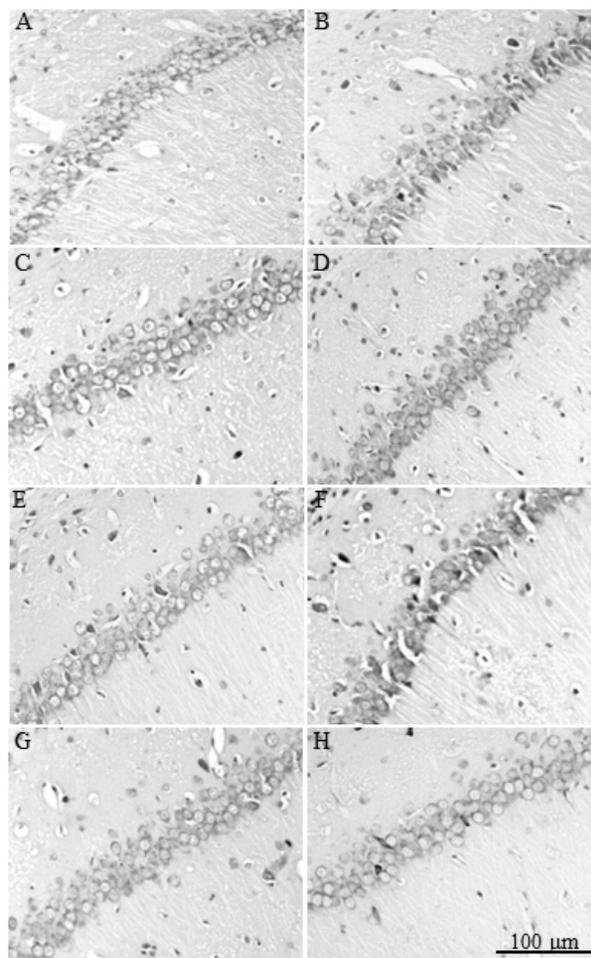


Fig. 3. Microphotographs illustrating the injurious effect of SH on vulnerable neurons of the hippocampal CA1 field in non-preconditioned (B) and preconditioned (C, D, E, F, G, H) rats. A—control; B—Group 1; C—Group 2; D—Group 3; E—Group 4; F—Group 5; G—Group 6; H—Group 7. Scale bar, 100 μm

In rats which were treated with SH only, a serious neurological deficit was detected. It was observed that total and statistically significant exposure to SH impaired the performance of successful pull-ups. HPC in the effective mode (Group 2) reduced the percentage of errors in the neurological test

to the control level. In other tested HPC modes, the rats showed a level of successful attempts to pull-up in the range of 30–56%, which indicated their improved neurological scores compared to the non-preconditioned animals in the SH group, although they were lower than in Group 2 (Table 2).

Table 2. Neurological scores of the rats

Experimental groups	Successful pull-ups from total attempts, %	Successful pull-ups from 3 attempts
Control	0.61%	1.7 ± 0.5
SH	0%	0.0 ± 0
3PC + SH	77%	2.3 ± 0.4
3PC(1 h) + SH	56%	1.7 ± 0.5
3PC(3.5 km) + SH	33%	1.7 ± 1.4
1PC + SH	50%	1.5 ± 0.7
1PC + GC + SH	56%	1.7 ± 0.7
2Valp + SH	47%	1.4 ± 0.7

By monitoring the horizontal activity in the open field, we revealed that lowering the “altitude” in the HPC trials (Group 4) worsened rat behavior after SH and statistically significantly reduced the number of squares crossed compared to control (Fig. 4, A). Similar but non-significant changes were observed in the groups with reduced number of HPC exposures (Group 3) and injected with valproate (Group 7). Similar results were also obtained in the elevated plus maze test where statistically significant changes were observed only in Group 3 and Group 7, suggesting some anxiogenic effects (Fig. 4, B).

To study the hormonal status of the animals and the activity of the pituitary-adrenal system (HPA), we measured the levels of glucocorticoid hormones (corticosterone) in the peripheral blood in the early (one day) and delayed (seven days) periods after SH. Selection of these specific time-points for the analysis was aimed at the assessment of such important parameters of HPA functioning as its feedback regulation in the acute period and baseline activity in the delayed period after SH. It was found that, 24 hours after the exposure to SH, the levels of corticosterone in the blood of the non-preconditioned animals remained statistically significantly elevated above the baseline (Fig. 5). This finding

apparently indicates a weakening of the glucocorticoid feedback and correlates with our earlier published data (Rybnikova et al. 2008). On the seventh day after SH, serum corticosterone levels in the SH animals (Group 1) did not statistically differ from the baseline. The animals preconditioned in the initial HPC mode (Group 2) showed a similar statistically significant elevation of corticosterone levels on the first day which, nevertheless, persisted for seven days. These data confirm that application of the original mode of HPC used in our studies persistently up-regulates the baseline activity of HPA, which is also consistent with our previous report (Rybnikova et al. 2008). All other modes of HPC tested in this study did not result in the statistically significant elevation of corticosterone levels in the early period after SH. Hence, it might be suggested that these modes preserve normal functioning of the HPA feedback mechanisms by switching off the acute response. However, the modes of HPC applied in Group 3 and Group 4 caused an abrupt HPA up-regulation in the remote period (on the seventh day after SH) when corticosterone levels increased over 300–500% of the control. This might be considered as a manifestation of impaired glucocorticoid feedback observed

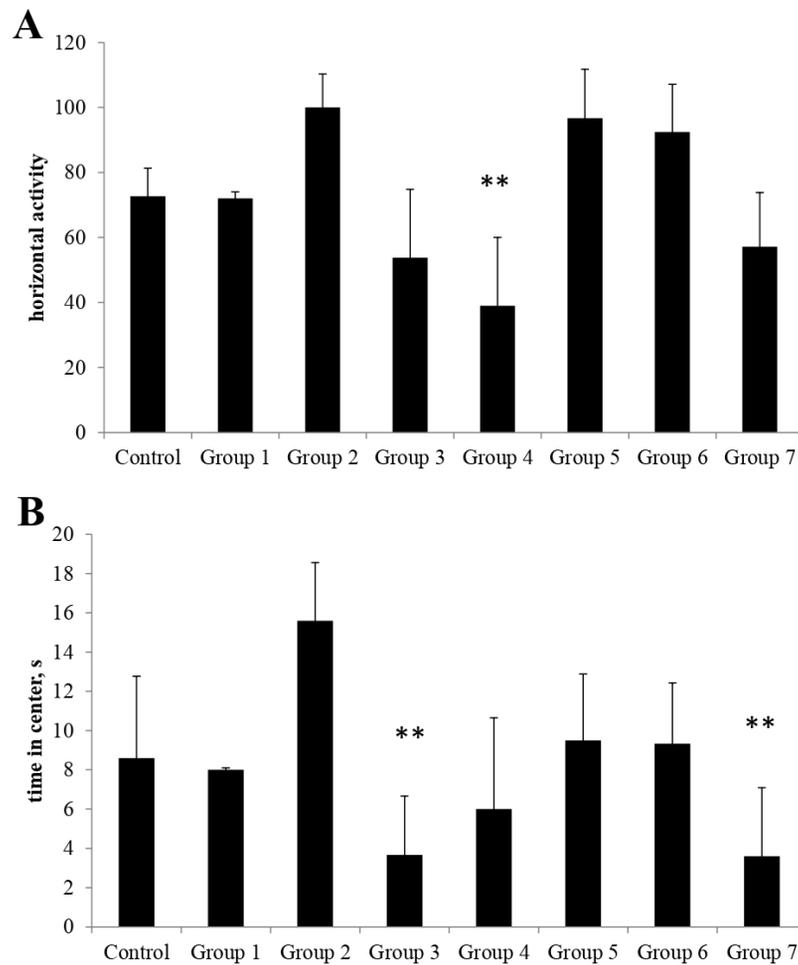


Fig. 4. Behavior of rats in the open field (A) and elevated plus maze (B) tests. A—locomotor activity (ambulances, number of squares crossed for 5 min); B—time spent in the central square of the maze (sec). Data presented as mean ± SEM; **— changes are significant compared to the control group, $p \leq 0.05$

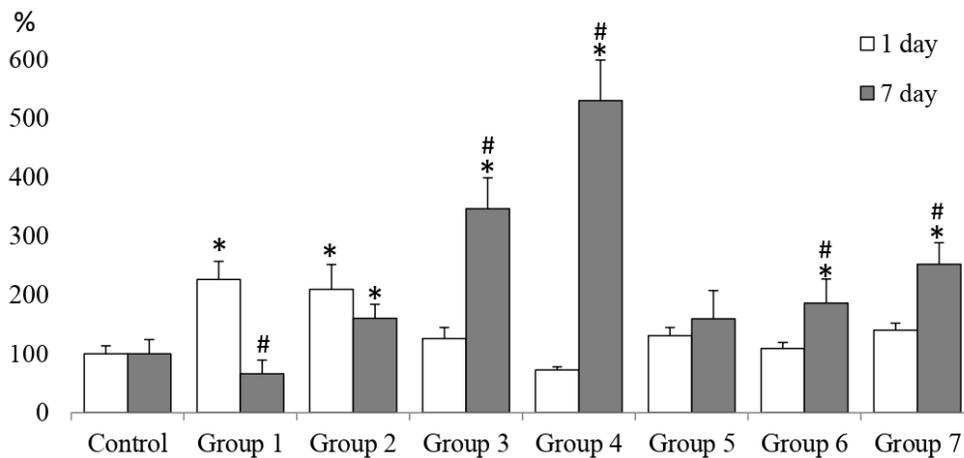


Fig. 5. Corticosterone levels in blood plasma on the first (white bars) and seventh days (grey bars) after SH. Data presented as mean ± SEM and expressed as a percent of the control group level taken as 100%. *—changes are significant compared to baseline, $p \leq 0.05$; #, *—hormonal levels on the seventh day after SH significantly differ from the levels on the first day in the same experimental group, $p \leq 0.05$

in depression (Pariante, Lightman 2008) or other disruption of the HPA regulation. Comparatively much lower but still statistically significant increase in the levels of corticosterone (220–320%) on the seventh day after SH was also observed in Group 6 and Group 7, suggesting some enhancement of the HPA baseline activity similar to that induced by our original HPC mode.

The data obtained by this comparative analysis demonstrate that amongst all tested modes of HPC only a single HPC exposure to the altitude of 5,000 m for 2 hours combined with the glucocorticoid injection was as effective as the original mode of the three-trial HPC at 5,000 m for 2 hours and produced no side-effects.

Discussion

Although hypoxic training of pilots in a barochamber was suggested by Holdein as early as in 1919, the increase of high altitude tolerance produced by physical exercise and high altitude acclimatisation was convincingly described later, in the middle of the 20th century (Balke, Wells 1958). Since that time intensive research has been performed on the phenomenon of cross-adaptation between various training techniques, mainly hypoxic ones, and increased resistance to high altitude (Meerson 1984; Meerson et al. 1994). For a long time, such research was in line with the development of various types and modes of the hypoxic training, including the normobaric intermittent hypoxic training, the hypoxia-hyperoxia training, and the barochamber training (Karash et al. 1988; Meerson et al. 1994; Serebrovska et al. 2016; Serebrovskaia 2002; Serebrovskaia et al. 2003; 2013; Strelkov, Chizhov 2001).

Upon the discovery of the phenomenon of HPC, it became clear that it provides a different but perhaps more promising approach to increase high altitude tolerance. At first glance, it may seem that the phenomena of the hypoxic training and HPC have a lot in common, since in both cases pre-exposure to non-injurious doses of the harmful factors is used. However, over the years basic research has accumulated evidence that the underlying mechanisms of enhanced tolerance involved in these two approaches differ significantly. Hypoxic training methods are based on a so-called “training reaction” triggered under the influence of a wide variety of active factors in a small, weak, threshold dose (Garkavi 2015). The key stage of the training reaction—the stage of passive resistance—develops not due to an increase in the activity of the protective subsystems of the body but to a decrease in their sensitivity, so that the stimulus is perceived as less

intensive, below the threshold. The training-induced resistance to hypoxia is associated with increased efficacy of oxygen delivery and utilisation allowing cells and tissues to function under the conditions of hypoxia and accompanied by enhanced antioxidant defences, remodelling of mitochondrial processes with increased efficiency of ATP production (Levine 2002; Serebrovskaia et al. 2003; 2013). These changes are similar to the changes underlying genetic adaptation or acclimation to high altitude in the populations of residents or newcomers living at such altitude (Moore 2017).

In contrast to the training protocols, HPC requires a more intensive stimulus which induces the “reaction of activation” that represents acute mobilisation of the adaptive resources. The reaction of activation significantly and quickly increases the resistance of the body by increasing the activity of all subsystems of the body up to the intracellular structures and primarily the activity of the protective subsystems of the body (Garkavi 2015). When such an activation reaction develops, changes in the central nervous system, endocrine and immune systems, plasticity and energy metabolism indicate a high functional activity within the upper half of the comfort zone to its upper limit. At the molecular level, the reaction of activation in HPC starts from the immediate expression of transcription factor HIF-1 α induced by succinate that reflects a key role of succinate-dependent signalling for immediate and delayed molecular adaptation and increased body resistance to oxygen deficiency (Lukyanova, Kirova 2015; Lukyanova et al. 2018). After termination of the activating stimulus, the reaction of activation transits into the stage of persistent activation and is maintained there for a rather long time. The evidence described above indicates that HPC-based therapeutic approaches could be successfully implemented as a mode of activation therapy, but as already mentioned, it requires a rather high intensity of the preconditioning factor that creates additional risks and/or is worse tolerated. For this reason, we set a task to reduce the intensity of the HPC factor by applying such stimuli which are targeted at additional stimulation of the endogenous mechanisms of tolerance.

In our previous work we studied the mechanisms mediating the development of high altitude tolerance induced by three trials of hypobaric HPC (our effective protocol of HPC) and revealed persistent activation of the pro-adaptive resources, including stabilisation of HIF-1 α , activation of MAP kinases, transcription factors CREB, NF- κ B, c-Fos, NGFI-A, increased acetylation of histones, and neuronal expression of neuroprotective proteins and antioxidants (Rybnikova, Samoilo 2015; Samoilo

et al. 2016). In addition, the wave-like rhythm of moderate activation of the HPA in response to each of three HPC trials allowed the multi-level rearrangement of HPA regulation resulting in its enhanced reactivity to the hypoxic or other stresses (Rybnikova et al. 2008). Having analysed our own experimental data, we suggested that in the complex coordinated response induced by HPC the key roles belonged to three critical steps: activation of HIF-1 followed by up-regulation of its target genes, enhanced HPA reaction to high altitude stress, and relaxation of chromatin due to histone acetylation. In the present study, we designed more experimental paradigms to examine the importance of each step individually. Milder hypoxic exposures with shorter duration (Group 3) or lower altitude (Group 4) were supposed to be enough to stabilise HIF-1 α , as in response to any hypoxic exposure. The earlier reported ineffective mode of a single HPC trial was also taken as a group for comparison for the new mode of single HPC combined with a supplement of exogenous glucocorticoids imitating thereby the enhanced glucocorticoid response to the altitude stress. The final experimental group (Group 7) was designed to examine the role of chromatin relaxation due to increased histone acetylation induced pharmacologically by injecting a histone deacetylase inhibitor, sodium valproate.

The results of this study demonstrate that the combined effect of a single HPC with the injection of exogenous corticosteroids was the most effective in terms of the sum of beneficial outcomes, while the least protective effect accompanied by manifestation of the side effects was observed in the three-trial HPC with a reduced "altitude" (3,500 m). It is interesting that the changes in the HPA functioning differed between the original and the new effective modes in such a way that the animals from Group 6 showed better feedback regulation in the early post-hypoxic period (24 h) since their levels of circulating corticosterone did not differ from the baseline. Regarding the effects of other new modes of preconditioning studied, although they did not improve the survival of rats after SH significantly, their application notably reduced the severity of the post-hypoxic pathology.

These data appear to support the key role of HIF-1 in the activating mechanisms of HPC, since all the modes with decreased hypoxic dose (reduced altitude, duration or number of trials) were less effective. Earlier the dose-dependent activation of HIF-1 was demonstrated in the brain neurons (Sidorova et al. 2013). It was shown that neuroprotection is conferred by using HPC exposures which induce more than 60–70% up-regulation of HIF-1 α levels, whereas no protection was seen

after HPC exposures which up-regulated HIF-1 α levels only by 20–30%. Accordingly, the present data suggest that all the modes with reduced altitude, duration, or the number of hypoxic trials did not activate HIF-1 sufficiently to increase the body resistance. Nevertheless, even slight activation of HIF-1 by lower doses of hypoxia might still contribute to better recovery of the animals after SH observed in those HPC modes.

The highest efficacy observed in the combination of one-trial HPC with glucocorticoid injection (Group 6) allow us to suggest that the interaction between HIF-1 and glucocorticoids might be extremely important for mediating the protection induced by HPC, even compensating presumably low activation of HIF-1. This suggestion is strongly supported by the data reporting that glucocorticoids limit the expression of Von Hippel Lindau protein (pVHL), a negative regulator of HIF-1, and thereby can stabilise HIF-1 α and activate HIF-associated transcriptional responses (Vettori et al. 2017). It was also shown that HIF-1 and glucocorticoid receptors are co-assembled on the promoters of some genes in response to either hypoxia or dexamethasone (Anderson et al. 2016). Hence, HIF-1 and glucocorticoids can functionally interact at multiple levels, from stabilisation of HIF-1 α to joint regulation of their target genes.

The experiments on animals injected with sodium valproate (Group 7) showed that simple activation of the histone acetylation processes without any external hypoxic factor was not sufficient to achieve hypoxic tolerance. A possible explanation of this observation might be that de-compaction of chromatin caused by enhanced histone acetylation facilitates access to multiple gene promoters but lacks specific transcriptional activators, such as HIF-1, not allowing up-regulation of desired target genes.

In summary, possible ways to reduce the severity of the HPC factor without reducing its effectiveness as well as the possibility of pharmacologic preconditioning by administration of sodium valproate were studied. As a result, it has been demonstrated that only one of the introduced new modes, namely a single hypoxic trial at 5,000 m for 2 hours combined with dexamethasone administration, is as effective as the original mode of three trials of HPC at 5,000 m for 2 hours. The findings open new perspectives for development of effective and safe HPC techniques based on a combination of the hypoxic factors and hormonal therapy.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest, either existing or potential.

Ethics Approval

The experiments were approved by the Ethical Committee for the Use of Animal Subjects at the Pavlov Institute of Physiology (Saint Petersburg, Russia).

Author Contributions

- a. Elena A. Rybnikova—general management of the experiment, writing the article;
- b. Ksenia A. Baranova—setting up experiments, histological and hormonal studies, analysis and presentation of data;

- c. Mikhail Yu. Zenko—setting up experiments, behavioral testing, analysis and presentation of data;
- d. Anna V. Churilova—assistance in setting up experiments and taking samples;
- e. Konstantin N. Stupin—assistance in setting up experiments and taking samples.

Acknowledgement

We express our gratitude to the Centre for Collective Use “The Biocollection of I. P. Pavlov Institute of Physiology” for providing the rats for the experiments. We deeply thank Dr Natalia N. Nalivaeva for her valuable comments and suggestions on improvement of the manuscript.

References

- Anderson, T. M., Ma, S. H., Raj, G. V. et al. (2016) Breast tumor kinase (BRK/PTK6) is induced by HIF, glucocorticoid receptor, and PELP1-mediated stress signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, vol. 76, no. 6, pp. 1653–1663. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2510> (In English)
- Balke, B., Wells, J. G. (1958) Ceiling altitude tolerance following physical training and acclimatization. *The Journal of Aviation Medicine*, vol. 29, no. 1, pp. 40–47. PMID: 13502289 (In English)
- Berger, M. M., Macholz, F., Mairbäurl, H., Bärtsch, P. (2015) Remote ischemic preconditioning for prevention of high-altitude diseases: Fact or fiction? *Journal of Applied Physiology*, vol. 119, no. 10, pp. 1143–1151. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00156.2015> (In English)
- Boissier, J.-R., Tardy, J., Diverres, J.-C. (1960) Une nouvelle méthode simple pour explorer l'action “tranquillisante”: le test de la cheminée [A new and simple method to explore ‘tranquillising’ action: the chimney test]. *Pharmacology*, vol. 3, no. 1, pp. 81–84. <https://doi.org/10.1159/000134913> (In French)
- Farinelli, C. C., Kayser, B., Binzoni, T., Cerretelli, P., Girardier, L. (1994) Autonomic nervous control of heart rate at altitude (5050 m). *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, vol. 69, no. 6, pp. 502–507. <https://doi.org/10.1007/BF00239867> (In English)
- Garkavi, L. (2015) Periodic system of unspecific adaptational reactions and its significance for theory and practice. *Cardiometry*, vol. 7. [Online]. Available at: <https://cardiometry.net/issues/no7-november-2015/unspecific-adaptational-reactions> (accessed 17.05.2022). (In English)
- Gempp, E., Blatteau, J.-E. (2010). Preconditioning methods and mechanisms for preventing the risk of decompression sickness in scuba divers: A review. *Research in Sports Medicine*, vol. 18, no. 3, pp. 205–218. <https://doi.org/10.1080/15438627.2010.490189> (In English)
- Hall, C. S. (1936) Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*, vol. 22, no. 3, pp. 345–352. <https://doi.org/10.1037/h0059253> (In English)
- Hausenloy, D. J., Candilio, L., Evans, R. et al. (2015) Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *The New England Journal of Medicine*, vol. 373, no. 15, pp. 1408–1417. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1413534> (In English)
- Heusch, G., Bötter, H. E., Przyklenk, K. et al. (2015) Remote ischemic conditioning. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 65, no. 2, pp. 177–195. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.10.031> (In English)
- Hobbins, L., Hunter, S., Gaoua, N., Girard, O. (2017). Normobaric hypoxic conditioning to maximize weight loss and ameliorate cardio-metabolic health in obese populations: A systematic review. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 313, no. 3, pp. R251–R264. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00160.2017> (In English)
- Julian, C. G. (2017) Epigenomics and human adaptation to high altitude. *Journal of Applied Physiology*, vol. 123, no. 5, pp. 1362–1370. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00351.2017> (In English)
- Karash, Yu. M., Strelkov, R. B., Chizhov, A. Ya. (1988) *Normobaricheskaya gipoksiya v lechenii, profilaktike i reabilitatsii [Normobaric hypoxia in treatment, prevention and rehabilitation]*. Moscow: Meditsina Publ., 352 p. (In Russian)
- Levine, B. D. (2002) Intermittent hypoxic training: Fact and fancy. *High Altitude Medicine and Biology*, vol. 3, no. 2, pp. 177–193. <https://doi.org/10.1089/15270290260131911> (In English)
- Lukyanova, L. D., Kirova, Yu. I. (2015) Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 9, article 320. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00320> (In English)
- Lukyanova, L. D., Kirova, Yu. I., Germanova, E. L. (2018) The role of succinate in regulation of immediate hif-1 α expression in hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 164, no. 3, pp. 298–303. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-3976-2> (In English)

- Meerson, F. Z. (1984) *Adaptation, stress, and prophylaxis*. Berlin: Springer-Verlag. 330 p (In English)
- Meerson, F. Z., Pozharov, V., Minyailenko, T. (1994) Superresistance against hypoxia after preliminary adaptation to repeated stress. *Journal of Applied Physiology*, vol. 76, no. 5, pp. 1856–1861. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.5.1856> (In English)
- Moore, L. G. (2017) Measuring high-altitude adaptation. *Journal of Applied Physiology*, vol. 123, no. 5, pp. 1371–1385. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00321.2017> (In English)
- Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, vol. 74, no. 5, pp. 1124–1136. <https://doi.org/10.1161/01.cir.74.5.1124> (In English)
- Navarrete-Opazo, A., Mitchell, G. S. (2014) Therapeutic potential of intermittent hypoxia: A matter of dose. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 307, no. 10, pp. R1181–R1197. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2014> (In English)
- Pariante, C. M., Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, vol. 31, no. 9, pp. 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006> (In English)
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M. (1985) Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 14, no. 3, pp. 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7) (In English)
- Rybnikova, E., Sitnik, N., Gluschenko, T. et al. (2006) The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats. *Brain Research*, vol. 1089, no. 1, pp. 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.053> (In English)
- Rybnikova, E., Mironova, V., Pivina, S. et al. (2007) Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats. *Neuroscience Letters*, vol. 417, no. 3, pp. 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.048> (In English)
- Rybnikova, E. A., Mironova, V. I., Pivina, S. G. et al. (2008) Hormonal mechanisms of neuroprotective effects of the mild hypoxic preconditioning in rats. *Doklady Biological Sciences*, vol. 421, no. 1, pp. 239–240. <https://doi.org/10.1134/s0012496608040054> (In English)
- Rybnikova, E., Samoilov, M. (2015) Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and postconditioning using hypobaric hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 9, article 388. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00388> (In English)
- Salvador, A. F., de Aguiar, R. A., Lisbôa, F. D. et al. (2016) Ischemic preconditioning and exercise performance: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, vol. 11, no. 1, pp. 4–14. <https://doi.org/10.1123/ijsspp.2015-0204> (In English)
- Samoilov, M., Churilova, A., Gluschenko, T. et al. (2016) Acetylation of histones in neocortex and hippocampus of rats exposed to different modes of hypobaric hypoxia: Implications for brain hypoxic injury and tolerance. *Acta Histochemica*, vol. 118, no. 2, pp. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.11.008> (In English)
- Serebrovska, T. V., Serebrovska, Z. O., Egorov, E. (2016) Fitness and therapeutic potential of intermittent hypoxia training: A matter of dose. *Fiziolohichnyi Zhurnal*, vol. 62, no. 3, pp. 78–91. <https://doi.org/10.15407/fz62.03.078> (In English)
- Serebrovska, T. V. (2002) Intermittent hypoxia research in the former Soviet Union and the commonwealth of independent States: History and review of the concept and selected applications. *High Altitude Medicine and Biology*, vol. 3, no. 2, pp. 205–221. <https://doi.org/10.1089/15270290260131939> (In English)
- Serebrovska, T. V., Nosar, V. I., Bratus, L. V. et al. (2013) Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia. *High Altitude Medicine and Biology*, vol. 14, no. 3, pp. 280–288. <https://doi.org/10.1089/ham.2013.1012> (In English)
- Serebrovska, T. V., Swanson, R. J., Kolesnikova, E. E. (2003) Intermittent hypoxia: Mechanisms of action and some applications to bronchial asthma treatment. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 54, no. 1, pp. 35–41. PMID: [15886409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15886409/) (In English)
- Sidorova, M. V., Rybnikova, E. A., Churilova, A. V. et al. (2013) Vliyanie rezhima legkoj gipobaricheskoy gipoksii na ekspressiyu factora indutsirovannogo gipoksiej v neokortekse krysa [The effect of mild hypobaric hypoxia regime on expression of factor induced by hypoxia in the rat neocortex]. *Fiziolohichnyi Zhurnal*, vol. 59, no. 6, pp. 111–115. <https://doi.org/10.15407/fz59.06.111> (In Russian).
- Strelkov, R. B., Chizhov, A. Ya. (2001) *Preryvistaya normobaricheskaya gipoksiya v profilaktike, lechenii i reabilitatsii [Intermittent normobaric hypoxotherapy in the prevention, treatment and rehabilitation]*. Ekaterinburg: Ural'skij rabochij Publ., 400 p. (In Russian)
- Vettori, A., Greenald, D., Wilson, G. K. et al. (2017) Glucocorticoids promote Von Hippel Lindau degradation and Hif-1 α stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 37, pp. 9948–9953. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705338114> (In English)
- Vinciguerra, A., Cuomo, O., Cepparulo, P. et al. (2018) Models and methods for conditioning the ischemic brain. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 310, pp. 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.09.029> (In English)
- Walf, A. A., Frye, C. A. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, vol. 2, no. 2, pp. 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44> (In English)



УДК 612.2+612.21+616.002+612.216.2

EDN CWMFVS

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-359-366>

Изменения инспираторного усилия при тяжелой гипоксии на фоне действия интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей

Е. В. Баранова^{✉1}, Ж. А. Дони́на¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Елизавета Владимировна Баранова, SPIN-код: 9319-5419, Scopus AuthorID: 57109060600, ResearcherID: J-9605-2018, ORCID: 0000-0003-1234-4575, e-mail: baranovaev@infran.ru

Жанна Альбертовна Дони́на, SPIN-код: 2809-0044, Scopus Author ID: 6603757983, ResearcherID: J-9479-2018, ORCID: 0000-0002-4451-1270, e-mail: doninazha@infran.ru

Для цитирования: Баранова, Е. В., Дони́на, Ж. А. (2022) Изменения инспираторного усилия при тяжелой гипоксии на фоне действия интерлейкина-6 и фактора некроза опухолей. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 359–366. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-359-366> EDN CWMFVS

Получена 3 июня 2022; прошла рецензирование 23 июля 2022; принята 24 июля 2022.

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

Права: © Е. В. Баранова, Ж. А. Дони́на (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Актуальной проблемой настоящего времени является выяснение роли провоспалительных цитокинов в развитии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) с сопутствующей тяжелой гипоксемией при системной воспалительной реакции (СВР). Ранее нами было установлено, что повышенный уровень циркулирующих ИЛ-1 β и ФНО- α , подавляя компенсаторную реакцию легочной вентиляции на гипоксию, является основной причиной дыхательной недостаточности и снижения выживаемости после гипоксического апноэ. ИЛ-6, напротив, не вызывает декомпенсацию дыхания при тяжелой гипоксии, однако приводит к повышению уровня летальности по сравнению с ИЛ-1 β и ФНО- α . Мы предположили, что различный характер респираторных реакций может зависеть от противоположных биологических эффектов цитокинов на генерацию инспираторного усилия, отражающего активность дыхательных мышц. С целью проверки этого предположения нами была проведена сравнительная оценка влияния внутривенного введения ИЛ-6 и ФНО- α на генерацию инспираторного усилия (внутригрудного давления) и паттерн дыхания при тяжелой гипоксии. Опыты проведены на наркотизированных крысах, гипоксию воспроизводили методом «возвратного дыхания» от нормоксии до апноэ, данные анализировали при F₁O₂ 8%. Регистрировали дыхательный объем (ДО), частоту дыхания (ЧД), минутный объем дыхания (МОД), внутригрудное давление (ВГД), процент выживаемости после гипоксического апноэ. Установлено, что максимальный прирост ВГД на гипоксию у крыс с ФНО- α составлял 30%, а в контроле и с ИЛ-6 соответствовал 200% по сравнению с нормоксией, что способствовало росту МОД. Выживаемость после гипоксического апноэ у крыс с ИЛ-6 снижалась в 5 раз по сравнению с ФНО- α . Таким образом, при тяжелой гипоксии ИЛ-6 не подавляет генерацию инспираторного усилия и активность дыхательных мышц, что не приводит к декомпенсации функции дыхания. ФНО- α способствует развитию острой дыхательной недостаточности в результате ослабления генерации инспираторного усилия и его вклада в формирование паттерна дыхания.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, острый респираторный дистресс-синдром, гипоксия, инспираторное усилие, внутригрудное давление, паттерн дыхания

Changes in inspiratory effort in severe hypoxia against the backdrop of interleukin-6 and tumor necrosis factor

E. V. Baranova^{✉1}, Zh. A. Donina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Elizaveta V. Baranova, SPIN: 9319-5419, Scopus AuthorID: 57109060600, ResearcherID: J-9605-2018, ORCID: 0000-0003-1234-4575, e-mail: baranovaev@infran.ru

Zhanna A. Donina, SPIN: 2809-0044, Scopus Author ID: 6603757983, ResearcherID: J-9479-2018, ORCID: 0000-0002-4451-1270, e-mail: doninazha@infran.ru

For citation: Baranova, E. V., Donina, Zh. A. (2022) Changes in inspiratory effort in severe hypoxia against the backdrop of interleukin-6 and tumor necrosis factor. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 359–366. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-359-366> EDN CWMFVS

Received 3 June 2022; reviewed 23 July 2022; accepted 24 July 2022.

Funding: This study was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019–2030), No. 0134-2019-0001.

Copyright: © E. V. Baranova, Zh. A. Donina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. Today, it is paramount to clarify the role of proinflammatory cytokines in the acute respiratory distress syndrome (ARDS) with severe hypoxemia and systemic inflammatory reaction (SIR). Previously, we found that an increase in the number of circulating IL-1 β and TNF- α suppressing the compensatory reaction of pulmonary ventilation to hypoxia is the main cause of respiratory failure and reduced survival after hypoxic apnea. IL-6 does not cause respiratory decompensation in severe hypoxia, instead, it increases the risk of mortality compared to IL-1 β and TNF- α . We suggested that this difference in the nature of respiratory reactions may be due to the opposite biological effects that cytokines have on the generation of inspiratory effort which is indicative of the activity of respiratory muscles. We conducted a comparative assessment of the effect of intravenous administration of IL-6 and TNF- α on the generation of inspiratory effort (intra-thoracic pressure) and the breathing pattern in hypoxia. In anesthetized rats hypoxia was reproduced by the rebreathing method from normoxia up to apnea. The data were analyzed at F₁O₂ 8%. The recorded parameters include respiratory volume (V_t), breathing frequency (BF), minute lung ventilation (MLV), esophageal pressure (Pes), and survival after hypoxic apnea. It was found that in severe hypoxia IL-6 does not suppress the generation of inspiratory effort and the activity of the respiratory muscles, hence, it does not lead to decompensation of the respiratory function. TNF- α contributes to the development of acute respiratory failure due to the weakening of the inspiratory effort and its contribution to the formation of the breathing pattern.

Keywords: proinflammatory cytokines, acute respiratory distress syndrome, hypoxia, inspiratory effort, intra-thoracic pressure, breathing pattern

Введение

В развитии нарушений, характерных для тяжелой дыхательной недостаточности с сопутствующей гипоксемией, существенную роль играет повышенная продукция провоспалительных цитокинов (Behrens, Koretzky 2017). Провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (ИЛ-6) является одним из многочисленных медиаторов системной воспалительной реакции (СВР), которая усугубляется развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) с прогрессивно нарастающей гипоксемией, в большинстве случаев приводящей к неблагоприятному исходу (Liu et al. 2020; Somers et al. 2020). ИЛ-6 классифицируется как миокин, высвобождающийся при усиленной работе

скелетных мышц, в том числе и инспираторных, обладающий про- и противовоспалительными свойствами (Petersen, Pedersen 2005). ИЛ-6 является не только маркером воспаления, но и предиктором прогрессирования патофизиологических процессов при сердечной недостаточности (Dall'Ago et al. 2006; Park et al. 2001), сепсисе (Jiang et al. 2015), обострении хронической обструктивной болезни, пневмонии (Trushina et al. 2019).

Как известно, гипоксические состояния независимо от вызывающих их причин, сопровождаются изменением паттерна дыхания, компенсаторной гипервентиляцией, в первую очередь за счет увеличения дыхательного объема и частоты дыхания с усиленным сокращением дыхательных мышц (Vaporidi et al. 2020).

В то же время активизация инспираторных мышц, обеспечивающих общее инспираторное усилие, т. е. силу сокращений мышц, участвующих во вдохе, может привести к их атрофии. Так в работе Янссена с соавторами (Janssen et al. 2005), проведенной на крысах, было установлено, что даже кратковременное влияние рекомбинантного человеческого ИЛ-6 вызывает снижение массы и кровотока в основной дыхательной мышце — диафрагме, но без нарушений ее сократительной способности. Существуют сведения, что повышенный уровень ИЛ-6 в сыворотке крови у пациентов с ОРДС и тяжелой гипоксемией коррелировал с летальным исходом в результате декомпенсации дыхания (Henry et al. 2020; Liu et al. 2020; Somers et al. 2020). Некоторые авторы дисфункцию дыхательных мышц при рестриктивном нарушении вентиляции легких связывают с повышенным уровнем циркулирующих ИЛ-6 и ФНО- α (Jiang et al. 2015; Spiesshoefer et al. 2021). Проведенная нами ранее сравнительная оценка вентиляторной реакции на нарастающую гипоксию и спонтанное восстановление дыхания после гипоксического апноэ показала, что ИЛ-6, несмотря на отсутствие признаков дыхательной декомпенсации, в 5 раз снижает выживаемость по сравнению с ФНО- α (Donina et al. 2021). Это позволило нам предположить, что ИЛ-6 и ФНО- α оказывают разнонаправленное (противоположное) влияние на функциональное состояние дыхательных мышц, от которых зависит глубина, частота дыхания и соответственно легочная вентиляция. Согласно основам биомеханики дыхания суммарная сила сокращений мышц, участвующих во вдохе, т. е. общее инспираторное усилие, характеризуется величиной плеврального давления, в качестве аналога которого при функциональной диагностике дыхательной системы используется внутрипищеводное давление (внутригрудное, ВГД). Однако нет устоявшегося мнения о сочетанном влиянии гиперцитокинемии и гипоксии на сократительную способность дыхательных мышц и степень участия внутригрудного давления в формировании паттерна дыхания.

Целью настоящей работы явилась проверка гипотезы о разнонаправленном влиянии ИЛ-6 и ФНО- α на инспираторное усилие (внутригрудное давление) и паттерн дыхания при тяжелой гипоксии.

Методика

Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегра-

тивных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург). Работа выполнена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Европейская конвенция, 19.07.2014) и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Опыты были поставлены на 24 крысах самцах Wistar массой 280–300 г, наркотизированных уретаном (1000 мг/кг, внутривенно). Животные были разделены на 3 группы: 1-ой — (контроль) вводили 1 мл 0,9% физиологического раствора (NaCl), 2-ой — фактор некроза опухолей- α (ФНО- α , 40 мг/кг, Sigma, США), 3-ей — интерлейкин-6 (ИЛ-6, 50 мкг/кг, Sigma, США).

Фоновые показатели регистрировали в условиях нормоксии, затем вводили исследуемые препараты в бедренную вену, по истечении 70 мин животным предъявляли гипоксическое воздействие, используя метод «возвратного дыхания» с непрерывным нарастанием гипоксии от нормоксии до апноэ (Donina et al. 2021). После остановки дыхания крысу отключали от гипоксического воздействия и регистрировали время спонтанного восстановления дыхания или летальность в постгипоксическом периоде в процентах по отношению к контрольной группе. Прекращение дыхательной активности в течение 1 мин приравнивали к гибели животных. Регистрацию всех показателей проводили непрерывно в ходе воздействия, а сравнительную оценку данных после окончания эксперимента проводили на уровне 8% O_2 .

Методом пневмотахографии регистрировали объемную скорость инспираторного потока. Электронная интеграция пневмотахографической кривой позволяла получить кривую дыхательных объемов — спирограмму, вычислить дыхательный объем (ДО) и частоту дыхания (ЧД). Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывали как произведение ЧД и ДО. Для измерения внутригрудного (внутриплеврального) давления (ВГД), косвенно отражающего суммарную силу сокращений дыхательных мышц, использовали баллонографический метод. Фракционное содержание O_2 во вдыхаемой смеси (F_{I,O_2}) измеряли анализатором кислорода ПГК-06 («Инсовт», Санкт-Петербург). Эвтаназию животных осуществляли передозировкой уретана.

Сигналы пневмотахограммы и внутригрудного давления обрабатывали при помощи аппаратно-программного комплекса сбора биологических данных Biograf-7 (ГУАП, Санкт-Петербург, Россия).

Для статистического анализа данных использовали программы Statistica 10.0 (Windows) и Microsoft Office Excel 2020. Оценку достоверности различий проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия принимали за статистически значимые при $p < 0,05$. Данные на рисунках и в таблице представлены в виде среднего значения \pm ошибка средней ($M \pm SE$).

Результаты

Как следует из представленной таблицы, в условиях нормоксии после инъекции крысам исследуемых препаратов достоверные изменения параметров наблюдали только в группе с ФНО- α . Так, через 70 мин вслед за введением ФНО- α увеличивались ДО и МОД при незначительном снижении ЧД. В группе с ИЛ-6 достоверных различий ДО, ЧД и МОД по сравнению

с контрольной группой не было выявлено. ВГД в обеих экспериментальных группах незначительно (на 20%) повышалось.

Дыхание гипоксической смесью F_1O_2 8% вызывало достоверные, но разнонаправленные изменения параметров внешнего дыхания в обеих экспериментальных группах. Так, у контрольной группы компенсаторный прирост МОД на гипоксию составлял $36 \pm 7\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с нормоксией (рис. 1), в основном за счет увеличения ДО на $115 \pm 11\%$ ($p < 0,001$) в результате роста ВГД на $200 \pm 11\%$ ($p < 0,001$) (рис. 2), что свидетельствовало об усилении активности инспираторных мышц.

У крыс с введением ФНО- α компенсаторный прирост МОД на гипоксию практически отсутствовал в результате падения ЧД (рис. 1) и ДО (рис. 2). Прирост ВГД в этой группе был минимальным. У крыс с ИЛ-6 при гипоксии происходили противоположные изменения. Прирост МОД превышал почти в 2 раза значения контрольной группы, что составляло $72 \pm 8\%$ ($p < 0,05$), при этом увеличение ВГД на $200 \pm 10\%$ ($p < 0,001$) приводило к росту ДО на $113 \pm 10\%$ ($p < 0,001$) по сравнению

Таблица. Влияние ФНО- α и ИЛ-6 на параметры внешнего дыхания крыс в условиях нормоксии

Показатели	Через 70 мин после введения препаратов		
	NaCl (контроль) (n = 8)	ФНО- α (n = 8)	ИЛ-6 (n = 8)
Дыхательный объем, мл	1,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2*	1,2 \pm 0,1
Частота дыхания, мин ⁻¹	83 \pm 4	78 \pm 1	79 \pm 0,1
Минутный объем дыхания, мл/мин	92,3 \pm 6,5	120,5 \pm 5,4*	95,2 \pm 4,3
Внутригрудное давление, см вод.ст.	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1

Данные представлены в виде среднего значения и ошибки средней ($M \pm SE$). * — $p < 0,05$, по сравнению с контролем (NaCl)

Table. The effect of TNF- α and IL-6 on the parameters of external respiration in rats at normoxia

Parameters	70 min after the administration of drugs		
	NaCl (control) (n = 8)	TNF- α (n = 8)	IL-6 (n = 8)
Respiratory volume, ml	1.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2*	1.2 \pm 0.1
Breathing frequency, min ⁻¹	83 \pm 4	78 \pm 1	79 \pm 0.1
Minute ventilation, ml/min	92.3 \pm 6.5	120.5 \pm 5.4*	95.2 \pm 4.3
Esophageal pressure, cm H ₂ O	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1

Data are expressed as the mean \pm SE, (n = 8 in each group). * — $p < 0.05$, compared with the control (NaCl)

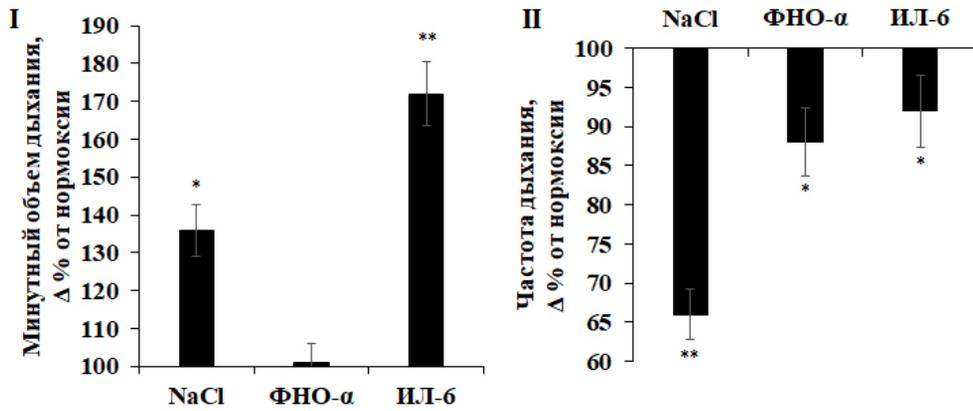


Рис. 1. Влияние ФНО-α и ИЛ-6 на компенсаторные реакции минутного объема дыхания (I) и частоты дыхания (II) при гипоксии 8% O₂. По оси абсцисс — экспериментальные группы. По оси ординат — приросты в % от нормоксии (нормоксия принята за 100%). * — p < 0,05 по сравнению с нормоксией, ** — p < 0,001 по сравнению с нормоксией

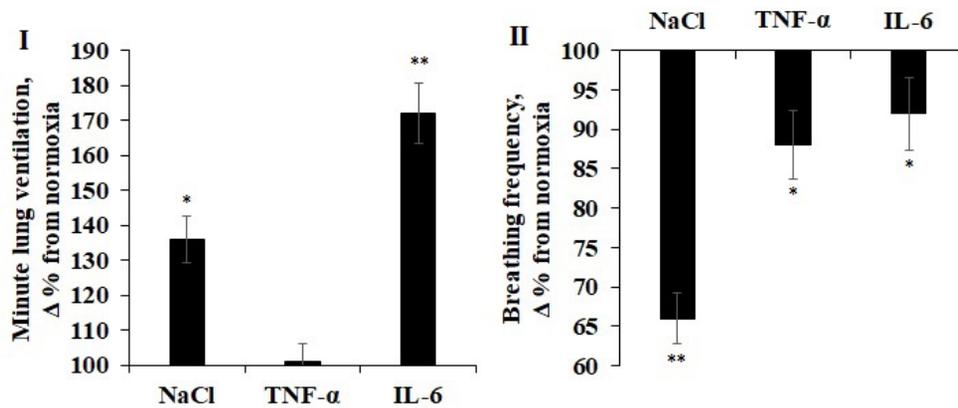


Fig. 1. Effect of TNF-α and IL-6 on compensatory response of minute lung ventilation (I) and breathing frequency (II) at hypoxia of 8% O₂. X-axis—experimental groups. Y-axis—an incremental growth in percent from normoxia, (normoxia is taken as 100%). *—p < 0.05 compared to normoxia, **—p < 0.001 compared to normoxia

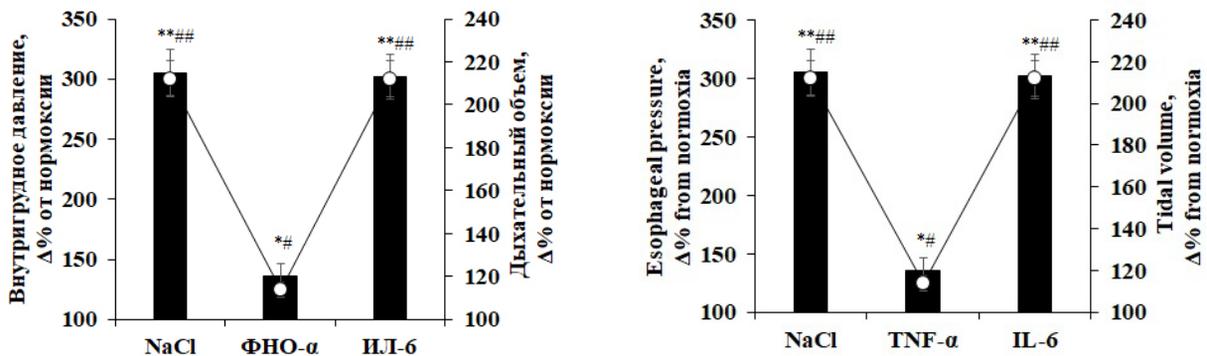


Рис. 2. Влияние ФНО-α и ИЛ-6 на взаимозависимые реакции внутригрудного давления и дыхательного объема при гипоксии 8% O₂. По оси абсцисс — экспериментальные группы. По оси ординат — приросты в % от нормоксии (нормоксия принята за 100%). По оси ординат: левая панель — внутригрудное давление (* — p < 0,05 по сравнению с нормоксией, ** — p < 0,001 по сравнению с нормоксией); правая панель — дыхательный объем (# — p < 0,05 по сравнению с нормоксией, ## — p < 0,001 по сравнению с нормоксией)

Fig. 2. Effect of TNF-α and IL-6 on the interdependent response of esophageal pressure and tidal volume at hypoxia of 8% O₂. X-axis—experimental groups. Y-axis—an incremental growth in percent from normoxia (normoxia is taken as 100%). Along the Y-axis: left panel—esophageal pressure (*—p < 0.05 compared to normoxia, **—p < 0.001 compared to normoxia); right panel—tidal volume (#—p < 0.05 compared to normoxia, ##—p < 0.001 compared to normoxia)

с нормоксией. Наряду со значительным ростом МОД, ДО и ВГД, урежение ЧД у этой группы было менее выраженным. Спонтанное восстановление дыхания (выживаемость) после гипоксического апноэ в группе с ФНО- α составляло 50%, а с ИЛ-6 только 10% по сравнению с контрольными крысами, у которых выживаемость составляла 100%.

Обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали разнонаправленное влияние цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 на компенсаторный прирост легочной вентиляции в ответ на гипоксическое воздействие. Как было установлено, при тяжелой гипоксии ФНО- α угнетает прирост МОД в то время, как у крыс с введением ИЛ-6 компенсаторный прирост легочной вентиляции возрастал в 2 раза по сравнению с контрольными животными и в 7 раз по сравнению с группой с ФНО- α .

При обсуждении причин наблюдаемых различий в реакциях внешнего дыхания следует принять во внимание, что цитокин ФНО- α экспрессируется на гломусных клетках каротидного тела, снижая их чувствительность к дефициту кислорода (Liu et al. 2009) и подавляя компенсаторный прирост МОД. Кроме того, установлено наличие рецепторов ФНО- α в ядре солитарного тракта и вентролатеральном отделе продолговатого мозга, т. е. в зонах мозга, регулирующих дыхание на уровне ЦНС (Hsieh et al. 2020; Probert 2015). Из этого следует, что ФНО- α может вовлекаться не только в центральные и периферические звенья хеморецепторной регуляции дыхания, но и угнетать электрическую активность диафрагмальных нейронов и диафрагмы. В отличие от других провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО- α), уровень ИЛ-6 не повышался ни в ткани легкого, ни в бронхоальвеолярной жидкости при моделировании острого воспаления легких (Jacono et al. 2011). В то же время ИЛ-6 классифицируется как миокин, обладающий про- и противовоспалительными свойствами, который высвобождается из функционирующей мышечной ткани, в том числе и диафрагмы при физической нагрузке (Pedersen et al. 2007; Petersen, Pedersen 2005). Противовоспалительные свойства ИЛ-6 проявляются при активном сокращении мышечных волокон, при этом дополнительно экспрессируется более мощный противовоспалительный цитокин ИЛ-10 и подавляется синтез ФНО- α (Pedersen et al. 2007).

Как видно из полученных результатов, в обеих экспериментальных группах наблюдалась

высокая степень корреляции между легочной вентиляцией и внутригрудным давлением. У крыс с ФНО- α при гипоксии отмечалось не увеличение ВГД, как у контрольной группы (на 200%), а его снижение, ВГД возросло лишь на 20–30% от уровня нормоксии. ИЛ-6 не оказывал влияния на ВГД, соответственно, не ограничивая гипоксический прирост МОД. Это означает, что ИЛ-6, в отличие от ФНО- α , не приводит к дисфункции дыхательных мышц, в том числе и диафрагмы — основной инспираторной мышцы, генерирующей общее усилие для формирования дыхательного объема и легочной вентиляции. Следовательно, можно предположить, что высокая смертность, наблюдавшаяся у пациентов с тяжелым течением ОРДС на фоне повышенного уровня ИЛ-6, не была ассоциирована с декомпенсацией функции дыхания (Somers et al. 2020). В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что ИЛ-6 может способствовать усилению липолиза, увеличивающего энергию, необходимую для повышения выносливости работающих дыхательных мышц в условиях дыхательной нагрузки. Известно, что ИЛ-6 способен проявлять противовоспалительное действие, ингибируя провоспалительный цитокин ФНО- α , который, как и ИЛ-1 β , вызывает острую дыхательную недостаточность в результате нарушения сократительной способности диафрагмы (Vassilakopoulos, Hussain 2007). Следует отметить, что ИЛ-6 представляет собой не только маркер воспалительной реакции, но и является биомаркером прогнозирования риска сердечно-сосудистых заболеваний (Moriya 2019). Показано, что при инфаркте миокарда в значительной степени повышен уровень ИЛ-6 (Zhang et al. 2005), также существует корреляция между повышенным уровнем ИЛ-6 и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний (Harris et al. 1999). Следовательно, негативное влияние ИЛ-6 на сердечно-сосудистую систему с сопутствующей артериальной гипоксемией могло привести к необратимым последствиям (Takagishi et al. 2010; Verity et al. 2020).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что совместное действие ФНО- α и тяжелой гипоксии способствует развитию острой дыхательной недостаточности в результате снижения активности дыхательных мышц, тогда как ИЛ-6 не оказывает влияния на генерацию инспираторного усилия и не приводит к декомпенсации функции дыхания. Более высокая смертность крыс в группе с ИЛ-6, чем с ФНО- α , по всей вероятности, могла быть связана со стремитель-

ным нарастанием артериальной гипоксемии и гипотонии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов, связанного с публикацией данной статьи.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Все процедуры, которым подвергали животных при подготовке к экспериментам и при их проведении, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, директиве Совета Европы 2010/63EU Европейского парламента о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Ethics Approval

All procedures to which animals were subjected in preparation for experiments and during their

conduct corresponded to ethical standards approved by laws and regulations of the Russian Federation, Council of Europe Directive 2010/63eu of the European Parliament on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, as well as recommendations of the Commission for the Control of the Maintenance and Use of Laboratory Animals at the I. P. Pavlov Institute of Physiology, RAS.

Вклад авторов

а. Елизавета Владимировна Баранова — идея работы, проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка графического материала и рукописи;

б. Жанна Альбертовна Дони́на — идея работы, планирование экспериментов, редактирование рукописи.

Author Contributions

a. Elizaveta V. Baranova designed the research concept, conducted experiments, processed the results, prepared figures and tables and drafted the manuscript;

b. Zhanna A. Donina designed the research concept, planned the experiments and edited the manuscript.

References

- Behrens, E. M., Koretzky, G. A. (2017) Review: Cytokine storm syndrome: Looking toward the precision medicine era. *Arthritis and Rheumatol*, vol. 69, no. 6, pp. 1135–1143. <https://doi.org/10.1002/art.40071> (In English)
- Dall'Ago, P., Chiappa, G. R. S., Guths, H. et al. (2006) Inspiratory muscle training in patients with heart failure and inspiratory muscle weakness: A randomized trial. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 47, no. 4, pp. 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.052> (In English)
- Donina, Zh. A., Baranova, E. V., Aleksandrova, N. P. (2021) Sravnitel'naya otsenka vliyaniya osnovnykh mediatorov ostrofazovogo otveta (IL-1, FNO- α i IL-6) na pattern dykhaniya i vyzhivaemost' krysa pri ostroj narastayushchej gipoksii [Comparative assessment of the effect of the main mediators of acute phase response (IL-1, TNF- α and IL-6) on breathing pattern and survival in rats with acute progressive hypoxia]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal imeni I. M. Sechenova*, vol. 107, no. 8, pp. 996–1006. <https://doi.org/10.31857/S0869813921080045> (In Russian)
- Harris, T. B., Ferrucci, L., Tracy, R. P. et al. (1999) Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *American Journal of Medicine*, vol. 106, no. 5, pp. 506–512. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(99\)00066-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(99)00066-2) (In English)
- Henry, B. M., de Oliveira, M. H. S., Benoit, S. et al. (2020) Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine*, vol. 58, no. 7, pp. 1021–1028. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369> (In English)
- Hsieh, Y.-H., Litvin, D. G., Zaylor, A. R. et al. (2020) Brainstem inflammation modulates the ventilatory pattern and its variability after acute lung injury in rodents. *The Journal of Physiology*, vol. 598, no. 13, pp. 2791–2811. <https://doi.org/10.1113/JP279177> (In English)

- Jacono, F. J., Mayer, C. A., Hsieh, Y-H., et al. (2011) Lung and brainstem cytokine levels are associated with breathing pattern changes in a rodent model of acute lung injury. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, vol. 178, no. 3, pp. 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.04.022> (In English)
- Janssen, S. P. M., Gayan-Ramirez, G., Bergh, A. V. et al. (2005) Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation*, vol. 111, no. 8, pp. 996–1005. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000156469.96135.0D> (In English)
- Jiang, J., Yang, B., Han, G. et al (2015) Early administration of cisatracurium attenuates sepsis-induced diaphragm dysfunction in rats. *Inflammation*, vol. 38, no. 1, pp. 305–311. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0034-8> (In English)
- Liu, B. W., Li, M., Zhou, Z. G. et al. (2020) Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *Journal of Autoimmunity*, vol. 111, article 102452. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102452> (In English)
- Liu, X., He, L., Stensaas, L. et al. (2009) Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 296, no. 2, pp. 158–166. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90597.2008> (In English)
- Moriya, J. (2019) Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *Journal of Cardiology*, vol. 73, no. 1, pp. 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2018.05.010> (In English)
- Park, W. Y., Goodman, R. B., Steinberg, K. P. et al. (2001) Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 10, pp. 1896–1903. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.10.2104013> (In English)
- Pedersen, B. K., Akerstrom, T. C. A., Nielsen, A. R., Fischer, C. P. (2007) Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology*, vol. 103, no. 3, pp. 1093–1098. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00080.2007> (In English)
- Petersen, A. M., Pedersen, B. K. (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, vol. 98, no. 4, pp. 1154–1162. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004> (In English)
- Probert, L. (2015) TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, vol. 302, pp. 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038> (In English)
- Somers, E. C., Eschenauer, G. A., Troost, J. P. et al. (2020) Tocilizumab for treatment of mechanically ventilated patients with COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 73, no. 2, pp. e445–e454. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa954> (In English)
- Spiesshoefer, J., Henke, C., Kabitz, J. H. et al. (2021) Heart failure results in inspiratory muscle dysfunction irrespective of left ventricular ejection fraction. *Respiration*, vol. 100, no. 2, pp. 96–108. <https://doi.org/10.1159/000509940> (In English)
- Takagishi, M., Waki, H., Bhuiyan, M. E. et al. (2010) IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarius attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 298, no. 1, pp. 183–190. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00176.2009> (In English)
- Trushina, E. Yu., Kostina, E. M., Molotilov, B. A. et al. (2019) Rol' tsitokinov IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 v immunopatogeneze khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkikh [Role of il-4, il-6, il-8, il-10 cytokines in the immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, vol. 21, no. 1, pp. 89–98. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-89-98> (In Russian)
- Vaporidi, K., Akoumianaki, E., Teliass, I. et al (2020) Respiratory drive in critically ill patients. Pathophysiology and clinical implications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 201, no. 1, pp. 20–32. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0596SO> (In English)
- Vassilakopoulos, T., Hussain, S. N. (2007) Ventilatory muscle activation and inflammation: cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide. *Journal Applied Physiology*, vol. 102, no. 4, pp. 1687–1695. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01273.2006> (In English)
- Verity, R., Okell, L., Dorigatti, I., Winskill, P. et al. (2020) Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: A model-based analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 20, no. 6, pp. 669–677. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30243-7) (In English)
- Zhang, J., Cheng, X., Liao, Y. H. et al. (2005) Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 19, no. 1, pp. 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10557-005-6893-3> (In English)



УДК 57.017.647; 612.133; 616.053

EDN FVMZMV

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377>

Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пиальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс

О. П. Горшкова^{✉1}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторе

Оксана Петровна Горшкова, SPIN-код: 6372-0076, Scopus AuthorID: 24491430500, ResearcherID: J-4850-2018, ORCID: 0000-0002-8026-6161, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Для цитирования: Горшкова, О. П. (2022) Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пиальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 367–377. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377> EDN FVMZMV

Получена 27 июня 2022; прошла рецензирование 24 сентября 2022; принята 25 сентября 2022.

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

Права: © О. П. Горшкова (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях [лицензии CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Аннотация. Изучали возрастные изменения роли NO, синтезируемого различными формами синтаз оксида азота (NOS), и экзогенного L-аргинина в ацетилхолин-опосредованной дилатации сосудов головного мозга у крыс. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки проведена сравнительная оценка реакций пиальных артерий различных диаметров на воздействие ацетилхолин хлорида (АХ, 10^{-7} М, 8 мин) в отсутствии и на фоне блокады NOS и воздействия экзогенного L-аргинина (0,25 мМ, 30 мин) у крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 и 18 месяцев. Блокаду NOS производили путем применения неселективного ингибитора NOS (L-NAME, 10^{-3} М, 12 мин) и ингибитора индуцибельной NOS (аминогуанидин, 1 мМ, 10 мин). Оценивали изменение числа и степени дилатации артерий, измеряя ширину потока эритроцитов в трех отдельных группах артерий: мелких (диаметр менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Установлено, что к 18 месяцам у крыс снижается роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в осуществлении АХ-опосредованных эндотелий-зависимых дилататорных реакций пиальных артерий мелких и средних диаметров и усиливается роль данного механизма в дилатации крупных пиальных артерий. Одновременно повышается роль индуцибельной NOS в дилатации артерий всех исследованных диаметров. Эти процессы сопровождаются снижением биодоступности экзогенного L-аргинина для NOS.

Ключевые слова: старение, эндотелиальная дисфункция, пиальные сосуды, NO-опосредованная дилатация, синтазы оксида азота

Mechanism of NO-mediated dilation of pial arteries in response to acetylcholine in aging rats

O. P. Gorshkova^{✉1}

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Author

Oksana P. Gorshkova, SPIN: 6372-0076, Scopus AuthorID: 24491430500, ResearcherID: J-4850-2018, ORCID: 0000-0002-8026-6161, e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

For citation: Gorshkova, O. P. (2022) Mechanism of NO-mediated dilation of pial arteries in response to acetylcholine in aging rats. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 367–377. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-367-377> EDN FVMZMV

Received 27 June 2022; reviewed 24 September 2022; accepted 25 September 2022.

Funding: This study was supported by Government Program of the Russian Federation 47 GP “Scientific and Technological Development of the Russian Federation” (2019–2030), No. 0134-2019-0001.

Copyright: © O. P. Gorshkova (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The article reports the results of the study focusing on age-related changes in the contribution of NO, synthesized by various forms of nitric oxide synthases (NOS) and exogenous L-arginine in acetylcholine-induced dilation of cerebral vessels in rats. A comparative assessment of the responses of pial arteries of various diameters to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 8 min) was carried in the absence and in the presence of NOS blockade and exogenous L-arginine (0.25 mM, 30 min) in Sprague-Dawley rats aged 4 and 18 months. NOS blockade was performed by using a non-selective NOS inhibitor (L-NAME, 10^{-3} M, 12 min) and an inducible NOS inhibitor (aminoguanidine, 1 mM, 10 min). The change in the number and degree of arterial dilation was assessed by measuring the width of the erythrocyte flow in three separate groups of arteries: small (<20 μ m in diameter), medium (20–40 μ m), and large (>40 μ m). It was found that in 18-month-old rats, the contribution of NO, synthesized by constitutive forms of NOS, decreases in the implementation of ACh-mediated endothelium-dependent dilatatory reactions in small and medium pial arteries, while an increase was observed for pial. At the same time, the contribution of inducible NOS to dilation of all types of arteries is on the increase. These processes are accompanied by a decrease in the bioavailability of exogenous L-arginine for NOS.

Keywords: aging, endothelial dysfunction, pial vessels, NO-mediated dilation, nitric oxide synthases

Введение

Церебро-вазкулярные заболевания являются ведущими причинами смертности и инвалидизации населения (Cuadrado-Godia et al. 2018). Эпидемиологические исследования однозначно показывают (Arvanitakis et al. 2016; Ungvari et al. 2018; Xu et al. 2022), что доминирующим фактором риска их развития является возраст. Механизмы, которые инициируют изменения в стареющей сосудистой сети, в настоящее время находятся в центре внимания все большего количества исследователей. Важным модулятором связанных с возрастом сосудистых изменений признана дисфункция сосудистого эндотелия (Cuadrado-Godia et al. 2018; Xu et al. 2022). Основные клеточные и молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в стареющем организме до конца не выяснены. Одним из основных ее проявлений является снижение реакции сосудов на сосудорасширяющие агенты и, в частности, на ацетилхолин (АХ). Снижение

эндотелий-зависимой вазодилатации при старении во многом связывают с нарушением NO-опосредованной регуляции сосудистых реакций, в основе которого лежит изменение уровня и/или снижение биодоступности NO (Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). Ограниченная биодоступность NO может быть опосредована изменением активности синтаз оксида азота (NOS) (Luiking et al. 2012; Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). В настоящее время выделяют три изоформы NOS (Fujii et al. 2016; Gambardella et al. 2020; Pozhilova, Novikov 2015). Две конститутивных (нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS)), которые постоянно присутствуют в соответствующих клетках, и третья индуцибельная (iNOS), которая синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку. В норме в эндотелии сосудов головного мозга NO преимущественно генерируется при участии eNOS (Cernadas et al. 1998; de Silva, Faraci 2020). Однако в кровеносных сосудах стареющих животных была показана способ-

ность продуцировать NO и в присутствии другой изоформы NOS — индуцибельной (Cernadas et al. 1998; Fujii et al. 2016). В то время как активация eNOS генерирует небольшие количества NO в течение коротких периодов времени, стимуляция iNOS приводит к замедленному и длительному высвобождению больших количеств NO. Некоторые экспериментальные работы показали, что активность eNOS заметно ингибируется самим NO, тогда как активность iNOS в меньшей степени зависит от концентрации NO (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998). Поэтому NO, высвобождаемый в больших количествах при участии iNOS, может быть вовлечен в снижение активности eNOS и нарушение NO-опосредованной вазодилатации при старении. Важным фактором возрастного снижения активности eNOS может быть также изменение в системе L-аргинин/NO. L-аргинин — аминокислота, которая в эндотелии сосудов метаболизируется синтазой оксида азота с образованием NO и L-цитрулина (Bierhansl et al. 2017; Mazlan et al. 2017; Morris 2007; Shin et al. 2011). Недостаточное снабжение L-аргинином может приводить к снижению выработки NO, увеличению генерации супероксида эндотелиальной NOS и развитию эндотелиальной дисфункции (Berkowitz et al. 2003; Katusic 2007; Santhanam et al. 2008).

Считается, что относительный вклад дисрегулирующих механизмов в сосудистую патологию при старении может быть видозависимым. Кроме того, возрастные изменения вклада различных механизмов в регуляцию сосудистых реакций могут варьировать в зависимости от сосудистого русла и размера сосудов (de Silva, Faraci 2020; Santhanam et al. 2008). В данной работе изучали возрастные изменения роли NO, синтезируемого различными формами синтаз оксида азота, и экзогенного L-аргинина в AX-опосредованной дилатации сосудов головного мозга у крыс. В задачи исследования входило сравнение реакций пиальных артерий различных диаметров на воздействие AX в отсутствие и на фоне блокады конститутивных и индуцибельной форм NOS и введения экзогенного L-аргинина у крыс в возрасте 4 и 18 месяцев.

Методика

Эксперименты проведены на самцах крыс *Sprague-Dawley* из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем»

(Санкт-Петербург) в возрасте 4 (n = 27, массой 290 ± 60 г) и 18 месяцев (n = 29, массой 450 ± 70 г). Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требованиям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Хирургическая подготовка животных

Крыс наркотизировали зоветилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). Для обеспечения свободного дыхания животному устанавливали трахеостому. В правую бедренную артерию вводили катетер, заполненный гепаринизированным физиологическим раствором (50 ед/мл). Голову животного фиксировали в горизонтальном положении. В теменной области черепа высверливали отверстие (S ≈ 1 см²), твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Температуру тела животного поддерживали на уровне +37 °С.

Регистрация артериального давления

На протяжении всего эксперимента у животных проводили прямое измерение артериального давления (АД) через катетер в бедренной артерии. Катетер соединяли с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производили с помощью программы по классической формуле:

$$P_{cp} = P_A + 1/3 (P_c - P_A),$$

где P_{cp} — среднее артериальное давление (мм рт. ст.), P_c — систолическое давление (мм рт. ст.), P_A — диастолическое давление (мм рт. ст.).

В течение всего эксперимента показатели среднего АД оставались примерно на одном уровне и у крыс в возрасте 4 месяцев составляли 138 ± 5 мм рт. ст., а в возрасте 18 месяцев — 143 ± 4 мм рт. ст.

Прижизненная микротомосъемка сосудов

Пиальные артерии визуализировали через отверстие в теменной области черепа с помощью оригинальной установки, включающей стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM («Микромед», Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа Basler acA 4600 – 10uc (Германия) и персональный компьютер. При регистрации фоновых значений поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120,4; KCl 5,9; NaHCO₃ 15,5; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaH₂PO₄ 1,2; глюкоза 11,5; pH 7,4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в водяном термостате (ТW-2, SIA «ELMI», Латвия) при температуре +37 °С.

Экспериментальный протокол

У всех крыс исследовали реакцию пиальных артерий на орошение поверхности головного мозга раствором АХ (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich, 10⁻⁷ М, 8 мин). После воздействия АХ поверхность головного мозга в течение 15 мин отмывали раствором Кребса. Этого времени было достаточно для полной отмывки и достижения исходных значений размеров исследуемых сосудов. Индуцированную АХ дилатацию считали базовой реакцией (100% дилатаций), и с ней сравнивали результаты, полученные при дальнейшем исследовании. Изучение роли NOS и L-аргинин/NO-опосредованной системы в дилатации пиальных артерий на воздействие АХ проводили в отдельных сериях эксперимента.

Оценка роли NOS в АХ-опосредованной дилатации

У крыс в возрасте 4 (n = 8) и 18 (n = 10) месяцев после воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности головного мозга раствором неселективного блокатора NOS метилового эфира нитро-L-аргинина (L-NAME, ICN Biomed. Inc, 10⁻³ М) в течение 12 мин с последующим добавлением АХ (8 мин) в раствор блокатора. Сравнивали реакции артерий на АХ до и на фоне применения L-NAME.

Оценка роли iNOS в АХ-опосредованной дилатации

У крыс в возрасте 4 (n = 7) и 18 (n = 7) месяцев после воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности мозга раствором селективного блокатора iNOS амингуанидина (AG) (ICN Biomed. Inc, 1 мМ) в течение 10 мин с последующим добавлением

АХ (8 мин) в раствор блокатора. Сравнивали реакции пиальных артерий на воздействие АХ до и на фоне применения АГ.

Исследование роли L-аргинин/NO-опосредованной системы в дилатации в ответ на воздействие АХ

У крыс в возрасте 4 (n = 7) и 18 (n = 6) месяцев исследовали влияние экзогенного L-аргинина на характер АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артерий. Сравнивали реакции артерий на АХ до и после воздействия раствора L-аргинина (ICN Biomed. Inc, 0,25 мМ, 30 мин (Xiong et al. 2014)).

Отдельно у крыс в возрасте 4 (n = 5) и 18 (n = 6) месяцев исследовали АХ-опосредованные реакции сосудов, подвергнутых воздействию L-аргинина, на фоне предварительного применения блокатора iNOS. После воздействия АХ и отмывки раствором Кребса проводили орошение поверхности мозга раствором АГ в течение 10 мин с последующим последовательным добавлением L-аргинина (30 мин) и АХ (8 мин) в раствор блокатора.

Измерения и оценка реакции сосудов

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью компьютерной программы для фотометрии «Blood Vessel Media Analyzer» (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрены режимы увеличения и контрастирования изображения и калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Изменение вклада исследуемых механизмов в дилатацию оценивали путем сравнения числа дилатированных артерий и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокаторов и L-аргинина.

Изменение количества расширившихся и сузившихся артерий на воздействие выражали в процентах относительно общего числа исследованных артерий в группе. Степень дилатации ΔД оценивали как разность между значениями диаметра после (Δ2) и до (Δ1) воздействия АХ относительно диаметра сосуда Δ1 перед воздействием АХ, %:

$$\Delta D = (\Delta 2 - \Delta 1) / \Delta 1 \times 100$$

Изменения диаметра в покое не превышали 5,0 ± 0,5%, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Проведено измерение 898 участков пиальных артерий диаметром от 9 до 78 мкм у крыс в возрасте 4 месяцев и 864 участков — у 18-месячных крыс (диаметр от 10 до 63 мкм). У каждой крысы было измерено от 30 до 65 участков сосудов. В литературе имеются сведения о том, что возрастные изменения вклада NO-опосредованных механизмов в регуляцию сосудистых реакций могут варьировать в зависимости от размера сосуда в исследуемом сосудистом русле (Santhanam et al. 2008). Поэтому для последующего анализа измеренные участки сосудов были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие (диаметром до 20 мкм), средние (от 20 до 40 мкм) и крупные (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного и использовали для статистических сравнений.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 («GraphPad Software Inc.», США). Проверку экспериментальных данных на нормальное распределение проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Во всех случаях исследование на нормальность распределения показало его отсутствие хотя бы для одной из

сравниваемых выборок, поэтому статистический анализ полученных данных проводили с использованием непараметрических методов. Для сравнения средних данных независимых выборок при сравнении более двух групп использовали U-критерий Манна — Уитни. При сравнении большего числа групп применяли критерий Краскела — Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты

У крыс в возрасте 4 месяцев орошение поверхности головного мозга раствором АХ вызывало дилатацию $52,81\% \pm 5,73\%$ исследованных пиальных артерий. Преимущественно расширялись артерии диаметром менее 20 мкм ($56,33 \pm 4,08\%$ исследованных артерий данного диаметра) (рис. 1А). Амплитуда реакции составляла в среднем $32,47 \pm 0,9\%$ (рис. 1Б). Число расширившихся средних и крупных артерий составило в среднем около 40% (рис. 1А). Амплитуда дилататорной реакции на АХ с увеличением диаметра достоверно снижалась и у крупных артерий составляла $13,79 \pm 1,01\%$ (критерий Краскела — Уоллиса, $KW = 12,3$, $p < 0,001$, рис. 1Б).

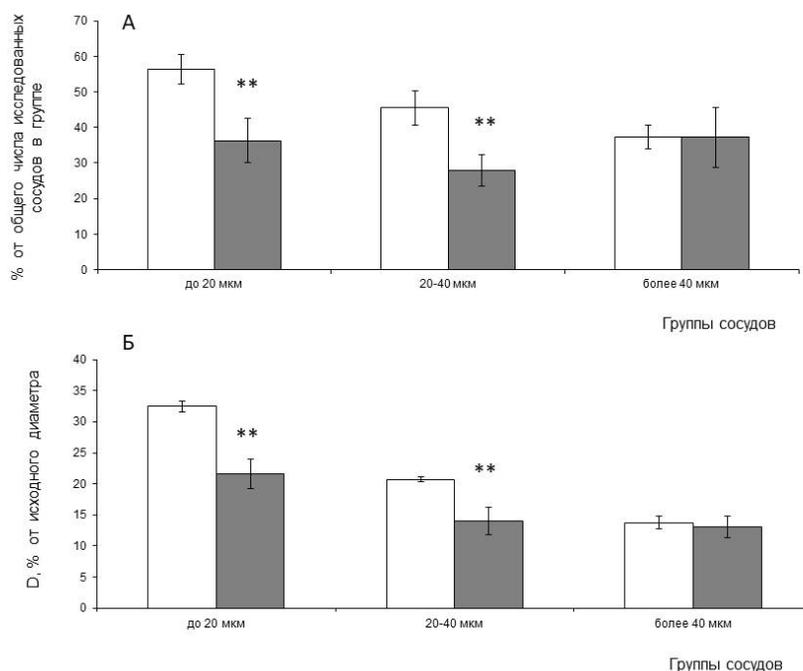


Рис. 1. Дилататорная реакция пиальных артерий на воздействие АХ. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилататорной реакции (диаметр сосуда после воздействия АХ, % от исходного диаметра). Светлая заливка — крысы в возрасте 4 месяцев; темная заливка — крысы в возрасте 18 месяцев. ** — различия статистически значимы при $p < 0,01$ (U-критерий Манна — Уитни)

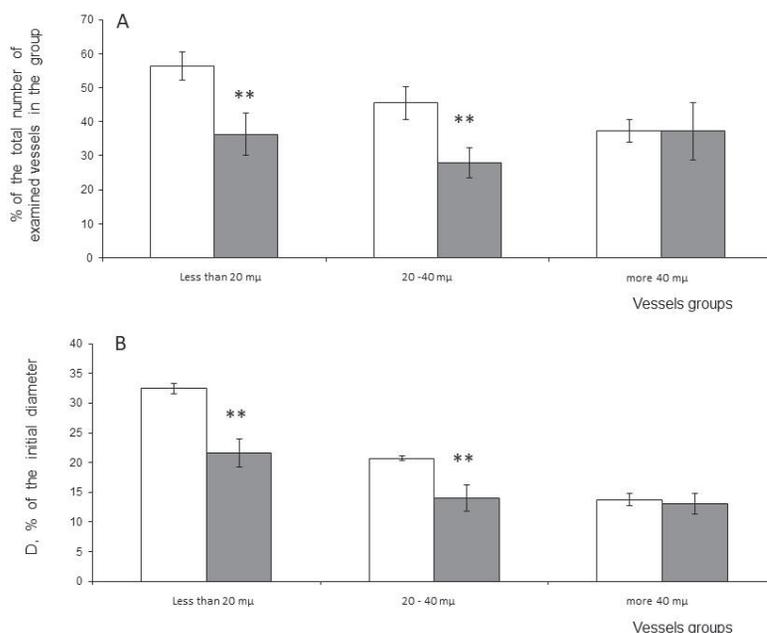


Fig. 1. Dilatory response of pial arteries to ACh. A—number of dilations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. White columns—4-month-old rats; dark columns—18-month-old rats. **—significant differences; $p < 0.01$ (Mann—Whitney U-test)

Применение L-NAME уменьшало число дилатаций артерий всех исследованных диаметров на воздействие AX в среднем примерно в 2 раза (рис. 2А). У мелких артерий также снижалась

амплитуда дилататорной реакции (в среднем на 35,11%, рис. 2Б). AG достоверно не изменяла число и амплитуду AX-опосредованных дилатаций (рис. 2).

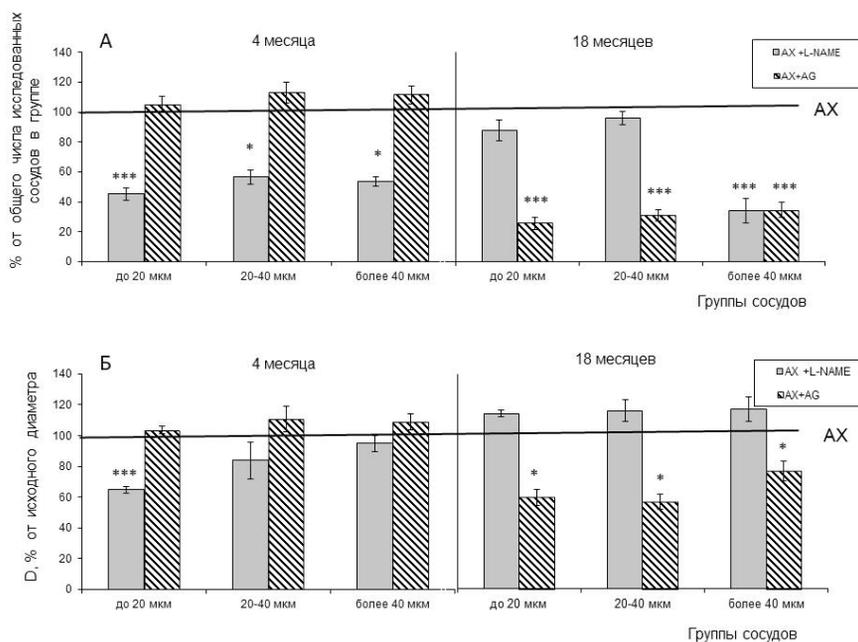


Рис. 2. Изменение дилататорной реакции пияльных артерий разных диаметров на воздействие AX на фоне применения блокаторов NOS. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилататорной реакции (диаметр сосуда после воздействия AX, % от исходного диаметра). Линия — дилататорная реакция сосудов в группе на введение AX без применения блокатора, принятая за 100%. * — различия статистически значимы; * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ (U-критерий Манна — Уитни)

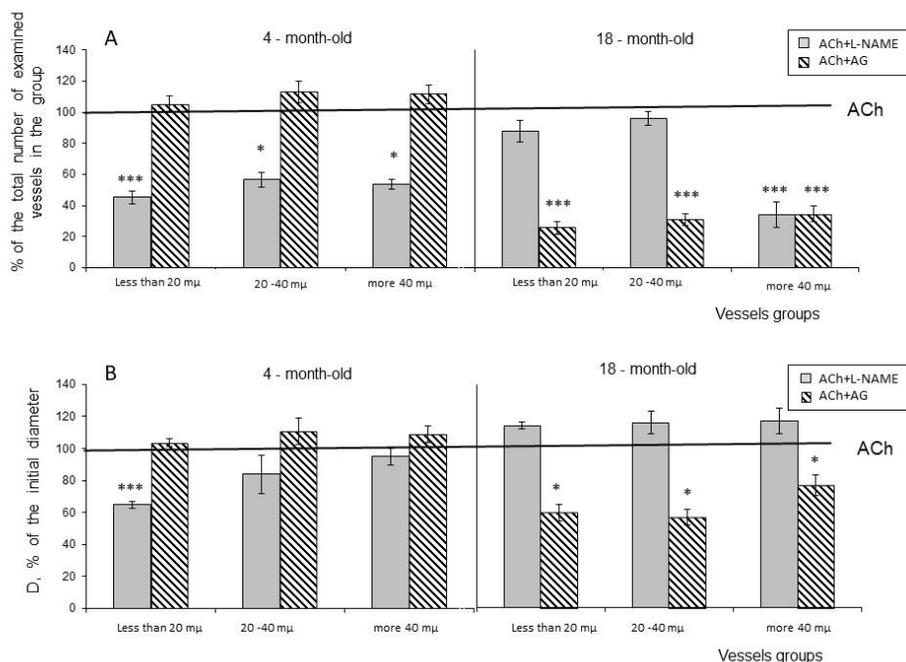


Fig. 2. Dilatory response of pial arteries of different diameter to ACh in the presence of NOS blockers. A—number of dilations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. Solid line—reaction of vessels group to the introduction to ACh without a blocker, taken as 100%. *—significant differences; *— $p < 0.05$, ***— $p < 0.001$ (Mann—Whitney U-test)

Предварительное орошение поверхности головного мозга раствором L-аргинина у молодых крыс изменяло дилататорную реакцию на воздействие АХ только у крупных артерий (число расширившихся артерий увеличилось в среднем на 31,52%, амплитуда дилатации увеличилась в среднем на 68,29%, рис. 3). При этом добавление АГ в раствор АХ не изменяло число и амплитуду АХ-опосредованных дилатаций пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина (рис. 3).

Старение уменьшало дилататорную реакцию пиальных артерий на воздействие АХ. У крыс в возрасте 18 месяцев, по сравнению с 4-месячными животными, было отмечено уменьшение числа (в среднем на 35%, рис. 1А) и амплитуды АХ-опосредованных дилатаций (в среднем на 30%) мелких и средних артерий (рис. 1Б).

Применение L-NAME у крыс в возрасте 18 месяцев вызывало уменьшение числа дилатаций на АХ только у артерий диаметром более 40 мкм (в среднем на 65,55%) без изменения амплитуды дилатации (рис. 2). АГ уменьшал число (в среднем на 65-70%) и амплитуду

(в среднем на 40%) АХ-опосредованных дилататорных реакций артерий всех исследованных диаметров (рис. 2).

Орошение поверхности мозга раствором L-аргинина у 18-месячных крыс уменьшало число дилатаций на воздействие АХ артерий всех диаметров в среднем на 40% (рис. 3А). У мелких и крупных артерий также снижалась амплитуда дилатаций (на 20% и 45% соответственно, рис. 3Б). Добавление АГ изменяло АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина. У мелких артерий увеличивалось число дилатаций на воздействие АХ до уровня значений, полученных без применения L-аргинина. Число дилатаций средних артерий увеличивалось в среднем на 25%. Амплитуда дилатации мелких и средних артерий при этом достоверно не изменялась (рис. 3). Число АХ-опосредованных дилатаций крупных артерий на фоне применения АГ снижалось примерно в два раза, а амплитуда дилатации увеличивалась и достигала значений в среднем на 40% превышающих показатели, полученные без применения L-аргинина (рис. 3).

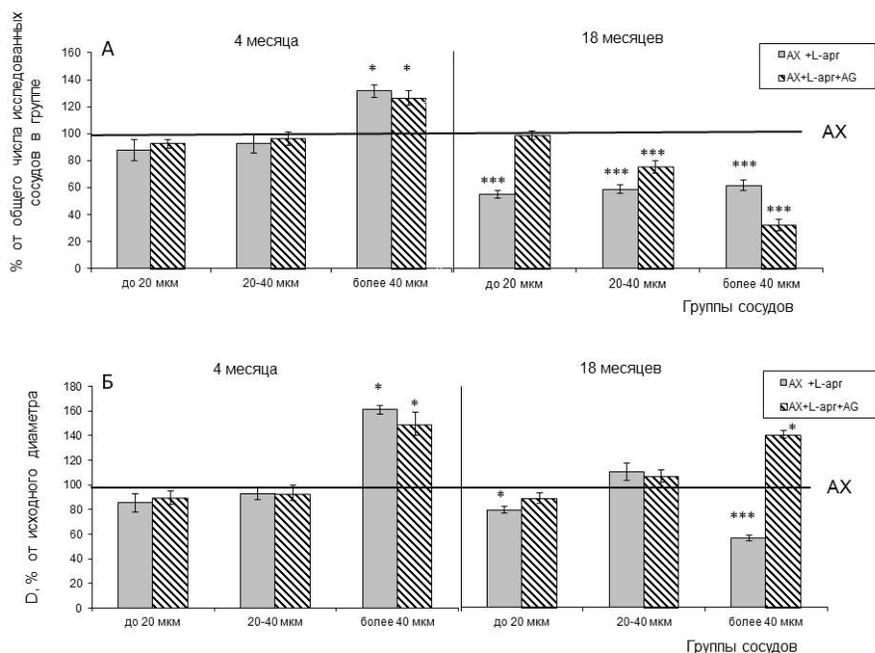


Рис. 3. Изменение дилаторной реакции пиларных артерий различных диаметров на воздействие ацетилхолина на фоне применения L-аргинина. А — число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов в группе), Б — амплитуда дилаторной реакции (диаметр сосуда после воздействия АХ, % от исходного диаметра). Линия — дилаторная реакция сосудов в группе на введение АХ без L-аргинина, принятая за 100%. * — различия статистически значимы; * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$ (U-критерий Манна — Уитни)

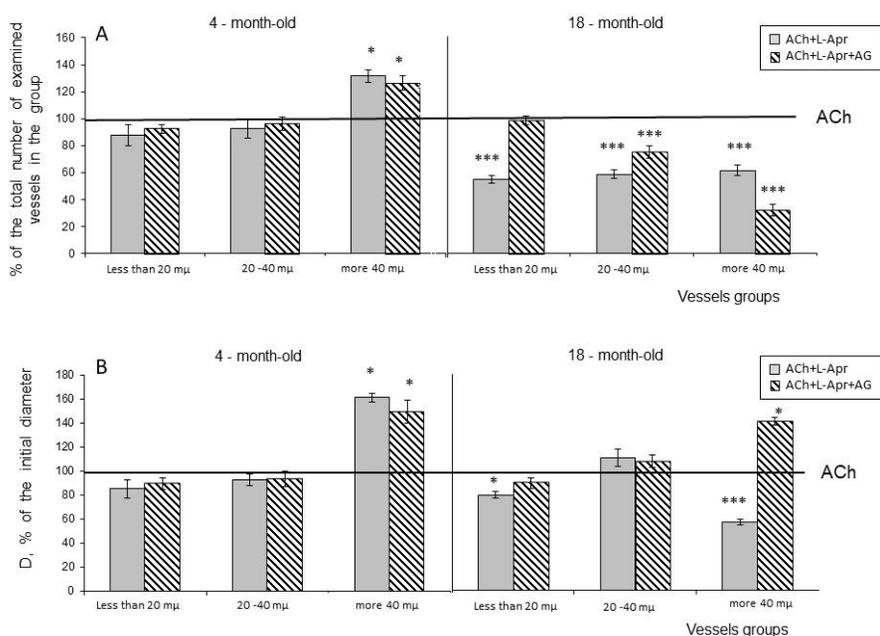


Fig. 3. Dilatory response of pial arteries of different diameter to ACh in the presence of L-arginine. A—number of dilatations, % of the total number of examined vessels in the group, B—vascular diameter after ACh exposure, % of the initial diameter. Solid line—reaction of vessels group to the introduction to ACh without L-arginine, taken as 100%. *—significant differences; *— $p < 0.05$, ***— $p < 0.001$ (Mann—Whitney U-test)

Обсуждение результатов

Исследование показало, что старение приводит к нарушению АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий у крыс. К 18 месяцам число и амплитуда дилататорных ответов на АХ снижаются в среднем на 30–35%. АХ стимулирует NOS, генерирующие NO, который диффундирует в нижележащие гладкомышечные клетки, вызывая расслабление за счет увеличения производства цГМФ, что приводит к АХ-индуцированной вазодилатации (Olchanheski et al. 2018). В литературе имеются сведения о том, что уменьшение вазодилатации при старении может быть связано с нарушением NO-зависимой регуляции сосудистых реакций (Mistry et al. 2002; Sindler et al. 2009). В основе этого нарушения может лежать снижение биодоступности NO, опосредованное изменением активности синтаз оксида азота: снижением активности eNOS и усилением активности iNOS (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998).

В наших экспериментах применение L-NAME (неселективного ингибитора NO-синтаз) у молодых крыс уменьшало число и амплитуду дилататорной реакции на воздействие АХ артерий всех исследованных диаметров примерно в равной степени. В то же время AG (селективный ингибитор iNOS (Cinelli et al. 2020)) достоверно не изменял дилатацию пиальных артерий на АХ. В норме в эндотелии сосудов NO преимущественно генерируется при участии одной из форм конститутивных синтаз оксида азота — eNOS (Cernadas et al. 1998). Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что у молодых крыс значительную роль в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий всех исследованных диаметров играет NO, синтезируемый eNOS.

У крыс в возрасте 18 месяцев L-NAME уменьшал число дилататорных реакций на АХ только у крупных артерий. Причем по сравнению с реакциями у более молодых животных снижение АХ-опосредованной дилатации крупных артерий на фоне применения L-NAME у стареющих крыс было выражено в большей степени. Роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в вазодилатации на АХ артерий меньших диаметров у 18-месячных крыс, по сравнению с более молодыми животными, снижалась. AG уменьшал число (в среднем на 65–70%) и амплитуду АХ-опосредованных дилататорных реакций всех исследованных артерий (в среднем на 40%). Следовательно, в отличие от полученных другими исследователями результатов (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998;

Gambardella et al. 2020; Toth et al. 2017), которые указывают на снижение роли NO-опосредованных механизмов в дилатации мозговых артерий при старении, нами обнаружено, что у крыс в возрасте 18 месяцев роль NO в АХ-опосредованной дилатации крупных пиальных артерий (диаметром более 40 мкм) усиливается. Такие противоречия могут быть связаны с видовыми или регионарными различиями. Также недавние исследования (Toth et al. 2017) показали, что эндотелиальная дисфункция играет решающую роль в вызванном старением нарушении мгновенной адаптации регионального мозгового кровотока к изменениям активности нейронов. Возможно, что в условиях снижения роли NO-опосредованной регуляции в эндотелий-зависимой дилатации мелких пиальных артерий обнаруженное нами усиление роли NO в дилатации более крупных сосудов может быть проявлением адаптивных процессов, направленных на поддержание нормального кровоснабжения стареющего мозга.

Усиление активности iNOS и продуцирование чрезмерного количества NO может приводить к ограничению доступности L-аргинина, общего субстрата для всех ферментов NOS (Fujii et al. 2016). Производство NO из eNOS в первую очередь определяется внеклеточной биодоступностью L-аргинина (Tang et al. 2009; Xiong et al. 2014). В наших экспериментах предварительное орошение поверхности головного мозга раствором L-аргинина у молодых крыс приводило к достоверному увеличению числа и амплитуды АХ-опосредованных дилатаций только крупных пиальных артерий. У крыс в возрасте 18 месяцев число и амплитуда дилататорных реакций на АХ всех исследованных артерий на фоне применения L-аргинина снижались. Это может быть связано с тем, что у стареющих животных дополнительное введение L-аргинина, помимо активации eNOS, способствует также усилению выработки NO, синтезируемого iNOS. NO, высвобождаемый в больших количествах при участии iNOS, может быть вовлечен в снижение активности eNOS и связанное с этим уменьшение дилататорной реакции сосудов (Cau et al. 2012; Cernadas et al. 1998), что подтверждают результаты, полученные нами в эксперименте с применением AG. Добавление AG в раствор АХ у крыс в возрасте 18 месяцев, в отличие от 4-месячных животных, усиливало АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий, предварительно обработанных раствором L-аргинина. Однако, если у мелких артерий увеличивалось число дилатаций на воздействие АХ до уровня значений, полученных без при-

менения L-аргинина, то число дилатаций средних артерий возрастало в среднем только на 25%. А у артерий диаметром более 40 мкм увеличивалась только амплитуда дилатаций (до значений, достоверно превышающих значения, полученные без применения L-аргинина). Число дилатаций крупных артерий при этом достоверно снижалось. Такое явление, возможно, связано с описанным в литературе возрастным увеличением в эндотелии сосудов экспрессии и активности аргиназы (Clemente et al. 2020; Katusic 2007), фермента, который также использует L-аргинин в качестве субстрата и может конкурировать за L-аргинин с NOS (Fujii et al. 2016; Katusic 2007).

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что к 18 месяцам у крыс снижается роль NO, синтезируемого конститутивными формами NOS, в АХ-опосредованных дилататорных реакциях пиальных артерий диаметром менее 40 мкм и усиливается роль данного механизма в дилатации более крупных пиальных артерий. В основе этих изменений может лежать обнаруженное нами повышение роли iNOS в дилатации артерий всех исследованных диаметров и снижение биодоступности экзогенного L-аргинина. Возрастное нарушение механизмов NO-опосредованной регуляции сосудистого тонуса, являющихся одним из основных модуляторов реакций мозговых сосудов, может являться причиной развития эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе снижения церебрального кровотока, разрежения микрососудистого русла и возникновения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The author declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Эксперименты проводили в соответствии с этическими стандартами, утвержденными правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Ethics Approval

The experiments were conducted in compliance with ethical standards as part of Russian legislation, the principles of the Basel Declaration and the requirements of the Commission for Control over the Maintenance and Use of Laboratory Animals, the I. P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences.

Вклад авторов

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

Author Contributions

The author planned the experiment, collected and processed data, drafted and edited the article independently.

References

- Arvanitakis, Z., Capuano, A. W., Leurgans, S. E. et al. (2016) Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: A cross-sectional study. *The Lancet. Neurology*, vol. 15, no. 9, pp. 934–943. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30029-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30029-1) (In English)
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D. et al. (2003) Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*, vol. 108, no. 16, pp. 2000–2006. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7> (In English)
- Bierhansl, L., Conradi, L.-C., Treps, L. et al. (2017) Central role of metabolism in endothelial cell function and vascular disease. *Physiology*, vol. 32, no. 2, pp. 126–140. <https://doi.org/10.1152/physiol.00031.2016> (In English)
- Cau, S. B., Carneiro, F. S., Tostes, R. C. (2012) Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: Therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*, vol. 3, article 218. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218> (In English)
- Cernadas, M. R., de Miguel, L. S., García-Durán, M. et al. (1998) Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circulation Research*, vol. 83, no. 3, pp. 279–286. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.279> (In English)

- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., Silverman, R. B. (2020) Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, vol. 40, no. 1, pp. 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599> (In English)
- Clemente, G. S., van Waarde, A., Antunes, I. F. et al. (2020) Arginase as a potential biomarker of disease progression: A molecular imaging perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 15, article 5291. <https://doi.org/10.3390/ijms21155291>. (In English)
- Cuadrado-Godia, E., Dwivedi, P., Sharma, S. et al. (2018) Cerebral small vessel disease: A review focusing on pathophysiology, biomarkers, and machine learning strategies. *Journal of Stroke*, vol. 20, no. 3, pp. 302–320. <https://doi.org/10.5853/jos.2017.02922> (In English)
- De Silva, T. M., Faraci, F. M. (2020) Contributions of aging to cerebral small vessel disease. *Annual Review of Physiology*, vol. 82, pp. 275–295. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034338> (In English)
- Fujii, N., Meade, R. D., Alexander, L. M. et al. (2016) iNOS-dependent sweating and eNOS-dependent cutaneous vasodilation are evident in younger adults, but are diminished in older adults exercising in the heat. *Journal of Applied Physiology*, vol. 120, no. 3, pp. 318–327. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00714.2015> (In English)
- Gambardella, J., Khondkar, W., Morelli, M. B. et al. (2020) Arginine and endothelial function. *Biomedicines*, vol. 8, no. 8, article 277. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080277> (In English)
- Katusic, Z. S. (2007) Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: Role of arginase I. *Circulation Research*, vol. 101, no. 7, pp. 640–641. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.162701> (In English)
- Luiking, Y. C., Ten Have, G. A. M., Wolfe, R. R., Deutz, N. E. P. (2012) Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 303, no. 10, pp. E1177–E1189. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00284.2012> (In English)
- Mazlan, M., Hamezah, H. S., Taridi, N. M. et al. (2017) Effects of aging and tocotrienol-rich fraction supplementation on brain arginine metabolism in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, article 6019796. <https://doi.org/10.1155/2017/6019796> (In English)
- Mistry, S. K., Greenfeld, Z., Morris, S. M. Jr., Baylis, C. (2002) The ‘intestinal-renal’ arginine biosynthetic axis in the aging rat. *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 123, no. 8, pp. 1159–1165. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(02\)00003-9](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(02)00003-9) (In English)
- Morris, S. M. Jr. (2007) Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *The Journal of Nutrition*, vol. 137, no. 6, pp. 1602S–1609S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S> (In English)
- Olchanheski, L. R. Jr., Sordi, R., Oliveira, J. G. et al. (2018) The role of potassium channels in the endothelial dysfunction induced by periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*, vol. 26, article e20180048. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0048> (In English)
- Pozhilova, E. V., Novikov, V. E. (2015) Sintaza oksida azota i endogennyj oksid azota v fiziologii i patologii kletki [Physiological and pathological value of cellular synthase of nitrogen oxide and endogenous nitrogen oxide]. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj meditsinskoj akademii — Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*, vol. 14, no. 4, pp. 35–41. (In Russian)
- Santhanam, L., Christianson, D. W., Nyhan, D., Berkowitz, D. E. (2008) Arginase and vascular aging. *Journal of Applied Physiology*, vol. 105, no. 5, pp. 1632–1642. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90627.2008> (In English)
- Shin, S., Mohan, S., Fung, H.-L. (2011) Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: Implications on the “L-arginine paradox”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 414, no. 4, pp. 660–663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.112> (In English)
- Sindler, A. L., Delp, M. D., Reyes, R. et al. (2009) Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *The Journal of Physiology*, vol. 587, no. 15, pp. 3885–3897. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172221> (In English)
- Tang, W. H. W., Wang, Z., Cho, L. et al. (2009) Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 53, no. 22, pp. 2061–2067. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.036> (In English)
- Toth, P., Tarantini, S., Csiszar, A., Ungvari, Z. (2017) Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: Mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 312, no. 1, pp. H1–H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00581.2016> (In English)
- Ungvari, Z., Tarantini, S., Donato, A. J. et al. (2018) Mechanisms of vascular aging. *Circulation Research*, vol. 123, no. 7, pp. 849–867. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378> (In English)
- Xiong, Y., Fru, M. F., Yu, Y. et al. (2014) Long term exposure to L-arginine Accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling. *Aging*, vol. 6, no. 5, pp. 369–379. <https://doi.org/10.18632/aging.100663> (In English)
- Xu, H., Li, S., Liu, Y.-S. (2022) Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 7, no. 1, article 231. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01082-z> (In English)



УДК 57.04

EDN FYRSMY

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-378-384>

Влияние магнитных полей на ацетилирование H3K9/14 в нейронах грибовидных тел медоносной пчелы

Т. Г. Зачепило^{✉1,2}, К. В. Исакова², А. К. Прибышина¹, Н. Г. Камышев¹, Н. Г. Лопатина¹

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

Сведения об авторах

Татьяна Геннадьевна Зачепило, SPIN-код: 7746-2208, Scopus AuthorID: 6506211770, ORCID: 0000-0001-6350-7050, e-mail: polosataya2@mail.ru

Карина Витальевна Исакова, e-mail: karina140998@gmail.com

Алиса Кирилловна Прибышина, e-mail: alisa_pribyshina@mail.ru

Николай Григорьевич Камышев, SPIN-код: 4461-9955, Scopus AuthorID: 6603773316, ResearcherID: N-3922-2017, ORCID: 0000-0002-3611-7417, e-mail: kamyshevng@infran.ru

Нина Георгиевна Лопатина, SPIN-код: 2856-6180, Scopus AuthorID: 35526198700, ORCID: 0000-0003-1392-4002, e-mail: lopatina_ng@infran.ru

Для цитирования: Зачепило, Т. Г., Исакова, К. В., Прибышина, А. К., Камышев, Н. Г., Лопатина, Н. Г. (2022) Влияние магнитных полей на ацетилирование H3K9/14 в нейронах грибовидных тел медоносной пчелы. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 378–384. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-378-384> EDN FYRSMY

Получена 10 июля 2022; прошла рецензирование 30 августа 2022; принята 31 августа 2022.

Финансирование: Исследование было выполнено в рамках государственного задания Института физиологии им. И. П. Павлова РАН с привлечением ресурсов ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» и «Конфокальная микроскопия».

Права: © Т. Г. Зачепило, К. В. Исакова, А. К. Прибышина, Н. Г. Камышев, Н. Г. Лопатина (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Эволюция живого длительное время протекала при определенных параметрах геомагнитного поля. Многие организмы чувствительны к электромагнитным полям и используют их для ориентации в пространстве и навигации при миграциях. Медоносная пчела *Apis mellifera* L. — адекватная экспериментальная модель для изучения биологических эффектов электромагнитных полей. В своей жизнедеятельности пчелы используют магнитное поле Земли для ориентации в пространстве и мобилизации на взятки. В последние десятилетия на Земле появились многочисленные антропогенные источники электромагнитных излучений, которые, вероятно, являются стрессорами для пчел и других насекомых. Известно, что при развитии стресс-реакции изменяется уровень транскрипционной активности, а ацетилирование гистонов связано с активацией транскрипции. В статье представлены данные об ацетилировании гистона H3K9/14 в нейронах (внутренних клетках Кеньона) каллисов грибовидных тел (структур, отвечающих у насекомых за обучение и память) у медоносной пчелы. Показано, что усиление естественного геомагнитного поля приводит к уменьшению ацетилирования гистона H3K9/14, что свидетельствует об уменьшении транскрипционной активности в грибовидных телах, что может сказываться на когнитивной и пищедобывательной деятельности пчелы.

Ключевые слова: электромагнитные поля, магнитное поле, насекомые, медоносная пчела, ацетилирование гистонов, центральная нервная система

Magnetic field effect on H3K9/14 acetylation in neurons of honeybee mushroom bodies

T. G. Zachepilo^{✉1,2}, K. V. Isakova², A. K. Pribishina¹, N. G. Kamyshev¹, N. G. Lopatina¹

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

² Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

Authors

Tatiana G. Zachepilo, SPIN: 7746-2208, Scopus AuthorID: 6506211770, ORCID: 0000-0001-6350-7050, e-mail: polosataya2@mail.ru

Karina V. Isakova, e-mail: karina140998@gmail.com

Alisa K. Pribyshina, e-mail: alisa_pribyshina@mail.ru

Nikolay G. Kamyshev, SPIN: 4461-9955, Scopus AuthorID: 6603773316, ResearcherID: N-3922-2017, ORCID: 0000-0002-3611-7417, e-mail: kamyshevng@infran.ru

Nina G. Lopatina, SPIN: 2856-6180, Scopus AuthorID: 35526198700, ORCID: 0000-0003-1392-4002, e-mail: lopatina_ng@infran.ru

For citation: Zachepilo, T. G., Isakova, K. V., Pribyshina, A. K., Kamyshev, N. G., Lopatina, N. G. (2022) Magnetic field effect on H3K9/14 acetylation in neurons of honeybee mushroom bodies. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 378–384. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-378-384> EDN FYRSMY

Received 10 July 2022; reviewed 30 August 2022; accepted 31 August 2022.

Funding: This study is part of the state-commissioned assignment to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences with part of the research done at the Center for Collective Use “Biocollection of the IF RAS for the study of integrative mechanisms of nervous and visceral systems” and “Confocal Microscopy”.

Copyright: © T. G. Zachepilo, K. V. Isakova, A. K. Pribyshina, N. G. Kamyshev, N. G. Lopatina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. Living things have been evolving under certain parameters of the geomagnetic field. Many organisms are sensitive to electromagnetic fields and use them for spatial orientation and navigation during migration. The honeybee *Apis mellifera* L. is a convenient experimental model to study the biological effects of electromagnetic fields. The honeybees use the Earth’s magnetic field for orientation in space and mobilization for foraging. Recent decades have seen an emergence of numerous anthropogenic sources of electromagnetic radiation. They are likely to be stressors for bees and other insects. It is known the transcriptional activity changes as part of stress response, while histone acetylation is associated with transcription activation. The article reports the results of the study into H3K9/14 histone acetylation in the neurons (inner Kenyon cells) of mushroom body calyxes (structures responsible for learning and memory in insects) in the honeybee. It was shown that an increase in the natural geomagnetic field leads to a decrease in H3K9/14 histone acetylation. This indicates a decrease in transcriptional activity in mushroom bodies, which may affect cognitive and foraging activities of the honeybee.

Keywords: electromagnetic fields, magnetic field, insects, honeybee, histone acetylation, central nervous system

Введение

Магнитное поле Земли, или геомагнитное поле, является одним из постоянно действующих на живое абиотических экологических факторов. Изменения в его параметрах могут приводить к нарушениям в работе физиологических и биохимических механизмов организма. В отличие от других экологических факторов, изменения в параметрах естественного электромагнитного поля (ЭМП) приводят к достаточно ограниченными адаптациям. Хотя некоторые организмы научились использовать изменения магнитного

поля Земли для ориентации в пространстве и миграций (некоторые птицы и насекомые). К таким организмам относятся медоносные пчелы — основные опылители сельскохозяйственных растений. Так, медоносные пчелы используют информацию о геомагнитном поле как один из значимых источников информации при ориентации в пространстве (магнитная навигация). Пчелы-разведчицы передают информацию о направлении к источнику корма с помощью танцев на ульевых сотах. В танце, в том числе, закодирована и информация об ориентации относительно магнитных линий Земли.

Однако эта информация не является первичным навигационным сигналом (Fleischmann et al. 2020).

В последние десятилетия на Земле появились многочисленные антропогенные источники электромагнитных излучений, которые, вероятно, являются стрессорами для пчел и других насекомых. Известно, что высоко- и низкочастотные электромагнитные излучения могут негативно влиять на процессы жизнедеятельности пчелиных семей, репродуктивные способности матки, пищевое поведение и опыление растений рабочими пчелами (Favre 2011; Kumar et al. 2011). В частности, ухудшается пищевая возбудимость и когнитивная деятельность медоносной пчелы (Lopatina et al. 2019; Greggers et al. 2013; Shepherd et al. 2018). За обучение и память у насекомых отвечают грибовидные тела — высшие интегративные центры мозга. У медоносной пчелы грибовидные тела — это парные структуры, состоящие из ножки (педункулюса) и чашечек (каликсов). Грибовидное тело представляет собой нейропил, образованный отростками нейронов, расположенных внутри (внутренние ветки Кенъона) и снаружи (наружные клетки Кенъона) каликсов (Mobbs 1982).

С другой стороны, известно, что при развитии стресс-реакции изменяется уровень транскрипционной активности, а ацетилирование гистонов связано с активацией транскрипции. В статье представлены данные об ацетилировании гистона H3K9/14 в нейронах каликсов грибовидных тел (структур, отвечающих у насекомых за обучение и память) у медоносной пчелы.

Материалы и методы

Материал исследования

Эксперименты проводили на 10–15-суточных рабочих особях медоносной пчелы краинской расы *Apis mellifera carnica* Pollm (отряд перепончатокрылые *Hymenoptera*). Пчел разводили на пасеке Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. Изучали три группы пчел: контроль (интактные пчелы), УМП (усиленное магнитное поле), ОМП (ослабленное магнитное поле).

Магнитные воздействия

Для ослабления геомагнитного поля использовали метод экранирования с помощью цилиндрической камеры из немагнитного материала с покрытием из магнитомягкого материала АМАГ 172 (обеспечивает уменьшение значения индукции магнитного поля Земли до 0,1 мкТл

внутри камеры, фоновое значение снаружи камеры — 45 мкТл). Используемый для экранирования материал, по данным изготовителя, эффективно экранирует биологические объекты от различных переменных внешних ЭМП. Контроль — имитирующая камера из того же немагнитного материала, покрытие — черный полиэтилен. Размеры цилиндров: диаметр — 10 см, высота — 25 см. Цилиндры были закрыты с одного торца и открыты с другого так, чтобы в глубину камеры на середину ее оси легко помещалась сетчатая пробирка с пчелами (размер пробирки: длина — 6 см, диаметр — 2,5 см). Пробирку с пчелами помещали в центре, по оси камеры для достижения минимального градиента постоянного магнитного поля внутри камеры. Для создания повышенного магнитного поля, накладываемого на геомагнитное поле в месте проведения экспериментов, были использованы 2 кольцевых магнита, при раздвижении которых по одной оси в некоторой области между ними, согласно проведенным измерениям, было получено суммарное постоянное магнитное поле с индукцией 200 мкТл, куда и помещали пробирку с пчелами. Величину индукции магнитного поля измеряли трехкомпонентным магнитометром НВ0302.1А (ООО «Магнитные приборы», Россия) с диапазоном измерений 0,1–100 мкТл и трехкомпонентным магнитометром НВ0305.2А на основе датчиков Холла (ООО «Магнитные приборы», Россия) с диапазонами измерений 10 мТл и 100 мТл.

Накануне эксперимента пчел изолировали из улья, помещали в 4 сетчатые пробирки с кормом, по 7–10 особей в каждой, и далее подвергали описанным выше воздействиям в течение 12 часов (20:00–8:00). Период воздействия совпадал с темновой фазой циркадного ритма.

Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов головного мозга

Утром пчел охлаждали на льду, извлекали мозг. Далее мозг фиксировали, обезвоживали и парафинизировали. Готовили парафиновые срезы (толщина 10 мкм) по стандартной методике. Депарафинизацию срезов проводили в ксилоле (2 x 15 мин) и в спиртах с убывающей концентрацией (96%–70%–40% по 10 мин). Далее депарафинизированные срезы промывали дистиллированной водой. Инкубировали срезы 10 мин в 0,03 М цитратном буфере (pH = 6) в микроволновой печи (450 Вт). Промывали дистиллированной водой и далее буфером РВТ (PBS + 0,2% Triton). Блокировали неспецифическое связывание на срезах с помощью сыворотки Normal blocking serum (Vectastain ABC Quick

kit, Vector Labs) во влажной камере в течение 2 часов при 25 °С. Инкубировали с первичными антителами к ацетилированному H3K9/14 (Santa Cruz) во влажной камере в течение ночи при +4°С. Промывали срезы РВТ. Инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцеином (Santa Cruz) при 25 °С 1 час во влажной камере. Промывали PBS. Контрастировали при помощи DAPI (Sigma). Закрывали препараты под покровное стекло в глицерине.

Микроскопический анализ

Полученные временные препараты анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (микроскоп Альтами ЛЮМ 1) и установки, содержащей цифровую CCD-камеру и компьютер. Делали фотографии интересующих областей (каликсов грибовидных тел), которые далее анализировали в программе ImageJ (NCBI). Отдельные препараты дополнительно были проанализированы на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss).

Анализ данных

Оценивали интенсивность окрашивания (оптическая плотность) иммунопозитивных областей в каликсах грибовидных тел головного мозга пчелы в контрольной и опытных группах. Выделение области интереса — внутренние нейроны грибовидных тел (клетки Кеньона) — показано на рисунке 1.

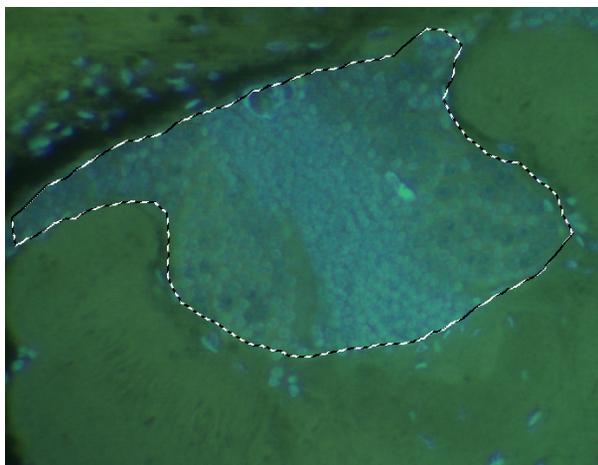


Рис. 1. Выделение анализируемой области — внутренние клетки Кеньона. Зеленый — окрашивание с антителом на ацетилированный H3K9/14, синий — окрашивание ядер DAPI

Fig. 1. Marked area—intrinsic Kenyon cells. Green—staining with antibody for acetylated H3K9/14, blue—nuclei staining by DAPI

Количественную оценку оптической плотности проводили по нижеописанной методике. Выделяли интересующую область каликсов. Для измерения оптической плотности использовали инструмент ROI Manager (Region of Interest — менеджер области интереса). После измерения данные нормализовывали путем деления количества окрашенных пикселей на площадь каликсов, получали индекс. Рассчитывали средний индекс на препарат. Данные заносили в таблицы и отображали на графиках. Сравнение данных проводили с помощью непараметрических методов статистики — Манна-Уитни (с поправкой Бонферрони) и Краскела-Уоллеса в программе Past 4.03.

Результаты и обсуждение

На рисунке 2 приведены результаты сравнения нормализованной оптической плотности для внутренних нейронов (внутренних клеток Кеньона) каликсов грибовидных тел головного мозга медоносной пчелы. Рисунок 2а демонстрирует суммарные значения по всем каликсам, 2б — отдельный анализ окрашивания и сравнения правых и левых каликсов (анализ на возможную асимметрию мозга), 2в — отдельный анализ окрашивания и сравнения латеральных и медиальных каликсов (анализ на различную чувствительность каликсов).

Были выявлены достоверные различия по уровню окрашивания между группой с искусственно усиленным магнитным полем (УМП) и контролем (критерий Краскелла — Уоллеса — $p = 0,0003$; критерий Манна — Уитни — $p = 0,0001$). Также были выявлены достоверные различия между группами с ослабленным и усиленным магнитным полем (ОМП и УМП) (критерий Манна — Уитни — $p = 0,0231$). Различий между группами ОМП и контролем не обнаружено. Полученные различия в уровне ацетилирования свидетельствуют, что усиленное магнитное поле оказывает более значительное влияние на клетки Кеньона, чем ослабленное. Сниженный уровень ацетилирования гистона H3 после 12 часов воздействия УМП указывает на снижение транскрипционной активности этих нейронов, и, возможно, изменение их функциональной активности.

Согласно ранее полученным данным (Shvetsov et al. 2013), у медоносных пчел наблюдаются различия по уровню окрашивания нейронов правых и левых каликсов грибовидных тел на другие эпигенетические маркеры: H3K4me2+3 и H3S10ph. В связи с этим мы проверили,

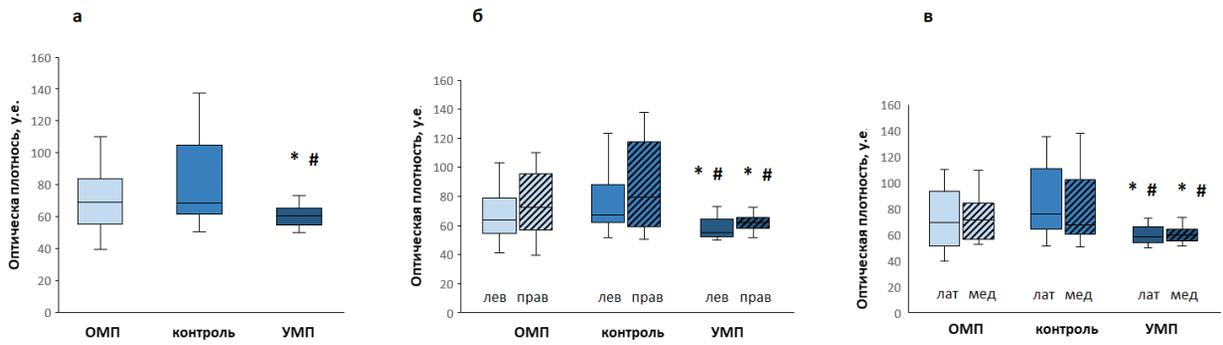


Рис. 2. Влияние усиленного (УМП) и ослабленного (ОМП) магнитных полей на ацетилирование H3K9/14 в нейронах грибовидных тел медоносной пчелы. а — суммарные значения по всем калликсам, б — отдельный анализ окрашивания и сравнения правых и левых калликсов, в — отдельный анализ окрашивания и сравнения латеральных и медиальных калликсов. * — $p \leq 0.05$, разница между контролем и УМП. # — $p \leq 0.05$, разница между ОМП и УМП

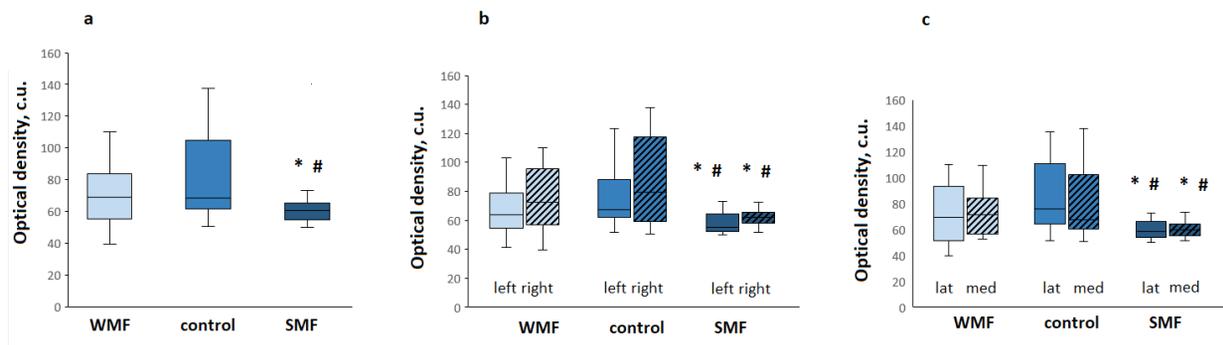


Fig. 2. Effect of strengthened (SMF) and weakened (WMF) magnetic fields on H3K9/14 acetylation in the neurons of honeybee mushroom bodies. a—total values for all calyxes, b—separate analysis of staining and comparison of right and left calyxes, c—separate analysis of staining and comparison of lateral and medial calyxes. *— $p \leq 0.05$, difference between control and SMF. #— $p \leq 0.05$, difference between WMF and SMF

наблюдаются ли подобные различия в этом исследовании: не было получено достоверных различий между правыми и левыми калликсами. При сравнении левых калликсов между собой в разных группах были получены различия между контролем и УМП (критерий Краскелла — Уоллеса — $p = 0,003$; критерий Манна — Уитни — $p = 0,0006$). При сравнении правых калликсов между собой в разных группах были получены различия между контролем и УМП (критерий Краскелла — Уоллеса — $p = 0,045$). Уровень ацетилирования снижался в группе УМП относительно контроля и в латеральных, и медиальных калликсах. Также были получены различия между ОМП и УМП (критерий Манна — Уитни — $p = 0,0127$). То есть наблюдается та же направленность реакции, что и при суммарной обработке данных.

Мы предположили, что латеральные и медиальные калликсы могут различаться по функциональной активности и, как следствие,

по изучаемому показателю. В каждой паре латеральный-медиальный калликсы ацетилирование не различалось. При сравнении латеральных калликсов между собой в разных группах были получены различия между контролем и УМП (критерий Краскелла — Уоллеса — $p = 0,015$; критерий Манна — Уитни — $p = 0,013$). При сравнении медиальных калликсов между собой в разных группах были получены различия между контролем и УМП (критерий Краскелла — Уоллеса — $p = 0,006$; критерий Манна — Уитни — $p = 0,003$). Уровень ацетилирования снижался в группе УМП относительно контроля и в латеральных, и медиальных калликсах. Также были получены различия между ОМП и УМП (критерий Манна — Уитни — $p = 0,0127$). Таким образом, полученные различия также повторяют суммарные данные, но не демонстрируют разный характер ацетилирования гистонов.

При сопоставлении полученных результатов с нашими ранними данными по изучению памяти у пчелы (модель условного обонятельного пищевого рефлекса вытягивания хоботка, proboscis extinction reflex, PER) (Lopatina et al. 2020), мы видим, что ОПМ влияет на кратковременную память (1 мин), сильнее, чем УМП. По-видимому, транскрипционные процессы менее важны для формирования кратковременной памяти, а важнее вклад состояния белков и проводимости мембран. На долговременную (3 ч) же память угнетающе действуют и ОМП, и УМП. Сходное действие на 3-часовую память ОМП оказывало у дрозофилы (Nikitina et al. 2017). Известно, что для этого типа памяти необходимы транскрипционные процессы.

Сравнить полученные результаты по ацетилированию гистона H3 с данными Никитиной с соавторами (2017), полученными на дрозофиле, затруднительно из-за того, что были изучены клетки разных органов: нейроны у имаго пчел, клетки слюнных желез у личинок дрозофилы.

Молекулярные механизмы действия магнитных полей на организм и магниторецепции остаются недостаточно изученными. Пчелы способны распознавать небольшие различия в интенсивности магнитного поля. В экспериментах Уолкера и Биттермана (1989) прикрепление магнитов к брюшку нарушало способность пчел различать изменения магнитного поля, но не способность к навигации (Fleischmann et al. 2020).

Используя ту же модель обучения, Лианг с соавторами обнаружили, что магниторецепция у пчелы происходит за счет частиц магнетита в брюшке (Liang et al. 2016). В эксперименте пчелы ассоциировали магнитный стимул с вознаграждением сахарным сиропом. При перерезке нервных волокон, соединяющих головные ганглии с брюшными, пчелы преставали связывать магнитный стимул с вознаграждением сахарозой, но реагировали на обонятельную задачу. Ламбине с коллегами проверили гипотезу о чувствительности медоносных пчел

к полярности магнитного поля (Lambinet et al. 2017). В установке размещали кормушки с сахарным сиропом и включали магнитное поле 1,5 Гц разной полярности. В контрольном эксперименте при обучении посещения кормушки и тестировании направление поля было одинаковым; в опыте — разным, что приводило к значимому снижению посещения пчелами кормушки. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что медоносные пчелы обладают магниторецептором, чувствительным к полярности магнитного поля. Таким образом, влияние магнитных полей на когнитивную и пищедобывательную деятельность пчелы может осуществляться с помощью периферических механизмов и особенностей самих полей.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Вклад авторов

Авторы участвовали в подготовке статьи в равной степени.

Author Contributions

The authors made an equal contribution to the preparation of this article.

Благодарности

Авторы крайне признательны Б. Ф. Щеголеву, С. В. Сурме и В. А. Муровцу за предоставленное оборудование.

Acknowledgements

The authors would like to thank B. F. Shchegolev, S. V. Surma and V. A. Murovets for the provided equipment.

References

Favre, D. (2011) Mobile phone-induced honeybee worker piping. *Apidologie*, vol. 42, no. 3, pp. 270–279. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0016-x> (In English)

- Fleischmann, P. N., Grob, R., Rössler, W. (2020) Magnetoreception in Hymenoptera: Importance for navigation. *Animal Cognition*, vol. 23, no. 6, pp. 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10071-020-01431-x> (In English)
- Greggers, U., Koch, G., Schmidt, V. et al (2013) Reception and learning of electric fields in bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 280, no. 1759, article 20130528. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0528> (In English)
- Kumar, N. R., Sangwan, S., Badotra, P. (2011) Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicology International*, vol. 18, no. 1, pp. 70–72. PMID: 21430927 (In English)
- Lambinet, V., Hayden, M. E., Reid, C., Gries, G. (2017) Honey bees possess a polarity-sensitive magnetoreceptor. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, vol. 203, no. 12, pp. 1029–1036. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1214-4> (In English)
- Liang, C.-H., Chuang, C.-L., Jiang, J.-A., Yang, E.-C. (2016) Magnetic sensing through the abdomen of the honey bee. *Scientific Reports*, vol. 23, no. 6, article 23657. <https://doi.org/10.1038/srep23657> (In English)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Dyuzhikova, N. A. et al. (2020) Vliyanie izmenenij elektromagnitnykh polej na pishchevuyu i kognitivnuyu aktivnost' medonosnoj pchely [The impact of changes in electromagnetic fields on food and cognitive behaviour of the honeybee]. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 231–241. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-3-231-241> (In Russian)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Kamyshev, N. G. et al. (2019) Vliyaniye neioniziruyushchego elektromagnitnogo izlucheniya na povedenie medonosnoj pchely *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera, Apidae*) [Effect of non-ionizing electromagnetic radiation on the honeybee, *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera, Apidae*) behaviour]. *Entomologicheskoye obozrenie*, vol. 98, no. 1, pp. 35–43. <https://doi.org/10.1134/S0367144519010039> (In Russian)
- Mobbs, P. (1982) The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 298, no. 1091, pp. 309–354. <https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0086> (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Gerasimenko, M. S. et al. (2017) Oslablennoe magnitnoe pole Zemli: vliyanie na transkriptsionnuyu aktivnost' genoma, obuchenie i pamyat' u *Dr. melanogaster* [Weakened geomagnetic field: Impact on transcriptional activity of the genome, learning and memory formation in *Dr. melanogaster*]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 67, no. 2, pp. 246–256. (In Russian)
- Shepherd, S., Lima, M. A. P., Oliveira, E. E. et al. (2018) Extremely low frequency electromagnetic fields impair the cognitive and motor abilities of honey bees. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 7932. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26185-y> (In English)
- Shvetsov, A. V., Zachepilo, T. G., Vajdo, A. I. et al. (2013) Ob epigeneticheskoy regulyatsii protsessa formirovaniya dolgovremennoj pamyati [On epigenetic regulation of process of formation of long-term memory]. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii*, vol. 49, no. 2, pp. 97–104. (In Russian)



УДК 612.821+612.83+616.74+616-092.6

EDN EXEVQN

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-385-390>

Реакция артериального давления на реальные и воображаемые движения

Т. Р. Мошонкина^{✉1,2}, Е. В. Попова³

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

³ Санкт-Петербургская клиническая больница Российской академии наук,
194017, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Мориса Тореза, д. 72, лит. А

Сведения об авторах

Татьяна Ромульевна Мошонкина, SPIN-код: 8537-6871, ORCID: 0000-0002-8934-5253, e-mail: moshonkina@infran.ru

Елена Вениаминовна Попова, SPIN-код: 5544-8022, e-mail: hospital@spbkbbran.ru

Для цитирования: Мошонкина, Т. Р., Попова, Е. В. (2022) Реакция артериального давления на реальные и воображаемые движения. *Интегративная физиология*, т. 3, № 3, с. 385–390. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-385-390> EDN EXEVQN

Получена 11 июля 2022; прошла рецензирование 17 июля 2022; принята 19 июля 2022.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Минобрнауки РФ, соглашение №075-15-2020-800.

Права: © Т. Р. Мошонкина, Е. В. Попова (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Интерес к воображаемым движениям связан с использованием их в интерфейсах мозг-компьютер и в реабилитационной практике. Получено много доказательств того, что в организации реального и воображаемого двигательного акта принимают участие одни и те же структуры мозга. Вегетативные реакции организма сопутствуют реальному движению, возникают перед стартом движения и не сразу угасают после окончания движения. В работе исследованы реакции сердечного ритма и артериального давления (АД) на воображение движений в сравнении с реакциями на реальные движения. Испытуемые ($n = 20$, 35–45 лет) совершали реальные приседания в быстром темпе ($n = 23$), на следующий день — воображаемые. Перед реальными и воображаемыми приседаниями определяли АД и частоту сердечных сокращений. Измерения повторяли сразу после и через 5 мин после окончания реальных и воображаемых движений. Получено достоверное увеличение систолического давления (СД) на 5 мм рт. ст. после воображения движений; прирост был меньше, чем увеличение СД после реальных приседаний (17 мм рт. ст.). Через 5 мин после воображения движений СД уменьшилось на 4 мм рт. ст. по отношению к начальному значению СД ($p < 0,05$), этот эффект отсутствовал после реальных приседаний. Анализ зависимости индивидуальных изменений СД от начального СД выявил надежную отрицательную корреляцию после реальных движений ($r = -0,35$ и $r = -0,81$ после и через 5 мин после движений, соответственно) и отсутствие зависимости после воображения движений. Таким образом, вегетативная система реагирует на воображение движений, однако в реализации реальных и мысленно выполняемых движений активируются разные физиологические процессы.

Ключевые слова: физические упражнения, воображение движений, систолическое давление, частота сердечных сокращений, интерфейс мозг-компьютер

Blood pressure response to real and imaginary movements

T. R. Moshonkina^{✉1,2}, E. V. Popova³

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

² Almazov National Medical Research Centre of Ministry of Health of Russian Federation, 2 Akkuratova Str., Saint Petersburg 197341, Russia

³ Saint Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, 72 A Morisa Toreza Str., Saint Petersburg 194017, Russia

Authors

Tatiana R. Moshonkina, SPIN: 8537-6871, ORCID: 0000-0002-8934-5253, e-mail: moshonkina@infran.ru

Elena V. Popova, SPIN: 5544-8022, e-mail: hospital@spbkbbran.ru

For citation: Moshonkina, T. R., Popova, E. V. (2022) Blood pressure response to real and imaginary movements. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 3, pp. 385–390. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-3-385-390> EDN EXEVQON

Received 11 July 2022; reviewed 17 July 2022; accepted 19 July 2022.

Funding: The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russia, Grant No. 075-15-2020-800.

Copyright: © T. R. Moshonkina, E. V. Popova (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Abstract. An interest in imaginary movements is associated with their use in brain-computer interfaces and rehabilitation. The obtained evidence shows that the same brain regions are involved in the organization of a real and imaginary motor act. Autonomic reactions of the body that accompany the real movement occur before the movement starts and do not immediately diminish after the movement ends. We investigated and compared the responses of heart rate (HR) and blood pressure (BP) to real and imaginary movements. The study involved 20 subjects aged 35 to 45. On the first day they did real squats at a fast pace ($n = 23$), the next day they did imaginary squats. Before real and imaginary squats, BP and HR was measured. Measurements were repeated immediately after and 5 min after the end of real/imaginary squats. HR showed an upward trend after imaginary squats. A significant increase in systolic pressure (SP) by 5 mm Hg was obtained immediately after the imaginary movements; SP increase was less than the increase after real squats and amounted to 17 mm Hg. Pressure significantly decreased 5 min after imaginary movements by 4 mm Hg relative to initial SP. There was no such effect after real squats. The analysis of the dependence of changes in SP after real movements and the initial SP revealed a significant negative correlation ($r = -0.35$ and $r = -0.81$ immediately after and 5 min after squats, respectively) and no dependence after imaginary movements. Thus, the autonomic system reacts to imaginary movements, however, real and mentally performed movements activate different physiological processes.

Keywords: physical exercise, motor imagination, systolic pressure, heart rate, brain-computer interface

Накоплено большое количество данных, демонстрирующих сходство механизмов и общность церебральных структур, обеспечивающих реализацию воображаемых и реальных движений (Stolbkov et al. 2019). Реальные физические упражнения всегда вызывают вегетативные реакции. Целью исследования было изучить реакции сердечного ритма и артериального давлений (АД) на воображения движения и сравнить их с реакциями на реальные движения.

Методы

В исследовании участвовали здоровые добровольцы (♀, 35–45 лет, $n = 20$). Испытуемые сидели, в состоянии покоя им измеряли АД и частоту сердечных сокращений (ЧСС) автоматическим тонометром, затем испытуемые вставали и приседали в быстром темпе, мыс-

ленно считая число приседаний (рис. 1). Длительность приседаний регистрировали. Затем испытуемые снова садились и им во второй раз измеряли АД и ЧСС. Испытуемые сидели 5 мин, и у них в третий раз определяли АД и ЧСС. На следующий день описанную последовательность повторяли, в положении стоя испытуемые воображали свои приседания в быстром темпе, считая число воображаемых приседаний. Реальные и воображаемые приседания испытуемые совершали с закрытыми повязкой глазами. Число приседаний — 23, потому что такая нагрузка вызывает увеличение АД у здоровых людей в возрасте 30–50 лет (Belina 1997). Воображаемые движения делали после реальных, чтобы стандартизировать воображение, сделать мысленные движения похожими на реальные.

Анализировали значения ЧСС, систолического давления (СД), диастолического давления (ДД)

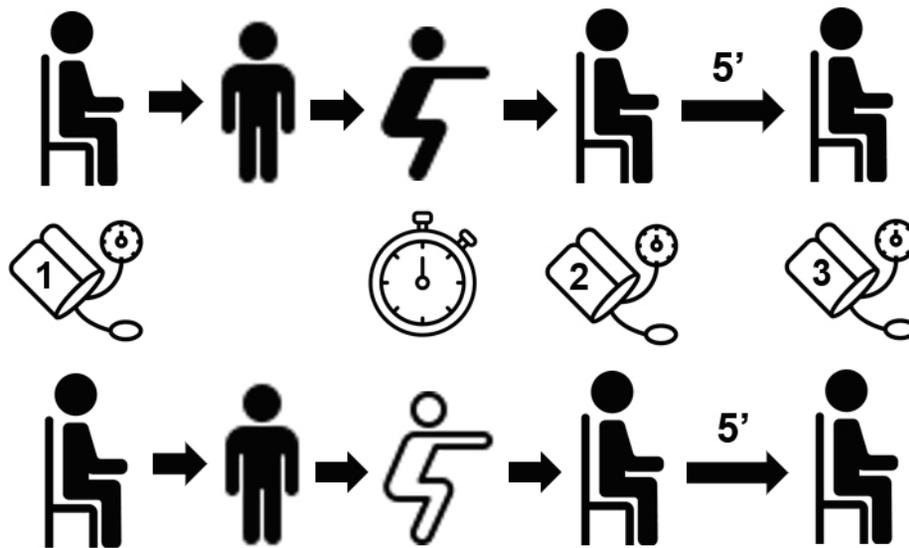


Рис. 1. Схема протокола с реальными (вверху) и воображаемыми (внизу) движениями

Fig. 1. The structure of the protocol with real (above) and imaginary (below) movements

и длительность реальных и воображаемых приседаний. Статистический анализ проводили в программе Microsoft Excel. Достоверность различий определяли с применением парного t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После выполнения реальных приседаний увеличились усредненные значения ЧСС

на 19,6 уд/мин ($p = 1,5E-05$) и СД на 16,8 мм рт. ст. ($p = 4,5E-05$). Через 5 мин после окончания приседаний усредненные значения ЧСС, СД и ДД не отличались от значений, зарегистрированных перед выполнением движений (табл. 1).

Средняя длительность воображения приседаний была на ~10 сек больше, чем длительность реальных приседаний ($p = 0,002$).

Сразу после воображения приседаний усредненная ЧСС увеличилась на 3,3 уд/мин, отличия

Табл. 1. Значения параметров при выполнении реальных и воображаемых движений (средн. ± станд.откл.; n = 20)

Движения	Длительность	ЧСС1	ЧСС2	ЧСС3	СД1	СД2	СД3	ДД1	ДД2	ДД3
	(сек)	(уд/мин)			(мм рт. ст.)					
Реальные	37,2 ± 9,2	74,4 ± 9,6	94,0 ± 13,7 [*]	75,3 ± 10,7	123,9 ± 19,0	140,7 ± 19,3 [*]	125,2 ± 12,3	76,3 ± 10,3	77,1 ± 11,1	76,3 ± 12,7
Воображаемые	46,8 ± 12,1 [§]	73,5 ± 9,4	76,8 ± 10,9 [§]	74,1 ± 9,7	122,0 ± 11,4	126,9 ± 12,9 [§]	118,5 ± 13,8 [§]	75,4 ± 12,6	77,4 ± 10,7	74,7 ± 11,7

* — $p < 0,05$ по сравнению с аналогичным значением до движений; § — $p < 0,05$ при сравнении с аналогичным значением при выполнении реального движения

Table 1. Parameter values when performing real and imaginary movements (average ± s.d.; n = 20)

Squats	Duration	HR1	HR2	HR3	SP1	SP2	SP3	DP1	DP2	DP3
	(s)	(beats per min)			(mm Hg)					
Real	37.2 ± 9.2	74.4 ± 9.6	94.0 ± 13.7 [*]	75.3 ± 10.7	123.9 ± 19.0	140.7 ± 19.3 [*]	125.2 ± 12.3	76.3 ± 10.3	77.1 ± 11.1	76.3 ± 12.7
Imaginary	46.8 ± 12.1 [§]	73.5 ± 9.4	76.8 ± 10.9 [§]	74.1 ± 9.7	122.0 ± 11.4	126.9 ± 12.9 [§]	118.5 ± 13.8 [§]	75.4 ± 12.6	77.4 ± 10.7	74.7 ± 11.7

*— $p < 0.05$ comparison with the same value measured before squats; §— $p < 0.05$ comparison with the same value measured when performing a real movement

от измерения до воображения на уровне тенденции ($p = 0,065$). СД увеличилось достоверно на 4,9 мм рт. ст. ($p = 0,001$). Прирост СД после воображаемых приседаний был значимо меньше, чем после реальных. Через 5 мин после воображения приседаний СД стало значимо меньше, чем СД до воображения, уменьшение составило 3,5 мм рт. ст. ($p = 0,02$) и было на 6 мм рт. ст. достоверно меньше ($p = 0,001$), чем СД через 5 мин после реальных приседаний.

Достоверность изменения СД после воображения приседаний проверили, проанализировав величины изменений между СД после воображения приседаний и СД до воображения для каждого испытуемого. Аналогичным

способом проанализировали данные, полученные с реальными движениями (рис. 2А). Этот анализ воспроизвел описанный выше результат: сразу после реальных приседаний СД увеличилось на 16,9 мм рт. ст. ($p = 4,5E-05$), после воображения — на 4,9 мм рт. ст. ($p = 0,002$), через 5 мин после воображения движений СД уменьшилось по сравнению с СД до воображения на 3,5 мм рт. ст. ($p = 0,045$). Полученные результаты свидетельствуют в пользу общности структур, ответственных за организацию реальных и воображаемых движений. Причиной изменения СД при воображении движения, вероятно, является то, что мыслительные процессы запрограммированы как на соматическом,

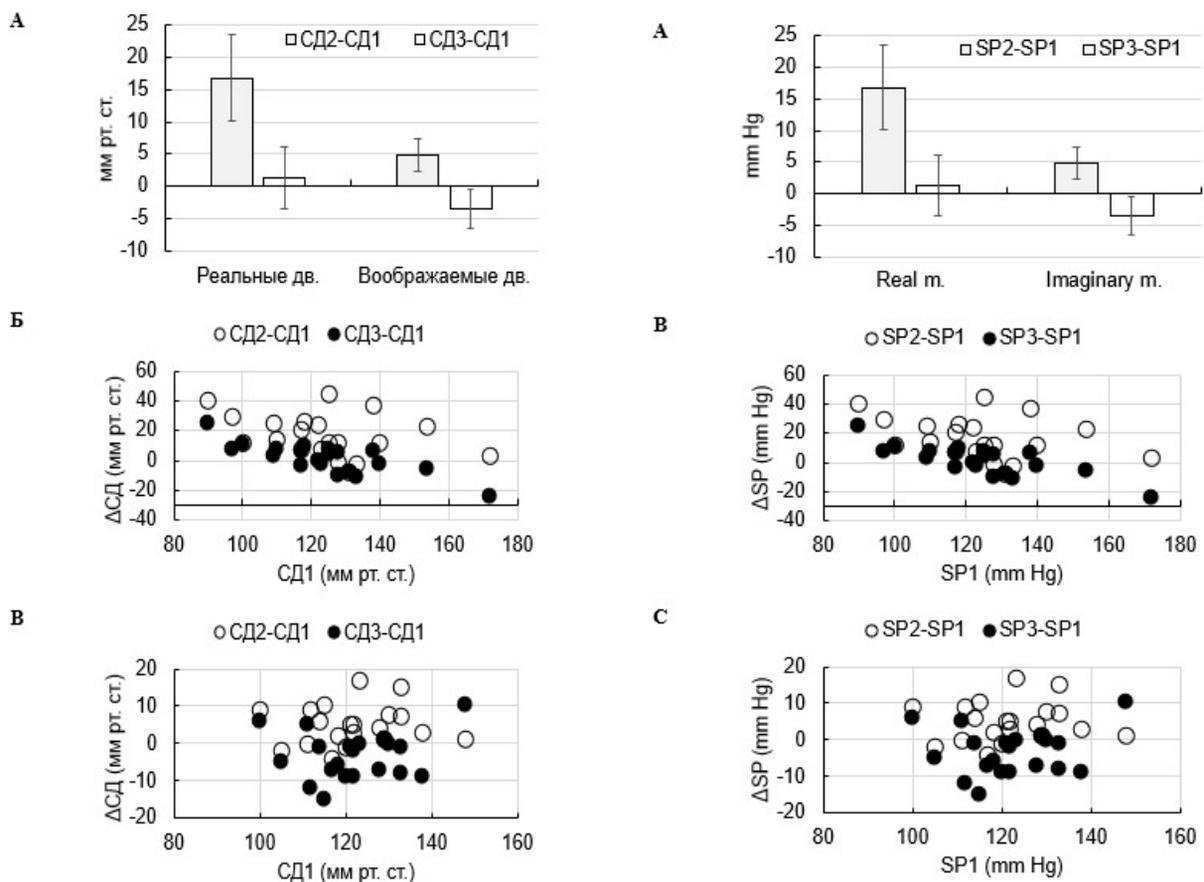


Рис. 2. Изменения СД после реальных и воображаемых движений. А — разности между СД сразу после движений и перед движениями (СД2-СД1), и между СД через 5 мин после движений и перед движениями (СД3-СД1); показан доверительный интервал. Б — зависимости разности СД после реальных движений и перед реальными движениями от начального СД, $n = 20$; обозначения как в А. В — так же, как Б для воображаемых движений

Fig. 2. SP changes after real and imaginary movements. А—differences between SP immediately after and before movements (SP2-SP1); between the values five minutes after and before movements (SP3-SP1); with the confidence interval. Б—SP difference after the end and before real movements relative to the initial SP, individual data, $n = 20$; see A for designations. С—designations taken from B for imaginary movements

так и на вегетативном уровнях центральной нервной системы (Collet et al. 2013).

Однако снижение СД через 5 мин после воображения приседаний ниже значений, полученных до воображения, и отсутствие такого эффекта после реальных приседаний демонстрирует, что, вероятно, механизмы организации реальных и воображаемых движений отличаются. Это предположение подтверждает тот факт, что изменение СД после реальных приседаний зависит от исходного уровня СД, а в случае с воображением движений такая зависимость отсутствует (рис. 2Б, В). У испытуемых с низким начальным СД прирост был больше, чем у испытуемых с изначально высоким СД, и такую зависимость подтверждает величина коэффициента корреляции и тенденция к значимости этого коэффициента ($r = -0,35$, $p = 0,064$). Через 5 мин после реальных приседаний у испытуемых с высоким начальным СД (> 140 мм рт. ст.) давление уменьшается, а у испытуемых с низким исходным СД (< 120 мм рт. ст.) давление увеличивается, что отражается в значении коэффициента корреляции и в его высокой достоверности ($r = -0,81$, $p = 8,6E-06$). Зависимость изменения СД от исходного значения СД после воображения движений отсутствует.

Заключение

Вегетативная система активируется в процессе воображения движений. В реализации реальных и мысленно выполняемых движений участвуют разные физиологические механизмы. Использование воображения движений для реабилитационных целей и для оптимизации реальных двигательных функций может привести к эффекту, отличающемуся от эффекта реальных движений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

Список сокращений

АД — артериальное давление, ДД — диастолическое давление, СД — систолическое давление, ЧСС — частота сердечных сокращений.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

Соответствие принципам этики

Исследование проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого».

Ethics Approval

The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects”.

Вклад авторов

- a. Татьяна Ромульевна Мошонкина — постановка задачи, анализ результатов, подготовка публикации;
- b. Елена Вениаминовна Попова — проведение экспериментов, анализ результатов.

Author Contributions

- a. Tatiana R. Moshonkina: conceptualization, data curation, drafting the article;
- b. Elena V. Popova: investigation, formal analysis.

Благодарности

Авторы благодарны Светлане Витальевне Гарькиной, старшему научному сотруднику ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России за интерес к результатам.

Acknowledgements

The authors would like to thank Svetlana V. Garkina, Senior Research Fellow at Almazov National Medical Research Center of the Russian Ministry of Health for her interest in the research results.

Abbreviations

BP—blood pressure, DP—diastolic pressure, HR—heart rate, SP—systolic pressure.

References

- Belina, O. N. (1997) *Funktsional'nye proby, ispol'zuemye v massovoj fizicheskoj kul'ture [Functional tests used in mass physical culture]*. Moscow: Russian State Academy of Physical Culture Publ., 33 p. (In Russian)
- Collet, C., di Rienzo, F., Hoyek, N. El., Guillot, A. (2013) Autonomic nervous system correlates in movement observation and motor imagery. *Frontiers in Human Neuroscience*, vol. 7, article 415. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00415> (In English)
- Stolbkov, Y. K., Moshonkina, T. R., Orlov, I. V et al. (2019) The neurophysiological correlates of real and imaginary locomotion. *Human Physiology*, vol. 45, no. 1, pp. 104–114. <https://doi.org/10.1134/S0362119719010146> (In English)