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

Т. 1 № 2 2020

Vol. 1 No. 2 2020

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

intphysiology.ru
ISSN 2687-1270 (online)
DOI 10.33910/2687-1270-2020-1-2
2020. Том 1, № 2
2020. Vol. 1, no. 2

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

Редакционная коллегия

В. Г. Александров (Санкт-Петербург, Россия)
Н. М. Бажан (Новосибирск, Россия)
Б. Боназ (Гренобль, Франция)
Л. 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)
И. Жданова (Бостон, США)
Д. Зелена (Печ, Венгрия)
Б. Мачадо (Сан-Паулу, Бразилия)
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)
К. Такеучи (Киото, Япония)
И. Таше (Лос-Анджелес, США)
П. Фердинанди (Сегед, Венгрия)
Ю. Е. Шелепин (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)

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)
Irina V. Zhdanova (Boston, USA)
Dora Zelena (Pécs, Hungary)
Benedito Machado (São Paulo, Brazil)
Mikhail P. Moshkin (Novosibirsk, Russia)
Pavel E. Musienko (St Petersburg, Russia)
Meiczyslaw Pokorski (Warsaw, Poland)
Elena A. Rybnikova (St Petersburg, Russia)
Sandor Szabo (Irvine, USA)
Koji Takeuchi (Kyoto, Japan)
Yvette Taché (Los Angeles, USA)
Peter Ferdinandy (Szeged, 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 Moyka Emb., St Petersburg, Russia, 191186
E-mail: izdat@herzen.spb.ru
Phone: +7 (812) 312-17-41

Объем 10,8 Мб
Подписано к использованию 05.06.2020

Published at 05.06.2020

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 *О. В. Колотина, А. С. Самарский*
Корректор *А. Ю. Гладкова*
Оформление обложки *О. В. Рудневой*
Верстка *А. М. Ходан*

Санкт-Петербург, 2020
© Российский государственный педагогический университет
им. А. И. Герцена, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Приветствие главного редактора 81

Обзоры **82**

Громова Л. И. Использование экспериментальных данных, полученных на животных, для понимания патофизиологических механизмов нервных расстройств пациентов в клиниках И. П. Павлова 82

Экспериментальные статьи **92**

Takeuchi K., Hayashi S., Amagase K. Stimulation of gastroduodenal HCO_3- secretion by lubiprostone mediated by different prostaglandin EP receptor subtypes 92

Александрова Н. П., Данилова Г. А., Клинникова А. А. Участие оксида азота в механизмах влияния провоспалительного цитокина ИЛ-1β на гиперкапнический вентиляционный ответ 101

Мошонкина Т. Р., Щербакова Н. А., Моисеев С. А., Миняева А. В., Герасименко Ю. П. Регуляция дыхания при электрической стимуляции поясничного отдела спинного мозга у человека 108

Халисов М. М., Пенниайнен В. А., Подзорова С. А., Тимощук К. И., Розенблит А. Д., Крылов Б. В. Колхицин изменяет структуру цитоскелета фибробластов: количественное исследование адаптивной клеточной реакции методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии 115

Ширяева Н. В., Вайдо А. И., Павлова М. Б., Сурма С. В., Щеголев Б. Ф. Влияние электромагнитных излучений на ориентировочно-исследовательскую активность и когнитивные функции крыс с контрастной возбудимостью нервной системы 123

Кашкин В. А. Анальгетический эффект кардиотонических стероидов на фоне алкогольной нейропатии у крыс 133

Краткие сообщения **140**

Романова И. В., Михрина А. Л., Михайлова Е. В. Роль меланокортиновой системы в регуляции стрессорного ответа 140

Drozd U. S., Lanshakov D. A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump 144

Shelepin K. Yu. Insight and stress 147

Zhukov D. A., Arutunan N. A., Vinogradova E. P. Progesterone and anxiety during oestrus cycle in rats genetically selected for high and low active avoidance 151

CONTENTS

A word of salutation by the Editor-in-chief 81

Reviews **82**

Gromova L. I. Applying experimental data obtained in animals to understand the pathophysiological mechanisms of nervous disorders in patients in I. P. Pavlov clinics 82

Experimental articles **92**

Takeuchi K., Hayashi S., Amagase K. Stimulation of gastroduodenal HCO_3- secretion by lubiprostone mediated by different prostaglandin EP receptor subtypes 92

Aleksandrova N. P., Danilova G. A., Klinnikova A. A. The role of nitric oxide in the effects of the pro-inflammatory cytokine IL-1β on the hypercapnic ventilation response 101

Moshonkina T. R., Scherbakova N. A., Moiseev S. A., Minyaeva A. V., Gerasimenko Yu. P. Regulation of respiration during electrical stimulation of the lumbar spinal cord in humans 108

Khalisov M. M., Penniyaynen V. A., Podzorova S. A., Timoshchuk K. I., Rosenblit A. D., Krylov B. V. The effect of colchicine on the structure of the fibroblast cytoskeleton: A quantitative study of an adaptive cell response by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy methods 115

Shiryaeva N. V., Vaido A. I., Pavlova M. B., Surma S. V., Shchegolev B. F. Electromagnetic radiation impact on the orienting-exploratory activity and cognitive functions of rat strains with contrasting excitability of the nervous system 123

Kashkin V. A. Analgesic effect of cardiotonic steroids in rats with alcoholic neuropathy 133

Short communications **140**

Romanova I. V., Mikhrina A. L., Mikhailova E. V. The role of the melanocortin system in the regulation of the stress response 140

Drozd U. S., Lanshakov D. A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump 144

Shelepin K. Yu. Insight and stress 147

Zhukov D. A., Arutunan N. A., Vinogradova E. P. Progesterone and anxiety during oestrus cycle in rats genetically selected for high and low active avoidance 151

Приветствие главного редактора

Глубокоуважаемые коллеги!

Второй номер журнала «Интегративная физиология» выходит в тревожное для всего мирового сообщества время пандемии коронавирусной инфекции COVID-19.

Жертвами коронавирусной инфекции становятся люди всех возрастов, при этом выделяются группы риска, у которых заболевание протекает тяжело и может приводить к летальным исходам. Наличие сопутствующих хронических заболеваний, которые у пожилых людей встречаются чаще, вносит весомый вклад в неблагоприятное течение болезни. Эти обстоятельства подчеркивают необходимость развития интегративной физиологии, которая нацелена на понимание, каким образом каждый компонент организма работает как часть, интегрированная в его функционирование как единого целого, в здоровье и болезни.

Помимо пагубного действия на здоровье людей самой коронавирусной инфекции, неблагоприятны и последствия влияния тревожной ситуации и вынужденных условий самоизоляции. Это должно рассматриваться как новый вызов не только для клиницистов, но и для физиологов. Очевидным становится необходимость интенсивного продолжения физиологических исследований в области стресса и посттравматических стрессовых расстройств с выходом результатов этих исследований в практику.

Приветствуя читателей второго 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 второго номера журнала «Интегративная физиология».

С уважением,
главный редактор
Л. П. Филаретова

Обзоры

УДК 93/94+616.8+616.89 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

Использование экспериментальных данных, полученных на животных, для понимания патофизиологических механизмов нервных расстройств пациентов в клиниках И. П. Павлова

Л. И. Громова[✉1, 2]

[1] Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН,
199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6
[2] Мемориальный музей-квартира академика И. П. Павлова,
199034, Россия, Санкт-Петербург, 7-я линия В. О., д. 2

Аннотация. Занимаясь с 1901 года вопросами физиологии высшей нервной деятельности животных, Иван Петрович Павлов одновременно стал уделять большое внимание физиологическому пониманию психической деятельности человека в норме и при различных патологиях. С 1918 года он начал посещать Психиатрическую больницу в Удельной, а позже изучал истории болезней пациентов психиатрической клиники Женского медицинского института. К 1930-м годам в лабораториях Павлова был накоплен огромный опыт исследований высшей нервной деятельности животных не только в норме, но и при различных патологиях. С 1920-х годов у подопытных собак с помощью различных раздражителей и их сочетаний успешно вызывались экспериментальные неврозы. Было доказано, что сила и глубина невротизации зависела от типа нервной системы собаки. Классификация этих типов, по мнению Павлова, во многом совпадала с классической классификацией темпераментов по Гиппократу (флегматик, сангвиник, холерик и меланхолик). Экспериментальные неврозы лечили различными методами (бромистые препараты, перерывы в экспериментах и т. п.). Уверенность Павлова в том, что накопленный опыт изучения патологических процессов в высшей нервной деятельности животных может быть применен для успешного лечения больных нервными и психическими заболеваниями, привела к созданию 6 октября 1931 года при Институте экспериментальной медицины (ИЭМ) Отдела патофизиологии высшей нервной деятельности человека. При нем были открыты две клиники — психиатрическая и нервная, в которых развернулась работа по лечению пациентов совместными усилиями психиатров и физиологов. Впервые в отечественной невропатологии стал проводиться физиологический разбор нервных и психических заболеваний, таких как неврастения, психастения, истерия, а также шизофрения, нарколепсия, маниакально-депрессивный психоз и другие. В результате был дан развернутый патофизиологический анализ более чем 200 пациентов, проходивших лечение. Стенограммы клинических заседаний были опубликованы в 1954–1957 гг. в виде трехтомного издания «Павловские клинические среды» (1931–1936 гг.).

Ключевые слова: И. П. Павлов, история физиологии, история неврологии, история психиатрии, клиники Института экспериментальной медицины.

Сведения об авторе
Людмила Ивановна Громова,
РИНЦ AuthorID: 102042,
e-mail: museum@infran.ru

Для цитирования:
Громова, Л. И. (2020) Использование экспериментальных данных, полученных на животных, для понимания патофизиологических механизмов нервных расстройств пациентов в клиниках И. П. Павлова. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 82–91. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

Получена 2 декабря 2019;
прошла рецензирование
7 января 2020;
принята 15 января 2020.

Права: © Автор (2020).
Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена.
Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Applying experimental data obtained in animals to understand the pathophysiological mechanisms of nervous disorders in patients in I. P. Pavlov clinics

L. I. Gromova[✉1, 2]

[1] Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia
[2] Memorial Apartment Museum of Academician I. P. Pavlov, 2 Seventh Line, Vasilyevsky Island, Saint Petersburg 199034, Russia

Abstract. Having studied the physiology of higher nervous activity in animals since 1901, Ivan Petrovich Pavlov simultaneously began to devote great attention to the physiological understanding of human mental activity in normal conditions and in various pathological states. In 1918 he began to visit the Psychiatric Hospital in Udelnaya, and later studied the patient histories in the psychiatric clinic of the Women's Medical Institute. By the 1930s, Pavlov's laboratories had accumulated vast experience in studying animal higher nervous activity not only in the norm, but also in various pathologies. Since the 1920s, experimental neuroses were successfully induced in test dogs applying various stimuli and their combinations. It was proven that the strength and depth of a neurosis depended on the type of the dog's nervous system. The classification of these types, according to Pavlov, largely coincided with the classical types of temperament defined by Hippocrates (phlegmatic, sanguine, choleric and melancholic). Experimental neuroses were treated with various methods (bromide preparations, recesses in experiments, etc.). Pavlov was confident that the accumulated experience of studying pathological processes in the higher nervous activity of animals could be used to successfully treat patients with nervous and mental diseases, and his conviction in the matter led to the establishment of the Pathophysiology of Higher Nervous Human Activity Department at the Institute of Experimental Medicine (IEM) on October 6, 1931. The department supervised two new clinics — a psychiatric and a neurosis one, where psychiatrists and physiologists joined their efforts in administering treatment to the patients. For the first time in the history of Russian neuropathology, the physiological analysis of nervous and mental illnesses, such as neurasthenia, psychasthenia, hysteria, and also schizophrenia, narcolepsy, manic-depressive psychosis, etc., was conducted. A detailed pathophysiological analysis of more than 200 patients' medical histories was produced as a result of this effort. Transcripts of clinical conferences were published between 1954 and 1957 in the form of a three-volume edition of "Pavlov's Clinical Wednesdays" (1931–1936).

Keywords: I. P. Pavlov, history of physiology, history of neurology, history of psychiatry, clinic of the Institute of Experimental Medicine.

Author
Liudmila I. Gromova,
RSCI AuthorID: 102042,
e-mail: museum@infran.ru

For citation: Gromova, L. I. (2020) Applying experimental data obtained in animals to understand the pathophysiological mechanisms of nervous disorders in patients in I. P. Pavlov clinics. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 82–91. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

Received 2 December 2019; reviewed 7 January 2020; accepted 7 January 2020.

Copyright: © The Author (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Интерес И. П. Павлова к неврологии и психиатрии

Занимаясь с 1901 года вопросами физиологии высшей нервной деятельности животных, Иван Петрович Павлов одновременно уделял большое внимание физиологическому пониманию психической деятельности человека в норме и при различных патологиях. Еще с 1918 года он начал посещать Психиатрическую больницу в Удельной, которой руководил его друг и коллега по Военно-медицинской академии Александр Викторович Тимофеев, и знакомиться с историями болезней ее пациентов. Однако отношение Павлова к оценке изучаемого психиатрического материала отличалось от обычного отношения специалистов.

В своей работе «Психиатрия как пособница физиологии больших полушарий», вышедшей в свет уже в 1919 г., Павлов писал: «…Я вследствие предварительной многолетней лабораторной практики мыслил в известном направлении, все время оставался стоять на чисто физиологической точке зрения, постоянно выражая для себя психическую деятельность больных в определенных физиологических понятиях и словах» (Павлов 1951, кн. 1, 347).

Возможность наблюдения за психиатрическими больными, предоставленная Тимофеевым, давала Павлову обширный материал для новых

исследований по физиологии высшей нервной деятельности человека и животных.

Экспериментальные неврозы у животных

К 1930-м годам в лабораториях Павлова силами самого ученого и его многочисленных сотрудников был накоплен огромный опыт исследований высшей нервной деятельности животных не только в норме, но и при различных патологиях. Кроме того, ученым удалось самим вызывать в эксперименте неврозы у подопытных животных. Основу этих механизмов заложили опыты М. Н. Ерофеевой, вырабатывавшей условные рефлексы на сильное действие электрическим током, а также эксперименты Н. Р. Шенгер-Крестовниковой, которая выявляла предел дифференцирования собакой световых раздражителей — круга и эллипса одинакового размера. Круг подкреплялся дачей еды, эллипс — нет. Постепенно от отношений диаметров круга и эллипса 1:2 собаке предъявляли все более и более скругленное изображение эллипса. Наконец, когда это отношение становилось почти неотличимым, т. е. достигало значения 8:9, собака становилась чрезвычайно возбужденной, выла и рвалась из станка, одинаково реагируя выделением слюны на изображение круга и эллипса. И в том, и в другом случае невротическое состояние у животных возникало вследствие усложнения обстановки опыта и непосильного воздействия на их нервную систему.

Но особый толчок подобным исследованиям дало мощное наводнение в Ленинграде, произошедшее в 1924 году (рис. 1). Подвальные помещения Физиологической лаборатории Академии наук, которой руководил Павлов, были полностью затоплены, и сотрудники невероятными усилиями спасли находящихся там собак, у которых в результате этой стрессовой ситуации возникли тяжелые неврозы.

Рис. 1. Наводнение в Ленинграде. 1924 г.

Fig. 1. Flood in Leningrad. 1924

Павлов понимал под неврозами хронические (в течение недель, месяцев и даже лет) отклонения высшей нервной деятельности подопытных животных от нормы. В ходе опытов с собаками по искусственному вызыванию у них экспериментальных неврозов было показано, что они возникают в следующих случаях: как ответ на слишком сильные или слишком сложные раздражители, либо в результате перенапряжения тормозного процесса, и, наконец, в результате столкновения (т. н. сшибки) обоих противоположных нервных процессов — возбуждения и торможения (рис. 2). Экспериментальные неврозы легко вырабатывались также

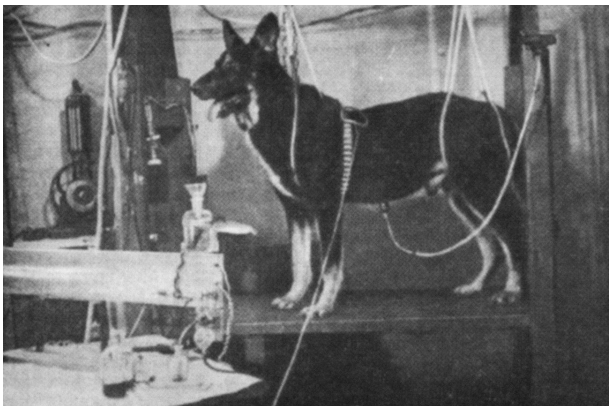

Рис. 2. Подопытная собака в станке готова к работе по выработке экспериментального невроза

Fig. 2. A test dog is prepared for an experiment in the development of a neurosis

и у кастрированных животных, т. е. у животных с нарушенным гормональным фоном. Проявлялись они либо в ослаблении обоих нервных процессов, либо в хаотической нервной деятельности, либо у собак возникали различные фазы т. н. гипнотического состояния — промежуточного состояния между бодрствованием и сном, когда подопытное животное не выполняло во время эксперимента привычные для него до этого действия. Сила и глубина невротизации зависели от типа нервной системы собаки.

Типы нервной деятельности у животных

К тому времени Павлов выделял три таких типа: т. н. центральный, абсолютно нормальный тип, у которого оба нервных процесса (возбуждение и торможение) находились в равновесии. Этот тип мог быть представлен в двух различных вариантах. Одни животные были спокойны, уравновешены, а другие — наоборот, очень подвижны, оживлены.

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

Два другие типа, названные им крайними, представляли собой противоположности. Один из них был очень сильным, но со слабо развитым процессом торможения, а второй — совершенно слабым, где оба нервных процесса были слабы, но особенно тормозной процесс. Эта классификация, по мнению Павлова, во многом совпадала с классической классификацией темпераментов по Гиппократу (флегматик, сангвиник, холерик и меланхолик) (рис. 3).

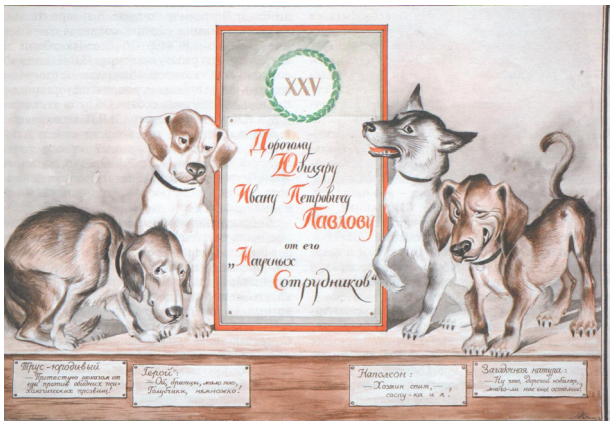

Рис. 3. Шуточный диплом, преподнесенный И. П. Павлову сотрудниками, на котором изображены собаки четырех темпераментов: меланхолик (слабый тип), флегматик, сангвиник и холерик. Декабрь 1926 г.

Fig. 3. A mock diploma presented to I. P. Pavlov by the staff, depicting dogs of four types of temperament: melancholic (weak type), phlegmatic, sanguine and choleric. December 1926

Лечение экспериментальных неврозов

Лечение экспериментальных неврозов у собак осуществлялось с помощью бромистых препаратов либо перерывами в несколько дней между опытами, которые представляли для животных, по словам Павлова, «серьезную нервную работу». Возникавшие в эксперименте неврозы собак проявлялись по-разному: у сильных типов — резким ослаблением тормозного процесса, а у слабых — наступлением вялого, сонливого состояния. При этом бром хорошо помогал излечению в первом случае и совершенно не действовал, а часто усугублял невротическое состояние слабого типа животных. Перерывы же в опытах на несколько дней давали полное восстановление нормального течения условных рефлексов (рис. 4).

Результаты этих исследований были доложены Павловым на 1 Международном неврологическом конгрессе в Берне 3 сентября 1931 г. в докладе «Экспериментальные неврозы», в котором довольно подробно были изложены новейшие опыты по их выработке на примере кастрированных животных. Закончил свой доклад Иван Петрович следующим заявлением: «…Серьезно аналогировать невротические состояния наших собак с различными неврозами людей нам, физиологам, не знакомым основательно с человеческой невропатологией, является задачей едва ли доступной. Но я убежден, однако, что разрешение или существенное благоприятствование разрешению многих важных вопросов об этиологии, естественной систематизации, механизме и, наконец, лечении неврозов у людей находится в руках экспериментатора на животных» (Павлов 1951, кн. 2, 191).

Профессор психобиологии Корнельского университета Г. С. Лидделл высказывался о Павлове таким образом: «…Сэр Эдвард Шарпей-Шефер сказал однажды, что "задача науки заключается в том, чтобы считать, взвешивать и измерять". Павлов твердо верил в то, что ни одна область медицины, не исключая даже психиатрию, не должна уклоняться от выполнения этой задачи» (Лидделл 1967, 297).

Участие Павлова в конгрессе имело цель, по словам самого Ивана Петровича, «горячо рекомендовать невропатологам работу с нормальными и патологическими условными рефлексами» (Павлов 1951, кн. 2, 192).

К началу 1930-х годов Павлов уже имел довольно богатый опыт изучения историй больных с различными формами душевных расстройств

Рис. 4. М. К. Петрова с подопытной собакой во время перерыва между опытами

Fig. 4. M. K. Petrova with a test dog during a break between experiments

в психиатрической клинике Женского медицинского института и на кафедре психиатрии, которую возглавлял профессор П. А. Останков.

Создание Отдела патофизиологии высшей нервной деятельности человека

Уверенность Павлова в том, что накопленный опыт изучения патологических процессов в высшей нервной деятельности животных может и должен быть применен для правильного и успешного лечения больных нервными и психическими заболеваниями, привела его к еще более активному увлечению неврологией

Рис. 5. Здание больницы им. И. М. Балинского на 5-й линии Васильевского острова, где располагалась психиатрическая клиника Института экспериментальной медицины

Fig. 5. The building of I. M. Balinsky hospital in the 5th Line of Vasilyevsky Island, where the psychiatric clinic of the Institute of Experimental Medicine was located

и психиатрией. Ему уже было недостаточно отрывочных наблюдений за пациентами в клиниках, возникла потребность систематического изучения больных. Это привело к созданию по инициативе Павлова при Институте экспериментальной медицины (ИЭМ) Отдела патофизиологии высшей нервной деятельности человека, который был организован 6 октября 1931 года приказом № 154 по ИЭМ. В приказе, в частности, говорилось, что Отдел организуется «…в связи с значительными результатами, полученными лабораторией акад. И. П. Павлова по физиологии высшей нервной деятельности животных, для использования имеющихся теоретических достижений в применении к человеку…» (Гаккель 1961, 508).

При новом отделе были открыты две клиники — психиатрическая (на 5-й линии

Рис. 6. Здание Александровской больницы на 15-й линии Васильевского острова, в котором располагалась клиника неврозов Института экспериментальной медицины

Fig. 6. The building of the Alexander Hospital in the 15th Line of Vasilievsky Island, where the neurosis clinic of the Institute of Experimental Medicine was located

Васильевского острова на базе больницы им. И. М. Балинского) (рис. 5) и нервная (на 15-й линии при Александровской больнице) (рис. 6), каждая из которых имела по 25 стационарных мест.

Заведующим нервной клиникой сначала был Б. Н. Бирман, а позже (с 1933 года) С. Н. Давиденков. Психиатрической клиникой руководил А. Г. Иванов-Смоленский. Общим руководителем и вдохновителем всего дела был сам Павлов.

При психиатрической клинике была организована лаборатория по изучению высшей нервной деятельности человека, при нервной клинике — две лаборатории: биохимическая (рис. 7), которой

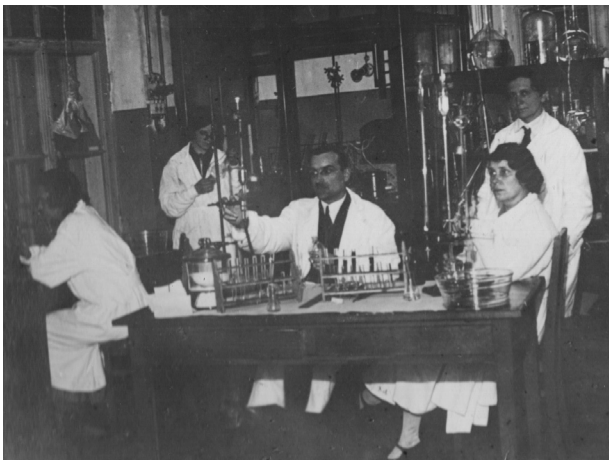

Рис. 7. Биохимическая лаборатория клиники неврозов

Fig. 7. The biochemical laboratory of the neurosis clinic

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

стала руководить А. М. Петрунькина, и патофизиологии высшей нервной деятельности человека, которую вначале возглавил А. О. Долин, а затем (с 1935 г.) Ф. П. Майоров.

Работа лабораторий давала возможность не только постоянно наблюдать за больными в клиниках, но и оценивать изменения их состояния в ходе лечения, своевременно проводить тесты как клинико-физиологические, так и биохимические. Это позволяло активно применять опыт изучения физиологии и патологии высшей нервной деятельности для понимания патофизиологических механизмов нервных расстройств — неврозов и психозов.

В 1932 году в клиниках исследовали различные формы неврозов — неврастению, психастению, истерию, а также шизофрению и маниакально-депрессивный психоз.

Первые попытки применения физиологических знаний для лечения нервных и психических заболеваний

Сравнивая динамику развития экспериментальных неврозов и последующего восстановления у животных с некоторыми заболеваниями пациентов нервной и психиатрической клиник, Павлов указывал на тождество нервных процессов, происходящих в том и другом случае. Об этом он подробно высказался в своей статье «О неврозах человека и животного», впервые опубликованной в 1932 году в американском журнале The Bulletin of the Battle Creek Sanitarium and Hospital Clinic.

Однако, подчеркивал он, «…в случае человека, при сложности его жизненной обстановки и при многообразии реакций его на нее как для анализа, так и для цели излечения, всегда предстоит очень трудный вопрос: какие жизненные обстоятельства были непомерно сильны для данной нервной системы, где и когда сталкивались, невыносимо для нее, требования деятельности и требования задержки ее» (Павлов 1951, кн. 2, 151).

Впервые в отечественной невропатологии стал проводиться физиологический разбор нервных и психических заболеваний (рис. 8). Физиологическое значение тормозного процесса как охранителя клеток коры больших полушарий, приносившего пользу подопытным собакам при стрессовых ситуациях, стало применяться в соответствующих условиях и для лечения неврозов пациентов павловских клиник. Впервые неврозы стали оцениваться с точки зрения «нервного срыва», и были предприняты успешные попытки их лечения продолжительным

Рис. 8. Коллектив нервной клиники (врачи и физиологи). Сидят (слева направо) М. К. Петрова, С. Н. Давиденков, И. П. Павлов, А. О. Долин, Н. А. Крышова. Стоят (слева направо) А. Н. Пахомов, Н. Ш. Аристов, Н. И. Короткин, Л. Б. Гаккель, Б. В. Андреев, М. М. Суслова, А. С. Михайлович. Крайний справа Ф. П. Майоров

Fig. 8. The neurosis clinic team (doctors and physiologists). Seated (from left to right) M. K. Petrova, S. N. Davidenkov, I. P. Pavlov, A. O. Dolin, N. A. Kryshova. Standing (from left to right) A. N. Pakhomov, N. Sh. Aristov, N. I. Korotkin, L. B. Gakkel, B. V. Andreev, M. M. Suslova, A. S. Mikhailovich, F. P. Mayorov (on the far right)

сном. «Опыт оказался удачен. Клиницисты выдвигают перед физиологами новые проблемы физиологии, по новому развертывают свою экспериментальную работу», — так оценивал работу павловских клиник директор ИЭМ Л. Н. Федоров на заседании Правительственной экспертной комиссии 25 июня 1933 года.

Клинические среды

Обсуждение экспериментально-клинических материалов проходило в клиниках, как и в лабораториях Павлова, по средам. Каждую среду его ученики собирались в утренние часы в лаборатории для разбора всего материала, полученного за неделю, а во второй половине дня в том же составе переходили в одну из клиник, где проводился разбор отдельных клинических случаев. На этих научных заседаниях в разные отрезки времени рассматривались типичные случаи неврозов навязчивых состояний, реактивных неврозов истерического типа, психастении, невроза страха, агорафобии, депрессивных состояний, афазии, различных форм шизофрении, нарколепсии, эпилепсии, алкогольной

Рис. 9. И. П. Павлов на заседании в нервной клинике (1933 г.) Слева направо: Я. Л. Шрайбер (ординатор больницы), С. Н. Давиденков, И. П. Павлов, М. К. Петрова, В. Н. Крячко (стенографистка). Врач-ординатор М. М. Блюмкина (Суслова) докладывает историю болезни

Fig. 9. I. P. Pavlov at a conference at the neurosis clinic (1933). From left to right: Ya. L. Schreiber (an intern), S. N. Davidenkov, I. P. Pavlov, M. K. Petrova, V. N. Kryachko (a stenographer). Resident physician M. M. Blumkina (Suslova) reports on a medical history

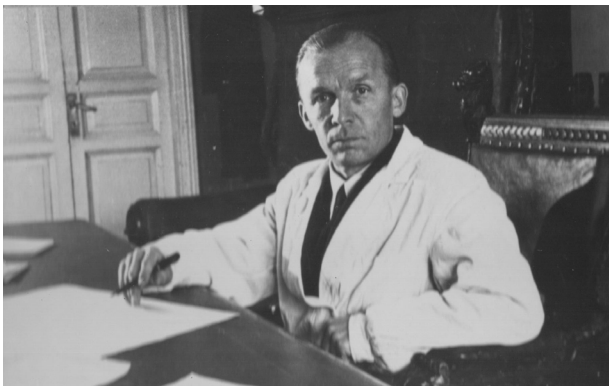

Рис. 10. Ф. П. Майоров за редактированием стенограмм клинических заседаний

Fig. 10. Fedor Petrovich Mayorov edits clinical conference transcripts

паранойи, слабоумия и многих других заболеваний (рис. 9).

Участники заседаний подробно изучали и обсуждали не только состояние больных, но и истории их жизни и болезни, ее течение, при этом часто разгорались жаркие споры и дискуссии.

«Я заметила, — вспоминала сотрудница нервной клиники Н. А. Крышова, — что его (Павлова) очень раздражали многословные, неконкретные выступления некоторых врачей, предположения, не подкрепленные наблюдениями и фактами; тогда он сердился, обрывал говорящего, бывал иногда невежлив… он не любил выслушивать несерьезные речи, а предпочитал узнавать продуманные и аргументированные обобщения сотрудников, которые бы опирались на наблюдения и анализ хода лечения больных» (Крышова 1967, 134).

Присутствуя на беседах Павлова с больными, она была поражена его отношением к ним: «…Он вдумчиво и деликатно расспрашивал их о здоровье, симптомах болезни, о профессии, семье, условиях быта, интересовался, нравится ли им в клинике, как они относятся к врачам, не имеют ли жалоб. Сведения, которые он получал в результате задушевной беседы, цепко удерживались в его памяти и помогали Ивану Петровичу оригинально, по-своему анализировать причины заболевания пациента, намечать соответствующее лечение» (Крышова 1967, 135).

Павлов бывал очень доволен, когда ему удавалось разъяснить запутанный клинический случай с физиологических позиций. В результате клинических заседаний был дан развернутый патофизиологический анализ более чем 200 пациентов, проходивших лечение в клиниках.

Практически сразу (с ноября 1931 г.) клинические заседания стали стенографироваться; записывала беседы постоянная стенографистка сред В. Н. Крячко, корректировал тексты Федор Петрович Майоров, исполнявший обязанности секретаря «клинических сред» (рис. 10).

В 1934 году был выпущен первый сборник трудов павловских клиник. Но полное трехтомное издание стенограмм заседаний «Павловские клинические среды» (1931–1936 гг.) вышло в свет только в 1954–1957 гг. (рис. 11).

Рис. 11. Первый том издания «Павловские клинические среды» вышел в свет в 1954 году

Fig. 11. The first volume of “Pavlov Clinical Wednesdays” was published in 1954

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

Стилистика этого издания тем более интересна, что сохранила живой, разговорный язык самого Павлова и его сотрудников, а также тот дух научных дискуссий, которые возникали на заседаниях.

Попытки лечения шизофрении физиологическими методами

Павлов отмечал, что наблюдаемые в лаборатории явления т. н. «гипнотизации» у собак с экспериментально полученными неврозами, такие как негативизм, стереотипия, парадоксальная фаза и т. п., наблюдаются и у психически больных, например, с диагнозом «шизофрения». Он вообще не видел резких различий между нервными и психическими заболеваниями, считая их проявлениями нарушения мозговой ткани если не в структурном, то в функциональном отношении, и объясняя разницу между ними только степенью этого нарушения. В «Лекциях о работе больших полушарий головного мозга» Павлов анализирует причины возникновения этих нарушений у животных и людей: «…На собаках мы познакомились с двумя условиями, производящими функционально нервные расстройства, — пишет он. — Это — трудная встреча, столкновение раздражительного и тормозного процессов и сильные чрезвычайные раздражения. Они же составляют и обыкновенные причины нервных и психических заболеваний людей. Жизненные положения, возбуждающие нас в высшей степени, например в случае жестоких оскорблений, сильного горя, и вместе с тем обязывающие нас сдерживать, подавлять естественные реакции на них, часто и ведут к глубокому и долговременному нарушению нервного и душевного равновесия. С другой стороны, люди также часто делаются нервно и психически больными, подвергаясь чрезвычайным опасностям, угрожающим им самим, а также их дорогим близким, или даже только присутствуя при страшных событиях, ни их самих, ни их близких непосредственно не касавшихся. При этом замечается, как правило, что те же обстоятельства остаются без этих последствий для других лиц, как говорят, не расположенных к заболеванию, т. е. с более сильной нервной системой» (Павлов 1999, 431).

Изучив проявления болезни у многих пациентов, Павлов в своей статье «Пробная экскурсия физиолога в область психиатрии» высказал мысль о том, что «…шизофрения в известных вариациях и фазах действительно представляет собой хронический гипноз, а глубокое основание этого гипноза есть слабая нервная система, специально слабость нервных клеток… Это состояние, с одной стороны — патология, так как оно лишает пациента возможности нормальной деятельности, с другой — по существу физиологическая мера, потому что оно предохраняет корковые клетки против угрожающего разрушения вследствие непосильной работы» (Павлов 1951, кн. 2, 131).

На основании теоретических выводов Павлова об охранительном значении торможения в клиниках было организовано лечение не только неврозов, но и шизофрении методом длительного медикаментозного сна, что приводило если не к излечению, то к достаточно выраженной ремиссии заболевания.

Понимание симптомов истерии с точки зрения физиологии

В своей знаменитой статье «Проба физиологического понимания симптомологии истерии» (1932) Павлов дает глубокий физиологический анализ симптомов и болезни в целом, также рассматривая ее в качестве «продукта слабой нервной системы». Слабость коры больших полушарий приводит, по его мнению, к запредельному торможению и, как следствие этого, к повышенной эмоциональности истериков, чьи поступки определяются не столько рассудком, сколько чувствами и эмоциями. «…С устранением и ослаблением деятельности больших полушарий должна причинно связываться более или менее хаотическая, лишенная должной меры и согласованности с условиями данной обстановки деятельность подкорки», — считает он (Павлов 1951, кн. 2, 205).

Именно с этих позиций он подробно описывает различные проявления истерии, такие как внушаемость (и самовнушение), спонтанно возникающие аналгезии, параличи, а в некоторых случаях стигматы, часто отсутствие реального отношения к жизни, некая фантастичность и, наконец, «бегство в болезнь».

По материалам клинико-физиологических исследований Павлов опубликовал еще несколько статей: «О неврозах человека и животных» (1932), «Чувство овладения и ультрапарадоксальная фаза» (1933), «Проба физиологического понимания навязчивого невроза и параной» (1934). Он также сделал несколько докладов на международных конгрессах. Это доклады: «Экспериментальные неврозы» на 1 Международном неврологическом конгрессе в Берне (1931), «Пример экспериментально произведенного невроза и его излечение на слабом типе нервной системы» на VI Невро-

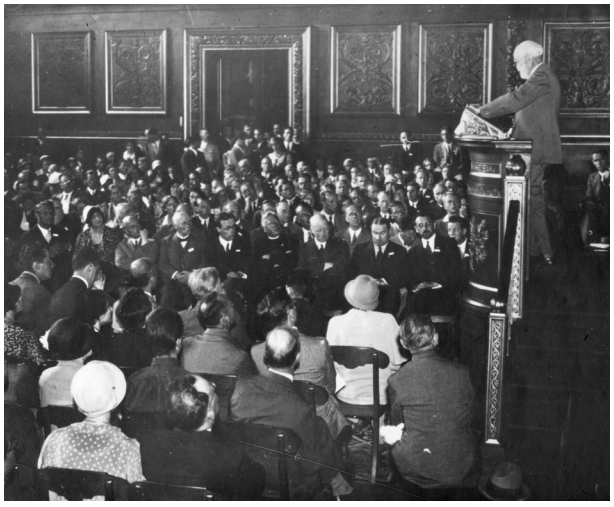

Рис. 12. И. П. Павлов выступает с докладом «Динамическая стереотипия высшего отдела головного мозга» на X Психологическом конгрессе в Копенгагене (1932)

Fig. 12. I. P. Pavlov makes his presentation "Dynamic Stereotypy of the Higher Part of the Brain" during the 10th Psychological Congress in Copenhagen (1932)

логическом скандинавском конгрессе в Копенгагене (1932), «Динамическая стереотипия высшего отдела головного мозга» на X Психологическом конгрессе в Копенгагене (1932) (рис. 12) и др.

Отношение Павлова к организации психиатрической помощи в нашей стране

Итак, Павлов рассматривал многие симптомы нервных и психических заболеваний как проявление защитных сил организма, показатель охранительного торможения, защищающего нервные клетки от перенапряжения и гибели. Именно поэтому его отношение к организации лечебной помощи психически больным также отличалось от общепринятого в те годы. Состояние психиатрических больниц, где часто унижалось человеческое достоинство, заставило его еще в 1930 году высказать в своей статье «Пробная экскурсия физиолога в область психиатрии» пожелание, чтобы невменяемые больные были отделены от прошедших лечение и «уже располагающих сознанием самих себя в известной степени», чтобы оградить последних от негативного влияния раздражителей в виде криков, угроз и прямого насилия, что ложилось бы непосильным грузом на их слабые корковые клетки.

«…Уже сознаваемое больным нарушение своих человеческих прав, — писал Павлов, — заключающееся частью в ограничении свободы, частью в естественном и почти неизбежном третировании пациента как невменяемого со стороны служебного и медицинского персонала, не может не представлять опять же серьезных ударов по этим слабым клеткам. Следовательно, нужно как можно скорее, своевременнее как бы переводить таких душевнобольных на положение больных, страдающих всякими другими болезнями, которые не истязают так непосредственно чувство человеческого достоинства» (Павлов 1951, кн. 2, 132).

По воспоминаниям современников, павловские клиники по режиму и отношению к больным больше напоминали санатории, нежели психиатрические больницы (рис. 13).

К Ивану Петровичу, зная его доброе и внимательное отношение к больным, стали обращаться за советом и помощью как сами больные, так и их родственники, причем живущие не только в России, но и за рубежом, особенно в США. К концу 1935 года он стал получать в день от 5 до 10 писем, на которые не успевал ответить. Это, в конце концов, заставило его обратиться в редакцию газеты «Известия» со следующим письмом: «…Поистине всесоюзной молвой я как-то превращен из фиктивного врача (имею диплом, но никогда не лечил) в медицинского чудотворца… на меня тучами сыплются письма с горячими мольбами о помощи, начиная с пустяков, вроде стыдливого покраснения лица, слабых волос и т. д. и кончая тяжелейшими неизлечимыми болезнями… В одних случаях не отвечать — неловко, в других — прямо совестно. А между тем труд

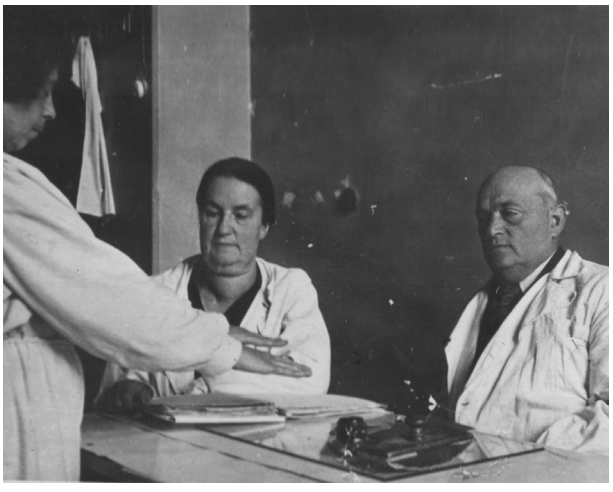

Рис. 13. Клиника неврозов. Врач Л. Б. Гаккель и профессор Б. Н. Бирман осматривают больную

Fig. 13. Neurosis clinic. Doctor L. B. Gakkel and professor B. N. Birman examine a patient

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-82-91

напрасный, бесполезный для обеих сторон. Поэтому, тоже горячо, прошу преодолеть это печальное недоразумение. Прошу другие газеты перепечатать это мое обращение» (Павлов 1936).

Письмо было опубликовано в газете 25 января 1936 года, а через месяц великого ученого не стало. Он скончался от пневмонии 27 февраля на 87-м году жизни.

В наше время некоторый пересмотр взглядов Павлова на механизмы развития отдельных симптомов и синдромов нервных заболеваний, конечно, возможен. Но общие принципы анализа патологического состояния головного мозга, сформировавшиеся в процессе экспериментальной работы самого Павлова и его сотрудников, остаются неизменными и определяют путь дальнейших исследований в нейрофизиологии и психиатрии.

Высоко оценивая вклад Павлова в психиатрию, профессор Лидделл писал, что когда-нибудь, основываясь на трудах великого физиолога, «врач-практик будет в состоянии с уверенностью предсказать для своего пациента счастливый и успешный путь в бурных течениях социальной и экономической жизни» (Лидделл 1967, 300).

Сам же Иван Петрович считал, что «…было бы большим легкомыслием первые шаги физиологии больших полушарий… считать уже за какое-то решение грандиозной задачи о высшем механизме человеческой натуры… Сложное берется наукой только по частям и обрывкам, но оно захватывается ею постепенно все более и более. Следовательно, будем надеяться и терпеливо ждать, когда точное и полное знание нашего высшего органа — головного мозга — сделается нашим подлинным достоянием, а с этим и главной основой прочного человеческого счастья» (Павлов 1999, 428–429).

Литература

Гаккель, Л. Б. (1961) История Павловских клиник ИЭМ. В кн.: *Труды Института экспериментальной медицины АМН СССР.* Т. 6. Л.: Изд-во ИЭМ АМН СССР, с. 508–510.

Крышова, Н. А. (1967) Иван Петрович в нервной клинике. В кн.: Е. М. Крепс (ред.). *И. П. Павлов в воспоминаниях современников.* Л.: Наука, с. 134–136.

Лидделл, Г. С. (1967) Павлов — психиатр будущего. В кн.: Е. М. Крепс (ред.). *И. П. Павлов в воспоминаниях современников.* Л.: Наука, с. 297–301.

Павлов, И. П. (1936) Письмо академика И. П. Павлова. *Известия*, № 21, 25 января, с. 3.

Павлов, И. П. (1951) *Полное собрание сочинений*: в 6 т. Т. 3: в 2 кн. М.; Л.: Издательство АН СССР.

Павлов, И. П. (1999) Лекции о работе больших полушарий головного мозга. Лекция двадцать третья. Приложение экспериментальных данных, полученных на животных, к человеку. В кн.: Н. А. Григорян (сост.). *И. П. Павлов. Избранные труды.* М.: Медицина, с. 428–445.

References

Gakkel, L. B. (1961) Istoriya Pavlovskikh klinik IEM [History of Pavlov Institute of Experimental Medicine Clinics]. *Trudy Instituta eksperimentalnoj meditsiny AMN SSSR.* Vol. 6. Leningrad: IEM AMN SSSR Publ., pp. 508–510. (In Russian)

Kryshova, N. A. (1967) Ivan Petrovich Pavlov v nervnoy klinike [Ivan Petrovich Pavlov in a nervous clinic]. In: E. M. Kreps (ed.). *I. P. Pavlov v vospominaniyakh sovremennikov [I. P. Pavlov in the memoirs of contemporaries].* Leningrad: Nauka Publ., pp. 134–136. (In Russian)

Liddell, G. S. (1967) Pavlov — psikhiatr buduschego [Pavlov — a psychiatrist of the future]. In: E. M. Kreps (ed.). *I. P. Pavlov v vospominaniyakh sovremennikov [I. P. Pavlov in the memoirs of contemporaries].* Leningrad: Nauka Publ., pp. 297–301. (In Russian)

Pavlov, I. P. (1936) Pis'mo akademika I. P. Pavlova [Letter of academician I. P. Pavlov]. *Izvestiya*, no. 21, 25 January, p. 3. (In Russian)

Pavlov, I. P. (1936) *Polnoe sobranie sochineniy [I. P. Pavlov. Full composition of writings]*: In 6 vols. Vol. 3: In 2 books. Moscow; Leningrad: Academy of Sciences of the Soviet Union Publ. (In Russian)

Pavlov, I. P. (1999) Lektsii o rabote bolshikh polusharij golovnogo mozga. Lektsiya dvadtsat' tret'ya. Prilozhenie eksperimentalnykh dannykh, poluchennykh na zhivotnykh, k cheloveky [Lectures on the work of the cerebral hemispheres. Lecture twenty three. Application of experimental data obtained in animals to humans]. In: N. A. Grigoryan (comp.). *I. P. Pavlov. Izbrannye trudy [I. P. Pavlov. Selected works].* Moscow: Meditsina Publ., pp. 428–445. (In Russian)

Экспериментальные статьи

UDC 612.018 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-92-100

Stimulation of gastroduodenal HCO_3- secretion by lubiprostone mediated by different prostaglandin EP receptor subtypes

K. Takeuchi✉[1, 2], S. Hayashi[1], K. Amagase[1, 3]

[1] Kyoto Pharmaceutical University, 5 Misasaginakauchicho, Yamashina Ward, Kyoto 607-8414, Japan
[2] Kyoto Research Center for Gastrointestinal Diseases, 671 Karasuma-Oike, Kyoto 604-8106, Japan
[3] Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

Authors
Koji Takeuchi,
Scopus AuthorID: 56603096400,
e-mail: koji01210121@yahoo.co.jp
Shusaku Hayashi,
Scopus AuthorID: 35733933500
e-mail: hayashi@inm.u-toyama.ac.jp
Kikuko Amagase,
Scopus AuthorID: 6603389023
e-mail: amagase@mb.kyoto-phu.ac.jp

For citation: Takeuchi, K., Hayashi, S., Amagase, K. (2020) Stimulation of gastroduodenal HCO_3- secretion by lubiprostone mediated by different prostaglandin EP receptor subtypes. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 92–100. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-92-100

Received 21 November 2019; reviewed 22 December 2019; accepted 24 December 2019.

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. We examined the stimulatory effects of lubiprostone, a bicyclic fatty acid derived from prostaglandin E_1 and a chloride channel type-2 opener (ClC-2), on HCO_3- secretion in the rat stomach and duodenum, with a focus on the EP receptor subtypes involved in this action. Under urethane anesthesia, an *ex-vivo* chambered stomach or a duodenal loop was perfused with saline, and HCO_3- secretion was measured at pH 7.0 using a pH stat-method. Lubiprostone (0.1–30 μM) was perfused in the chamber or loop for 10 min. Indomethacin, ONO-8711 (an EP_1 antagonist), or AE5-599 (an EP_3 antagonist) was given s.c. 1 h before the lubiprostone treatment, while AE3-208 (an EP_4 antagonist) or $CFTR_{inh}$-172 (a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibitor) was given i.p. 30 min before. Lubiprostone dose-dependently and significantly increased HCO_3- secretion in both the stomach (≥ 10 μM) and duodenum (≥ 1 μM). The stimulatory effect in the stomach was significantly abrogated by a pretreatment with the EP_1 antagonist, but not the EP_3/EP_4 antagonists or CFTR inhibitor, while that in the duodenum was significantly attenuated by the EP_3/EP_4 antagonists as well as the CFTR inhibitor. Indomethacin had no effect on the response of either tissue to lubiprostone. These results suggest that lubiprostone stimulated HCO_3- secretion in the stomach and duodenum in a manner that was mediated by different EP receptor subtypes; the former was mediated by EP_1 receptors, while the latter was mediated by both EP_3 and EP_4 receptors. CFTR/ClC-2 may be involved in the response observed in the duodenum, but not in the stomach.

Keywords: lubiprostone, HCO_3- secretion, prostaglandin EP receptor subtypes, stomach, duodenum, rat.

Introduction

Lubiprostone, a bicyclic fatty acid derived from prostaglandin (PG) E_1, has been used to treat chronic constipation and irritable bowel syndrome with constipation (Schey, Rao 2011). Its mechanism of action has been attributed to the stimulation of intestinal fluid secretion via the activation of ClC-2 chloride channels, which are located in the apical membranes of epithelial cells as a cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) bypass channel in Cystic Fibrosis (Schwiebert et al. 1998; Cuppoletti et al. 2004). Previous studies demonstrated that lubiprostone activated PGE receptors (Bassil et al. 2008; Mizumori et al. 2009; Cuthbert 2011). These receptors have been pharmacologically subdivided into four subtypes, EP_1-EP_4 (Woodward et al. 2011). Among them, the EP_4 receptor appears to be the main target for lubiprostone. Cuthbert demonstrated that EP_4 receptors in sheep were the major target for lubiprostone to stimulate the secretion of anions in ovine airways (Cuthbert 2011). In addition, several studies showed that lubiprostone activated ClC-2/CFTR chloride channels via EP_4 receptors (Cuppoletti et al. 2004; Bassil et al. 2008; Bao et al. 2008). We previously reported that PGE_2 ameliorated indomethacin-induced small intestinal damage via the activation of EP_4 receptors (Kunikata et al. 2002; Hatazawa et al. 2006; Takeuchi 2014). In consistence with these findings, we recently

confirmed that lubiprostone also prevented indomethacin-induced enteropathy via an EP_4 receptor-dependent mechanism (Hayashi et al. 2014).

The secretion of HCO_3^- from surface epithelial cells is one of the main processes involved in mucosal defense and plays an important role in protecting the gastroduodenal mucosa against acid (Flemström, Garner 1982; Flemström, Turnberg 1984; Takeuchi et al. 1986). The physiological regulation of HCO_3^- secretion involves several factors such as PGs, nitric oxide, and neuronal factors (Flemström, Garner 1982; Heylings et al. 1984; Takeuchi et al. 1991; Hogan et al. 1993; Sugamoto et al. 2001; Takeuchi et al. 1997). Mizumori et al. (2009) reported that lubiprostone stimulated CFTR-dependent duodenal HCO_3^- secretion in rats, and this action was mediated by the activation of EP_4 receptors. PGE_2 has been shown to stimulate HCO_3^- secretion in the stomach and duodenum in a manner that is mediated by different EP receptors; EP_1 receptors in the stomach and EP_3/EP_4 receptors in the duodenum (Takeuchi et al. 1997; Takeuchi et al. 1999; Aoi et al. 2004; Aihara et al. 2007). However, it currently remains unknown whether lubiprostone stimulates HCO_3^- secretion in the stomach similar to PGE_2 and which EP receptors are responsible for its effects in the stomach.

In the present study, we examined the stimulatory effects of lubiprostone on HCO_3^- secretion in the rat stomach and duodenum, with a focus on the EP receptor subtypes involved in these effects. Since lubiprostone is a ClC-2 chloride channel opener (Schwiebert et al. 1998; Cuppoletti et al. 2004), we also determined the contribution of ClC-2/CFTR channels to its HCO_3^- stimulatory effects in these tissues.

Materials and methods

1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (200–260 g; Nippon Charles River, Shizuoka, Japan) were acclimated to standard laboratory conditions (12:12 h light-dark cycle, temperature of 22 ± 1° C). Animals were kept in individual cages with raised mesh bottoms and deprived of food, but allowed free access to tap water for 18 h before the experiments. Experiments were carried out using four to six rats per group under urethane anesthesia (1.25 g/kg, i.p.). Body temperature was monitored intermittently using a rectal thermometer (Natsume, Tokyo, Japan) and maintained at ~35 °C by placing the animals on a heat pad and exposing them to an external heat lamp (40 W) (Takeuchi et al. 1986; Takeuchi et al. 1997). All experimental procedures described were approved by the Experimental Animal Research Committee of Kyoto Pharmaceutical University.

2. Determination of HCO_3^- secretion

The secretion of HCO_3^- was measured in a chambered stomach or duodenal loop as described previously (Takeuchi et al. 1997; Takeuchi et al. 1990). The abdomen was incised, and the stomach was exposed and mounted on a chamber (exposed area: 3.1 cm^2), while a duodenal loop (17 mm) was made between the pyloric ring and area just above the outlet of the common bile duct to exclude the influences of bile and pancreatic juice (fig. 1).

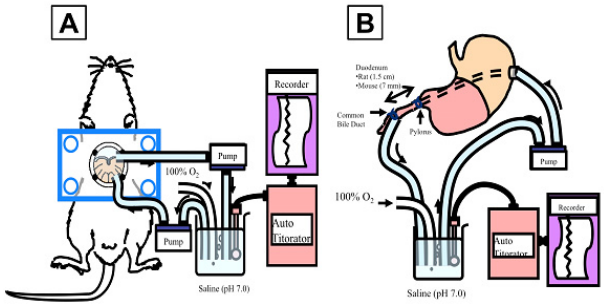

Fig. 1. Schematic illustration of the perfusion system and order of connection of the loop to determine HCO_3^- secretion in the whole stomach **(A)** or proximal duodenum **(B)** of an anesthetized rat. The tissue was continuously perfused at a rate of 0.2 ml/min with saline, which was gassed with 100 % O_2, heated at 37 °C, and kept in a reservoir. HCO_3^- secretion was measured at pH 7.0 using a pH-stat method

The *ex-vivo* chambered stomach or duodenal loop was perfused at a rate of 0.2 ml/min with saline, which was gassed with 100 % O_2 and kept in a reservoir. The secretion of HCO_3^- was measured at pH 7.0 using a pH-stat method (Hiranuma Comtite-8, Mito, Japan) and by the addition of 2 mM HCl to the reservoir. To unmask HCO_3^- in the stomach, the secretion of acid was completely inhibited by omeprazole, which was administered i.p. at a dose of 60 mg/kg. Omeprazole at this dose has been shown to have no influence on gastric HCO_3^- secretion in rats (Flemstrom, Mattsson 1986). After the basal secretion of HCO_3^- had been stabilized, the chamber or loop was perfused at a rate of 0.2 ml/min for 10 min with lubiprostone (0.1~30 μM) made isotonic with NaCl. In some cases, HCO_3^- secretion was stimulated in both the stomach and duodenum by PGE_2 (1 mg/kg) given intravenously (i.v.). Indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor:

5 mg/kg), ONO-8711 (an EP_1 antagonist: 10 mg/kg), or AE5-599 (an EP_3 antagonist: 10 mg/kg) was given subcutaneously (s.c.) 1 h before the application of lubiprostone or administration of PGE_2, while AE3-208 (an EP_4 antagonist: 3 mg/kg) or $CFTR_{inh}$-172 (an inhibitor of CFTR: 1 mg/kg) was given intraperitoneally (i.p.) 30 min before. The doses of these EP and CFTR antagonists were selected in order to induce the respective pharmacological actions according to the findings of previous studies (Hayashi et al. 2014; Takeuchi et al. 2011; Takeuchi et al. 2002; Norimatsu et al. 2012).

3. Determination of gene expression of the ClC-2 chloride channel and EP_1-EP_4 receptors

The gene expression of the ClC-2 chloride channel and EP_1-EP_4 receptors was measured in the gastric and duodenal mucosa by a reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). The stomach or duodenum was removed under deep ether anesthesia, and stored at -80 °C prior to use. Total RNA was extracted from tissue samples using Sepasol RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Total RNA was reverse-transcribed with a first strand cDNA synthesis kit (ReverTra Ace alpha, TOYOBO, Osaka, Japan). The sequences of the sense and antisense primers for the rat ClC-2 chloride channel and EP_1-EP_4 receptors, and each product size, are shown in Table 1. An aliquot

Table 1. Sequences of Sense and Antisense Primers for ClC-2 and EP_1-EP_4 Receptors

Gene	Primer Sequence 5'-3'	PCR Product
ClC-2		499 bp
Forward	CAAGTTCCTCTCCCTCTTTG	
Reverse	GAACTGTCCAAAGCCAGGG	
EP1		778 bp
Forward	CCCAGGGTCCCCAATACATCT	
Reverse	GGGCAGCTGTGGTTGAAG	
EP2		1178 bp
Forward	CGCCCTCCACCATGGACAAT	
Reverse	AAGCAGCGCATGCTCACAAC	
EP3		666 bp
Forward	TGGCTGGCGCTCACCGACTTG	
Reverse	GCATTGCTCTACTGACATCTG	
EP4		488 bp
Forward	CCCTGCAGCGCCTCAGTGACTTT	
Reverse	CTTGCCTCCGAGGCTGCTTTCAGT	
GAPDH		331 bp
Forward	GAACGGGAAGCTCACTGGCATGGC	
Reverse	TGAGGTCCACCACCCTGTTGCTG	

of the RT reaction product served as a template in 35 cycles of PCR with 0.5 min of denaturation at 95 °C and 1 min of extension at 68 °C using the Advantage 2 polymerase mixture (CLONTECH, Mountain View, CA) in a thermal cycler (PC-806, ASTEC, Fukuoka, Japan). A portion of the PCR mixture was electrophoresed in 1.5 % agarose gel in Tris-acetic acid-EDTA buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, and 2 mM EDTA; pH 8.1), and the gel was stained with ethidium bromide and photographed (Bio Doc-It Imaging System; UVP, Upland, CA, USA). Images were analyzed with Image J (version 1.39).

4. Preparation of drugs

The drugs used were prostaglandin E_2, indomethacin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), lubiprostone (Abbott Japan Co., Ltd. Tokyo, Japan), ONO-8711 (an EP_1 antagonist), AE5-599 (an EP_3 antagonist), AE3-208 (an EP_4 antagonist) (Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan), CFTR(inh)-172 (a CFTR inhibitor; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), and urethane (Tokyo Kasei, Tokyo, Japan). Prostanoids, including lubiprostone, were dissolved in absolute ethanol and diluted with saline to the desired concentrations. Indomethacin was suspended in a 0.5 % hydroxypropylcellulose solution (Wako Pure Chemicals). Other drugs were dissolved in saline. All drugs were prepared immediately before use, perfused intraluminally at a rate of 0.2 ml/min, and administered subcutaneously (s.c.) or intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.5 ml/100 g body weight or intravenously (i.v.) in a volume of 0.1 ml/100 g body weight. Control animals received the vehicle alone.

5. Statistical analyses

Data are presented as means ± SE for four to eight rats per group. Statistical analyses were performed using a two-tailed unpaired t-test and Dunnett's multiple comparison test, and values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

1. Effects of lubiprostone on gastric HCO_3^- secretion

Under urethane anesthesia, the rat chambered stomach spontaneously secreted HCO_3^- at a steady rate of 0.1~0.2 μEq/10 min, and secretion remained unaltered after the perfusion of saline for 10 min at a rate of 0.2 ml/min. The perfusion of the chambered stomach with lubiprostone (1–30 μM) for 10 min increased the secretion of HCO_3^- in a concentration-dependent manner. The rate of HCO_3^- secretion was significantly increased by lubiprostone perfusion at 30 μM compared to saline (fig. 2A), while the net HCO_3^- output was significantly greater at 10 μM and 30 μM than that in the saline-perfused stomach; ΔHCO_3^- outputs at 1, 10, and 30 μM were 1.11 ± 0.42, 2.15 ± 0.36, and 3.53 ± 0.37 μEq/h, respectively (fig. 2B). The HCO_3^- response to lubiprostone in the stomach persisted for ap-

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-92-100

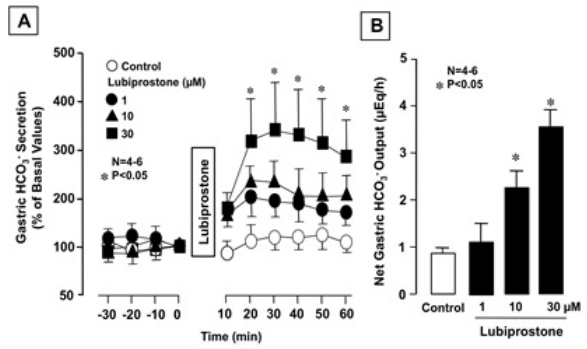

Fig. 2. Effects of lubiprostone on gastric HCO_3^- secretion in anesthetized rats. The chambered stomach was perfused at a rate of 0.2 ml/min for 10 min with lubiprostone (1–30 μM), and HCO_3^- secretion was measured before and after the perfusion of lubiprostone. Figure A: Data are presented as the mean ± SE of the values determined every 10 min from 4–6 rats. *Significantly different from the control, at $P < 0.05$.
Figure B shows the net HCO_3^- output for 1 h after the perfusion of lubiprostone, and the data represent the mean ± SE from 4–6 rats. *Significantly different from the control, at $P < 0.05$

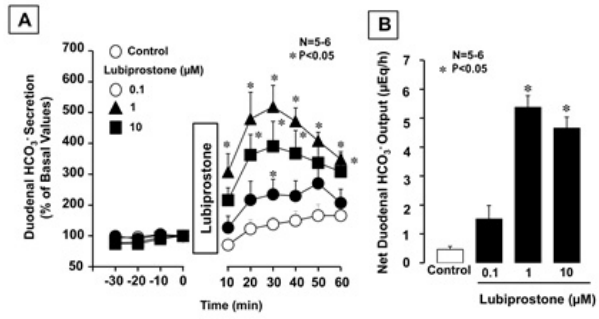

Fig. 3. Effects of lubiprostone on duodenal HCO_3^- secretion in anesthetized rats. The duodenal loop was perfused at a rate of 0.2 ml/min for 10 min with lubiprostone (0.1–10 μM), and HCO_3^- secretion was measured before and after the perfusion of lubiprostone. Figure A: Data are presented as the mean ± SE of the values determined every 10 min from 5–6 rats. *Significantly different from the control, at $P < 0.05$.
Figure B shows the net HCO_3^- output for 1 h after the perfusion of lubiprostone, and the data represent the mean ± SE from 4–6 rats. *Significantly different from the control, at $P < 0.05$

proximately 2 h. Based on these results, lubiprostone was perfused in the chambered stomach at 30 μM in subsequent experiments.

2. Effects of lubiprostone on duodenal HCO_3^- secretion

The rat duodenum spontaneously secreted HCO_3^- at a steady rate of 0.3~0.5 μEq/10 min under urethane anesthesia, and its secretion remained unaltered after the perfusion of saline for 10 min at a rate of 0.2 ml/min. However, lubiprostone (0.1–10 μM) perfused luminally in the duodenal loop for 10 min increased the secretion of HCO_3^- in a concentration-dependent manner, and its secretion was significantly greater at concentrations of 1 μM and 10 μM than that in the saline-perfused duodenum; ΔHCO_3^- outputs at 0.1, 1, and 10 μM were 1.62 ± 0.42, 5.35 ± 0.31, and 4.78 ± 0.32 μEq/h, respectively (figs. 3A and 3B). Based on these results, lubiprostone was perfused in the duodenal loop at 1 μM in subsequent experiments.

3. Effects of EP_1, EP_3, and EP_4 antagonists on lubiprostone-stimulated gastric HCO_3^- secretion

The luminal perfusion of lubiprostone (30 μM) in the chambered stomach for 10 min potently increased HCO_3^- secretion, with ΔHCO_3^- output at 3.73 ± 0.41 μEq/h, which was significantly higher than that (0.96 ± 0.08 μEq/h) in the control. The stimulatory effects of lubiprostone were significantly attenuated by the pretreatment of animals with ONO-8711 (10 mg/kg, s.c.), the EP_1 antagonist, but not by either AE5-599 (10 mg/kg), the EP_3 antagonist, or AE3-208 (3 mg/kg), the EP_4 antagonist, with the degrees of inhibition being 70.3 %, 16.2 %, and -16.1 %, respectively (fig. 4).

4. Effects of EP_1, EP_3, and EP_4 antagonists on lubiprostone-stimulated duodenal HCO_3^- secretion

The luminal perfusion of lubiprostone (1 μM) in the duodenal loop for 10 min significantly elevated HCO_3^- secretion over that in the control group treated with saline; ΔHCO_3^- output was 5.38 ± 0.41 μEq/h. The HCO_3^- stimulatory effect of lubiprostone was significantly attenuated by the pretreatment of animals with AE5-599 (10 mg/kg, s.c.) and AE3-208 (3 mg/kg, i.p.), but not with ONO-8711 (10 mg/kg, s.c.), and the degrees of inhibition were 48.2 %, 75.9 % and 5.5 %, respectively (fig. 5).

5. Effects of indomethacin and CFTR(inh)-172 on HCO_3^- responses induced by lubiprostone in the stomach and duodenum

Since the HCO_3^- response to lubiprostone was significantly attenuated by EP antagonists, this effect may be mediated by endogenous PGs. Lubiprostone has also been shown to activate ClC-2 chloride channels (De Lisle et al. 2010; Schiffhauer

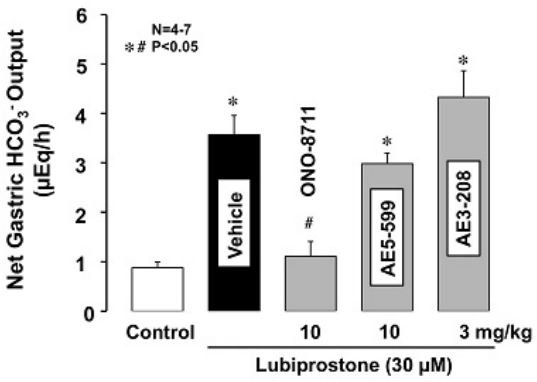

Fig. 4. Effects of various subtype-selective EP antagonists on lubiprostone-stimulated gastric HCO_3^- secretion in anesthetized rats. Lubiprostone (30 μM) was perfused in the chambered stomach at a rate of 0.2 ml/min for 10 min. ONO-8711 (an EP_1 antagonist: 10 mg/kg) or AE5-599 (an EP_3 antagonist: 10 mg/kg) was given s.c. 1 h before the perfusion of lubiprostone, while AE3-208 (an EP_4 antagonist: 3 mg/kg) was given i.p. 30 min before. Data are presented as the mean ± SE for 4–7 rats. Significant difference at P < 0.05; *from the control; # from the vehicle

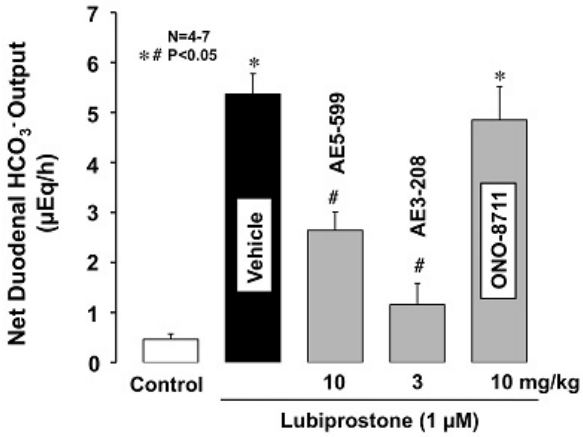

Fig. 5. Effects of various subtype-selective EP antagonists on lubiprostone-stimulated duodenal HCO_3^- secretion in anesthetized rats. Lubiprostone (1 μM) was perfused in the duodenal loop at a rate of 0.2 ml/min for 10 min. ONO-8711 (an EP_1 antagonist: 10 mg/kg) or AE5-599 (an EP_3 antagonist: 10 mg/kg) was given s.c. 1 h before the perfusion of lubiprostone, while AE3-208 (an EP_4 antagonist: 3 mg/kg) was given i.p. 30 min before. Data are presented as the mean ± SE for 4–7 rats. Significant difference at P < 0.05; *from the control; # from the vehicle

et al. 2013). In order to investigate the possible involvement of endogenous PGs and ClC-2 chloride channels in the HCO_3^- stimulatory action of lubiprostone, we examined the effects of indomethacin and CFTR(inh)-172 on HCO_3^- responses to lubiprostone in the stomach and duodenum.

When lubiprostone was perfused for 10 min into the chambered stomach or duodenal loop at 30 μM or 1 μM, respectively, the secretion of HCO_3^- was significantly increased; ΔHCO_3^- output was 3.68 ± 0.46 μEq/h in the stomach or 5.50 ± 0.32 μEq/h in the duodenum, respectively. As shown in Fig. 6A, HCO_3^- responses in the stomach and duodenum were not significantly affected by the pretreatment of animals with indomethacin (5 mg/kg, s.c.); the responses observed were similar to those in control tissues. On the other hand, CFT(inh)-172 (1 mg/kg, i.p.), the inhibitor of CFTR, significantly attenuated the HCO_3^- response to lubiprostone (1 μM) in the duodenum, but not in the stomach, with inhibition at 41.6 % in the former and 23.6 % in the latter (fig. 6B).

6. Effects of EP_1, EP_3, and EP_4 antagonists on PGE_2-induced gastric and duodenal HCO_3^- secretion

To confirm the involvement of specific EP receptor subtypes in the HCO_3^- response to PGE_2 in the stomach and duodenum, we examined the effects of various EP antagonists on PGE_2-induced HCO_3^- secretion in these tissues. The intravenous administration of PGE_2 (1 mg/kg) significantly increased the secretion of HCO_3^- in the stomach and duodenum; ΔHCO_3^- output was at 3.48 ± 0.96 μEq/h

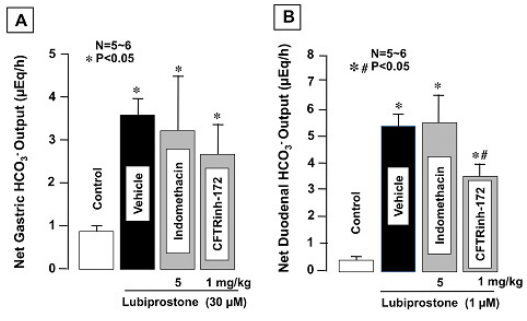

Fig. 6. Effects of indomethacin and $CFTR_{inh}$-172 on lubiprostone-stimulated HCO_3^- secretion in the stomach **(A)** and duodenum **(B)** of anesthetized rats. The chambered stomach or duodenal loop was perfused at a rate of 0.2 ml/min for 10 min with lubiprostone at 30 μm or 1 μM, respectively. Indomethacin (5 mg/kg) was given s.c. 1 h before the perfusion of lubiprostone while $CFTR_{inh}$-172 (1 mg/kg), the CFTR inhibitor, was given i.p. 30 min before. Data are presented as the mean ± SE for 4–7 rats. Data are presented as the mean ± SE for 5–6 rats. Significant difference at P < 0.05; *from the control; # from the vehicle

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-92-100

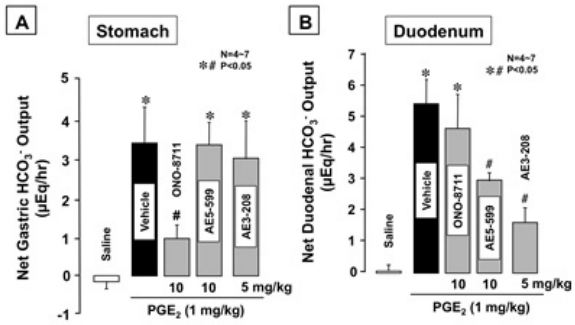

Fig. 7. Effects of various subtype-selective EP antagonists on PGE_2-stimulated HCO_3^- secretion in the stomach **(A)** and duodenum **(B)** of anesthetized rats. PGE_2 was administered i.v. at 1 mg/kg. ONO-8711 (an EP_1 antagonist: 10 mg/kg) or AE5-599 (an EP_3 antagonist: 10 mg/kg) was given s.c. 1 h before the administration of PGE_2, while AE3-208 (an EP_4 antagonist: 3 mg/kg) was given i.p. 30 min before. Data are presented as the mean ± SE for 4–7 rats. Significant difference at $P < 0.05$; *from the control; # from the vehicle

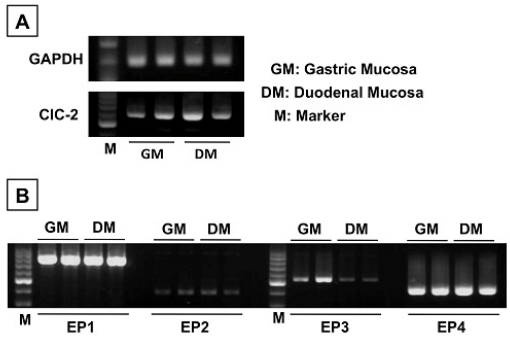

Fig. 8. Gene expression of EP receptor subtypes (EP_1-EP_4) **(A)** and ClC-2 **(B)** in the rat stomach and duodenum

and 5.43 ± 0.62 μEq/h, respectively (fig. 7). The response in the stomach was significantly inhibited by ONO-8711 (10 mg/kg, s.c.), but not by AE5-599 (10 mg/kg, s.c.) or AE3-208 (5 mg/kg, i.p.), while the response in the duodenum was significantly attenuated by both AE5-599 and AE3-208, but not by ONO-8711.

7. Gene expression of the ClC-2 chloride channels and EP_1-EP_4 receptors in rat gastric and duodenal mucosa

Since EP_1 and EP_3/EP_4 receptors were found to be involved in the HCO_3^- stimulatory action of lubiprostone in the stomach and duodenum, respectively, we examined the gene expression of various EP receptor subtypes (EP_1-EP_4) in addition to the ClC-2 chloride channel. As shown in fig. 8A, EP_1-EP_4 receptors were expressed in both the gastric and duodenal mucosa, although differences were observed in the intensity of their expression. The gene expression of the ClC-2 chloride channel was also clearly detected in both tissues (fig. 8B).

Discussion

Lubiprostone has been used to treat chronic constipation (Schey, Rao 2011), and its mechanism of action has been attributed to the stimulation of intestinal fluid secretion via the activation of ClC-2 chloride channels (Schwiebert et al. 1998; Cuppoletti et al. 2004). This drug is a bicyclic fatty acid derived from PGE_1 and has been shown to activate PGE receptors (Bassil et al. 2008; Mizumori et al. 2009; Cuthbert 2011). We recently reported that lubiprostone prevented indomethacin-induced small intestinal damage via the activation of EP_4 receptors, similar to PGE_2 (Hayashi et al. 2014; Flemström, Garner 1982), suggesting the prophylactic use of this drug against NSAID-induced enteropathy. In the present study, we demonstrated for the first time that lubiprostone stimulated HCO_3^- secretion in both the stomach and duodenum via different EP receptor subtypes; its effect in the stomach was mediated by EP_1 receptors, while that in the duodenum was mediated by both EP_3 and EP_4 receptors.

The secretion of HCO_3^- from the surface epithelium is one of the mucosal defensive mechanisms and plays an important role in protecting the gastroduodenal mucosa. Various analogues of PGs or agents that enhance the biosynthesis of endogenous PGs stimulate HCO_3^- secretion, while nonsteroidal anti-inflammatory agents decrease the secretion of HCO_3^- by inhibiting PG generation (Flemström, Garner 1982; Flemström, Turnberg 1984; Takeuchi 1986; Takeuchi et al. 2011). We previously reported that PGE_2 affected HCO_3^- secretion via distinctive mechanisms in the stomach and duodenum concerning the EP receptor subtypes involved in this process; its effect in the stomach was mediated by EP_1 receptors coupled with elevations in intracellular Ca^{2+}, while that in the duodenum was associated with the intracellular accumulation of both Ca^{2+} and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) caused by the activation of EP_3/EP_4 receptors (Takeuchi et al. 1997; Takeuchi et al. 1999; Aoi et al. 2004; Aihara et al. 2007; Takeuchi et al. 2011).

Since lubiprostone is derived from PGE_1 and induces its pharmacological effects through EP receptors (Schwiebert et al. 1998; Cuppoletti et al. 2004),

this drug may increase the secretion of HCO_3^- in the stomach and duodenum via EP receptors. Mizumori et al. (2009) was the first to report that lubiprostone stimulated duodenal HCO_3^- secretion via the activation of EP_4 receptors in rats, and suggested the possibility of its protection of the duodenum from acid-induced injury. We confirmed the HCO_3^- stimulatory effect of lubiprostone in the duodenum via EP_4 receptors and further showed that this effect was mediated by the activation of not only EP_4 receptors, but also EP_3 receptors. As expected, we also found that this drug increased the secretion of HCO_3^- in the stomach, and this effect was significantly attenuated by the pretreatment with ONO-8711, the EP_1 antagonist, but not by the EP_3 or EP_4 antagonist, suggesting that its action in the stomach was mediated by the activation of EP_1 receptors. Lubiprostone is unlikely to have stimulated HCO_3^- secretion by increasing endogenous PG levels, because this effect was observed even under PG-deficient conditions caused by indomethacin. This was also supported by previous findings in which lubiprostone prevented the intestinal ulcerogenic response caused by indomethacin via EP_4 receptors (Takeuchi 2014; Hayashi et al. 2014). In a preliminary study, we also observed the effects of lubiprostone in an isolated mouse stomach *in vitro*, which suggested its direct action on epithelial cells without involving intrinsic and extrinsic nerves (Takeuchi 2014).

Several studies demonstrated that lubiprostone activated ClC-2/CFTR chloride channels via EP_4 receptors (Bassil et al. 2008; Mizumori et al. 2009; Cuthbert 2011). Lubiprostone has been shown to stimulate CFTR-dependent duodenal HCO_3^- secretion without changing net Cl^- secretion, which suggested that lubiprostone acts as a dual activator of CFTR-independent Cl^- secretion and as a PG receptor agonist (Mizumori et al. 2009). In the present study, we confirmed the gene expression of ClC-2 chloride channels as well as EP_1-EP_4 receptors in both rat stomach and duodenum, with some differences in the intensity of their expression. Although the cell types that express each EP receptor subtype and ClC-2 chloride channels have not yet been identified, we assumed that ClC-2/CFTR channels are expressed in epithelial cells, even in the stomach. However, we noted that the prior administration of CFTR(inh)-172, an inhibitor of CFTR, significantly attenuated the HCO_3^- stimulatory effect of lubiprostone in the duodenum, but not in the stomach. Since the activation of EP_4 receptors increases intracellular camp (Regan 2003), and elevations in cAMP, in turn, activate CFTR (Li, Naren 2005), CFTR-dependent HCO_3^- secretion by lubiprostone appeared to be consistent with the activation of EP_4 receptors by lubiprostone. Norimatsu et al. (2012) also confirmed that CFTR was activated by lubiprostone via the EP_4 receptor in oocytes, even though the drug had no direct effect on either ClC-2 or CFTR channels expressed in oocytes. It has not yet been determined why the effect of lubiprostone in the stomach was unaffected by the CFTR inhibitor; however, these results suggest that the direct activation of CFTR/ClC-2 chloride channels does not contribute to the HCO_3^- stimulatory action of lubiprostone in the stomach.

Another interesting finding was that the effective dose of lubiprostone markedly differed between the stomach and duodenum; the stimulation of HCO_3^- secretion was observed at ≥ 10 μM in the stomach and at ≥ 1 μM in the duodenum. Consistent with our previous findings (Takeuchi et al. 1997; Takeuchi et al. 1999; Aoi et al. 2004; Aihara et al. 2007; Takeuchi et al. 2011), PGE_2 stimulated HCO_3^- secretion in both the stomach and duodenum at the same dose level (1 mg/kg, i.v.); however, these effects were mediated via different EP receptors in these tissues, similar to those of lubiprostone. Although this difference remains unexplained, it may have been due to different affinities to the EP receptor subtypes and/or ClC-2/CFTR-dependency; higher affinity to both EP_3/EP_4 receptors than EP_1 receptors and ClC-2/CFTR- dependency in the duodenum, but not in the stomach.

The present results suggest that lubiprostone, a bicyclic fatty acid derived from PGE_1, stimulated HCO_3^- secretion in the stomach and duodenum, similar to PGE_2, and these effects were mediated by different EP receptor subtypes in these tissues; the effect observed in the stomach was mediated by EP_1 receptors, while that in the duodenum was mediated by both EP_3 and EP_4 receptors. In addition, CFTR was involved in modulating HCO_3^- secretion in the duodenum, but not in the stomach. Considering the findings in the present study, it is assumed that beyond treatment of constipation, irritable bowel syndrome and enteropathy, lubiprostone may have potential to be used more for protection against gastritis and peptic ulcer diseases, since it does stimulate the secretion of HCO_3^- in both the stomach and duodenum. Furthermore, because duodenal HCO_3^- secretion was shown to be impaired in patients with *Helicobacter pylori* (Tuo et al. 2004; Tuo et al. 2009), it is also possible that lubiprostone may be useful for treatment of *Helicobater pylori*-related diseases.

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-92-100

Conclusion

Lubiprostone stimulated gastroduodenal HCO_3^- secretion, and these stimulatory effects differed in the two tissues examined; the effect observed in the stomach was mediated by EP_1 receptors and independent of CFTR channels, while that in the duodenum was mediated by both EP_3 and EP_4 receptors and dependent on CFTR channels. Lubiprostone appeared to protect the stomach and duodenum against acid injury by stimulating the secretion of HCO_3^-.

Conflict of interest statement

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the graduate and undergraduate students at Division of Pathological Sciences, Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Kyoto Pharmaceutical University for their technical collaboration.

References

Aihara, E., Nomura, Y., Sasaki, Y. et al. (2007) Involvement of prostaglandin E receptor EP_3 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. *Life Sciences*, vol. 80, no. 26, pp. 2446–2453. PMID: 17512019. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.04.012 (In English)

Aoi, M., Aihara, E., Nakashima, M. et al. (2004) Participation of prostaglandin receptor EP_4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, no. 1, pp. G96–G103. PMID: 15194560. DOI: 10.1152/ajpgi.00038.2004 (In English)

Bao, H. F., Liu, L., Self, J. et al. (2008) A synthetic prostone activates apical chloride channels in A6 epithelial cells. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology,* vol. 295, no. 2, pp. G234–G251. PMID: 18511742. DOI: 10.1152/ajpgi.00366.2007 (In English)

Bassil, A. K., Borman, R. A., Jarvie, E. M. et al. (2008) Activation of prostaglandin EP receptors by lubiprostone in rat and human stomach and colon. *British Journal of Pharmacology,* vol. 154, no. 1, pp. 126–135. PMID: 18332851. DOI: 10.1038/bjp.2008.84 (In English)

Cuppoletti, J., Malinowska, D. H., Tewari, K. P. et al. (2004) SPI-0211 activates T84 cell chloride transport and recombinant human ClC-2 chloride currents. *American Journal of Physiology: Cell Psychology, vol.* 287, no. 5, pp. C1173–C1183. PMID: 1521305. DOI: 10.1152/ajpcell.00528.2003 (In English)

Cuthbert, A. W. (2011) Lubiprostone targets prostanoid EP_4 receptors in ovine airways. *British Journal of Pharmacology,* vol. 162, no. 2, pp. 508–520. PMID: 20883477. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01058.x (In English)

De Lisle, R. C., Mueller, R., Roach, E. (2010) Lubiprostone ameliorates the cystic fibrosis mouse intestinal phenotype. *BMC Gastroenterology,* vol. 10, article 107. PMID: 20843337. DOI: 10.1186/1471-230X-10-107 (In English)

Flemström, G., Garner, A. (1982) Gastroduodenal transport: Characteristics and proposed role in acidity regulation and mucosal protection. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology,* vol. 242, no. 3, pp. G183–G193. PMID: 7039351. DOI: 10.1152/ajpgi.1982.242.3.G183 (In English)

Flemström, G., Mattsson, H. (1986) Effects of omeprazole on gastric and duodenal bicarbonate secretion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 21, suppl. 118, pp. 65–67. DOI: 10.3109/00365528609090894 (In English)

Flemström, G., Turnberg, L. A. (1984) Gastroduodenal defense mechanisms. *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 13, no. 2, pp. 327–354. PMID: 6378442 (In English)

Hatazawa, R., Ohno, R., Tanigami, M. et al. (2006) Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in healing of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 318, no. 2, pp. 691–699. DOI: 10.1124/jpet.106.103994 (In English)

Hayashi, S., Kurata, N., Yamaguchi, A. et al. (2014) Lubiprostone prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage by suppressing the expression of inflammatory mediators via EP_4 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 349, no. 3, pp. 470–479. DOI: 10.1124/jpet.114.213991 (In English)

Heylings, J. R., Garner, A., Flemström, G. (1984) Regulation of gastroduodenal transport by luminal acid in the frog *in vitro*. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 246, no. 3, pp. G235–G242. DOI: 10.1152/ajpgi.1984.246.3.G235 (In English)

Hogan, D. L., Yao, B., Steinbach, J. H., Isenberg, J. I. (1993) The enteric nervous system modulates mammalian duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Gastroenterology*, vol. 105, no. 2, pp. 410–417. PMID: 8335196. DOI: 10.1016/0016-5085(93)90714-n (In English)

Koyama, M., Hayashi, S., Takahashi, K., Takeuchi, K. (2010) Lubiprostone stimulates HCO_3^- secretion in isolated mouse stomachs *in vitro* through activation of prostaglandin EP_1 receptors. *Gastroenterology*, vol. 138, no. 5, suppl. 1, p. S-59. DOI: 10.1016/S0016-5085(10)60269-7 (In English)

Kunikata, T., Tanaka, A., Miyazawa, T. et al. (2002) 16,16-Dimethyl prostaglandin E_2 inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP_3 and EP_4 receptors. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 47, no. 4, pp. 894–904. PMID: 11991626. DOI: 10.1023/a:1014725024519 (In English)

Li, C., Naren, A. P. (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 108, no. 2, pp. 208–223. PMID: 15936089. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.004 (In English)

Mizumori, M., Akiba, Y., Kaunitz, J. D. (2009) Lubiprostone stimulates duodenal bicarbonate secretion in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 54, no. 10, pp. 2063–2069. PMID: 19657734. DOI: 10.1007/s10620-009-0907-0 (In English)

Norimatsu, Y., Moran, A. R., MacDonald, K. D. (2012) Lubiprostone activates CFTR, but not ClC-2, via the prostaglandin receptor (EP_4). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 426, no. 3, pp. 374–379. PMID: 22960173. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.097 (In English)

Regan, J. W. (2003) EP_2 and EP_4 prostanoid receptor signaling. *Life Sciences*, vol. 74, no. 2–3, pp. 143–153. PMID: 14607241. DOI: 10.1016/j.lfs.2003.09.031 (In English)

Schey, R., Rao, S. S. (2011) Lubiprostone for the treatment of adults with constipation and irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 56, no. 6, pp. 1619–1625. PMID: 21523369. DOI: 10.1007/s10620-011-1702-2 (In English)

Schiffhauer, E. S., Vij, N., Kovbasnjuk, O. et al. (2013) Dual activation of CFTR and CLCN2 by lubiprostone in murine nasal epithelia. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 304, no. 5, pp. L324–331. PMID: 23316067. DOI: 10.1152/ajplung.00277.2012 (In English)

Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D. et al. (1998) Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 7, pp. 3879–3884. DOI: 10.1073/pnas.95.7.3879 (In English)

Sugamoto, S., Kawauchi, S., Furukawa, O. et al. (2001) Role of endogenous nitric oxide and prostaglandin in duodenal bicarbonate response induced by mucosal acidification in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 46, no. 6, pp. 1208–1216. PMID: 11414296. DOI: 10.1023/a:1010603026913 (In English)

Takeuchi, K. (2014) Prophylactic effects of prostaglandin E_2 on NSAID-induced enteropathy — role of EP_4 receptors in its protective and healing-promoting effects. *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 19, pp. 38–45. PMID: 25063918. DOI: 10.1016/j.coph.2014.07.005 (In English)

Takeuchi, K., Furukawa, O., Okada, M. et al. (1990) Influence of stress on gastric alkaline secretion in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 252, no. 3, pp. 1228–1233. PMID: 2319469. (In English)

Takeuchi, K., Furukawa, O., Tanaka, H., Okabe, S. (1986) A new model of duodenal ulcers induced in rats by indomethacin plus histamine. *Gastroenterology*, vol. 90, no. 3, pp. 636–645. PMID: 3943695. DOI: 10.1016/0016-5085(86)91118-2 (In English)

Takeuchi, K., Kita, K., Hayashi, S. Aihara, E. (2011) Regulatory mechanism of duodenal bicarbonate secretion: Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 130, no. 1, pp. 59–70. PMID: 21185865. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.006 (In English)

Takeuchi, K., Matsumoto, J., Ueshima, K., Okabe, S. (1991) Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in alkaline secretory response to luminal acid in the rat duodenum. *Gastroenterology*, vol. 101, no. 4, pp. 954–961. PMID: 1889720. DOI: 10.1016/0016-5085(91)90721-v (In English)

Takeuchi, K., Ogawa, Y., Kagawa, S., Ukawa, H. (2002) Gastric ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP_1 receptors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 16, suppl. 2, pp. 74–82. PMID: 11966527. DOI: 10.1046/j.1365-2036.16.s2.21.x (In English)

Takeuchi, K., Ukawa, H., Furukawa, O. et al. (1999) Prostaglandin E receptor subtypes involved in gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 50, no. 2, pp. 155–167. PMID: 10424714. (In English)

Takeuchi, K., Yagi, K., Kato, S., Ukawa, H. (1997) Roles of prostaglandin E-receptor subtypes in gastric and duodenal bicarbonate secretion in rats. *Gastroenterology*, vol. 113, no. 5, pp. 1553–1559. PMID: 9352857. DOI: 10.1053/gast.1997.v113.pm9352857 (In English)

Tuo, B.-G., Sellers, Z.M., Smith, A.J. et al. (2004) A role for CagA/VacA in *Helicobacter pylori* inhibition of murine duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 49, no. 11–12, pp. 1845–1852. DOI: 10.1007/s10620-004-9582-3 (In English)

Tuo, B., Song, P., Wen, G. et al. (2009) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits duodenal bicarbonate secretion by a histamine-dependent mechanism in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 199, no. 4, pp. 505–512. PMID: 19099486. DOI: 10.1086/596318 (In English)

Woodward, D.F., Jones, R.L., Narumiya, S. (2011) International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIII: Classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 3, pp. 471–538. PMID: 21752876. DOI: 10.1124/pr.110.003517 (In English)

Экспериментальные статьи

УДК 612.258.1+612.014.464+57.084.1 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107

Участие оксида азота в механизмах влияния провоспалительного цитокина ИЛ-1β на гиперкапнический вентиляционный ответ

Н. П. Александрова[1], Г. А. Данилова[✉1], А. А. Клинникова[1]

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

Сведения об авторах
Нина Павловна Александрова,
SPIN-код: 4994-4591,
Scopus AuthorID: 56249021000,
ORCID: 0000-0002-5564-161X,
e-mail: naleks54@yandex.ru

Галина Анатольевна Данилова,
SPIN-код: 6784-1326,
Scopus AuthorID: 7003784398,
ORCID: 0000-0001-8091-0618,
e-mail: danilovaga@infran.ru

Анна Андреевна Клинникова,
SPIN-код: 8341-1551,
ORCID: 0000-0002-2728-423X,
e-mail: klinnikova.an@gmail.com

Для цитирования:
Александрова, Н. П., Данилова, Г. А., Клинникова, А. А. (2020) Участие оксида азота в механизмах влияния провоспалительного цитокина ИЛ-1β на гиперкапнический вентиляционный ответ. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 101–107. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107

Получена 2 декабря 2019;
прошла рецензирование 11 февраля 2020;
принята 25 февраля 2020.

Права: © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Целью данного исследования было выяснение роли нитрергических механизмов в способности основного провоспалительного цитокина ИЛ-1β оказывать влияние на паттерн дыхания и чувствительность респираторной системы к гиперкапнии. Эксперименты проводились на трахеостомированных наркотизированных крысах. Гиперкапнический вентиляторный ответ оценивался методом возвратного дыхания гипероксически-гиперкапнической газовой смесью до и после церебровентрикулярного введения ИЛ-1β. Для выявления участия оксида азота в вентиляционных эффектах ИЛ-1β использовался неспецифический ингибитор NO-синтазной активности L-NAME.
Установлено, что при экзогенном повышении церебрального уровня ИЛ-1β наблюдается достоверное увеличение вентиляции легких на фоне снижения вентиляционной чувствительности к гиперкапнии. Прирост вентиляционного ответа на гиперкапнический стимул уменьшается почти в два раза на 40 мин действия цитокина. При предварительном введении L-NAME респираторные эффекты ИЛ-1β не проявляются. Сделан вывод об участии оксида азота в модуляции рефлекторных механизмов регуляции дыхания в условиях воспаления, при активации иммунной системы и повышении в организме уровня провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: цитокин, интерлейкин-1бета, гиперкапния, респираторный хеморефлекс, дыхание, вентиляция, NO-синтаза.

The role of nitric oxide in the effects of the pro-inflammatory cytokine IL-1β on the hypercapnic ventilation response

N. P. Aleksandrova[1], G. A. Danilova✉[1], A. A. Klinnikova[1]

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

Authors
Nina P. Aleksandrova,
SPIN: 4994-4591,
Scopus AuthorID: 56249021000,
ORCID: 0000-0002-5564-161X,
e-mail: naleks54@yandex.ru

Galina A. Danilova,
SPIN: 6784-1326,
Scopus AuthorID: 7003784398,
ORCID: 0000-0001-8091-0618,
e-mail: danilovaga@infran.ru

Anna A. Klinnikova,
SPIN: 8341-1551,
ORCID: 0000-0002-2728-423X,
e-mail: klinnikova.an@gmail.com

For citation: Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A., Klinnikova, A. A. (2020) The role of nitric oxide in the effects of the pro-inflammatory cytokine IL-1β on the hypercapnic ventilation response. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 101–107.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107

Received 2 December 2019; reviewed 11 February 2020; accepted 25 February 2020.

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The aim of the current study was to compare the respiratory effects of IL-1β before and after pre-treatment with L-NAME, a nonspecific NO-synthases inhibitor.
The experiments were performed on tracheotomised anaesthetised rats. The hypercapnic ventilatory response was measured by means of the rebreathing method using a hyperoxic-hypercapnic gas mixture (60 % O2, 7 % CO2) before and after the cerebroventricular administration of human recombinant IL-1β in the amount of 500 ng dissolved in 10 μl of saline. In order to determine the role of the NO-pathway in the ventilatory effects of IL-1β, L-NAME, a non-specific inhibitor of NO-synthase, was used.
As a result, the slope of the ventilatory response to carbon dioxide decreased almost twofold at 40 min. after the cerebroventricular administration of IL-1β. In contrast, the basal level of lung ventilation increased after the elevation of IL-1β in CSF. L-NAME pre-treatment reduced these respiratory effects of IL-1β. The data indicate that the inhibitor of NO-synthase significantly reduces the effect of the pro-inflammatory cytokine IL-1β.
The authors conclude that the ability of IL-1β to enhance basal ventilation and to reduce the ventilatory hypercapnic response may be mediated by NO-dependent mechanisms.

Keywords: cytokines, interleukin-1, hypercapnia, respiratory chemoreflex, breathing, ventilation, NO-synthase.

Введение

К настоящему времени установлено, что цитокины, биологически активные пептиды, экспрессируемые иммунокомпетентными клетками, участвуют в нейроиммунных взаимодействиях, оказывая прямое или опосредованное влияние на клетки центральной нервной системы (Мюльберг, Гришина 2006). Иммуногистохимические исследования показали наличие экспрессии цитокинов и их рецепторов в ядре солитарного тракта и в вентролатеральном отделе продолговатого мозга, т. е. в респираторно зависимых районах ствола мозга (Churchill, Taishi, Wang et al. 2006). Это позволяет предполагать участие провоспалительных цитокинов в центральных механизмах регуляции дыхания. Наши предыдущие исследования подтверждают это предположение, показывая, что экзогенное повышение церебрального уровня ИЛ-1β, ключевого провоспалительного цитокина, вызывает изменение паттерна дыхания и ослабление вентиляторного ответа на гиперкапнию (Aleksandrova, Danilova 2010; Aleksandrova, Danilova, Aleksandrov 2015). Снижение вентиляторной чувствительности к гиперкапнии было обнаружено и при усилении эндогенной продукции ФНО-α (фактора некроза опухолей), который также является провоспалительным цитокином, близким по своим свойствам к ИЛ-1β (Gosselin et al. 2003). В дальнейшем было установлено, что в модуляции дыхательных хеморефлексов, вызванной увеличением уровня ИЛ-1β в крови и/или в цереброспинальной жидкости, участвуют циклооксигеназные пути. Активация циклооксигеназы и усиление синтеза простагландинов является, вероятно, одним из основных специфических механизмов,

посредством которого ИЛ-1β может влиять на функцию респираторных нейронов и изменять функциональное состояние дыхательной системы (Aleksandrova, Danilova, Aleksandrov 2015; Hofstetter, Saha, Siljehav et al. 2007; Olsson, Kayhan, Lagercrantz, Herlenius 2003). Однако известно, что влияние ИЛ-1β на физиологические функции может быть опосредовано множественными путями, в том числе и через высвобождение оксида азота (Graff, Gozal 1999). Это позволяет предполагать, что усиление синтеза оксида азота клетками, которое происходит при взаимодействии ИЛ-1β с соответствующим мембранным рецептором, может оказаться еще одним механизмом, опосредующим влияние воспаления на респираторную функцию.

Целью настоящей работы явилась проверка этого предположения и исследование возможного участия NO-ергических механизмов в реализации влияний повышенного церебрального уровня ИЛ-1β на паттерн дыхания и гиперкапнический вентиляторный ответ. Для достижения этой цели были проведены эксперименты с интрацеребровентрикулярным введением ИЛ-1β на фоне действия L-нитро-аргинин-метил-эфира (L-NAME) — неспецифического блокатора NO-синтазы, фермента, который катализирует трансформацию L-аргинина в L-цитруллин и газообразные медиаторы NO. LNAME предотвращает проникновение в клетки L-аргинина и ингибирует его взаимодействие с любыми изоформами NO-синтаз, что уменьшает синтез эндогенного оксида азота.

Методика

Эксперименты проведены на 32 наркотизированных трахеостомированных спонтанно дышащих крысах-самцах линии Wistar весом 250–300 г. Наркоз осуществлялся внутрибрюшинным введением уретана из расчета 1400 мг/кг. Ректальная температура измерялась на протяжении всего эксперимента и поддерживалась на уровне, не превышавшем 38 °C. Исследование проводилось на животных из биоколлекции (ЦКП Биоколлекция ИФ РАН) с соблюдением основных норм и правил биомедицинской этики (European Community Council Directives 86/609/EEC).

Во всех экспериментах применялась пневмотахографическая методика для регистрации объемно-временных параметров внешнего дыхания. К трахеостомической канюле подключалась пневмометрическая трубка MLT-1L (ADInstruments, Австралия), которая обеспечивала ламинарность проходящего сквозь нее воздушного потока. При помощи пневмотахограммы измеряли длительность вдоха и выдоха, максимальную скорость воздушного потока и частоту дыхательных движений (ЧДД). Дыхательный объем (ДО) рассчитывался при помощи автоматического интегрирования пневмотахографической кривой в спирографическую. Минутный объем дыхания рассчитывался как произведение ДО на ЧДД.

Физиологические параметры регистрировались до введения ИЛ-1β и каждые 20 минут после его введения на протяжении 90 минут. Вентиляторный ответ на гиперкапнию тестировали при проведении 4-минутных проб с возвратным дыханием гипероксически-гиперкапнической газовой смесью (7 % CO_2, 60 % O_2). Парциальное давление углекислого газа (P_ECO_2) в конечной порции выдыхаемого воздуха измерялось при помощи метода масс-спектрометрии.

ИЛ-1β вводили в правый боковой желудочек головного мозга. Координаты для введения определялись по стереотаксическому атласу мозга крысы (Paxinos, Watson 1982) и составляли 0,8 мм каудальнее уровня bregma, 1,5 мм латеральнее средней линии и 3,5–4,0 мм от поверхности черепа в количестве 500 нг на животное.

При исследовании NO-ергических механизмов, участвующих в реализации респираторных эффектов ИЛ-1β, за 10 мин до введения цитокина производили внутривенное введение в хвостовую вену L-NAME неизбирательного ингибитора NO-синтаз в количестве 10 мг/кг массы тела.

Статистическая обработка данных производилась программными средствами с использованием статистического пакета Statistic for Windows и Microsoft Excel. Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка средней. Для выявления достоверности различий использовался однофакторный дисперсионный анализ. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Эксперименты с церебровентрикулярным введением ИЛ-1β показали, что экзогенное повышение церебрального уровня данного провоспалительного цитокина вызывает достоверное увеличение ДО, МОД и средней скорости инспираторного потока ($V_{инсп}$) (табл. 1). Помимо этого, наблюдается тенденция к увеличению ЧДД. Изменения параметров дыхания отмечались уже на 20-й минуте после введения ИЛ-1β, а на 40-й минуте становились статистически

Табл. 1. Изменение параметров дыхания при повышении церебрального уровня ИЛ-1β и сочетанном действии ИЛ-1β с L-NAME

Table 1. Effects of interleukin-1β and interleukin-1β with L-NAME pre-treatment on the breathing pattern

Параметр	**ИЛ-1β (n = 8)**			**ИЛ-1β + L-NAME (n = 8)**		
	фон	**40 мин**	**60 мин**	**фон**	**40 мин**	**60 мин**
МОД ($мл \cdot мин^{-1}$)	104 ± 9,0	126 ± 3,7**	131 ± 5,4**	227 ± 11,0	240 ± 12,9	252 ± 14,2
ДО (мл)	1,0 ± 0,05	1,13 ± 0,06*	1,17 ± 0,04*	2,2 ± 0,08	2,2 ± 0,09	2,2 ± 0,11
ЧД ($цикл \cdot мин^{-1}$)	109 ± 6,0	113 ± 6,8	115 ± 6,4	105 ± 4,0	110 ± 2,0	116 ± 3,0
Vинс ($мл \cdot с^{-1}$)	3,7 ± 0,27	4,4 ± 0,12*	4,5 ± 0,19*	8,1 ± 0,33	8,0 ± 0,42	8,7 ± 0,48

Примечание: * — *P < 0,05; ** — P < 0,01 по сравнению с фоновыми величинами*
** — P < 0.05; ** — P < 0.01 vs. baseline*

значимыми: ДО достоверно возрастал в среднем на 13 ± 3 %, МОД на 40 ± 5 %, $V_{инсп}$ на 20 ±3 %. Церебровентрикулярное введение ИЛ-1β на фоне действия L-NAME не вызывало достоверных изменений в величине объемно-временных параметров паттерна дыхания.

Анализ вентиляционного ответа на гиперкапнию выявил значительное изменение чувствительности дыхательной системы к гиперкапнической стимуляции при экзогенном повышении церебрального уровня ИЛ-1β. Было показано, что после введения цитокина уменьшается угол наклона линии тренда, усредняющей вентиляторные кривые, зарегистрированные в нескольких экспериментах (рис. 1А, Б, В). Как и следовало ожидать, при возвратном дыхании гиперкапнически-гипероксической газовой смесью (7 % CO_2, 60 % O_2) по мере роста парциального давления CO_2 в крови наблюдалось увеличение $V_{инсп}$, ДО и МОД как до введения ИЛ-1β, так и после его введения (Данилова 2014). Однако после введения препарата линии тренда становились более пологими, что свидетельствует о снижении вентиляционной чувствительности к гиперкапнической стимуляции. Отмеченный респираторный эффект ИЛ-1β отчетливо проявлялся через 20 минут действия вещества, через 40 минут был выражен максимально и исчезал через 90 минут после введения препарата (линии тренда становились параллельными). Проведение количественных расчетов показало достоверное снижение величины прироста МОД, ДО и $V_{инсп}$ в ответ на гиперкапническую стимуляцию на фоне действия ИЛ-1β (рис. 2). Максимальный эффект проявлялся на 40-й минуте действия цитокина. Прирост МОД при увеличении $P_{ET}CO_2$ на 1 мм рт. ст. через 40 минут действия ИЛ-1β снижался на 47 ± 9 %, прирост ДО — на 40 ± 8 % и $V_{инсп}$ на 38 ± 9 % по сравнению с фоновыми величинами.

При проведении серии контрольных экспериментов с церебровентрикулярным введением физиологического раствора не было выявлено изменений дыхательных параметров как в спокойном состоянии, так и при гиперкапнической стимуляции.

Повышение церебрального уровня ИЛ-1β на фоне ингибирования NO-синтазной активности статистически значимых изменений в объемно-временных параметрах дыхания не вызывало (табл. 1). Кроме того, при сочетанном действии ИЛ-1β и L-NAME не было выявлено достоверных изменений чувствительности дыхательной системы к гиперкапнической стимуляции после введения ИЛ-1β. Повышение церебрального уровня ИЛ-1β на фоне действия L-NAME не вызывало достоверного снижения вентиляционного ответа на гиперкапнию: угол наклона линий тренда, характеризующий зависимость дыхательных параметров (МОД, ДО, $V_{инсп}$) от величины гиперкапнической стимуляции, не изменялся после введения ИЛ-1β (рис. 1Г, Д, Е). Количественная оценка реакции на гиперкапнию после введения ИЛ-1β на фоне L-NAME показала, что в течение всего эксперимента отмечалась незначительная тенденция к снижению приростов МОД, ДО и $V_{инсп}$. Однако достоверных изменений прироста не наблюдалось (рис. 2).

Полученные данные указывают на то, что в основе модулирующего влияния провоспалительных цитокинов на центральные механизмы регуляции дыхания лежит усиление синтеза оксида азота. Мы предполагаем, что в наших экспериментах церебровентрикулярное

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107

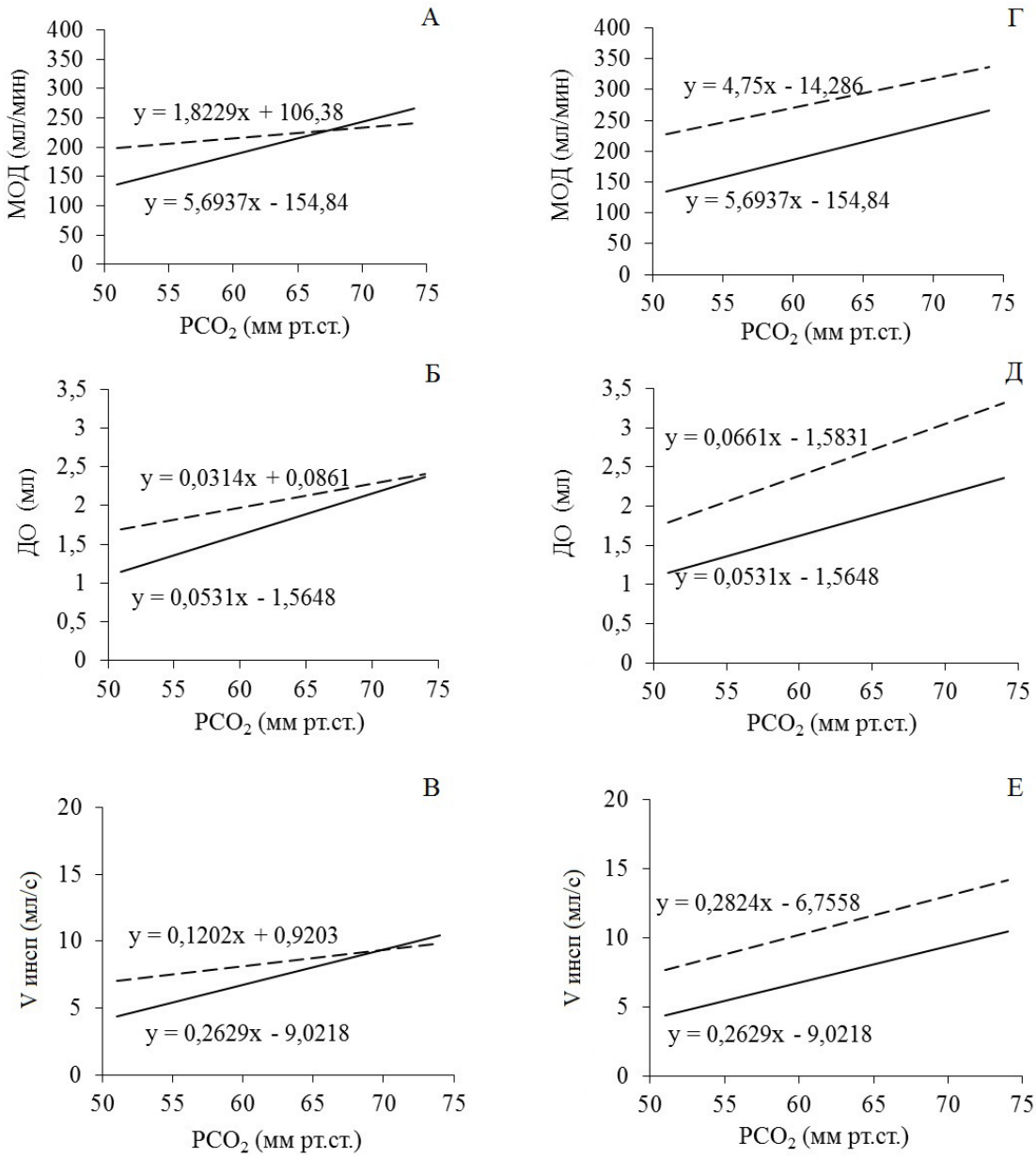

Рис. 1. Вентиляционный ответ на гиперкапнию. Панели А, Б, В: составляющие вентиляционного ответа до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) церебрального введения ИЛ-1β. Панели Г, Д, Е: ИЛ-1β — составляющие вентиляционного ответа до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) сочетанного введения ИЛ-1β и L-NAME

Fig. 1. Ventilatory response to hypercapnia in a representative animal before (solid line) and 40 min. after (dotted line) the cerebroventricular administration of interleukin-1beta (IL-1β) with (А, Б, В) and without (Г, Д, Е) L-NAME pretreatment. IL-1β treatment without L-NAME decreased the slope of minute ventilation, mean inspiratory flow, and tidal volume response, whereas IL-1β treatment with L-NAME did not alter the ventilatory response

введение ИЛ-1β сопровождалось его взаимодействием с соответствующими рецепторами, локализованными на клетках нейроглии, а также на эпендимных клетках, выстилающих желудочки мозга, что вызывало усиление синтеза оксида азота, который мог изменять активность нейронов, участвующих в нейронных сетях, регулирующих дыхание. Как известно, небольшая молекула NO, обладая высокой проникающей способностью, может влиять на внутриклеточные процессы, не взаимодействуя с мембранными рецепторами, поскольку она способна легко диффундировать через клеточную мембрану (Александров и др. 2015; Brenman, Bredt 1996).

Кроме того, известно, что оксид азота обладает способностью усиливать синтез циклооксигеназы. В наших предыдущих исследо-

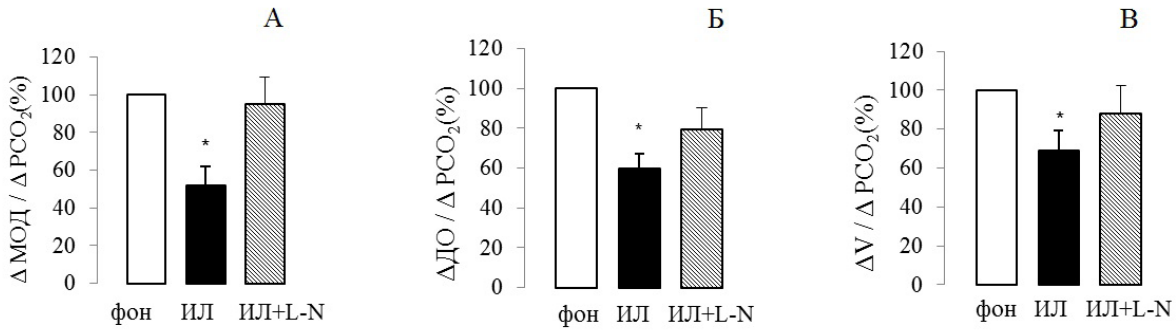

Рис. 2. Устранение ингибирующего влияния ИЛ-1β на вентиляторный гиперкапнический ответ при действии L-NAME через 40 минут после церебровентрикулярного введения ИЛ-1β. По оси ординат: прирост минутного объема дыхания (А), дыхательного объема (Б), средней скорости инспираторного потока (В) при увеличении PCO_2 на 1 мм рт. ст. Белые столбики — фоновое значение, черные столбики — действие ИЛ-1β, заштрихованные столбики — сочетанное действие L-NAME и ИЛ-1β. * — достоверные отличия от фона при $P \leq 0,05$

Fig. 2. Change in the ventilatory response to hypercapnia slope as measured 40 min. after cerebroventricular administration of interleukin-1beta (IL-1β) with (hatched bars) or without (black bars) L-NAME pretreatment. The slope of ventilatory volume gain (A), tidal volume (Б), mean inspiratory flow (B). * — $P < 0,05$ vs. baseline

ваниях было установлено, что ослабление вентиляционного гиперкапнического ответа, вызванного повышением церебрального уровня ИЛ-1β, опосредовано действием простагландинов на медуллярные нейроны (Aleksandrova, Danilova, Aleksandrov 2015). Об этом свидетельствует отсутствие влияния цереброventрикулярных инъекций ИЛ-1β на вентиляционный гиперкапнический ответ на фоне действия диклофенака, ингибирующего активность циклооксигеназы. Результаты данного исследования указывают на взаимодействие циклооксигеназных и нитрэргических механизмов в реализации респираторных эффектов провоспалительных цитокинов, так как доказывают, что ингибирование не только циклооксигеназных, но и NO-синтазных путей устраняет влияние ИЛ-1β на гиперкапнический хеморефлекс. По-видимому, зарегистрированные нами респираторные эффекты ИЛ-1β вызваны действием простагландинов, для усиления экспрессии которых необходима активация NO-синтазной активности и увеличение синтеза оксида азота, который является мощным индуктором экспрессии COX-2, фермента, необходимого для синтеза простагландинов.

Эксперименты с внутривенным введением только L-NAME без последующего повышения церебрального уровня ИЛ-1β также не выявили никаких изменений в параметрах системы внешнего дыхания. Отсутствие собственного респираторного эффекта ингибитора NO-синтазной активности свидетельствует о том, что в обычных условиях NO-синтазные пути не вовлечены в регуляцию паттерна дыхания и гиперкапнического хеморефлекса. Однако их роль в регуляции дыхания резко возрастает в условиях воспаления, при активации иммунной системы и повышении в организме уровня провоспалительных цитокинов.

Литература

Александров, В. Г., Александрова, Н. П., Туманова, Т. С. и др. (2015) Участие NO-ергических механизмов в реализации респираторных эффектов провоспалительного цитокина интерлейкина-1-бета. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 101, № 12, с. 1372–1384.

Данилова, Г. А. (2014) *Роль провоспалительного цитокина интерлейкина-1бета в хеморецепторных механизмах регуляции дыхания. Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук.* СПб., Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 147 с.

Мюльберг, А. А., Гришина, Т. В. (2006) Цитокины как медиаторы нейроиммунных взаимодействий. *Успехи физиологических наук*, т. 37, № 1, с. 18–27.

Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A. (2010) Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *European Journal of Medical Research*, vol. 15, suppl. II, pp. 3–6. PMID: 21147611. DOI: 10.1186/2047-783x-15-s2-3

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107

Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A., Aleksandrov, V. G. (2015) Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1β in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 209, pp. 85–90. PMID: 25511383. DOI: 10.1016/j.resp.2014.12.006

Brenman, J. E., Bredt, D. S. (1996) Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods in Enzymology*, vol. 269, pp. 119–129. PMID: 8791642. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)69014-4

Churchill, L., Taishi, P., Wang, M. et al. (2006) Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1β or tumor necrosis factor α. *Brain Research*, vol. 1120, no. 1, pp. 64–73. PMID: 17022949. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.08.083

Gosselin, L. E, Barkley, J. E, Spencer, M. J. et al. (2003) Ventilatory dysfunction in mdx mice: Impact of tumour necrosis factor-alpha deletion. *Muscle & Nerve*, vol. 28, no. 3, pp. 336–343. PMID: 12929194. DOI: 10.1002/mus.10431

Graff, G. R., Gozal, D. (1999) Cardiorespiratory responses to interleukin-1β in adult rats: Role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 97–112. PMID: 10650342. DOI: 10.1076/apab.107.2.97.4344

Hofstetter, A. O, Saha, S., Siljehav, V. et al. (2007) The induced prostaglandin E_2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 23, pp. 9894–9899. PMID: 17535900. DOI: 10.1073/pnas.0611468104

Olsson, A., Kayhan, G., Lagercrantz, H., Herlenius, E. (2003) IL-1β depresses respiration and anoxic survival *via* a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatric Research*, vol. 54, pp. 326–331. DOI: 10.1203/01.PDR.0000076665.62641.A2

Paxinos, G., Watson, C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Sydney: Academic Press, VII, 12 p., 71 bl. pl.

References

Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A. (2010) Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *European Journal of Medical Research*, vol. 15, suppl. II, pp. 3–6. PMID: 21147611. DOI: 10.1186/2047-783x-15-s2-3 (In English)

Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A., Aleksandrov, V. G. (2015) Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1β in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 209, pp. 85–90. PMID: 25511383. DOI: 10.1016/j.resp.2014.12.006 (In English)

Alexandrov, V. G., Alexandrova, N. P., Tumanova, T. S. et al. (2015) Uchastie NOergicheskikh mekhanizmov v realizatsii respiratornykh effektov provospalitel'nogo tsitokina interlejkina-1-beta [Participation of NO-ergic mechanisms in realization of respiratory effects of pro-inflammatory cytokine interleukin-1-beta]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*, vol. 101, no. 12, pp. 1372–1384. (In Russian)

Brenman, J. E., Bredt, D. S. (1996) Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods in Enzymology*, vol. 269, pp. 119–129. PMID: 8791642. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)69014-4 (In English)

Churchill, L., Taishi, P., Wang, M. et al. (2006) Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1β or tumor necrosis factor α. *Brain Research*, vol. 1120, no. 1, pp. 64–73. PMID: 17022949. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.08.083 (In English)

Danilova, G. A. (2014) *Rol' provospalitel'nogo tsitokina interlejkina-1beta v khemoretseptornykh mekhanizmakh regulyatsii dykhaniya [The role of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 beta in the chemoreceptor mechanisms of respiration regulation]. PhD dissertation (Biology)*. Saint Petersburg, Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 147 p. (In Russian)

Gosselin, L. E, Barkley, J. E, Spencer, M. J. et al. (2003) Ventilatory dysfunction in mdx mice: Impact of tumour necrosis factor-alpha deletion. *Muscle & Nerve*, vol. 28, no. 3, pp. 336–343. PMID: 12929194. DOI: 10.1002/mus.10431 (In English)

Graff, G. R., Gozal, D. (1999) Cardiorespiratory responses to interleukin-1β in adult rats: Role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 97–112. PMID: 10650342. DOI: 10.1076/apab.107.2.97.4344 (In English)

Hofstetter, A. O, Saha, S., Siljehav, V. et al. (2007) The induced prostaglandin E_2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 23, pp. 9894–9899. PMID: 17535900. DOI: 10.1073/pnas.0611468104. (In English)

Mulberg, A. A., Grishina, T. V. (2006) Tsitokiny kak mediatory nejroimmunnykh vzaimodejstvij [Cytokines as mediators of neuroimmune interactions]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, vol. 37, no. 1, pp. 18–27. (In Russian)

Olsson, A., Kayhan, G., Lagercrantz, H., Herlenius, E. (2003) IL-1β depresses respiration and anoxic survival *via* a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatric Research*, vol. 54, pp. 326–331. DOI: 10.1203/01.PDR.0000076665.62641.A2 (In English)

Paxinos, G., Watson, C. (1982) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Sydney: Academic Press, VII, 12 p., 71 bl. pl. (In English)

Экспериментальные статьи

УДК 612.283

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

Регуляция дыхания при электрической стимуляции поясничного отдела спинного мозга у человека

Т. Р. Мошонкина[1], Н. А. Щербакова✉[1], С. А. Моисеев[2], А. В. Миняева[3], Ю. П. Герасименко[1]

[1] Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6
[2] Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, 182100, Россия, г. Великие Луки, Юбилейная пл., д. 4
[3] Тверской государственный университет, 170100, Россия, г. Тверь, ул. Желябова, д. 33

Сведения об авторах
Татьяна Ромульевна Мошонкина, SPIN-код: 8537-6871, Scopus AuthorID: 6506810155, e-mail: moshonkina@infran.ru

Наталия Александровна Щербакова, SPIN-код: 6796-0793, e-mail: chsherbakovana@infran.ru

Сергей Александрович Моисеев, SPIN-код: 7557-5559, e-mail: siranovl@yandex.ru

Арина Владимировна Миняева, SPIN-код: 5091-7865, e-mail: Minyaeva.AV@tversu.ru

Юрий Петрович Герасименко, SPIN-код: 1433-9271, Scopus AuthorID: 7003598492, e-mail: gerasimenko@infran.ru

Для цитирования:
Мошонкина, Т. Р., Щербакова, Н. А., Моисеев, С. А., Миняева, А. В., Герасименко, Ю. П. (2020) Регуляция дыхания при электрической стимуляции поясничного отдела спинного мозга у человека. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 108–114. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

Получена 9 декабря 2019; прошла рецензирование 29 января 2020; принята 31 января 2020.

Финансирование: Поддержано Программой Президиума РАН П.42 (проект 0134-2018-0001).

Права: © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Работа продолжает исследование механизмов регуляции вентиляторной реакции на чрескожную электрическую стимуляцию спинного мозга (ЧЭССМ), вызывающую локомоторный ответ. Сравнивали реакции дыхательной системы здоровых добровольцев на ЧЭССМ на уровне T12-L1 позвонков, производимую на фоне произвольных и пассивных движений ногами с равными амплитудно-скоростными параметрами, а также при внешнем сдерживании вызываемого ЧЭССМ локомоторного ответа, что позволяло модулировать вклад нейрогенного механизма регуляции дыхания в вентиляторную реакцию. Для исследований использовали реабилитационный механотренажер. ЧЭССМ с интенсивностью, вызывающей мышечный ответ, в условии внешнего торможения движений ног вызывала уменьшение глубины дыхания на 0,10 ± 0,03 л за счет незначительного, но синхронного уменьшения продолжительности и скорости как вдоха, так и выдоха. Стимуляция на фоне совершения испытуемыми активных движений ногами сопровождалась достоверным увеличением минутного объема вентиляции легких на 3,23 ± 1,06 л/мин за счет прироста глубины дыхания на 0,10 ± 0,03 л. Респираторная реакция на ЧЭССМ на фоне пассивных движений была слабо выражена, однако прослеживалась тенденция к увеличению частоты и снижению глубины дыхания, было отмечено достоверное повышение потребления кислорода на 33,10 ± 13,16 мл/мин. На фоне выполнения пассивных движений эффекты ЧЭССМ и механизмов регуляции дыхания при мышечной деятельности оказываются практически сбалансированными. Выявленные различия в респираторных реакциях на ЧЭССМ, скорее всего, связаны с наложением разнонаправленных эффектов стимуляции поясничного утолщения спинного мозга, с одной стороны, и комплекса нейрогенных и гуморально-рефлекторных механизмов регуляции дыхания при физической работе, с другой стороны.

Ключевые слова: человек, чрескожная электростимуляция спинного мозга, дыхание, вызванные шагательные движения, вентиляция легких, газообмен.

Regulation of respiration during electrical stimulation of the lumbar spinal cord in humans

T. R. Moshonkina[1], N. A. Scherbakova✉[1], S. A. Moiseev[2], A. V. Minyaeva[3], Yu. P. Gerasimenko[1]

[1] Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia
[2] Velikiye Luki State Academy of Physical Culture and Sports, 4 Yubilejnaya Square, Velikiye Luki 182100, Russia
[3] Tver State University, 33 Zheliabova Str., Tver 170100, Russia

Authors
Tatyana R. Moshonkina,
SPIN: 8537-6871,
Scopus AuthorID: 6506810155,
e-mail: moshonkina@infran.ru

Natalia A. Scherbakova,
SPIN: 6796-0793,
e-mail: chsherbakovana@infran.ru

Sergey A. Moiseev,
SPIN: 7557-5559,
e-mail: siranovl@yandex.ru

Arina V. Minyaeva,
SPIN: 5091-7865
e-mail: Minyaeva.AV@tversu.ru

Yuri P. Gerasimenko,
SPIN: 1433-9271,
Scopus AuthorID: 7003598492,
e-mail: gerasimenko@infran.ru

For citation: Moshonkina, T. R., Scherbakova, N. A., Moiseev, S. A., Minyaeva, A. V., Gerasimenko, Yu. P. (2020) Regulation of respiration during electrical stimulation of the lumbar spinal cord in humans. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 108–114.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

Received 9 December 2019; reviewed 29 January 2020; accepted 31 January 2020.

Funding: This research was supported by the Presidium of the Russian Academy of Sciences Program PI.42 (project 0134-2018-0001).

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The current research is a continuation of our recent study devoted to the regulation mechanisms of the human respiratory system reaction to transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord (tSCS), which causes a locomotor response. With healthy volunteers serving as the subjects in our experiment, we compared the respiratory system reactions to tSCS in the area of T12-L1 vertebrae, which was performed during the voluntary and passive leg movements with equal amplitude and speed parameters, with the reaction under the conditions of external suppression of the locomotor response caused by tSCS, which made it possible to modulate the contribution of the neurogenic mechanism of respiration regulation to the ventilatory reaction. A rehabilitation biomechanical simulator was used for this investigation. Our experiments showed that tSCS with an intensity that induced muscle response under the conditions of external restraint of leg movements causes a decrease in the depth of breathing by 0.10 ± 0.03 l due to an insignificant, but synchronous decrease in the duration and speed of both inspiration and exhalation. Stimulation during voluntary leg movement was accompanied by a significant increase in the minute volume of the ventilation of the lungs by 3.23 ± 1.06 l/min. due to an increase in the depth of breathing by 0.10 ± 0.03 l. The respiratory reaction to tSCS during passive leg movement was weak, but there was a tendency towards an increase in the frequency and a decrease in the depth of breathing with a marked increase in oxygen consumption by 33.10 ± 13.16 ml/min. In case of the passive leg movement, the effects of tSCS and the mechanisms of respiration regulation during muscular activity were almost coherent. The revealed differences in respiratory reactions to tSCS are most likely associated with the imposition of multidirectional effects of stimulation of the lumbar areas of the spinal cord, on the one hand, and a complex of neurogenic and humoral-reflex mechanisms of breathing regulation during physical work, on the other.

Keywords: human, transcutaneous stimulation of the spinal cord, respiration, involuntary stepping movements, lung ventilation, gas exchange.

Введение

Ранее было показано, что у здоровых добровольцев в положении лежа на боку с внешней поддержкой ног чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ) в проекции Т11-Т12 позвонков с параметрами стимуляции, инициирующими шагательные движения, оказывает влияние на респираторную функцию. Действие ЧЭССМ проявляется в увеличении частоты дыхания (за счет сокращения длительности выдоха) и уменьшении глубины дыхания (Миняева, Герасименко, Моисеев и др. 2016; Миняева, Моисеев, Пухов и др. 2017). Сравнительный анализ вентиляции легких при ЧЭССМ, вызывавшей шагательные движе-

ния малой и большой амплитуды, выявил сходную динамику параметров вентиляции легких у испытуемых с низкой и высокой способностью к локомоторному ответу на ЧЭССМ. Отличалась только выраженность наблюдаемых респираторных реакций (Миняева, Моисеев, Пухов и др. 2019). На основании полученных результатов было сделано предположение о том, что вызывающая локомоцию ЧЭССМ может оказывать воздействие на спонтанную вентиляцию легких за счет трех факторов: (1) нейрогенного компонента, связанного с мышечной активностью при шагательных движениях (Бреслав, Волков, Тамбовцева 2013), (2) прямой активации абдоминальной экспираторной мускулатуры, обусловленной расположением референтных стимулирующих электродов над гребнями подвздошных костей и использованием биполярных импульсов для стимуляции, и (3) стимуляции спинальных центров, участвующих в регуляции дыхания (Исаев, Герасименко 2005).

В настоящем исследовании сравнивали реакции дыхательной системы на ЧЭССМ, производимую на фоне произвольных и пассивных движений с равными амплитудно-скоростными параметрами, а также при механическом сдерживании инициируемых ЧЭССМ движений ног, что позволяло модулировать вклад нейрогенного механизма регуляции дыхания в вентиляторную реакцию (Бреслав, Волков, Тамбовцева 2013). Для ЧЭССМ использовали монополярные импульсы, что позволяло снизить эффект прямой активации абдоминальной экспираторной мускулатуры. Таким образом, были созданы условия для исследования влияния вызывающей локомоторный ответ ЧЭССМ спинальных дыхательных центров (Исаев, Герасименко 2005) на спонтанное дыхание.

Материалы и методы

В группу испытуемых входили шесть мужчин — студентов и сотрудников Великолукской академии физической культуры и спорта (ВЛГАФК). Средний возраст испытуемых составлял 20,2 ± 0,96 года, индекс массы — 22,4 ± 0,45 кг/м^2. На проведение исследования было получено разрешение комитета по этике ВЛГАФК. В соответствии с принципами Хельсинкской декларации испытуемыми было оформлено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Для регистрации показателей вентиляции легких и газообмена использовали метаболограф Cosmed Quark CPET (Италия). Определяли значения минутного объема вентиляции легких (VE, л/мин), дыхательного объема (VT, л), частоты дыхания (Rf, цикл/мин), времени вдоха (Ti, с) и выдоха (Te, с), скорости вдоха (VT/Ti, мл/с) и выдоха (VT/Te, мл/с), минутного объема потребления кислорода (VO_2, мл/мин), дыхательного коэффициента (RQ), парциального давления кислорода ($PetO_2$, мм рт. ст.) и углекислого газа ($PetCO_2$, мм рт. ст.) в альвеолярном газе, оксигенации артериальной крови (SpO_2, %).

Для регистрации электрической мышечной активности использовали телеметрический 16-канальный электронейромиограф (ME 6000 MegaWin, Финляндия). Электромиограммы большеберцовой и икроножной мышц правой и левой ног регистрировали с помощью одноразовых ЭКГ-электродов с адгезивной поверхностью диаметром 30 мм (ARBO, H124SG). Для анализа мышечной активности ЭМГ-сигнал инвертировали и считали среднюю величину мышечного ответа (m. tibialis, m. gastrocnemius).

Для регистрации кинематических характеристик движений ног использовали видеосистему (Qualisys, Швеция). По динамике изменения углов тазобедренного, коленного и голеностопного суставов рассчитывали скорость, амплитуду и частоту перемещения ног.

Для ЧЭССМ использовали стимулятор «Биостим-5» (ООО «Косима») (Гришин, Мошонкина, Солопова и др. 2016). Применяли накожные электроды с адгезивной токопроводящей поверхностью (Lead-Lok, Sand point, США). Круглые катоды диаметром 2,5 см устанавливали между T12-L1 позвонками, прямоугольные аноды площадью 5×10 см^2 симметрично располагали над гребнями подвздошных костей. Ритмическую непрерывную стимуляцию с частотой 30 Гц выполняли монополярными импульсами длительностью 1 мс, заполненными модулированной частотой 5 кГц. Интенсивность ЧЭССМ подбирали индивидуально, ориентируясь на минимальную пороговую силу одиночных монополярных импульсов длительностью 1 мс и частотой 1 импульс в 2–3 сек, вызывавшую двигательный ответ во всех регистрируемых мышцах. Для непрерывной стимуляции использовали надпороговые по силе импульсы, вызывающие у испытуемых мышечный ответ при отсутствии неприятных ощущений. Рабочий диапазон токов составил 30–90 мА.

Испытуемые находились в положении полулежа в механотренажере «Биокин-ЭС» (ООО «Косима») (Гришин, Мошонкина, Боброва и др. 2019), предназначенном для реабилитации двигательных функций. Ноги испытуемых были закреплены в области голеностопов полу-

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

жесткими фиксаторами к кареткам, параллельно перемещающимся по направляющим. Тренажер позволял испытуемым самостоятельно выполнять активные, имитирующие ходьбу на месте движения ногами, а также мог обеспечивать эти движения за счет электромеханических приводов (рис. 1).

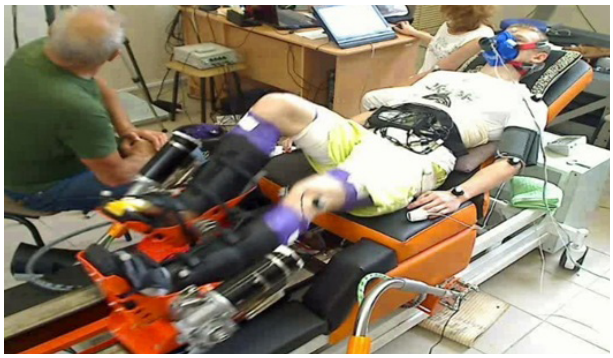

Рис. 1. Условия исследования. Положение испытуемого в тренажере

Fig. 1. Study conditions. The position of the subject in the biomechanical simulator

Перед началом исследования у испытуемых, находящихся в тренажере с выпрямленными ногами, 5 мин регистрировали параметры дыхания в состоянии покоя.

Затем последовательно проводили три серии исследования: 1) испытуемые, лежа спокойно, не препятствуя и не помогая движениям ног, вызываемым ЧЭССМ, решали в уме арифметические задачи (из трехзначного числа отнимать двузначное); 2) произвольно выполняли поочередные движения ногами на максимально возможную амплитуду с комфортной скоростью; 3) лежа спокойно, не препятствовали и не помогали пассивным движениям ног, которые задавал тренажер. Во всех трех сериях исследования был одинаковый порядок включения ЧЭССМ: респираторные и двигательные параметры регистрировали на протяжении 1 мин без стимуляции, затем 30 сек при ЧЭССМ на уровне T12-L1. Индивидуально подобранная интенсивность ЧЭССМ для каждого испытуемого во всех сериях была одинаковой. Амплитудно-скоростные характеристики произвольных и пассивных движений практически не различались, амплитуда составляла соответственно 0,44 ± 0,014 м, скорость 0,16 ± 0,03 м/с.

При статистическом анализе дыхательных и двигательных параметров были рассчитаны среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического. Достоверность различий между значениями параметров оценивали с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение

Дыхание в покое у всех испытуемых имело нормопноический паттерн. Продолжительность выдоха была больше, чем продолжительность вдоха, осуществлявшегося с достоверно большей скоростью, чем выдох. Показатели вентиляции легких и газообмена не выходили за границы референтных значений, однако присутствовали некоторые признаки гипервентиляции. Так, парциальное напряжение кислорода в последней порции выдыхаемого воздуха было несколько выше, а содержание углекислого газа было ниже нормальных значений, что, вероятнее всего, было проявлением предстартовой эмоциональной гипервентиляции.

В 1-й серии ЧЭССМ движения ног практически не вызывала. Это связано с тем, что голеностопы были зафиксированы в каретках тренажера и движениям ног препятствовали как тяжесть кареток, так и трение, с которым каретки перемещались по направляющим. В этих условиях вызвать непроизвольные движения ног, применяя ЧЭССМ с параметрами, использованными в предыдущих исследованиях, когда ноги были подвешены в независимых качелях и качели компенсировали силу тяжести (Миняева, Герасименко, Моисеев и др. 2016; Миняева, Моисеев, Пухов и др. 2017), было затруднительно (рис. 2).

Несмотря на то, что в 1-й серии исследования ЧЭССМ практически не вызывала видимых движений ног, суммарная амплитуда ЭМГ активности мышц голени достоверно увеличилась. В отдельных случаях проявлялась пачечная активность (рис. 2). То есть можно предположить, что локомоторный ЭМГ паттерн возникал в статическом режиме.

ЧЭССМ в состоянии покоя вызывала достоверное уменьшение глубины дыхания на 0,10 ± 0,03 л за счет незначительного, но синхронного уменьшения продолжительности и скорости как вдоха, так и выдоха (рис. 3). Поскольку компенсаторное повышение частоты дыхания было слабо выражено, минутный объем вентиляции легких несколько снизился.

Таким образом, изменения параметров дыхания испытуемых под действием ЧЭССМ в условиях механического сдерживания движений ног практически совпадают с респираторными реакциями на ЧЭССМ в условиях внешней

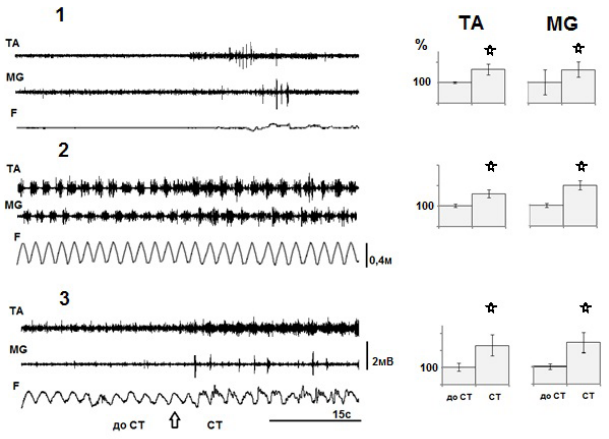

Рис. 2. Изменения ЭМГ активности мышц tibialis anterior (TA) и medial gastrochemius (MG) и амплитуды движений большого пальца правой ноги (F) при ЧЭССМ на фоне состояния покоя (1), при произвольных (2) и пассивных (3) движениях. Слева — примеры записей ЭМГ и амплитуды движений исп. С. И. Начало ЧЭССМ (СТ) обозначено стрелкой. Справа — усредненные по всем испытуемым изменения суммарной ЭМГ при ЧЭССМ относительно значений до стимуляции. * — достоверность ($p < 0,05$) изменения параметров при стимуляции

Fig. 2. Changes in the EMG activity of the muscles of the tibialis anterior (TA) and medial gastrochemius (MG), and the amplitude of the right big toe movements (F) under tSCS during rest state (1), voluntary (2), and passive (3) stepping movements. Left — examples of EMG records and the amplitude of the movements of Subject S. I. The arrow indicates the beginning of stimulation. Right — average data for all subjects, changes under stimulation in the total EMG, relative to the values before stimulation. * — reliability ($p < 0.05$) of parameter changes under stimulation

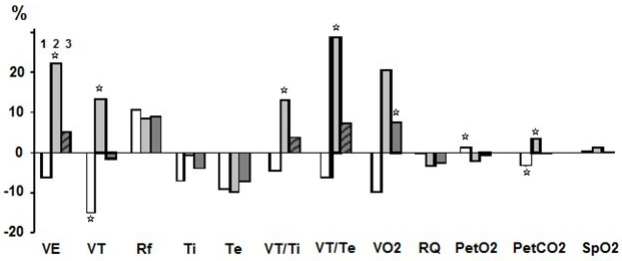

Рис. 3. Изменение параметров вентиляции легких и газообмена при ЧЭССМ на фоне состояния покоя (1), при произвольных (2) и пассивных (3) движениях относительно значений до стимуляции; обозначения параметров как в методике. Достоверность ($p < 0,05$) изменения параметров: * — относительно значений при отсутствии стимуляции; столбцы с жирной обводкой — относительно значений при состоянии покоя; штриховка — относительно значений при выполнении произвольных движений

Fig. 3. The changes in the parameters of lung ventilation and gas exchange under tSCS during rest state (1), voluntary (2), and passive (3) stepping movements, relative to the values before stimulation. Reliability ($p < 0.05$) of parameter changes: * — relative to values in the absence of stimulation, bold bars — relative to values in rest state, hatched bars — relative to values when performing voluntary movements

вывески ног (Миняева, Герасименко, Моисеев и др. 2016; Миняева, Моисеев, Пухов и др. 2017).

Во 2-й серии исследования начало стимуляции на фоне совершения испытуемыми активных движений ногами сопровождалось достоверным увеличением минутного объема вентиляции легких на 3,23 ± 1,06 л/мин за счет достоверного прироста глубины дыхания на 0,10 ± 0,03 л. Прирост потребления кислорода был недостоверным. Дыхательный объем увеличился благодаря достоверному приросту объемных скоростей вдоха и выдоха на фоне некоторого сокращения их продолжительности. При этом наблюдалось достоверное увеличение парциального давления углекислого газа во выдыхаемом воздухе на 1,30 ± 0,29 мм рт. ст. Однако отмеченные изменения дыхания могли быть как результатом начала ЧЭССМ, так и следствием реализации гуморально-рефлекторной регуляции дыхания в ответ на повышение содержания углекислого газа в крови.

В 3-й серии исследования респираторная реакция на начало ЧЭССМ на фоне пассивных движений была слабо выражена. Однако прослеживалась тенденция к увеличению частоты и снижению глубины дыхания. Было отмечено достоверное повышение потребления кислорода на 33,1 ± 13,16 мл/мин.

Сравнение респираторных эффектов ЧЭССМ на уровне T12-L1 позвонков выявило однонаправленные изменения временных параметров дыхательного цикла (рис. 3). Тогда как остальные респираторные параметры демонстрируют разнонаправленные реакции на ЧЭССМ: в состоянии покоя ЧЭССМ снижает скорости вдоха и выдоха и, как следствие, вентиляцию легких; при выполнении активных и пассивных движе-

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

ний скорости вдоха, выдоха и вентиляция легких растут.

Выявленные различия в респираторных реакциях на ЧЭССМ, скорее всего, связаны с наложением разнонаправленных эффектов стимуляции поясничного утолщения спинного мозга, с одной стороны, и комплекса нейрогенных и гуморально-рефлекторных механизмов регуляции дыхания при физической работе, с другой стороны. В результате при внешнем сдерживании вызванных стимуляцией движений влияние ЧЭССМ, подавляющей выполнение вдоха за счет тонической активации экспираторной мускулатуры, на вентиляцию легких оказывается значительно более мощным, чем нейрогенного (сдерживание конечностей препятствует активации проприоцепторов) и гуморально-рефлекторного (эффект Лингарда при статической работе) механизмов регуляции дыхания.

Напротив, при ЧЭССМ на фоне выполнения произвольных движений более мощными оказываются эффекты нейрогенного и гуморально-рефлекторного механизмов регуляции дыхания, направленные на увеличение вентиляции легких в соответствии с метаболическими потребностями организма. При ЧЭССМ на фоне выполнения пассивных движений эффекты ЧЭССМ и механизмов регуляции дыхания при мышечной деятельности оказываются практически сбалансированными. Следовательно, можно говорить об участии непрямой активации абдоминальной экспираторной мускулатуры и об активации спинальных центров, связывающих дыхательный и шагательный генераторы (Исаев, Герасименко 2005).

В настоящем исследовании, как и в двух наших предыдущих работах (Миняева, Герасименко, Моисеев и др. 2016; Миняева, Моисеев, Пухов и др. 2017), показано, что стимуляция спинного мозга в нижнегрудном отделе у человека вызывает быструю, в течение первых дыхательных циклов, активацию абдоминальной мускулатуры. Это дает основание полагать, что ЧЭССМ потенциально может применяться для восстановления дыхательной функции у пациентов с заболеваниями респираторной системы.

До недавнего времени реакцию дыхательной системы на электрическую стимуляцию спинного мозга изучали только на животных моделях. Метод ЧЭССМ позволяет проводить исследования с участием людей в качестве испытуемых. Возможная задача следующих исследований — проверить, является ли увеличение частоты дыхания в ответ на стимуляцию следствием прямой активации спинальных нейронных сетей или это изовентиляторная реакция на снижение или недостаточное увеличение глубины дыхания, то есть вторичная реакция на электростимуляцию.

Литература

Бреслав, И. С., Волков, Н. И., Тамбовцева, Р. В. (2013) *Дыхание и мышечная активность человека в спорте: руководство для изучающих физиологию человека*. М.: Советский спорт, 333 с.

Гришин, А. А., Мошонкина, Т. Р., Солопова, И. А. и др. (2016) Пятиканальный неинвазивный электростимулятор спинного мозга для реабилитации пациентов с тяжелыми двигательными нарушениями. *Медицинская техника*, № 5 (299), с. 8–11.

Гришин, А. А., Мошонкина, Т. Р., Боброва, Е. В., Герасименко, Ю. П. (2019) Комплекс для реабилитационного лечения пациентов с двигательной патологией с использованием механотерапии, чрескожной электростимуляции спинного мозга и биологической обратной связи. *Медицинская техника*, № 4 (316), с. 1–4.

Исаев, Г. Г., Герасименко, Ю. П. (2005) Механизм «быстрого нейрогенного компонента» вентиляторной реакции при инициации двигательной активности. *Физиология человека*, т. 31, № 5, с. 73–79.

Миняева, А. В., Герасименко, Ю. П., Моисеев, С. А. и др. (2016) Сравнительный анализ реакций системы дыхания на произвольные и вызванные стимуляцией спинного мозга шагательные движения. *Ульяновский медико-биологический журнал*, № S4, с. 47–49.

Миняева, А. В., Моисеев, С. А., Пухов, А. М. и др. (2017) Реакция внешнего дыхания на движения, вызванные чрескожной стимуляцией спинного мозга. *Физиология человека*, т. 43, № 5, с. 43–51. DOI: 10.7868/S0131164617050113

Миняева, А. В., Моисеев, С. А., Пухов, А. М. и др. (2019) Зависимость респираторной реакции от интенсивности локомоторного ответа на чрескожную электрическую стимуляцию спинного мозга. *Физиология человека*, т. 45, № 3, с. 38–47. DOI: 10.1134/S0131164619030111

Hachmann, J. T., Grahn, P. J., Calvert, J. S. et al. (2017) Electrical neuromodulation of the respiratory system after spinal cord injury. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 92, no. 9, pp. 1401–1414 PMID: 28781176. DOI: 10.1016/j.mayocp.2017.04.011

References

Breslav, I. S., Volkov, N. I., Tambovtseva, R. V. (2013) *Dykhanie i myshechnaya aktivnost' cheloveka v sporte: rukovodstvo dlya izuchayushchikh fiziologiyu cheloveka [Breathing and muscle activity of a person in sports: Handbook for human physiology learners]*. Moscow: Sovetskij sport Publ., 333 p. (In Russian)

Grishin, A. A., Moshonkina, T. R., Bobrova, E. V., Gerasimenko, Yu. P. (2019) Kompleks dlya reabilitatsionnogo lecheniya patsientov s dvigatel'noj patologiej s ispol'zovaniem mekhanoterapii, chreskozhnoj elektrostimulyatsii spinnogo mozga i biologicheskoj obratnoj svyazi [A device for the rehabilitation therapy of patients with motor pathology using mechanotherapy, transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord, and biological feedback]. *Meditsinskaya tekhnika*, vol. 4 (316), pp. 1–4. (In Russian)

Grishin, A. A., Moshonkina, T. R., Solopova, I. A. et al. (2016) Pyatikanal'nyj neinvazivnyj elektrostimulyator spinnogo mozga dlya reabilitatsii patsientov s tyazhelymi dvigatel'nymi narusheniyami [A five-channel non-invasive electrical stimulator of the spinal cord for rehabilitation of patients with severe motor impairment]. *Meditsinskaya tekhnika*, vol. 5 (299), pp. 8–11. (In Russian)

Hachmann, J. T., Grahn, P. J., Calvert, J. S. et al. (2017) Electrical neuromodulation of the respiratory system after spinal cord injury. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 92, no. 9, pp. 1401–1414. PMID: 28781176. DOI: 10.1016/j.mayocp.2017.04.011 (In English)

Isaev, G. G., Gerasimenko, Yu. P. (2005) Mekhanizm "bystrogo nejrogennogo komponenta" ventilyatornoj reaktsii pri initsiatsii dvigatel'noj aktivnosti [Mechanism of the fast neurogenic component of the ventilatory response to the initiation of locomotor activity]. *Fiziologiya cheloveka*, vol. 31, no. 5, pp. 73–79. (In Russian)

Minyaeva, A. V., Gerasimenko, Yu. P., Moiseev, S. A. et al. (2016) Sravnitel'nyj analiz reaktsij sistemy dykhaniya na proizvol'nye i vyzvannye stimulyatsiej spinnogo mozga shagatel'nye dvizheniya [Comparative analysis of the reactions of the respiratory system to voluntary and walking movements caused by spinal cord stimulation]. *Ul'yanovskij medico-biologicheskij zhurnal — Ulyanovsk Medico-biological Journal*, no. S4, pp. 47–49. (In Russian)

Minyaeva, A. V., Moiseev, S. A., Pukhov, A. M. et al. (2017) Reaktsiya vneshnego dykhaniya na dvizheniya, vyzvannye chreskozhnoj stimulyatsiej spinnogo mozga [Response of external inspiration to the movements induced by transcutaneous spinal cord stimulation]. *Fiziologiya cheloveka*, vol. 43, no. 5, pp. 43–51. DOI: 10.7868/S0131164617050113 (In Russian)

Minyaeva, A. V., Moiseev, S. A., Pukhov, A. M. et al. (2019) Zavisimost' respiratornoj reaktsii ot intensivnosti lokomotornogo otveta na chreskozhnuyu elektricheskuyu stimulyatsiyu spinnogo mozga [Dependence of respiratory reaction on the intensity of locomotor response to transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord]. *Fiziologiya cheloveka*, vol. 45, no. 3, pp. 38–47. DOI: 10.1134/S0131164619030111 (In Russian)

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-108-114

Экспериментальные статьи

УДК 57.085.23+577.353.2 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Колхицин изменяет структуру цитоскелета фибробластов: количественное исследование адаптивной клеточной реакции методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

М. М. Халисов[1], В. А. Пеннияйнен[1], С. А. Подзорова[1], К. И. Тимощук[1], А. Д. Розенблит[1], Б. В. Крылов✉[1]

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

Сведения об авторах
Максим Миндигалеевич Халисов,
SPIN-код: 5815-3655,
Scopus AuthorID: 56771519000,
e-mail: hamax@list.ru

Валентина Альбертовна Пеннияйнен,
SPIN-код: 6610-3718,
Scopus AuthorID: 26535039500,
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Светлана Александровна Подзорова,
SPIN-код: 3974-3430,
Scopus AuthorID: 6602224180,
e-mail: sveap@yandex.ru

Кирилл Игоревич Тимощук,
SPIN-код: 8075-1157,
Scopus AuthorID: 57193425814,
e-mail: kirill_timoshhuk@rambler.ru

Алина Дмитриевна Розенблит,
SPIN-код: 3294-6891,
e-mail: roz.alina.dm@mail.ru

Борис Владимирович Крылов,
SPIN-код: 3946-6408,
Scopus AuthorID: 7004655760,
e-mail: krylov@infran.ru

Для цитирования:
Халисов, М. М., Пеннияйнен, В. А., Подзорова, С. А., Тимощук, К. И., Розенблит, А. Д., Крылов, Б. В. (2020) Колхицин изменяет структуру цитоскелета фибробластов: количественное исследование адаптивной клеточной реакции методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 115–122. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Аннотация. Исследовано действие колхицина на примере первичной культуры фибробластов сердца новорожденных крысят методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Хорошо известно, что действие колхицина приводит к разрушению микротрубочек клеток. С другой стороны, этот агент используется в качестве лекарственной субстанции в терапии ряда патологий. Однако молекулярные механизмы его действия остаются малоизученными. Данные атомно-силовой микроскопии показали, что колхицин в концентрации 1 мкг/мл приводит к увеличению жесткости фибробластов, причем более выраженная реакция наблюдается у фибробластов со стресс-фибриллами: их средний модуль Юнга был на 60 % выше, чем у контрольных клеток. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показало, что колхицин вызывает у фибробластов увеличение интенсивности флуоресценции F-актина в среднем на 40 % относительно контрольного уровня. Полученные результаты позволяют заключить, что колхицин, ингибирующий полимеризацию тубулиновых микротрубочек, запускает компенсаторную реакцию клетки, увеличивающую жесткость фибробластов благодаря запуску полимеризации актина. Подход, использованный в настоящей работе, может быть применим для количественного анализа молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов на этапе их доклинических исследований.

Ключевые слова: фибробласты, колхицин, атомно-силовая микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, стресс-фибриллы.

Получена 29 августа 2019;
прошла рецензирование
15 сентября 2019;
принята 18 сентября 2019.

Финансирование: Работа поддержана Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64) и РФФИ (грант № 18-015-00079).

Права: © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

The effect of colchicine on the structure of the fibroblast cytoskeleton: A quantitative study of an adaptive cell response by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy methods

M. M. Khalisov[1], V. A. Penniyaynen[1], S. A. Podzorova[1], K. I. Timoshchuk[1], A. D. Rosenblit[1], B. V. Krylov[✉1]

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

Authors
Maksim M. Khalisov,
SPIN: 5815-3655,
Scopus AuthorID: 56771519000,
e-mail: hamax@list.ru

Valentina A. Penniyaynen,
SPIN: 6610-3718,
Scopus AuthorID: 26535039500,
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Svetlana A. Podzorova,
SPIN: 3974-3430,
Scopus AuthorID: 6602224180,
e-mail: sveap@yandex.ru

Kirill I. Timoshchuk,
SPIN: 8075-1157,
Scopus AuthorID: 57193425814,
e-mail: kirill_timoshhuk@rambler.ru

Alina D. Rosenblit,
SPIN: 3294-6891,
e-mail: roz.alina.dm@mail.ru

Boris V. Krylov,
SPIN: 3946-6408,
Scopus AuthorID: 7004655760,
e-mail: krylov@infran.ru

For citation: Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A., Podzorova, S. A., Timoshchuk, K. I., Rosenblit, A. D., Krylov, B. V. (2020) The effect of colchicines on the structure of the fibroblast cytoskeleton: A quantitative study of an adaptive cell response by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy methods.

Abstract. The effect of colchicine was studied quantitatively in a primary culture of newborn rat cardiac fibroblasts by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy. It is an established fact that colchicine has a destructive effect on cellular microtubules. On the other hand, this agent is used as a drug substance in the treatment of a number of pathologies, while the molecular mechanisms of its effect remain poorly understood. Atomic force microscopy data showed that colchicine introduced at the concentration of 1 μg/ml caused an increase in fibroblast stiffness, with a more pronounced reaction in fibroblasts with stress fibres: their average Young's modulus was 60% higher than in control cells. The use of confocal laser scanning microscopy showed that colchicine causes an increase in F-actin fluorescence intensity of fibroblasts by an average of 40% in comparison with the control level. The results suggest that colchicine (1 μg/ml), which inhibits the polymerisation of tubulin microtubules, launches a compensatory cell response that increases the rigidity of fibroblasts by triggering actin polymerisation. The approach used in this work can be used in quantitative analysis of the molecular mechanisms of drug substance effects during preclinical studies.

Keywords: fibroblasts, colchicine, atomic force microscopy, confocal laser scanning microscopy, stress fibres.

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Integrative Physiology, vol. 1, no. 2, pp. 115–122.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Received 29 August 2019; reviewed 15 September 2019; accepted 18 September 2019.

Funding: This research was supported by the Russian Academy of Sciences Fundamental Scientific Research Program for the years 2013–2020 (GP-14, Section 64) and by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 18-015-00079).

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Введение

Живые клетки содержат систему волокон и микрофиламентов, которые образуют цитоскелет. Цитоскелет участвует в перемещении клеток, с его помощью поддерживается и изменяется их форма, осуществляются внутриклеточные движения органелл, происходит процесс митоза (Chang, Kious, Yorgancioglu et al. 1993). Широкое применение для изучения цитоскелета получил метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющий визуализировать и количественно исследовать его, в частности после воздействия ряда химических агентов, влияющих на различные компоненты цитоскелета (Timoshchuk, Khalisov, Penniyaynen et al. 2019; Henderson, Haydon, Sakaguchi 1992; Jung, Park, Joo et al. 2011; Liu, Zhang, Li et al. 2018; Rotsch, Radmacher 2000; Spedden, White, Naumova et al. 2012).

Колхицин связывается с субъединицами тубулина, образуя тубулин-колхициновый комплекс, за счет чего ингибирует полимеризацию тубулина в микротрубочки (Mareel, De Mets 1984; Rotsch, Radmacher 2000). Из-за этого ингибирующего эффекта клетки, культивируемые в присутствии колхицина, не могут образовывать веретена и вступать в митоз (Innoue 1981; Rieder, Palazzo 1992; Rotsch, Radmacher 2000; Salmon, McKeel, Hays 1984).

При исследовании фибробластов линии Swiss 3T3 было показано, что колхицин (5 мкМ) вызывает активацию полимеризации F-актина (Jung, Shin, Park et al. 1997). Цитируемые авторы установили, что ингибирующий полимеризацию микротрубочек агент колхицин значительно усиливает полимеризацию F-актина по сравнению с контрольными клетками. Данный эффект, по их мнению, был полностью обусловлен увеличением содержания этого белка в стресс-фибриллах исследуемых клеток. Обнаруженный ими механизм объяснялся тем, что деполимеризация микротрубочек приводит к формированию стресс-фибрилл благодаря активации серин/треониновых фосфатаз в фибробластах. Метод АСМ был применен для исследования действия колхицина на фибробласты (Rotsch, Radmacher 2000; Wu, Kuhn, Moy 1998), однако первичные культуры фибробластов теплокровных животных ранее не были исследованы этим методом. Поэтому представляет интерес количественное исследование механизма действия этого агента с помощью методов атомно-силовой и конфокальной микроскопии.

Методы исследования

Культура клеток

Первичная культура фибробластов была получена из сердца новорожденного крысенка. Фибробласты изолировали путем ферментативной обработки в 0,125%-ном растворе трипсина (Sigma, США) с последующим механическим выделением клеток при 4 °С. Полученную клеточную суспензию помещали в питательную среду, содержащую 45 % раствора Хенкса, 40 % среды Игла и 10 % фетальной сыворотки коровы с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), 0,6 % глюкозы, глютамина (2 мМ) и гентамицина (100 ед./мл). Изолированные фибробласты культивировали на дне 40 мм пластиковых чашек Петри, предварительно покрытых коллагеном, в CO_2-инкубаторе (Sanyo, Япония) в течение

5 суток при 36,5 °C и 5 % CO_2. В части экспериментов в культуральную среду добавляли колхицин в концентрации 1 мкг/мл. Контрольные фибробласты культивировали в условиях питательной среды стандартного содержания.

Атомно-силовая микроскопия

Изучение нативных фибробластов проводилось с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США), встроенного в инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), который используется для визуального выбора клеток и контроля их состояния во время АСМ-сканирования. Индентирование (т. е. процесс продавливания АСМ-зондом) фибробластов осуществляли зондами CSG10 (НТ-МДТ СИ, Россия), константы жесткости которых были предварительно откалиброваны с помощью метода тепловых шумов (в среднем величина параметра составляла приблизительно 0,35 Н/м). Физиологически адекватные условия эксперимента обеспечивались путем поддержания температуры клеток на уровне 37 °C, что достигалось за счет подогрева содержащей культуру фибробластов чашки Петри нагревательным элементом под управлением термоконтроллера 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США).

Для изучения механических свойств фибробластов применяли режим АСМ PeakForce QNM, позволяющий картировать локальные механические характеристики нативных клеток с высоким пространственным разрешением. Фибробласты характеризовались «кажущимся» модулем Юнга (Timoshchuk, Khalisov, Penniyaynen et al. 2019), рассчитанным в соответствии с моделью Снеддона, которая предполагает аппроксимацию формы зонда конусом (Sneddon 1965). В рамках этой модели нахождение модуля Юнга производится на основе следующего выражения (Kuznetsova, Starodubtseva, Yegorenkov et al. 2007):

$$F = \frac{2}{\pi} tg\alpha \frac{E_{sample}}{1-\nu^2_{sample}} h^2,$$

где F — сила взаимодействия зонд-образец, α — половинный угол раствора конуса (зонда), E_{sample}, ν_{sample} и h — модуль Юнга, коэффициент Пуассона и величина деформации образца соответственно. В данной работе фибробласты подвергались АСМ-сканированию с пиковой силой 3 нН. Значения α = 18°, ν_{sample} = 0,5 подставлялись для расчета модуля Юнга.

Размеры области сканирования подбирались индивидуально для каждого фибробласта и составили от 40×40 мкм до 70×70 мкм. Как правило, область сканирования включала центральную часть клетки, содержащую ядро, и лишь фрагмент периферии, поскольку зачастую латеральная протяженность фибробласта на подложке превышала максимально допустимые размеры АСМ-кадра. Разрешение АСМ-кадра устанавливалось равным 128×128 точек. В каждой точке измерялась величина модуля Юнга, при дальнейшей обработке производилось усреднение этих величин. Остальные параметры сканирования были следующими: частота строчной развертки — 0,15 Гц, амплитуда и частота индентирования — соответственно 1000 нм и 0,25 кГц.

Обработку полученных АСМ-данных осуществляли с использованием программных пакетов NanoScope Analysis 1.40 и Gwyddion версий 2.50 и 2.53. Каждый фибробласт характеризовали средним значением модуля Юнга, который определяли по всей отсканированной области клетки за исключением края, где толщина клетки минимальна и при индентировании которого вклад в результаты измерения может вносить твердая подложка. Также из рассмотрения исключались участки АСМ-кадров, содержащие различные артефакты.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Прижизненное окрашивание фибробластов осуществляли фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Texas Red (Texas Red®-X phalloidin, Life Technologies, США). В работе использовали рабочий раствор Texas Red®-X phalloidin с концентрацией 3 мкл/мл. Время экспозиции составляло 60 минут. Фаллоидин высокоспецифично связывается с F-актином и позволяет визуализировать и количественно оценивать актиновый цитоскелет клеток. Texas Red возбуждали при λ = 591 нм, краситель флуоресцирует в красной области спектра (λ = 608 нм). Ядра клеток докрашивали 1%-ным раствором специфического флуоресцентного красителя DAPI (Life Technologies, США) в течение 10 минут. Флуоресценция обусловлена встраиванием красителя в малую бороздку двунитевой молекулы ДНК. Свечение возбуждали диодным лазером с длиной волны 405 нм, флуоресценцию регистрировали при λ = 450–490 нм.

Для цитологического анализа использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), интегрированный с инвертированным микроскопом Axio Observer Z1

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

(Carl Zeiss, Германия) с объективом LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr. Интенсивность флуоресценции актина определяли, используя для обработки изображений программное обеспечение ZEN_2012 (Carl Zeiss, Германия).

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в программных пакетах STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием U-критерия Манна — Уитни. Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Различия принимались статистически значимыми при $p \le 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Атомно-силовая микроскопия

Изучение механических свойств фибробластов с помощью АСМ показало, что величины модуля Юнга сильно различаются в разных клетках. Часть фибробластов характеризовалась относительно равномерным распределением величин модуля Юнга по своей поверхности; остальные клетки, напротив, демонстрировали большой разброс значений данного параметра (рис. 1а, б). При этом последние, как правило, были существенно жестче первых. Большая неоднородность значений модуля Юнга у части фибробластов объясняется присутствием на АСМ-карте распределения параметра у таких клеток очень жестких фибриллярных структур (рис. 1б). Эти структуры представляют собой довольно толстые пучки актиновых микрофиламентов — стресс-фибриллы (Ченцов 2010; Rotsch, Radmacher 2000). Необходимо отметить, что стресс-фибриллы могут присутствовать в относительно небольшом количестве в контрольных клетках (рис. 1б). Они вносят определяющий вклад в средние значения модуля Юнга фибробластов. Анализ гистограмм значений модуля Юнга фибробластов показывает, что клетки, не имеющие жестких волокон цитоскелета, характеризуются распределением, по форме близким к нормальному, в то время как распределение значений модуля Юнга фибробластов со стресс-фибриллами отличается наличием «хвоста» в области больших величин параметра (рис. 1в, г). При изучении действия колхицина на фибробласты клетки были разделены на две группы: не содержащие (первая) и содержащие стресс-фибриллы (вторая). Это разделение основывалось на анализе АСМ-карт механических параметров и формы гистограмм модуля Юнга. Результаты действия колхицина на клетки из этих двух групп анализировались по отдельности.

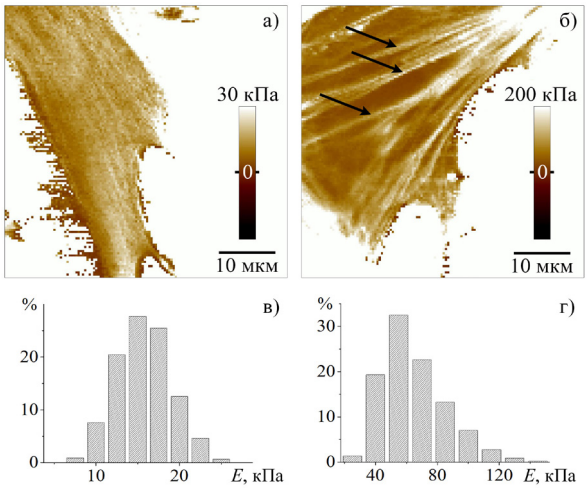

Рис. 1. АСМ-карты распределения модуля Юнга по поверхности нативных контрольных фибробластов: а) без стресс-фибрилл, б) со стресс-фибриллами (стрелками обозначены стресс-фибриллы); в, г) гистограммы значений модуля Юнга клеток а и б соответственно. По оси ординат — частота попаданий в интервал

Fig. 1. AFM maps of the distribution of Young's modulus values over the surface of living fibroblasts in control experiments: a) without stress fibres, b) with stress fibres (arrows indicate stress fibres); c, d) histograms of the Young's modulus values of the cells a, and b, respectively. The Y-axis indicates the frequency of hits in the interval

Исследование первой группы фибробластов, не содержащих стресс-фибриллы, показало, что колхицин приводит к увеличению среднего значения модуля Юнга. Так, после воздействия колхицина величина модуля Юнга составляла 23 ± 7 кПа (число измеренных клеток n = 21), а значение этого параметра у контрольных клеток было равно 18 ± 4 кПа (n = 21). Применение статистического критерия Манна — Уитни показало, что разница между выборками значений модуля Юнга является статистически значимой ($p < 0,05$).

При сравнении результатов измерения модуля Юнга фибробластов из второй группы, имеющих стресс-фибриллы, оказалось, что, так же как и в случае с клетками без жестких во-

локон, под действием колхицина фибробласты становятся существенно жестче. Значения измеряемого параметра были 48 ± 18 кПа (n = 28) и 76 ± 38 кПа (n = 29) для контрольных и обработанных колхицином клеток соответственно. Полученная разница являлась статистически значимой по U-критерию Манна — Уитни ($p < 0,05$).

Механические характеристики фибробластов после воздействия колхицина значительно отличаются от данных контрольных опытов. Представляет интерес тот факт, что под воздействием колхицина часть фибробластов (7 из 29) демонстрировала очень высокие средние значения модуля Юнга (свыше 100 кПа), в то время как в контрольных опытах таких жестких клеток обнаружено не было. Таким образом, полученные здесь результаты свидетельствуют о том, что колхицин (1 мкг/мл), действие которого приводит к разрушению микротрубочек, запускает и компенсаторную реакцию клетки, которая проявляется в том, что она становится жестче за счет увеличения количества стресс-фибрилл.

Для ответа на вопрос о том, с чем связано увеличение жесткости фибробластов, был применен метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Интенсивность флуоресценции была измерена на фибробластах, как в контрольных опытах, так и после воздействия колхицина в концентрации 1 мкг/мл (три эксперимента). Площадь выбранного участка клетки в обоих случаях была одинаковой. Функция распределения интенсивности по выбранной области клетки характеризовалась нормальным распределением. В данном случае нам не удалось разделить исследуемые фибробласты на две группы, как это было сделано ранее при исследовании с помощью АСМ. Для каждой клетки было сделано по три измерения интенсивности. Уровень флуоресценции определяли, как усредненную интенсивность флуоресценции в условных единицах (у. е.), которые соответствуют значению в пикселях.

Используя методику прижизненной окраски актиновых структур клетки, мы наблюдали значительное увеличение внутриклеточного F-актина в фибробластах после воздействия колхицина (1 мкг/мл) (рис. 2а, б). Средняя интенсивность флуоресценции актиновых микрофиламентов клеток, обработанных колхицином,

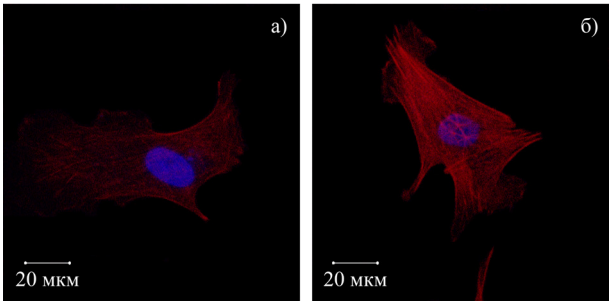

Рис. 2. Фибробласты сердца новорожденного крысенка.
Окраска: красным цветом — актиновые микрофиламенты (фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем Texas Red); синим цветом — ядра клеток (DAPI);
а) контроль, б) колхицин (1 мкг/мл)

Fig. 2. Fibroblasts of a newborn rat's heart.
Colouring: red — actin microfilaments (phalloidin conjugated with the Texas Red fluorescent dye); blue — cell nuclei (DAPI);
a) control; b) colchicine (1 μg/ml)

была достоверно выше (25,6 ± 1,6 у. е., $p < 0,05$; n = 45), чем в контроле (17,7 ± 2,0 у. е.; n = 43) (рис. 3).

Сравнительное исследование действия колхицина на первичные фибробласты новорожденных крысят с помощью методов АСМ и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показало следующее: возможный механизм компенсаторной реакции клеток

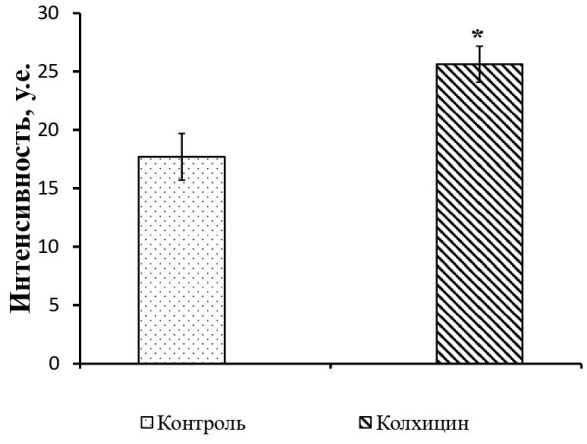

Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресцентных сигналов от актиновых волокон в фибробластах после воздействия колхицина (1 мкг/мл).
* — различия статистически значимы относительно контроля, $p < 0,05$

Fig. 3. Change in the intensity of fluorescent signals from actin fibres in fibroblasts after exposure to colchicine (1 μg/ml).
* — difference is statistically significant relative to the control, $p < 0.05$

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

на воздействие исследуемого агента обусловлен эффектом увеличения полимеризации F-актина (рис. 3) и, как следствие, повышением жесткости фибробластов в обеих группах клеток. Отличительная особенность данной работы заключается в том, что нами применен количественный подход, который показал, что наши данные не противоречат результатам других авторов, исследовавших клетки различных тканей с помощью разных методов (Jung, Shin, Park et al. 1997; Liu, Zhang, Li et al. 2018; Tsai, Waugh, Keng 1998). Подчеркнем, что впервые на первичной культуре фибробластов теплокровных животных нами было показано, что действие колхицина приводит к одновременному увеличению жесткости клетки и интенсивности флуоресценции F-актина в среднем на ≈ 60 % и ≈ 40 % соответственно.

Известно, что колхицин как лекарственная субстанция широко применяется в медицине (Liu, Zhang, Li et al. 2018). Наши результаты позволяют детализировать молекулярные механизмы действия колхицина, что может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, содержащих указанный агент в качестве лекарственной субстанции, на уровне доклинических исследований.

References

Chang, L., Kious, T., Yorgancioglu, M. et al. (1993) Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. *Biophysical Journal*, vol. 64, no. 4, pp. 1282–1286. DOI: 10.1016/S0006-3495(93)81493-0 (In English)

Chentsov, Yu. S. (2010) *Tsitologiya s elementami tsellyulyarnoj patologii [Cytology with elements of cellular pathology]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo Publ., 361 p. (In Russian)

Henderson, E., Haydon, P. G., Sakaguchi, D. S. (1992) Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, vol. 257 (5078), pp. 1944–1946. PMID: 1411511. DOI: 10.1126/science.1411511 (In English)

Inoue, S. (1981) Cell division and the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, vol. 91, no. 3, pp. 131–147. (In English)

Jung, H. I., Shin, I., Park Y. M. et al. (1997) Colchicine activates actin polymerization by microtubule depolymerization. *Molecules and Cells*, vol. 7, no. 3, pp. 431–437. PMID: 9264034. (In English)

Jung, S.-H., Park, J.-Y., Joo, J.-H. et al. (2011) Extracellular ultrathin fibers sensitive to intracellular reactive oxygen species: Formation of intercellular membrane bridges. *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 12, pp. 1763–1773. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.02.010 (In English)

Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I. et al. (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, vol. 38, no. 8, pp. 824–833. PMID: 17709250. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011 (In English)

Liu, L., Zhang, W., Li, L. et al. (2018) Biomechanical measurement and analysis of colchicine-induced effects on cells by nanoindentation using an atomic force microscope. *Journal of Biomechanics*, vol. 67, pp. 84–90. PMID: 29249455. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.11.018 (In English)

Mareel, M. M., De Mets, M. (1984) Effect of microtubule inhibitors on invasion and on related activities of tumor cells. *International Review of Cytology*, vol. 90, pp. 125–168. PMID: 6389412. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61489-8 (In English)

Rieder, C. L., Palazzo, R. E. (1992) Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of Cell Science*, vol. 102, no. 3, pp. 387–392. PMID: 1506421. (In English)

Rotsch, C., Radmacher, M. (2000) Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, vol. 78, no. 1, pp. 520–535. PMID: 10620315. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76614-8 (In English)

Salmon, E. D., McKeel, M., Hays, T. (1984) Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *The Journal of Cell Biology*, vol. 99, no. 3, pp. 1066–1075. PMID: 6470037. DOI: 10.1083/jcb.99.3.1066 (In English)

Sneddon, I. N. (1965) The relation between load and penetration in the axi-symmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, no. 1, pp. 47–57. DOI: 10.1016/0020-7225(65)90019-4 (In English)

Spedden, E., White, J. D., Naumova, E. N. et al. (2012) Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, vol. 103, no. 5, pp. 868–877. PMID: 23009836. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.08.005 (In English)

Timoshchuk, K. I., Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A. et al. (2019) Mechanical characteristics of intact fibroblasts studied by atomic force microscopy. *Technical Physics Letters*, vol. 45, no. (9), pp. 947–950. DOI: 10.1134/S1063785019090293 (In English)

Tsai, M. A., Waugh, R. E., Keng, P. C. (1998) Passive mechanical behavior of human neutrophils: Effects of colchicine and paclitaxel. *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 6, pp. 3282–3291. PMID: 9635782. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)78035-X (In English)

Wu, H. W., Kuhn, T., Moy, V. T. (1998) Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning*, vol. 20, no. 5, pp. 389–397. PMID: 9737018. DOI: 10.1002/sca.1998.4950200504 (In English)

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Экспериментальные статьи

УДК 537.87+612.812

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

Влияние электромагнитных излучений на ориентировочно-исследовательскую активность и когнитивные функции крыс с контрастной возбудимостью нервной системы

Н. В. Ширяева✉[1], А. И. Вайдо[1], М. Б. Павлова[1], С. В. Сурма[1], Б. Ф. Щеголев[1]

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

Сведения об авторах
Наталья Викторовна Ширяева,
SPIN-код: 6291-7682,
Scopus AuthorID: 6701910737,
ORCID: 0000-0001-9940-9575,
e-mail: shiryaeva@infran.ru

Александр Иванович Вайдо,
SPIN-код: 1323-5153,
Scopus AuthorID: 7004491278,
ORCID: 0000-0002-6209-9902,
e-mail: vaidoai@infran.ru

Марина Борисовна Павлова,
SPIN-код: 6457-5630, Scopus AuthorID: 55159027700,
ORCID: 0000-0002-3674-906X,
e-mail: pavlova.mb@infran.ru

Сергей Викторович Сурма,
SPIN-код: 7059-0259,
Scopus AuthorID: 36054909800,
ORCID: 0000-0003-4505-0995,
e-mail: svs-infran@yandex.ru

Борис Федорович Щеголев,
SPIN-код: 1239-3324,
Scopus AuthorID: 6701534523,
ORCID: 0000-0001-5500-2837,
e-mail: shcheg@mail.ru

Для цитирования:
Ширяева, Н. В., Вайдо, А. И., Павлова, М. Б., Сурма, С. В., Щеголев, Б. Ф. (2020) Влияние электромагнитных излучений на ориентировочно-исследовательскую активность и когнитивные функции крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 123–132.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

Получена 27 июня 2019;
прошла рецензирование 8 июля 2019;
принята 24 июля 2019.

Аннотация. В последние годы активно исследуются механизмы воздействия на биологические объекты техногенных источников электромагнитных излучений и изменений естественного электромагнитного фона окружающей среды (ослабление, усиление). Важными индикаторами неблагоприятного влияния неионизирующих электромагнитных излучений являются изменения элементов врожденного поведения и когнитивных функций. При этом роль наследственно обусловленных характеристик нервной системы в определении чувствительности/устойчивости к колебаниям электромагнитных полей практически не изучалась. Цель работы заключалась в исследовании влияния излучения УВЧ-диапазона стандартного Wi-Fi-роутера и ослабленных экранированием внешних магнитных и электрических полей на врожденное поведение, отражающее ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональность животных в тесте «открытое поле», и когнитивные функции (сохранение условного рефлекса пассивного избегания) у самцов крыс двух селектированных линий ВП и НП (с высоким и низким порогами возбудимости нервной системы, низковозбудимые и высоковозбудимые, соответственно), а также крыс контрольной линии Вистар. Показано негативное влияние на врожденное поведение и память крыс двух линий с различными порогами возбудимости нервной системы ослабленных внешних электрических и магнитных полей, а также ЭМИ УВЧ-диапазона. Крысы с высокой возбудимостью нервной системы оказались более чувствительными к изменениям магнитного и электрического фона, электромагнитным излучениям по сравнению с низковозбудимыми животными.

Ключевые слова: электромагнитные излучения, слабые магнитные поля, поведение, обучение, возбудимость, крысы.

Финансирование: Работа проводилась в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 65).

Права: © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Electromagnetic radiation impact on the orienting-exploratory activity and cognitive functions of rat strains with contrasting excitability of the nervous system

N. V. Shiryaeva[✉1], A. I. Vaido[1], M. B. Pavlova[1], S. V. Surma[1], B. F. Shchegolev[1]

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

Authors
Natalya V. Shiryaeva,
SPIN: 6291-7682,
Scopus AuthorID: 6701910737,
ORCID: 0000-0001-9940-9575,
e-mail: shiryaeva@infran.ru

Alexander I. Vaido,
SPIN: 1323-5153,
Scopus AuthorID: 7004491278,
ORCID: 0000-0002-6209-9902,
e-mail: vaidoai@infran.ru

Marina B. Pavlova,
SPIN: 6457-5630,
Scopus AuthorID: 55159027700,
ORCID: 0000-0002-3674-906X,
e-mail: pavlova.mb@infran.ru

Sergey V. Surma,
SPIN: 7059-0259,
Scopus AuthorID: 36054909800,
ORCID: 0000-0003-4505-0995,
e-mail: svs-infran@yandex.ru

Boris F. Shchegolev,
SPIN: 1239-3324,
Scopus AuthorID: 6701534523,
ORCID: 0000-0001-5500-2837,
e-mail: shcheg@mail.ru

For citation: Shiryaeva, N. V., Vaido, A. I., Pavlova, M. B., Surma, S. V., Shchegolev, B. F. (2020) Electromagnetic radiation impact on the orienting-exploratory activity and cognitive functions of rat strains with contrasting excitability of the nervous system. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 123–132.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

Received 27 June 2019;
reviewed 8 July 2019;
accepted 24 July 2019.

Abstract. In recent years, the mechanisms of influence that technogenic sources of electromagnetic radiation and the change in the natural electromagnetic field have on biological objects have been actively investigated. Nevertheless, the role of ancestral conditional characteristics of the nervous system in susceptibility towards and resilience against electromagnetic field oscillations has been virtually ignored. The objective of our research is to investigate the impact of the UHF band radiation emitted by a standard Wi-Fi router and the impact of external magnetic and electric fields weakened by shielding on animals' innate behaviour which reflects orientational and exploratory activity and emotional response in an Open Field Test, and also on the cognitive functions (retention of the conditioned response of passive avoidance) of male rats from two selected strains: HT and LT — with high and low thresholds of nervous system excitability, and control Wistar rats. The outcomes of the study confirm the negative impact of weak external electric and magnetic fields, as well as EMR of the UHF band, on innate behaviour and memory in rats regardless of the selected strain, although HT rats were more sensitive to changes in magnetic and electric fields and electromagnetic radiation in comparison with LT rats.

Keywords: electromagnetic radiation, weak electromagnetic fields, behaviour, learning, excitability, rats.

Funding: This research is part of the Fundamental Scientific Research Program for State Academies for the years 2013–2020 (GP-14, Section 65).

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Техногенные источники электромагнитных излучений (ЭМИ) и изменение естественного электромагнитного фона окружающей среды (ослабление, усиление) оказывают существенное влияние на функции организма человека и животных на различных структурных уровнях, что может представлять угрозу для здоровья и экологической безопасности живых организмов. В последние годы особенно активно изучаются механизмы воздействия на биологические объекты высокочастотных ЭМИ и ослабленных экранированием магнитных полей (МП) (Karthick et al. 2017; Lai 2005; Buchachenko 2014).

Чрезвычайно чувствительной к влиянию ЭМИ и ослабленных магнитных полей является нервная система. Их действие на нервную систему характеризуется изменением врожденных элементов поведения, условно-рефлекторной деятельности, физиологических процессов (Schneider et al. 2014; Spivak et al. 2016; Никитина и др. 2017), что является важным индикатором неблагоприятного влияния естественных и техногенных модификаций ЭМИ. Реакция организма на эти воздействия может иметь индивидуальный характер и быть связанной с функциональным состоянием нервной системы. Роль наследственно обусловленных характеристик нервной системы в определении чувствительности/устойчивости к колебаниям электромагнитных полей практически не изучалась (Дюжикова и др. 2018; 2019).

Цель настоящей работы — изучение влияния излучения УВЧ-диапазона стандартного Wi-Fi-роутера и ослабленных экранированием внешних магнитных и электрических полей на врожденное поведение, отражающее ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональность животных, и когнитивные функции у самцов крыс двух селектированных линий ВП и НП (с высоким и низким порогами возбудимости нервной системы, низковозбудимые и высоковозбудимые соответственно), а также крыс контрольной линии Вистар.

Материал и методы

Работу проводили с использованием самцов крыс в возрасте 5 месяцев стандартной линии Вистар и линий ВП и НП, селектированных в лаборатории генетики высшей нервной деятельности (Вайдо 2000; Вайдо и др. 2018) и входящих в биоколлекцию ФГБУН Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (№ ГЗ 0134-2018-0003). Самцов содержали группами по 6–8 особей в стандартных клетках на стандартном пищевом рационе в условиях лабораторного вивария.

В работе использовали Wi-Fi-роутер (беспроводной маршрутизатор LinkSys E1200-EE/RU) со следующими техническими характеристиками: частота беспроводной связи 2,4 ГГц, 2 внутренние антенны с коэффициентом усиления 4 ДБи, выходная мощность 16 ДБм, среднее расстояние до животных — 40 см.

Для создания условий ослабления магнитного поля Земли (далее — ОМП) использовали экранирующую камеру, выполненную из немагнитного материала (картона) и покрытую сверху несколькими слоями аморфного магнитомягкого материала АМАГ-172, что обеспечило 40-кратное уменьшение величины индукции магнитного поля Земли внутри камеры (с 48 мкТл до 1,2 мкТл) (Сурма и др. 2012). Имитирующая камера (без ослабления магнитного поля Земли, величина индукции МП — 48 мкТл, далее — БОМП) была изготовлена из картона, не имела экранирующего покрытия и была покрыта черным полиэтиленом. Обе камеры выполнены в виде цилиндров диаметром 60 см и длиной 140 см, закрытых с одного торца и открытых с другого так, чтобы в глубину камеры легко помещалась клетка с крысами. Для определения величины индукции магнитного поля за пределами и внутри экспериментальных камер были проведены измерения с использованием магнитометров Fluxmaster (StefanMayerInstruments, Dinslaken, Germany) (1 нТл — 200 мкТл, с разрешением 1 нТл) и HB0302.1A (St. Petersburg, Russia) (0,1 мкТл — 100 мкТл, с разрешением 0,1 мкТл).

Для защиты от внешних низкочастотных электрических полей в экспериментах использовали клетку Фарадея, представляющую собой контейнер размером 600×750×600 мм со съемной крышкой, изготовленный из нескольких слоев металлической сетки, в которую помещали стандартную клетку с животными. Под верхней крышкой размещали дополнительную полку, в центре которой располагали Wi-Fi-роутер (Дюжикова и др. 2018).

Влияние на поведение крыс УВЧ-излучения роутера изучали в условиях экспозиции животных в камере, экранирующей магнитное поле, и в клетке Фарадея.

Для изучения влияния ЭМИ роутера в условиях ослабления внешнего магнитного поля (ОМП) либо без дополнительных ограничивающих воздействий (БОМП) «домашнюю» клетку с животными помещали в экранирующую камеру с роутером, расположенном на поддоне в центре верхней крышки клетки (группа ОМП+Роутер). Альтернативную группу крыс помещали в имитирующую камеру на то же время с роутером (группа БОМП+Роутер). Экспериментальные группы были подвергнуты воздействиям на протяжении 12 часов (с 22:00 до 10:00). Интактным контролем (далее — контроль1) служили животные, содержавшиеся в виварии и не подвергавшиеся воздействиям.

Оценку поведения животных в тесте «открытое поле» проводили через час после окончания экспозиции животных в камерах.

Используемая установка «открытое поле» представляла собой круг диаметром 160 см, ограниченный бортом высотой 35 см. Пол круга разделен на квадраты со стороной 20 см. Над центром поля на высоте 60 см подвешивалась лампа 500 Вт с зеркальным отражателем, обеспечивающим освещенность на уровне пола от 2000 Люкс в центре до 1500 Люкс по краям. При проведении тестирования крысу помещали в центральный квадрат круга и в течение 5 минут наблюдали за ее поведением. Регистрировали следующие параметры поведения: латентный период выхода из центра поля, число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность), подъем на задние лапы (число стоек) (вертикальная двигательная активность), оценивали количество актов груминга, количество поворотов налево и направо, количество кручений, количество болюсов (эмоциональность), количество актов фризинга (реакция страха).

Для изучения влияния ЭМИ Wi-Fi-роутера на когнитивные функции крыс оценивали сохранение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) после 24-часовой экспозиции животных с роутером в клетке Фарадея с размещенной в ней стандартной клеткой с животными. В качестве контрольных использовали интактных животных каждой из линий (контроль1) и животных, помещенных в клетку Фарадея без дополнительных воздействий (контроль2).

Выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с однократным отрицательным болевым подкреплением производили с использованием установки, состоящей из двух камер, светлой и темной, в которой освещение отсутствовало. Как известно, в норме крысы проводят большую часть времени в темном отсеке, что связано с инстинктивным стремлением животных находиться в темном и тесном пространстве — норке (норковый рефлекс). Метод основан на выработке у крыс условной реакции пассивного избегания темной камеры в ответ на безусловный электрокожный болевой раздражитель. Крысу высаживали в центр светлой камеры, хвостом к отверстию в темную камеру. Животному давали 3 минуты для обследования; в течение этого времени оно находило отверстие в темную камеру и заходило в нее. В темной камере животное получало электрокожное болевое раздражение силой 1 мА длительностью 1 мин. На этом выработка рефлекса завершалась. Если животное в течение 3 минут не заходило в темную камеру, оно исключалось из дальнейшего эксперимента.

Через 1 час после выработки УРПИ крыс соответствующих групп, за исключением интактного контроля1, помещали на сутки в заданные экспериментальные условия. Проверку сохранения УРПИ осуществляли сразу после окончания экспозиции животных в камерах Фарадея с роутером.

Регистрировали процент животных, не заходивших в темный отсек.

Статистическая обработка

Для представления результатов вычисляли средние значения и медианы. На рисунках представлены медианы. Определение достоверности различий между вариантами проводили с помощью критерия Манна — Уитни, ANOVA, а также критерия достоверности разности долей (Плохинский 1970). Использовали программное обеспечение Statgraphics Centurion XV11 и Statistica 6.0.

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

Результаты

Результаты оценки разных компонентов ориентировочно-исследовательского поведения и эмоциональности в тесте «открытое поле» у крыс двух линий ВП и НП, интактных и после экспозиции в экранирующей внешнее магнитное поле и имитирующей камер, без дополнительных воздействий, и в сочетании с работающим Wi-Fi-роутером представлены на рисунке 1.

У интактных высоковозбудимых крыс линии НП число стоек выше (рис. 1–3), а количество актов фризинга ниже (рис. 1–6) по сравнению с низковозбудимой линией ВП.

Экспозиция линейных животных в экранирующей и имитирующей камерах в течение 12 часов, независимо от дополнительных экспериментальных условий, приводит у крыс линии ВП к снижению актов фризинга (рис. 1–6) и увеличению количества поворотов (рис. 1–7); у НП — к снижению латентного периода первого движения (рис. 1–1) и количества болюсов (рис. 1–4), увеличению актов груминга (рис. 1–5) по сравнению с интактным контролем.

ОМП вызывает изменения — увеличение актов фризинга, а также левых и правых поворотов (рис. 1–7 и 1–8) — только у крыс линии НП (рис. 1–6) по сравнению с соответствующими группами БОМП и интактным контролем.

ЭМИ роутера и в условиях ослабленного экранированием внешнего магнитного поля, и без него приводит у крыс линии ВП к увеличению правых поворотов (рис. 1–8), тогда как у линии НП — к увеличению актов фризинга (рис. 1–6) и кручений (рис. 1–9) по сравнению с группами ОМП и БОМП соответственно, а также с интактным контролем.

При этом влияние роутера на фоне ОМП приводит к избирательному снижению количества болюсов у крыс линии ВП (рис. 1–4) и числа пересеченных квадратов у крыс линии НП (рис. 1–2).

Результаты оценки сохранения УРПИ после 24-часового воздействия УВЧ ЭМИ роутера в условиях клетки Фарадея по сравнению с собственно клеткой Фарадея и у интактного контроля линии Вистар представлены на рисунке 2, а соответствующие результаты у крыс линий ВП и НП — на рисунке 3.

Действие УВЧ ЭМИ роутера привело к нарушению сохранения УРПИ у крыс линии Вистар в 2 раза по сравнению с интактным контролем и в 3 раза по сравнению с активным контролем — клеткой Фарадея (рис. 2).

Экспозиция высоковозбудимых крыс линии НП в клетке Фарадея и без дополнительных воздействий, и при действии роутера привела к значительному снижению уровня сохранения УРПИ по сравнению с интактным контролем (рис. 3). При этом в условиях действия роутера проявились более чем 2-кратные различия с линией ВП в эффективности сохранения УРПИ.

У животных линии ВП не обнаружено различий в сохранении рефлекса между всеми экспериментальными группами (рис. 3).

Обсуждение

Проведенные эксперименты свидетельствуют в пользу влияния всех исследуемых факторов (УВЧ ЭМИ роутера, ослабление внешнего магнитного поля, экспериментальные условия) на поведение крыс в тесте «открытое поле». Характер реакции зависит от наследственно обусловленной возбудимости нервной системы животных и затрагивает разные компоненты поведения.

Влияние ЭМИ роутера в большей степени сказалось на поведении высоковозбудимых крыс линии НП и привело к усилению реакции страха в новой обстановке и повышению хаотичности движений.

Ослабление экранированием внешнего магнитного поля повлияло только на крыс линии НП и вызвало также усиление реакции страха и увеличение количества поворотов, свидетельствующих о повышении общего беспокойства.

Однако и само пребывание животных в ограниченном пространстве экспериментальных цилиндров привело к изменениям поведения крыс обеих линий, что проявилось у линии ВП в снижении реакции страха (фризинга) и увеличении поворотов, тогда как у линии НП — в усилении тревожности и снижении эмоциональности.

Оценка поведения в тесте «открытое поле» у интактных крыс линий ВП и НП позволила также подтвердить наличие межлинейных различий в уровне двигательной активности и реакции страха, связанных с генетически детерминированными особенностями возбудимости нервной системы (Вайдо 2000; 2018).

Полученные результаты позволили заключить, что нарушение сохранения памяти при обучении УРПИ вследствие ослабления электрического поля в клетке Фарадея и в сочетании с дополнительным влиянием ЭМИ роутера более выражено при наследственно обусловленной высокой возбудимости нервной системы у крыс линии НП. Собственно УВЧ ЭМИ роутера значительно ослабляло когнитивные функции только у крыс линии Вистар.

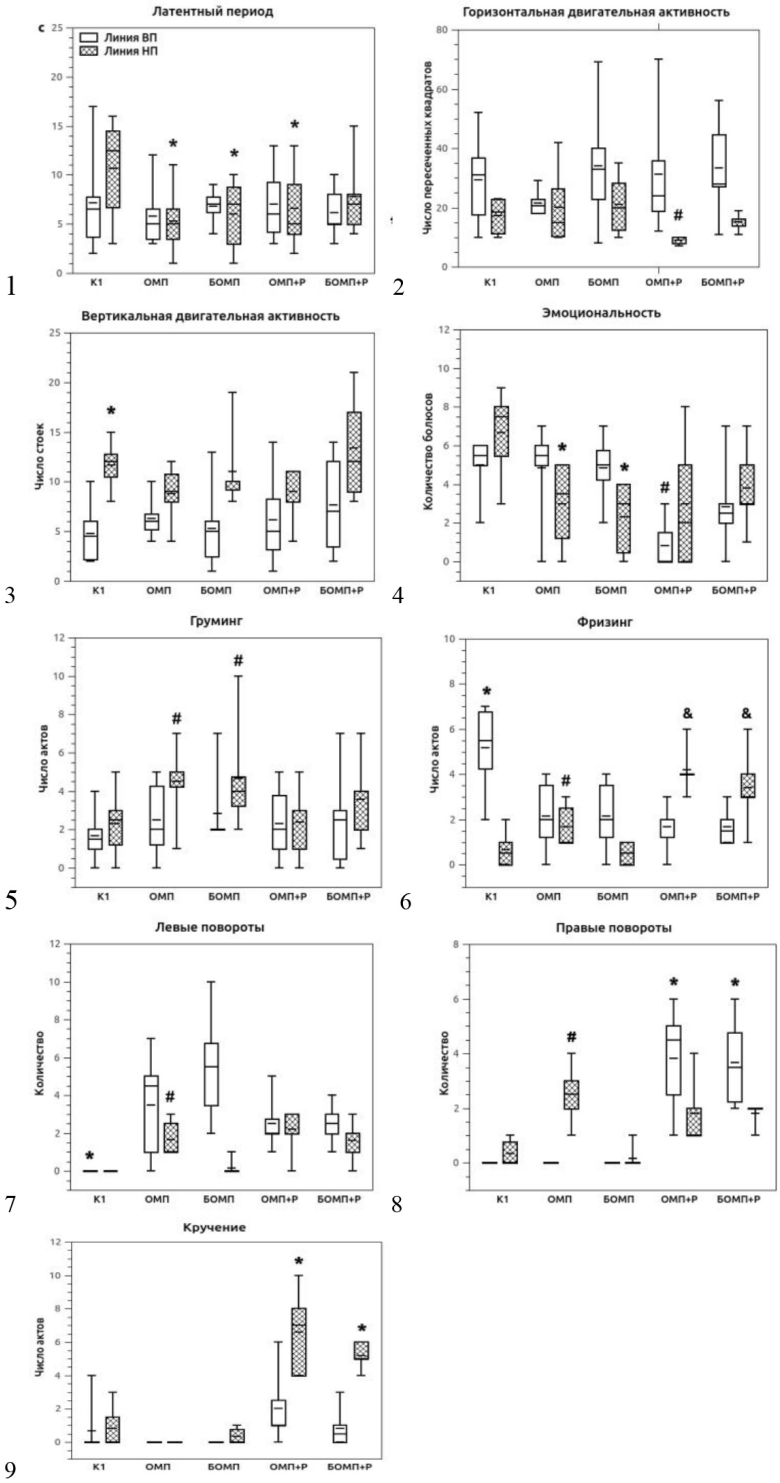

Рис. 1. Результаты оценки разных компонентов поведения в тесте «открытое поле» у самцов крыс линий ВП и НП после экспозиции в экранирующей (ОМП) и имитирующей (БОМП) камерах, в тех же условиях с роутером (ОМП+Роутер, БОМП+Роутер, соответственно), контроль1 — интактные животные.

Обозначения:

1 — Латентный период; * — различия с контролем1 линии НП достоверны ($P < 0,05$).

2 — Горизонтальная двигательная активность (число пересеченных квадратов); # — различия с остальными группами линии НП достоверны ($P < 0,05$).

3 — Вертикальная двигательная активность (число стоек) в тесте; * — различия с группой контроль1 линии ВП достоверны ($P < 0,05$).

4 — Эмоциональность (количество болюсов); * — различия с группой контроль1 соответствующей линии достоверны ($P < 0,05$); # — различия с остальными группами линии ВП достоверны ($P < 0,05$).

5 — Число актов груминга; # — различия с группой контроль1 линии НП достоверны ($P < 0,05$).

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

6 — Число актов фризинга; * — различия с контролем1 линии НП и со всеми остальными группами линии ВП достоверны (P < 0,05); # — различия с группой БОМП линии НП достоверны (P < 0,05); & — различия с соответствующими группами ОМП и БОМП линии НП достоверны (P < 0,05).

7 — Число левых поворотов; * — различия со всеми остальными группами линии ВП достоверны (P < 0,05); # — различия с группой БОМП линии НП достоверны (P < 0,05).

8 — Число правых поворотов; * — различия с группами контроль1, ОМП, БОМП линии ВП достоверны (P < 0,05); # — различия с группой БОМП линии НП достоверны (P < 0,05).

9 — Число кручений; * — различия с группами контроль1, ОМП, БОМП линии НП достоверны (P < 0,05)

Fig. 1. Evaluation results for different behavioral components in the Open Field Test in HT and LT strain male rats after the exposure in a Faraday cage and a simulation cage; under the same conditions with a router (Faraday cage + router, simulation cage + router, respectively), Control 1 — intact animals.

1 — Latent period; * — difference between LT strain and Control 1 is significant p < 0.05.

2 — Horizontal mobility (number of squares crossed); # — difference from other LT strain groups is significant p < 0.05.

3 — Vertical mobility (number of upright stands) during the test; * — difference between HT strain and Control 1 is significant p < 0.05.

4 — Excitement (number of boli); * — difference between the corresponding strain and Control 1 is significant p < 0.05; # — difference from other HT strain groups is significant p < 0.05.

5 — Number of grooming acts; # — difference between LT strain and Control 1 is significant p < 0.05.

6 — Number of freezing acts; * — difference between LT strain Control 1 and the other HT strains is significant p < 0.05; # — difference from simulation cage LT strain is significant p < 0.05; & — difference from corresponding LT strain groups is significant p < 0.05.

7 — Number of left turns; * — difference from other HT strain groups is significant p < 0.05; # — difference from simulation cage LT strain is significant p < 0.05.

8 — Number of right turns; * — difference between Control 1, Faraday cage and simulation cage HT strain groups is significant p < 0.05; # — difference from simulation cage LT strain is significant p < 0.05.

9 — Number of rotations; * — difference between Control 1, Faraday cage and simulation cage LT strain groups is significant p < 0.05

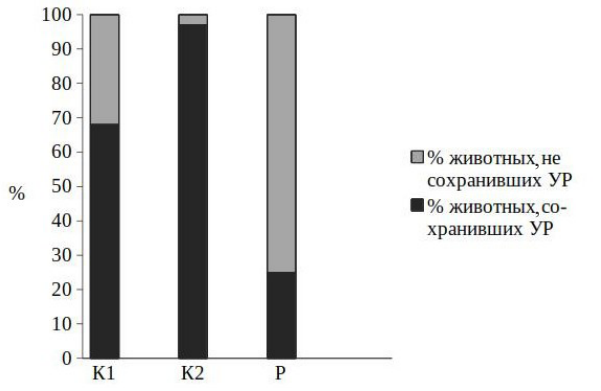

Рис. 2. Сохранение УРПИ после экспозиции крыс линии Вистар в клетке Фарадея без дополнительных воздействий (К2) и с роутером (Р). К1 — интактные контрольные животные. * — различия со всеми остальными группами достоверно (P < 0,05)

Fig. 2. Retention of the conditioned reaction of passive avoidance after Wistar rats exposure in the Faraday cage without additional effects (K2) and with router (P). K1 — control group of intact animals. * — difference from all groups is significant p < 0.05

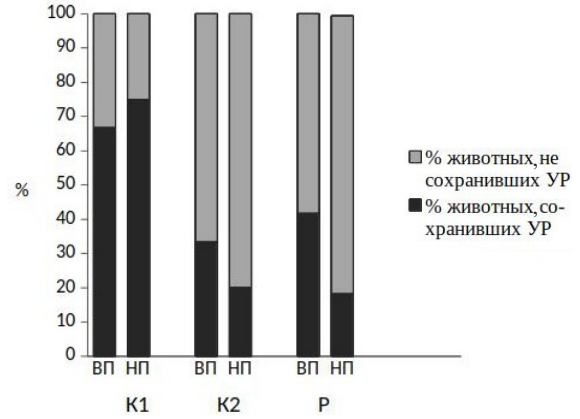

Рис. 3. Сохранение УРПИ после экспозиции крыс двух линий ВП и НП в клетке Фарадея без дополнительных воздействий (К2) и с роутером (Р). К1 — интактные контрольные животные. Линиями обозначены достоверно различающиеся величины (P < 0,05)

Fig. 3. Retention of the conditioned reaction of passive avoidance after HT and LT rats exposure in the Faraday cage without additional effects (K2) and with router (P). K1 — control group of intact animals. Lines indicate the difference (significant p < 0.05)

У крыс с низкой возбудимостью нервной системы (линия ВП) используемые экспериментальные воздействия не вызывали статистически значимых изменений в способности к сохранению в памяти УРПИ.

Таким образом, в целом крысы с высокой возбудимостью нервной системы оказались более чувствительными к изменениям магнитного и электрического фона, электромагнитным излучениям по сравнению с низковозбудимыми животными.

Хромосомный аппарат высоковозбудимых крыс линии НП также более подвержен повреждающему действию высокочастотных ЭМИ по сравнению с линией ВП (Дюжикова и др. 2019).

Влияние переменного, но не статического электрического поля (35 кВ/м) на способность к обучению и пространственную память показано у мышей (Di et al. 2019). Воздействие высокочастотных электромагнитных полей на память зрелых самцов крыс продемонстрировано в тестах социальной дискриминации (Schneider et al. 2014). Показано, что ЭМИ сверхвысокой частоты вызывают у крыс линии Вистар метаболическое перепрограммирование митохондрий клеток головного мозга, что увеличивает скорость образования супероксидных радикалов и оксида азота, которые могут инициировать развитие нейродегенеративных заболеваний и рака (Burlaka et al. 2016).

Механизмы воздействия на организм ЭМИ и магнитных полей в настоящее время активно исследуются, ведутся многочисленные дискуссии в отношении возможных путей их влияния на организм, проявления магнитобиологических эффектов и их последствий (Karthick et al. 2017; Pall 2016; Terzi et al. 2016). Недавно группой американских и японских исследователей с использованием метода ЭЭГ обнаружена способность человека ощущать изменения магнитного поля (выявлены изменения активности мозга в альфа-диапазоне при различной ориентации магнитного поля относительно испытуемого в клетке Фарадея) (Wang et al. 2019); тем не менее механизмы магниторецепции у человека пока неясны.

Наиболее обоснованной среди обсуждаемых гипотез представляется молекулярная концепция (Buchachenko 2014), построенная на значении ион-радикальной пары в качестве приемника магнитных полей и источника магнитных эффектов. Неспаренные электроны в них являются носителями спинового магнетизма, и именно они взаимодействуют с постоянными и переменными магнитными полями. Доказано участие таких пар в ферментативном синтезе основного энергоносителя живых систем — АТФ и репликативном синтезе ДНК при участии полимераз.

Заключение

Результаты настоящей работы подтверждают негативное влияние на врожденное поведение и память крыс ограничений внешнего электрического и магнитного полей, а также ЭМИ УВЧ-диапазона, указывают на необходимость учета типологических особенностей нервной системы при разработке средств защиты от негативного влияния ЭМИ и корректировки магнитобиологических эффектов различных источников излучения. Такой подход важен для понимания причин индивидуальной изменчивости в чувствительности к ЭМИ и определении на этой основе путей коррекции индуцированных ЭМИ патогенетических процессов у человека.

Литература

Вайдо, А. И. (2000) *Физиолого-генетический анализ возбудимости нервной системы и поведения лабораторной крысы. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук*. СПб., Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 197 с.

Вайдо, А. И., Ширяева, Н. В., Павлова, М. Б. и др. (2018) Селектированные линии крыс с высоким и низким порогом возбудимости: модель для изучения дезадаптивных состояний, зависимых от уровня возбудимости нервной системы. *Лабораторные животные для научных исследований*, № 3, с. 12–22. DOI: 10.29296/2618723X-2018-03-02

Дюжикова, Н. А., Копыльцов, А. В., Коршунов, К. А. и др. (2018) Действие электромагнитного излучения высокой частоты и влияние резонаторов-преобразователей на частоту хромосомных аберраций в клетках костного мозга самцов крыс линии Вистар. *Электромагнитные волны и электронные системы*, т. 23, № 1, с. 12–18.

Дюжикова, Н. А., Вайдо, А. И., Даев, Е. В. и др. (2019) Влияние электромагнитного излучения УВЧ-диапазона на дестабилизацию генома клеток костного мозга у крыс линий с контрастной возбудимостью нервной системы. *Экологическая генетика*, т. 17, № 2, с. 83–92. DOI: 10.17816/ecogen17283-92

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-123-132

Никитина, Е. А., Медведева, А. В., Герасименко, М. С. и др. (2017) Ослабленное магнитное поле Земли: влияние на транскрипционную активность генома, обучение и память у *Dr. melanogaster*. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*, т. 67, № 2, с. 246–256. DOI: 10.7868/S0044467717020101

Плохинский, Н. А. (1970) *Биометрия.* 2-е изд. М.: Изд-во МГУ, 367 с.

Сурма, С. В., Кузнецов, П. А., Хрусталева, Р. С. и др. (2012) *Устройство для исследования влияния электромагнитных полей на биологические объекты*. Патент RU2454675C2. Дата регистрации 27.06.2012. Выдано Роспатентом.

Buchachenko, A. L. (2014) Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry,genetics and medicine. *Russian Chemical Reviews*, vol. 83, no. 1, pp. 1–12. DOI: 10.1070/RC2014v083n01ABEH004335

Burlaka, A. P., Druzhyna, M. O., Vovk, A. V., Lukin, S. M. (2016) Disordered redox metabolism of brain cells in rats exposed to low doses of ionizing radiation or UHF electromagnetic radiation. *Experimental Oncology*, vol. 38, no. 4, pp. 238–241. PMID: 28230822.

Di, G., Kim, H., Xu, Y. et al. (2019) A comparative study on influences of static electric field and power frequency electric field on cognition in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 66, pp. 91–95. PMID: 30639900. DOI: 10.1016/j.etap.2019.01.001

Karthick, T., Sengottuvelu, S., Haja Sherief, H., Duraisami, R. (2017) Review: Biological effects of magnetic fields on rodents. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, vol. 5 (4E), pp. 1569–1580.

Lai, H. (2005) Biological effects of radiofrequency electromagnetic fields. In: Gary E. Wnek, Gary L. Bowlin (eds.). *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. Vol. 1. 2nd ed. New York; London: Informa Healthcare, pp. 254–261.

Pall, M. L. (2016) Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 75, pt B, pp. 43–51. PMID: 26300312. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.08.001

Schneider, J., Stangassinger, M. (2014) Nonthermal effects of lifelong high-frequency electromagnetic field exposure on social memory performance in rats. *Behavioral Neuroscience*, vol. 128, no. 5, pp. 633–637. PMID: 24999587. DOI: 10.1037/a0037299

Spivak, I. M., Kuranova, M. L., Mavropulo-Stolyarenko, G. R. et al. (2016) Cell response to extremely weak static magnetic fields. *Biophysics*, vol. 61, no. 3, pp. 435–439. DOI: 10.1134/S0006350916030180

Terzi, M., Ozberk, B., Deniz, O. G., Kaplan, S. (2016) The role of electromagnetic fields in neurological disorders. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 75, pt B, pp. 77–84. PMID: 27083321. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2016.04.003

Wang, C. X., Hilburn, I. A., Wu, D.-A. et al. (2019) Transduction of the geomagnetic field as evidenced from alpha-band activity in the human brain. *eNeuro*, vol. 6, no. 2, article e0483-18.2019. PMID: 31028046. DOI: 10.1523/eneuro.0483-18.2019

References

Buchachenko, A. L. (2014) Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine. *Russian Chemical Reviews*, vol. 83, no. 1, pp. 1–12. DOI: 10.1070/RC2014v083n01ABEH004335 (In English)

Burlaka, A. P., Druzhyna, M. O., Vovk, A. V., Lukin, S. M. (2016) Disordered redox metabolism of brain cells in rats exposed to low doses of ionizing radiation or UHF electromagnetic radiation. *Experimental Oncology*, vol. 38, no. 4, pp. 238–241. PMID: 28230822. (In English)

Di, G., Kim, H., Xu, Y. et al. (2019) A comparative study on influences of static electric field and power frequency electric field on cognition in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacol*ogy, vol. 66, pp. 91–95. PMID: 30639900. DOI: 10.1016/j.etap.2019.01.001 (In English)

Dyuzhikova, N. A., Kopyltsov, A. V., Korshunov, K. A. et al. (2018) Dejstvie electromagnitnogo izlucheniya vysokoj chastoty i vliyanie rezonatorov-preobrazovatelej na chastotu khromosomnykh aberratsij v kletkakh kostnogo mozga samtsov krys linij Vistar [The effect of high-frequency electromagnetic radiation and the effect of resonator-convertors on the frequency of chromosomal aberrations in bone marrow cells of male Wistar rats]. *Elektromagnitnye volny i elektronnye sistemy — Electromagnetic Waves and Electronic Systems*, vol. 23, no. 1, pp. 12–18. (In Russian)

Dyuzhikova, N. A., Vaido, A. I., Daev, E. V. et al. (2019) Vliyaniye electromagnitnogo izlucheniya UVCh-diapazona na destabilizatsiyu genoma kletok kostnogo mozga u krys linij s kontrastnoj vozbudimost'yu nervnoj systemy [Impact of electromagnetic UHF radiation on genome destabilization in bone marrow cell of rat strains with contrast nervous system excitability]. *Ekologicheskaya genetika — Ecological Genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 83–92. DOI: 10.17816/ecogen17283-92 (In Russian)

Karthick, T., Sengottuvelu, S., Haja Sherief, H., Duraisami, R. (2017) Review: Biological effects of magnetic fields on rodents. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, vol. 5 (4E), pp. 1569–1580. (In English)

Lai, H. (2005) Biological effects of radiofrequency electromagnetic fields. In: Gary E. Wnek, Gary L. Bowlin (eds.). *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. Vol. 1. 2nd ed. New York; London: Informa Healthcare, pp. 254–261. (In English)

Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Gerasimenko, M. S. et al. (2017) Oslablennoe magnitnoe pole Zemli: vliyaniye 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 visshej nervnoj deyatel'nosti — I. P. Pavlov Journal Of Higher Nervous Activity*, vol. 67, no. 2, pp. 246–256. DOI: 10.7868/S0044467717020101 (In Russian)

Pall, M. L. (2016) Microwave frequency electromagnetic fields (EMFs) produce widespread neuropsychiatric effects including depression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 75, pt B, pp. 43–51. PMID: 26300312. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.08.001 (In English)

Plokhinskij, N. A. (1970) *Biometriya [Biometrics]*. 2nd ed. Moscow: Moscow State University Publ., 367 p. (In Russian)

Schneider, J., Stangassinger, M. (2014) Nonthermal effects of lifelong high-frequency electromagnetic field exposure on social memory performance in rats. *Behavioral Neuroscience*, vol. 128, no. 5, pp. 633–637. PMID: 24999587. DOI: 10.1037/a0037299 (In English)

Spivak, I. M., Kuranova, M. L., Mavropulo-Stolyarenko, G. R. et al. (2016) Cell response to extremely weak static magnetic fields. *Biophysics*, vol. 61, no. 3, pp. 435–439. DOI: 10.1134/S0006350916030180 (In English)

Surma, S. V., Kuznecov, P. A., Hrustaleva, R. S. et al. (2012) *Ustrojstvo dlya issledovaniya vliyaniya elektromagnitnyh polej na biologicheskie ob'ekty [Device for the study of the influence of electromagnetic fields on biological objects]*. Patent RU2454675C2. Register date 27.06.2012. Granted by Rospatent. (In Russian)

Terzi, M., Ozberk, B., Deniz, O. G., Kaplan, S. (2016) The role of electromagnetic fields in neurological disorders. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 75, pt B, pp. 77–84. PMID: 27083321. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2016.04.003 (In English)

Vaido, A. I. (2000) *Fiziologo-geneticheskij analiz vozbudimosti nervnoj sistemy i povedeniya laboratornoj krysy [Physiological and genetic analysis of the excitability of the nervous system and the behavior of the laboratory rat]. PhD dissertation (Biology)*. Saint Petersburg, Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 197 p. (In Russian).

Vaido, A. I., Shiryaeva, N. V., Pavlova, M. B. et al. (2018) Selektirovannye linii krys s vysokim i nizkim porogom vozbudimosti: model' dlya izucheniya dezadaptivnykh sostoyanij zavisimyh ot urovnya vozbudimosti nervnoj sistemy [Selected rat strains HT, LT as a model for the study of dysadaptation states dependent on the level of excitability of the nervous system]. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovanij — Laboratory Animals for Science*, vol. 3, pp. 12–22. DOI: 10.29296/2618723X-2018-03-02 (In Russian)

Wang, C. X., Hilburn, I. A., Wu, D.-A. et al. (2019) Transduction of the geomagnetic field as evidenced from alpha-band activity in the human brain. *eNeuro*, vol. 6, no. 2, article e0483-18.2019. PMID: 31028046. DOI: 10.1523/eneuro.0483-18.2019 (In English)

Экспериментальные статьи

УДК 615.225

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-133-139

Анальгетический эффект кардиотонических стероидов на фоне алкогольной нейропатии у крыс

В. А. Кашкин[✉1, 2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8
[2] Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, 194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Сведения об авторе
Владимир Александрович Кашкин,
SPIN-код: 6184-0878,
Scopus Author ID: 6701337632,
ORCID: 0000-0002-7202-0233,
e-mail: kashkinv@gmail.com

Для цитирования: Кашкин, В. А. (2020) Анальгетический эффект кардиотонических стероидов на фоне алкогольной нейропатии у крыс. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 133–139. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-133-139

Получена 27 октября 2019;
прошла рецензирование 28 ноября 2019;
принята 29 ноября 2019.

Финансирование: Данное экспериментальное исследование выполнено в рамках Государственных заданий № АААА-А18-118070690064-0 ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова МЗ РФ и № АААА-А18-118012290373-7 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. П. Сеченова РАН.

Права: © Автор (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Целью данного исследования была оценка антиноцицептивного эффекта кардиотонических стероидов на фоне развития алкогольной нейропатии у грызунов. Патология была сформирована путем хронического и форсированного потребления алкоголя в нарастающей концентрации. Модель форсированного употребления высоких доз алкоголя в течение 8 недель позволила сформировать симптомокомплекс, который был характерен для алкогольной нейропатии. При имитации (моделировании) острого алкогольного абстинентного синдрома выяснено, что на второй день после отмены алкоголя происходило увеличение почечной экскреции маринобуфагенина, ингибитора альфа-1 изоформы Na/K-АТФазы, с параллельным увеличением порога тактильной аллодинии, что указывает на вовлеченность кардиотонических стероидов в процесс ноцицепции при алкогольной зависимости. Концентрация маринобуфагенина в моче была измерена иммуноферментным анализом. Также было продемонстрировано, что оуабаин, ингибитор альфа-3 изоформы Na/K-АТФазы, при системном введении статистически значимо увеличивал порог тактильной аллодинии, что указывает на выраженный обезболивающий эффект тестируемого стероида. Полученные данные свидетельствуют о том, что модуляция системы Na/K-АТФазы и ее эндогенных лигандов имеет терапевтический потенциал при развитии хронической боли на фоне алкогольной зависимости.

Ключевые слова: маринобуфагенин, оуабаин, алкогольная нейропатия, Na/K-АТФаза, крысы.

Analgesic effect of cardiotonic steroids in rats with alcoholic neuropathy

V. A. Kashkin[✉1, 2]

[1] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6–8 Lva Tolstogo Str., Saint Petersburg 197022, Russia
[2] Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Toreza Avenue, Saint Petersburg 194223, Russia

Author
Vladimir A. Kashkin,
SPIN: 6184-0878,
Scopus Author ID: 6701337632,
ORCID: 0000-0002-7202-0233,
e-mail: kashkinv@gmail.com

For citation: Kashkin, V. A. (2020) Analgesic effect of cardiotonic steroids in rats with alcoholic neuropathy. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 133–139. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-133-139

Received 27 October 2019; reviewed 28 November 2019; accepted 29 November 2019.

Funding: This research was carried out within the framework of State Assignment no. AAAA-A18-118070690064-0 Pavlov First Saint Petersburg State Medical University and State Assignment no. AAAA-A18-118012290373-7 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences.

Copyright: © The Author (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The present study aimed to assess the possible antinociceptive effect of cardiotonic steroids during the development of alcoholic neuropathy. The pathology was formed in rodents by means of forced alcohol consumption in increasing concentration. The force consumption of high doses of alcohol for 8 weeks allowed us to model a symptomatic complex typical for alcoholic neuropathy. During consequent modelling of the acute alcohol withdrawal syndrome, it was established that on the second day after the withdrawal there was an increase in the renal excretion of marinobufagenin, an alpha-1 isoform inhibitor of Na/K-ATPase, with a simultaneous increase in the threshold of tactile allodynia; that indicated the involvement of cardiotonic steroids in the process of nociception in alcohol dependence. The concentration of marinobufagenin in urine was measured by enzyme-linked immunoassay. It was also demonstrated that intraperitoneally administered ouabain, an alpha-3 isoform inhibitor of Na/K-ATPase, significantly increased the threshold of tactile allodynia, indicating a pronounced analgesic effect of the steroid. These data suggest that the system of Na/K-ATPase and its endogenous ligands has therapeutic potential against the development of chronic pain associated with alcohol dependence.

Keywords: marinobufagenin, alcoholic neuropathy, ouabain, Na/K-ATPase, rats.

Введение

Наиболее частым осложнением хронической алкогольной интоксикации является алкогольная нейропатия, которая характеризуется поражением периферического отдела нервной системы. Алкогольная нейропатия имеет симптомы, схожие с другими формами повреждения нервов: покалывание, онемение конечностей, озноб, нарушение координации и так далее. Все это может сопровождаться хроническими болями, типичными для периферической нейропатии.

Вероятно, причиной развития алкогольной нейропатии является прямой нейротоксический эффект этанола и его метаболитов (Claus et al. 1985; Koike et al. 2003; Monforte et al. 1995). Однако данные, полученные в последние годы, показали, что в развитии патологии могут иметь значение и другие факторы, индуцирующие нейродегенеративные процессы, такие как оксидативный стресс и инсулиновая резистентность (Bosch-Morell et al. 1998; Cohen et al. 2007; de la Monte et al. 2005; 2008; 2009; Mellion et al. 2013).

В настоящее время при данном виде нейропатии применяется симптоматическое лечение (анальгетики, антидепрессанты, антиконвульсанты), дающее лишь временное облегчение. В качестве дополнительной терапии могут использоваться препараты, восполняющие дефицит биологически активных веществ в организме: бенфотимамин, альфа-липоевая кислота, ацетил-L-карнитин, метилкобаламин (Chopra, Tiwari 2012).

Около 20 лет назад было высказано предположение, что кардиотонические стероиды могут быть вовлечены в развитие алкогольной зависимости (Bagrov et al. 1999). У крыс введение дигоксина приводило к уменьшению потребления алкоголя, тогда как иммунизация животных против дигоксина, оуабаина и маринобуфагенина (МБГ) заметно усиливала добровольное потребление этанола (Bagrov et al. 1999). У мышей введение МБГ предотвращало внутривенное самовведение этанола, тогда как иммунизация против МБГ облегчала поведение, связанное с поиском алкоголя (Kashkin et al. 2002). Кроме того, МБГ опосредует прессорный ответ при алкогольной абстиненции, который связан с ретенцией почечного натрия у крыс (Kashkin et al. 2008).

Целью данного исследования была оценка возможного антиноцицептивного эффекта у кардиотонического стероида оуабаина при системном введении на фоне развития алкогольной нейропатии.

Материалы и методы исследования

Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с рекомендациями «Руководства по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» (Belozertseva 2014).

Препараты

Этанол (d = 0,73) для потребления крысами разводили дистиллированной водой до необходимой концентрации (v/v). Оуабаин (Sigma-Aldrich, США) предварительно разводили в дистиллированной воде и вводили внутрибрюшинно в объеме 1 мл/кг.

Животные и условия их содержания

В экспериментах использовали самцов крыс стока Wistar массой 200–250 г (n = 24) (питомник «Рапполово», Россия). Животных содержали в стандартных условиях (фоторежим — 12 ч свет/12 ч темнота; температура воздуха — 20 ± 1 °C; влажность — 50 ± 20 %), при свободном доступе стандартному корму.

Моделирование патологии

Животные были подвергнуты процедуре форсированного потребления раствора этанола в нарастающих концентрациях на протяжении 8 недель. Еженедельно концентрацию этанола повышали в следующем порядке: 9 % (v/v), 15 % (v/v), 20 % (v/v), 25 % (v/v), 30 % (v/v). Далее до окончания моделирования патологии животные получали этанол в концентрации 30 % (v/v) (Кашкин et al. 2016). Доступ к корму не был ограничен, доступ к воде был ограничен. Для предотвращения дегидратации ежедневно на 2 часа животным предоставляли дополнительную поилку с питьевой водой. Контрольные животные (группа № 1) получали только питьевую воду, без ограничений.

Оценка развития болевого синдрома (тактильная аллодиния)

Процедуру тестирования проводили через 8 недель после начала моделирования патологии (на фоне потребления этанола), затем ежедневно в течение 7 дней острого абстинентного синдрома и на протяжении последующей 5-дневной терапии оуабаином, где тестирование проводили до введения оуабаина, через 60, 120 и 180 минут после введения.

Для оценки развития болевого синдрома измеряли тактильную аллодинию. Определение порога тактильной реактивности было проведено по методу Chaplan и соавторов (Chaplan et al. 1994) с помощью набора из 8 стандартных волосков фон Фрея (Touch Test®, North Coast Medical, Inc, Gilroy, CA). Жесткость филаментов, выражаемая как минимальное усилие, необходимое для сгибания волоска, возрастала логарифмически с абсолютными значениями от 0,692 г до 28,840 г. У каждой крысы порог вначале определяли на левой лапе, а затем на правой лапе. Кончиком волоска прикасались к середине плантарной поверхности лапы с усилием, необходимым для сгибания волоска, и удерживали волосок в таком положении 6–8 секунд. Положительный ответ регистрировали, если животное резко отдергивало лапу во время касания или если после удаления волоска следовало резкое сгибание лапы. Тестирование начинали с использования волоска, соответствующего усилию в 3,630 г. Затем стимулы (волоски) предъявляли в возрастающей или убывающей последовательности. В случае положительного ответа предъявляли волосок с меньшей жесткостью, и, наоборот, в случае негативного ответа предъявляли волосок с большей жесткостью. После первоначального определения порога чувствительности по тому же принципу предъявляли еще 4 волоска.

Среднеэффективный порог тактильной реактивности был рассчитан по методу, описанному Dixon (Dixon 1980) в модификации Chaplan с коллегами (Chaplan et al. 1994).

Измерение концентрации МБГ в моче

Образцы мочи за 24 ч были собраны при помощи метаболических клеток (Lab Products, Inc. Seaford, DE, USA). Концентрацию МБГ (пмоль/24 ч) в моче измеряли с использованием флуороиммунного анализа (*Dissosiation Enhanced Fluoro Immuno Assay* — DELFIA) при помощи мышиных моноклональных антител 4G4 (*mAb*) (Fedorova et al. 2002).

Статистический анализ данных

Обработку полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ *SAS* (SAS v.9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, США). Для анализа данных использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), в случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора последующие межгрупповые сравнения *(post hoc analysis)* были проведены с использованием критерия Даннетта. Данные по тактильной аллодинии представлены как площадь под кривой процента от 50 % порога отдергивания лапы (0–180 минут), которое было рассчитано с использованием трапецеидального правила. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

После 8 недель форсированного употребления алкоголя у экспериментальных животных этанол был заменен на питьевую воду. Крысы были посажены в метаболические клетки для взятия образцов суточной мочи. На протяжении всего абстинентного синдрома ежедневно у крыс оценивали пороги тактильной аллодинии. Проведение однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показало, что при развитии острого алкогольного абстинентного синдрома на 2-й день наблюдений у крыс происходило увеличение порога тактильной реактивности ($p < 0,05$, критерий Даннетта, рис. 1, правая панель), которое сопровождалось параллельным увеличением почечной экскреции МБГ ($p < 0,05$, критерий Даннетта, рис. 1, левая панель).

Это наблюдение позволило предположить, что блокада активности Na/K-АТФазы может влиять на выраженность болевого синдрома на фоне развития алкогольной нейропатии.

Через 7 дней абстиненции крысам был возвращен алкоголь в соответствующей концентрации (30 %). После стабилизации потребления алкоголя крысам вводили внутрибрюшинно оуабаин — ингибитор альфа-3 изоформы Na/K-АТФазы в течение 5 дней в дозах 0,1;

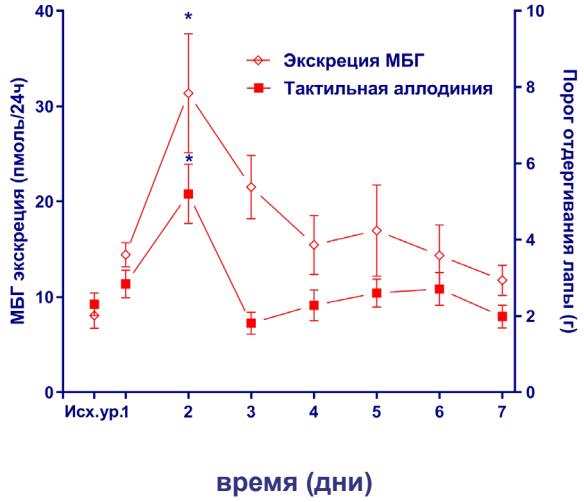

Рис. 1. Развитие аллодинии и экскреция маринобуфагенина (МБГ) на фоне отмены этанола у крыс.
Развитие аллодинии после отмены этанола оценивали с помощью калиброванных микрофиламентов фон Фрея.
Данные представлены в виде средних значений порога отдергивания задних лап (M±SEM, левая ось ординаты).
Измерения проводились ежедневно. n = 18.
Точка «исх. ур.» — значения порогов, измеренные в последний день перед отменой этанола.
Экскреция МБГ оценивалась в суточной моче крыс с помощью иммуноферментного анализа.
Данные представлены в виде средних значений концентрации МБГ в моче на сутки (M±SEM, правая ось ординаты). n = 6.
* — $p < 0,05$, статистически значимое отличие от показателя в исходном уровне (критерий Даннетта)

Fig. 1. Development of tactile allodynia and renal excretion of marinobufagenin during alcohol withdrawal in rats.
The development of tactile allodynia during alcohol withdrawal was assessed with the help of graded microfilaments. The data are presented in mean values of the threshold for hind legs movement (M ± SEM, left vertical axis).
Assessment was carried out daily. n = 18.
The point of "initial level" — threshold values, measured the day before alcohol withdrawal.
Renal excretion of marinobufagenin was measured by means of immunoenzymometric analysis.
The data are presented in mean values of marinobufagenin concentration in the urine during a 24-hour period (M ± SEM, right vertical axis). n = 6.
* — difference is significant at $p < 0.05$ (Dunnett's criterion)

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-133-139

0,33 и 0,56 мг/кг, или дистиллированную воду (контрольная группа). Параллельно у крыс оценивали тактильную реактивность до введения, через 60 и 120 минут после введения вещества или же его растворителя ежедневно. Было показано, что вызванное оуабаином увеличение порогов тактильной аллодинии носило выраженный, статистически значимый и дозозависимый характер ($p < 0,05$, критерий Даннетта, рис. 2). Однако длительность действия препарата была ограничена 60 минутами после его внутрибрюшинного введения. Максимальный эффект отмечался в дозе 0,33 мг/кг на протяжении всего периода введения.

В проведенном исследовании было продемонстрировано, что острый алкогольный абстинентный синдром характеризуется увеличением экскреции МБГ с параллельным увеличением порога тактильной аллодинии, который был снижен на фоне хронического употребления этанола. Также было показано, что системное введение оуабаина сопровождается увеличением порога тактильной аллодинии. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что блокада активности Na/K-АТФазы на фоне алкогольной нейропатии приводит к обезболивающему эффекту.

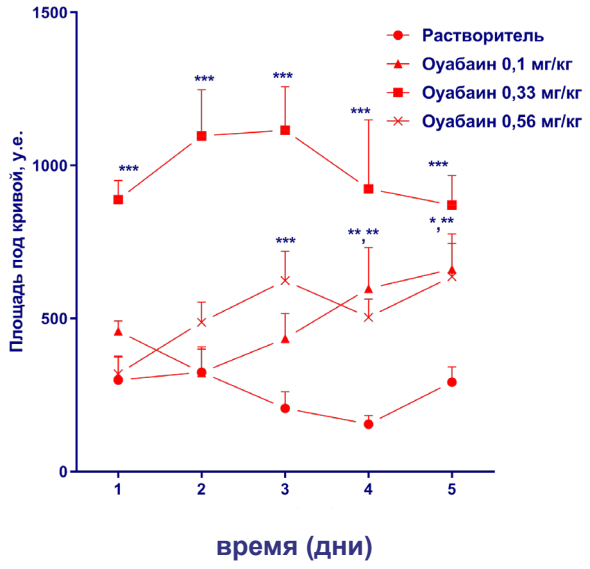

Рис. 2. Влияние оуабаина на тактильную аллодинию у крыс.
На протяжении 5 дней животным вводили оуабаин (0,1; 0,33 или 0,56 мг/кг) или его растворитель внутрибрюшинно. Тактильную аллодинию оценивали до введения, через 60 и 120 минут после введения вещества или же его растворителя. Данные представлены как площадь под кривой процента от максимально возможного эффекта (%MPE), рассчитанная с использованием трапецеидального правила. n = 6, в каждой группе.

Примечания: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — статистически значимые отличия от контрольной группы в соответствующий день теста (тест Даннетта)

Fig. 2. Thresholds of tactile allodynia after administration of ouabain in rats.
Over the period of 5 days ouabain (0.1; 0.33 or 0.56 mg/kg) or its solvent was intraperitoneally administered to the test animals. Tactile allodynia was assessed before, and 60 and 120 minutes after the administration of ouabain or its solvent. The data are presented as the area under the curve of the percentage of maximum possible effect (%MPE), calculated with the application of the trapezoidal rule. n = 6, in each group

Notes: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$ — significant differences from the control group on a corresponding day (Dunnett's test)

Обсуждение

Полученные результаты согласуются с литературными данными, где был показан антиноцицептиный эффект оуабаина в сочетании с лидокаином и морфином (Zeng et al. 1999), с клонидином (Zeng et al. 2007), а также при интратекальном введении оуабаина (Ou-Yang et al. 2008).

Анальгетический эффект оуабаина на модели нейропатической боли, вызванной хроническим употреблением алкоголя, вероятно, можно объяснить следующим. Установлено, что, помимо «классического» влияния на ионообменную функцию Na/K-АТФазы, оуабаин может модулировать трансдукторную функцию фермента. Являясь видоспецифичным и дозозависимым блокатором альфа-3 изоформы Na/K-АТФазы у крыс (O'Brien et al. 1994), оуабаин, при внутрибрюшинном введении в сопоставимых дозах, оказывал антиноцицептивное действие на модели формалинового теста у крыс (Lopatina et al. 2012). В проведенном исследовании было доказано, что обезболивающий эффект оуабаина реализуется через сигнальную функцию Na/K-АТФазы, которая связана с активностью натриевых каналов $Na_{v1.8}$ в периферических отделах и на спинальной уровне ноцицептивной системы (Krylov et al. 2000; Lopatina et al. 2012).

Таким образом, модуляция активности Na/K-АТФазы может оказывать терапевтический эффект в отношении хронического болевого синдрома при алкогольной нейропатии.

References

Bagrov, Y. Y., Dmitrieva, N. I., Manusova, N. B. et al. (1999) Involvement of endogenous digitalis-like factors in voluntary selection of alcohol by rats. *Life Sciences*, vol. 64, no. 20, pp. PL219–PL225. DOI: 10.1016/s0024-3205(99)00131-9 (In English)

Belozertseva, I. V. (comp.). (2014) *Rukovodstvo po ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh dlya nauchnykh i uchebnykh tselei v PSPbGMU im. I. P. Pavlova [Handbook on use of laboratory animals for scientific and educational purposes in First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg]*. 2nd ed. Saint Petersburg: First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg Publ., 79 p. (In Russian)

Bosch-Morell, F., Martínez-Soriano, F., Colell, A. et al. (1998) Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves. Effect of S-adenosyl-L-methionine and N-acetyl-L-cysteine. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 25, no. 3, pp. 365–368. PMID: 9680183. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00036-7 (In English)

Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W. et al. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 53, no. 1, pp. 55–63. PMID: 7990513. DOI: 10.1016/0165-0270(94)90144-9 (In English)

Chopra, K., Tiwari, V. (2012) Alcoholic neuropathy: Possible mechanisms and future treatment possibilities. *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 73, no. 3, pp. 348–362. PMID: 21988193. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04111.x (In English)

Claus, D., Eggers, R., Engelhardt, A. et al. (1985) Ethanol and polyneuropathy. *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 72, no. 3, pp. 312–316. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1985.tb00876.x (In English)

Cohen, A. C., Tong, M., Wands, J. R., de la Monte, S. M. (2007) Insulin and insulin-like growth factor resistance with neurodegeneration in an adult chronic ethanol exposure model. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 31, no. 9, pp. 1558–1573. PMID: 17645580. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00450.x (In English)

de la Monte, S. M., Longato, L., Tong, M. et al. (2009) The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: Role of toxic lipids. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 6, no. 7, pp. 2055–2075. PMID: 19742171. DOI: 10.3390/ijerph6072055 (In English)

de la Monte, S. M., Xu, X. J., Wands, J. R. (2005) Ethanol inhibits insulin expression and actions in the developing brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 10, pp. 1131–1145. PMID: 15870954. DOI: 10.1007/s00018-005-4571-z (In English)

de la Monte, S. M., Yeon, J. E., Tong, M. et al. (2008) Insulin resistance in experimental alcohol-induced liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 23, no. 8, pt 2, pp. e477–e486. PMID: 18505416. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05339.x (In English)

Dixon, W. J. (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 20, pp. 441–462. PMID: 7387124. DOI: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301 (In English)

Fedorova, O. V., Talan, M. I., Agalakova, N. I. et al. (2002) Endogenous ligand of α_1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride-dependent hypertension. *Circulation*, vol. 105, no. 9, pp. 1122–1127. PMID: 11877366. DOI: 10.1161/hc0902.104710 (In English)

Kashkin, V. A., Bagrov, A. Y., Fedorova, O. V. et al. (2002) Marinobufagenin (MBG) suppression of ethanol-seeking behavior is associated with inhibition of brain cortex Na/K-ATPase in mice. *European Neuropsychopharmacoly*, vol. 12, no. 3, pp. 217–223. DOI: 10.1016/S0924-977X(02)00026-3 (In English)

Kashkin, V. A., Shekunova, E. V., Muzhikyan, A. A. et al. (2016) Model' alkogol'noj nejropatii u krys [Experimental models of alcoholic neuropathy in rats]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya — Experimental and Clinical Pharmacology*, vol. 79, no. 12, pp. 29–33. (In Russian).

Kashkin, V. A., Zvartau, E. E., Fedorova, O. V. et al (2008) Endogenous bufadienolide mediates pressor response to ethanol withdrawal in rats. *European Neuropsychopharmacoly*, vol. 18, no. 1, pp. 74–77. PMID: 17683916. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2007.05.006 (In English)

Koike, H., Iijima, M., Sugiura, M. et al. (2003) Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy. *Annals of Neurology*, vol. 54, no. 1, pp. 19–29. PMID: 12838517. DOI: 10.1002/ana.10550 (In English)

Krylov, B. V., Derbenev, A. V., Podzorova, S. A. et al. (2000). Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 30, pp. 431–439. DOI: 10.1007/bf02463098 (In English)

Lopatina, E. V., Yachnev, I. L., Penniyaynen, V. A. et al. (2012) Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na^+,K^+-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. *Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 33–39. PMID: 22420548. DOI: 10.2174/157340612799278531 (In English)

Mellion, M. L., Nguyen, V., Tong, M. et al. (2013) Experimental model of alcohol-related peripheral neuropathy. *Muscle & Nerve*, vol. 48, no. 2, pp. 204–211. PMID: 23761140. DOI: 10.1002/mus.23744 (In English)

Monforte, R., Estruch, R., Valls-Solé, J. et al. (1995) Autonomic and peripheral neuropathies in patients with chronic alcoholism. A dose-related toxic effect of alcohol. *Archives of Neurology*, vol. 52, no. 1, pp. 45–51. PMID: 7826275. DOI: 10.1001/archneur.1995.00540250049012 (In English)

O'Brien, W. J., Lingrel, J. B., Wallick, E. T. (1994) Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 310, no. 1, pp. 32–39. PMID: 8161218. DOI: 10.1006/abbi.1994.1136 (In English)

Ou-Yang, H. D., Zeng, W. A., Li, Q. et al. (2008) Effects of intrathecal ouabain and tizanidine injection for treatment of neuropathic pain in rats. *Nan fang yi ke da xue xue bao — Journal of Southern Medical University*, vol. 28, no. 10, pp. 1760–1763. PMID: 18971165. (In Chinese)

Persson, A. K., Kim, I., Zhao, P. et al. (2013a) Sodium channels contribute to degeneration of dorsal root ganglion neurites induced by mitochondrial dysfunction in an in vitro model of axonal injury. *The Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 49, pp. 19250–19261. PMID: 24305821. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2148-13.2013 (In English)

Persson, A. K., Liu, S., Faber, C. G. et al. (2013b) Neuropathy-associated $Na_v1.7$ variant I228M impairs integrity of dorsal root ganglion neuron axons. *Annals of Neurology*, vol. 73, no. 1, pp. 140–145. PMID: 23280954. DOI: 10.1002/ana.23725 (In English)

Zeng, W., Chen, X., Dohi, S. (2007) Antinociceptive synergistic interaction between clonidine and ouabain on thermal nociceptive tests in the rat. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, vol. 8, no. 12, pp. 983–988. PMID: 17892975. DOI: 10.1016/j.jpain.2007.07.006 (In English)

Zeng, W., Dohi, S., Shimonaka, H., Asano, T. (1999) Spinal antinociceptive action of Na^+–K^+ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats. *Anesthesiology*, vol. 90, no. 2, pp. 500–508. PMID: 9952158. DOI: 10.1097/00000542-199902000-00026 (In English)

Краткие сообщения

УДК 577.25

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-140-143

Роль меланокортиновой системы в регуляции стрессорного ответа

И. В. Романова[✉1], А. Л. Михрина[1], Е. В. Михайлова[1]

[1] Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, 194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Сведения об авторах
Ирина Владимировна Романова,
SPIN-код: 8891-8186,
Scopus AuthorID: 57198317559,
ORCID: 0000-0002-0348-0631,
e-mail: irinaromanova@mail.ru

Анастасия Леонидовна Михрина,
SPIN-код: 8506-5968,
Scopus AuthorID: 55544239900,
e-mail: nastya_mihrina@mail.ru

Елена Викторовна Михайлова,
SPIN-код: 5759-4849,
Scopus AuthorID: 57201469297,
e-mail: drakia87@gmail.com

Для цитирования:
Романова, И. В., Михрина, А. Л., Михайлова, Е. В. (2020) Роль меланокортиновой системы в регуляции стрессорного ответа. *Интегративная физиология*, т. 1, № 2, с. 140–143.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-140-143

Получена 10 июля 2019;
прошла рецензирование 27 августа 2019;
принята 4 сентября 2019.

Финансирование: Работа поддержана Государственным заданием ФАНО (№ АААА-А18-118012290427-7).

Права: © Авторы (2020). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. В организме млекопитающих и других позвоночных действие меланокортиновых пептидов реализуется через пять типов меланокортиновых рецепторов (МКР), которые связаны с G-белок-зависимыми механизмами и активацией цАМФ в клетках. В мозге показана экспрессия двух типов рецепторов МКР3 и МКР4, функциональная активность которых контролируется AgRp (agouti gene related peptide) — эндогенным антагонистом этих типов рецепторов, который образуется в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса. Экспрессия МКР3 и МКР4 показана в различных нейронах мозга, в частности, в дофаминергических, норадренергических и серотонинергических нейронах, что свидетельствует о морфофункциональной взаимосвязи меланокортиновой и моноаминергических систем мозга. В статье обсуждается дозозависимый тормозный характер влияния активных фрагментов AgRp (83-132 и 25-51) на функциональную активность моноаминергических нейронов мозга и, соответственно, биосинтез моноаминов, который реализуется через G-белок-зависимые и G-белок-независимые внутриклеточные механизмы. Тормозные влияния активных фрагментов AgRp на биосинтез моноаминов могут рассматриваться как защитный механизм, который при продолжительном стрессорном воздействии активируется кортикостероидами и направлен на снижение активности моноаминергических нейронов и, по-видимому, других нейронов мозга, которые экспрессируют МКР.

Ключевые слова: мозг, меланокортиновые рецепторы 3 и 4, AgRp, дофамин, норадреналин, серотонин, стресс.

The role of the melanocortin system in the regulation of the stress response

I. V. Romanova✉[1], A. L. Mikhrina[1], E. V. Mikhailova[1]

[1] Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Toreza Avenue, Saint Petersburg 194223, Russia

Authors
Irina V. Romanova,
SPIN: 8891-8186,
Scopus AuthorID: 57198317559,
ORCID: 0000-0002-0348-0631,
e-mail: irinaromanova@mail.ru

Anastasiia L. Mikhrina,
SPIN: 8506-5968,
Scopus AuthorID: 55544239900,
e-mail: nastya_mihrina@mail.ru

Elena V. Mikhailova,
SPIN: 5759-4849,
Scopus AuthorID: 57201469297,
e-mail: drakia87@gmail.com

For citation: Romanova, I. V., Mikhrina, A. L., Mikhailova, E. V. (2020) The role of the melanocortin system in the regulation of the stress response. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 140–143. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-140-143

Received 10 July 2019;
reviewed 27 August 2019;
accepted 4 September 2019.

Funding: This research was supported by the State Assignment of the Federal Agency for Scientific Organisations (no. AAAA-A18-118012290427-7).

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. In mammals and other vertebrates the effect of melanocortin peptides is promoted by five types of melanocortin receptors (MCR), connected with G-protein-dependent mechanisms and the activation of cAMP in the cells. The brain exhibits the expression of two types of receptors MCR3 and MCR4, the functional activity of which is controlled by AgRp (agouti gene related peptide), the endogenous antagonist of these types of receptors. The expression of AgRp was indicated in the neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus. The expression of MCR3 and MCR4 was shown in different brain neurons, in particular in dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. These data indicate the morphofunctional interrelation of the melanocortin and the monoaminergic systems of the brain. The current paper discusses the dose-dependent inhibitory effect of the active fragments of AgRp (83-132 and 25-51) on the functional activity of monoaminergic neurons in the brain, and, correspondingly, the biosynthesis of monoamines, which is realized via G-protein-dependent and G-protein-independent intracellular mechanisms. The inhibitory effects of AgRp active fragments on the biosynthesis of monoamines can be considered as a protective mechanism, which is activated by corticosteroids in times of prolonged stress in order to reduce the activity of monoaminergic neurons and, apparently, other brain neurons that express MCR.

Keywords: brain, melanocortin receptors 3 and 4, AgRp, dopamine, norepinephrine, serotonin, stress.

Изучение морфофункциональных взаимодействий меланокортиновой и моноаминергических систем мозга

Проопиомеланокортин (ПОМК) является молекулой, из которой образуются меланокортиновые пептиды: адренокортикотропный (АКТГ) и меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ: α-, β- и γ-МСГ). Действие всех этих пептидов осуществляется через 5 типов G-белок-зависимых меланокортиновых рецепторов (МКР) и связано с активацией цАМФ-опосредованных путей внутриклеточной сигнализации (Cone 2005). Хорошо известно, что ПОМК и его продукты образуются в клетках аденогипофиза, выведение АКТГ из которых в общий кровоток обеспечивает стимулирующее действие клеток коры надпочечников и синтез кортикостероидов. Экспрессия ПОМК показана и в мозге, в частности в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (АРК) и ядра одиночного тракта (NTS — nucleus tractus solitaries), проекции которых выявлены в различных областях мозга, в том числе в областях локализации моноаминергических нейронов (Bagnol et al. 1999). В литературе установилось мнение о том, что в мозге осуществляется экспрессия МКР3 и МКР4, что связано с тем, что в нейронах АРК также экспрессируется агути-связанный белок (AgRp — agouti-gene related peptide), который является

эндогенным антагонистом МКР3/МКР4. Структура AgRp такова, что из общей промолекулы образуется три фрагмента (25-51, 52-82 и 83-132), однако блокирующим действием на МКР3 и МКР4 обладает только фрагмент 83-132. Какова функциональная роль фрагментов 25-51 и 52-82, действие которых не связано с G-белок-зависимыми механизмами, не было известно (Pitchard, White 2005). Цель настоящего сообщения — обобщение данных об участии различных компонентов меланокортиновой системы в регуляции моноаминергических нейронов мозга, в частности при стрессе, когда на фоне увеличения уровня кортикостероидов в крови наблюдается активация экспрессии AgRp в АРК (Savontaus, Conwell, Wardlaw 2002).

С помощью двойного иммуномечения и конфокальной микроскопии у крысы и мыши экспрессия МКР3 и МКР4 выявлена в дофаминергических нейронах среднего мозга (Михрина и др. 2018) и серотонинергических нейронах raphe nucleus (Романова, Михайлова, Шпаков 2018). В норадренергических нейронах голубого пятна (LC — locus coeruleus) были выявлены только МКР3 (Romanova, Mikhrina, Saveleva 2018). В экспериментах *in vitro* на переживающих срезах мозга (Mikhrina, Romanova 2015) и *in vivo* (стереотаксическое введение пептидов в средний мозг и в locus coeruleus) был выявлен тормозный эффект активных фрагментов AgRp (25-51 и 83-132) на активность тирозингидроксилазы — фермента биосинтеза дофамина и норадреналина (Romanova, Mikhrina, Saveleva 2018). При этом с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии выявлено дозозависимое уменьшение уровня дофамина и норадреналина в стриатуме.

Ранее было показано, что крысы, отличающиеся по стратегии поведения в «открытом поле», различаются по уровню кортикостероидов в крови: более высокий уровень у пассивных и более низкий — у активных (Жуков 1997). Установлено, что крысы, разделенные в тесте «открытое поле» по показателям двигательной активности на «активных» и «пассивных», отличаются по уровню AgRp, который отрицательно коррелировал с уровнем активности тирозингидроксилазы. Выявлен повышенный уровень AgRp у «пассивных» крыс, которому соответствовал более низкий уровень тирозингидроксилазы по сравнению с таковым у «активных» крыс. После 30 минут иммобилизации крыс на спине не выявлено изменения уровня AgRp, однако активность тирозингидроксилазы в среднем мозге достоверно возрастала у «активных» и у «пассивных» крыс (Михрина и др. 2018). После шестичасовой депривации сна у крыс при увеличении экспрессии AgRp в гипоталамусе выявлено достоверное уменьшение уровня тирозингидроксилазы в гипоталамусе и стриатуме, а также и достоверное уменьшение уровня дофамина (Romanova, Mikhrina 2013).

Заключение

Представленные результаты демонстрируют морфофункциональные взаимосвязи между меланокортиновой и моноаминергическими системами мозга, а также дозозависимый тормозный характер влияния активных фрагментов эндогенного антагониста МКР (AgRp 25-51 и 83-132) на дофамин- и норадренергические нейроны мозга, в которых задействованы различные пути внутриклеточной сигнализации. Снижение функциональной активности моноаминергических нейронов мозга при длительном стрессорном воздействии можно рассматривать как защитный механизм, направленный на снижение контролируемых ими функций в условиях продолжительного стресса.

Литература

Жуков, Д. А. (1997) *Психогенетика стресса. Поведенческие и эндокринные корреляты генетических детерминант стресс-реактивности при неконтролируемой ситуации.* СПб.: Инженерный замок, 176 с.

Михрина, А. Л., Савельева, Л. О., Алексеева, О. С., Романова, И. В. (2018) Влияние активных фрагментов AgRP 83-132 и 25-51 на биосинтез дофамина в мозге. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 104, № 12, с. 1456–1466. DOI: 10.7868/S0869813918120067

Михрина, А. Л., Чернышев, М. В., Михайлова, Е. В. и др. (2018) Участие агутиподобного пептида в регуляции двигательной активности. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 104, № 7, с. 769–779.

Романова, И. В., Михайлова, Е. В., Шпаков, А. О. (2018) Локализация меланокортиновых и лептиновых рецепторов на серотонинергических нейронах вентральной области покрышки и дорсального ядра шва мозга крыс. *Морфология*, т. 153, № 3, с. 233.

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-140-143

Bagnol, D., Lu, X. Y., Kaelin, C. B. et al. (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: Relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of Neuroscience*, vol. 19, pp. 1–7. PMID: 10479719. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-j0004.1999

Cone, R. D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, vol. 8, no. 5, pp. 571–578. PMID: 15856065. DOI: 10.1038/nn1455

Mikhrina, A. L., Romanova, I. V. (2015) The role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 45, no. 5, pp. 536–541. DOI: 10.1007/s11055-015-0107-7

Pritchard, L. E., White, A. (2005) Agouti-related protein: More than a melanocortin-4 receptor antagonist? *Peptides*, vol. 26, no. 10, pp. 1759–1770. PMID: 15996791. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.11.036

Romanova, I. V., Mikhrina, A. L. (2013) Participation of agouti-related peptide in the regulation of the wakefulness-sleep cycle. *Human Physiology*, vol. 39, no. 6, pp. 584–589. DOI: 10.1134/S0362119713060108

Romanova, I. V., Mikhrina, A. L., Savelieva, L. O. (2018) Effect of AGRP 25-51 on dopamine- and norepinephrinergic brain neurons. *Neurochemical Journal*, vol. 12, no. 4, S77, p. 78.

Savontaus, E., Conwell, I. M., Wardlaw, S. L. (2002) Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Research*, vol. 958, no 1, pp. 130–138. PMID: 12468037. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)03674-0

References

Bagnol, D., Lu, X. Y., Kaelin, C. B. et al. (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: Relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *Journal of Neurosciences*, vol. 19, pp. 1–7. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-j0004.1999 (In English)

Cone, R. D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience,* vol. 8, no. 5, pp. 571–578. PMID: 15856065. DOI: 10.1038/nn1455 (In English)

Mikhrina, A. L., Chernyshev, M. V., Mikhailova, E. V. et al. (2018) Uchastie agutipodobnogo peptida v regulyatsii dvigatel'noj aktivnosti [Participation of AGRP in regulation of locomotion activity]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 104, no. 7, pp. 769–779. (In Russian)

Mikhrina, A. L., Romanova, I. V. (2015) The role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 45, no. 5, pp. 536–541. DOI: 10.1007/s11055-015-0107-7 (In English)

Mikhrina, A. L., Saveleva, L. O., Alekseeva, O. S., Romanova, I. V. (2018) Vliyanie aktivnykh fragmentov AgRP 83-132 i 25-51 na biosintez dofamina v mozge [Effect of active fragments of AgRP 83-132 and 25-51 on dopamine biosynthesis in the brain]. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 104, no. 12, pp. 1456–1466. DOI: 10.7868/S0869813918120067 (In Russian)

Pritchard, L. E., White, A. (2005) Agouti-related protein: More than a melanocortin-4 receptor antagonist? *Peptides*, vol. 26, no. 10, pp. 1759–1770. PMID: 15996791. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.11.036 (In English)

Romanova, I. V., Mikhailova, Ye. V., Shpakov, A. O. (2018) The localization of the melanocortin and the leptin receptors on the serotoninergic neurons of the ventral tegmental area and the dorsal raphe nuclei of rat brain. *Morfologiya — Morphology*, vol. 153, no. 3, p. 233. (In Russian)

Romanova, I. V., Mikhrina, A. L. (2013) Participation of agouti-related peptide in the regulation of the wakefulness-sleep cycle. *Human Physiology*, vol. 39, no. 6, pp. 584–589. DOI: 10.1134/S0362119713060108 (In Russian)

Romanova, I. V., Mikhrina, A. L., Savelieva, L. O. (2018) Effect of AGRP 25-51 on dopamine- and norepinephrinergic brain neurons. *Neurochemical Journal*, vol. 12, no. 4, S77, p. 78. (In English)

Savontaus, E., Conwell, I. M., Wardlaw, S. L. (2002) Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Research*, vol. 958, no. 1, pp. 130–138. PMID: 12468037. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)03674-0 (In English)

Zhukov, D. A. (1997) *Psikhogenetika stressa. Povedencheskie i endokrinnye korrelyaty geneticheskikh determinant stress-reaktivnosti pri nekontroliruemoj situatsii [Behavioural genetics of stress. Behavioral and endocrine correlates of genetic determinants of stress reactivity in uncontrollable situation]*. Saint Petersburg: Inzhenernyj zamok Publ., 176 p. (In Russian)

Краткие сообщения

UDC 611.81+577.218 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-144-146

Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump

U. S. Drozd[✉1, 2], D. A. Lanshakov[2]

[1] Novosibirsk State University, 1 Pirogova Str., Novosibirsk 630090, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentjeva Avenue, Novosibirsk 630090, Russia

Authors
Uliana S. Drozd,
SPIN: 8218-9497,
Scopus AuthorID: 57193563578,
ORCID: 0000-0002-8539-1463,
e-mail: drozdnsu@gmail.com

Dmitriy A. Lanshakov,
SPIN: 7041-4461,
Scopus AuthorID: 34872521600,
ORCID: 0000-0002-8482-1302

For citation: Drozd, U. S., Lanshakov, D. A. (2020) Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 144–146. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-144-146

Received 12 July 2019; reviewed 21 July 2019; accepted 8 August 2019.

Funding: The research is supported by Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-315-00114).

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. Depression is the most frequently diagnosed psychiatric disease in Western countries. Although a variety of pharmacological treatments for this disorder are available, a significant proportion of patients is treatment-resistant and/or suffer from side effects. There is a growing need for a complex understanding of the underlying pathogenic mechanisms in the neural circuits and effort for developing novel therapies for the depression. The role of serotonin in depression and antidepressant treatment remains unclear despite decades of research. New optogenetic tools for manipulation of neuronal activity have enabled the investigation of the contribution of distinct neural circuit elements to the pathogenesis of depression. In this study, we used the specific lentiviral vectors for the inhibition of serotonergic neurons. The proton pump archaerhodopsin-3 (eArchT3.0) has been expressed in the serotonergic neurons under the control of tryptophan hydroxylase 2 promotor. Green light stimulation of eArchT3.0 expressing neurons led to a reduced percentage of c-Fos expressing cells among those neurons, which indicates a decrease in their activity.

Keywords: serotonin, viral transfection, optogenetics, archaerhodopsin, raphe.

Introduction & aim

Serotonergic neurons are involved in the pathogenesis and the pharmacotherapy of major depression and anxiety disorders (Post et al. 2018). Yet, the precise mechanisms behind their involvement have not been determined. Moreover, available treatments (including selective serotonin reuptake inhibitors) seem to be effective in the treatment of depression, but more than two-thirds of depressed patients remain symptomatic after the initial intervention, and 20% of these fail to respond to any intervention (Gaynes 2009).

The recent development of optogenetic tools has made it possible to design new methods of treating mental disorders. Optogenetics has been widely used to control neuronal activity with high spatial and temporal resolution. There are many opsins that are used in optogenetics to excite or inhibit neuronal activity (Muir, Bagot 2019).

The outward proton pump enhanced ArchT3.0 (eArchT3.0) allows for efficient optogenetic silencing (Krol et al. 2019). This research was aimed at creating lentiviral vectors for the optogenetic inhibition of the serotonergic neurons using the proton pump archaerhodopsin-3.

Methods

To attenuate firing specifically in serotonergic neurons, vectors expressing the proton pump archaerhodopsin-3 under the control of TPH2 promoter were used. Viral vectors were constructed based on plasmids designed by the N. Nishitani group (Nishitani et al. 2019). Lentiviral particles (LVV) were obtained by transfecting HEK293 cells with the mixture of plasmids for the virus assembly (pPAX2 and pMD2.G), as well as a TPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE plasmid carrying the sequence of the archaerhodopsin-3 (eArchT3.0) and a yellow fluorescent protein (eYFP) or TPH2-Venus-WPRE plasmid that was used as a control. Wistar rats were stereotaxically injected with the virus in the dorsal raphe nucleus (DRN). One week after infection, animals were deeply anesthetized and green light (560 nm) was applied to the DRN for 3 min. Then animals were perfused, the brain was collected, frozen and sectioned. Expression of eArchT3.0-eYFP and c-Fos in the TPH-positive neurons was investigated immunohistochemically using confocal microscopy. The number of c-Fos, YFP, and TPH2 expressing neurons was determined. The expression of c-Fos was used as a marker of the neuron's activity.

Results

One week after the LVV injection, the specific expression of eArchT3.0-eYFP in serotonergic neurons was confirmed by immunohistochemistry. The majority of the TPH2 immunoreactive cells expressed eArchT3.0-eYFP that was detectable without immunohistochemical enhancement (fig. 1). Green light illumination for 3 min via optic fiber placed above the DRN decreased c-Fos expression in eYFP- or Venus-positive cells in TPH2-eArchT3.0 injected rats, compared with the TPH2-Venus injected rats (fig. 2). These observations demonstrated that continuous green light illumination for 3 min inhibited the activity of serotonergic neurons.

Conclusion

Our experiment demonstrated that the injection of TPH2-eArchT vectors in the DRN evokes the expression of the proton pump archaerhodopsin-3.

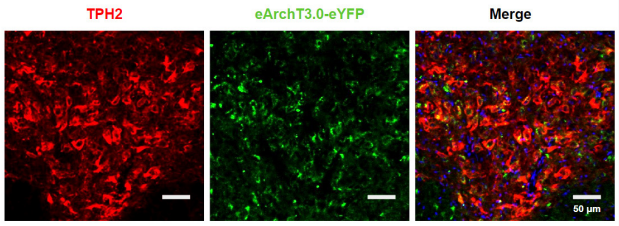

Fig. 1. The expression of eArchT3.0-eYFP in the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) immunopositive cells of the dorsal raphe nucleus, one week after the virus injection

We used c-Fos expression as a marker of neuronal activity to confirm whether green light illumination could inhibit the activity of the transfected serotonergic neurons. C-fos transcription can be induced by growth factors, cAMP signaling, and membrane depolarization (Flavell, Greenberg 2008). Synaptic activity regulates gene transcription by activating protein kinases associated with plasma membrane and then intracellular calcium-dependent signaling cascades that modify the function and/or expression of activity-dependent DNA-binding transcription factors such as c-Fos (Greer, Greenberg 2008). Green light illumination of eArchT3.0 induces outward current and suppressed action potential generation that leads to a decreased number of c-Fox expressing serotonergic neurons. Neuron membrane hyperpolarization state due to eArchT3.0 function could lead to a decrease in membrane protein kinase activity and, as a result, to a decrease in c-Fos expression.

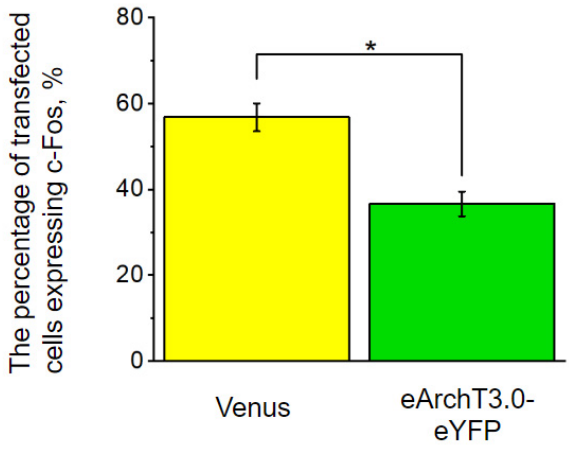

Fig. 2. Effects of optogenetic stimulation of the transfected serotonergic neurons on c-Fos expression. * $p < 0.001$ vs Venus

References

Flavell, S. W., Greenberg, M. E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 31, pp. 563–590. PMID: 18558867. DOI: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631 (In English)

Gaynes, B. N. (2009) Identifying difficult-to-treat depression: Differential diagnosis, subtypes, and comorbidities. *The Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 70, suppl. 6, pp. 10–15. PMID: 19922739. DOI: 10.4088/JCP.8133su1c.02 (In English)

Greer, P. L., Greenberg, M. E. (2008) From synapse to nucleus: Calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, vol. 59, no. 6, pp. 846–860. PMID: 18817726. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.09.002 (In English)

Krol, A., Lopez Huerta, V. G., Corey, T. E. C. et al. (2019) Two eARCHT3.0 lines for optogenetic silencing of dopaminergic and serotonergic neurons. *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 13, article 4. PMID: 30774584. DOI: 10.3389/fncir.2019.00004 (In English)

Muir, J., Bagot, R. C. (2019) Optogenetics: Illuminating the neural circuits of depression. In: J. Quevedo, A. F. Carvalho, C. A. Zarate (eds.). *Neurobiology of depression: Road to novel therapeutics*. S. p.: Academic Press, pp. 147–157. DOI: 10.1016/B978-0-12-813333-0.00014-7 (In English)

Nishitani, N., Nagayasu, K., Asaoka, N. et al. (2019) Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*, vol. 44, no. 4, pp. 721–732. PMID: 30377380. DOI: 10.1038/s41386-018-0254-y (In English)

Post, R. J., Warden, M. R. (2018) Melancholy, anhedonia, apathy: The search for separable behaviors and neural circuits in depression. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 49, pp. 192–200. PMID: 29529482. DOI: 10.1016/j.conb.2018.02.018 (In English)

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-144-146

Краткие сообщения

UDC 612.82

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-147-150

Insight and stress

K. Yu. Shelepin✉[1]

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

Author
Konstantin Yu. Shelepin,
SPIN: 4250-4127,
Scopus AuthorID: 57148212900,
ORCID: 0000-0003-2218-9716,
e-mail: shelepink@yandex.ru

For citation: Shelepin, K. Yu. (2020) Insight and stress. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 147–150.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-147-150

Received 11 July 2019;
reviewed 29 July 2019;
accepted 4 September 2019.

Copyright: © The Author (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia and Pavlov Institute of Physiology RAS. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. The development of neurotechnology in recent years and the creation of self-contained artificial systems that provide purposeful activity and decision-making under stress has substantiated the necessity to develop neurophysiological research of insight (Wechsler 2014). The purpose of our study was to develop an insight modelling technology and to verify it empirically in the course of experimental research on the neurophysiological mechanisms of visual insight using objective measurement methods. Insight has 3 stages: the indeterminacy stage, the stage of insight, and the post insight period. The classical Selye model of stress can also be decomposed into the following 3 time periods: pre-stress, stress, post-stress. Although an insight period and a stress period may have similar or different time scales, what is important is common periodicity, involving the same cortical and subcortical parts. The neurophysiological mechanisms of insight in solving problems of visual recognition of contour objects were studied using psychophysical testing methods and objective measurements (Hess, Field 1999; Kounios, Beeman 2014). In our study we identify the instant of insight occurrence with the image recognition threshold under conditions of indeterminacy. A computerised version of the Gollin figure test determining the recognition threshold for incomplete fragmentary images was chosen as a model of insight. In order to analyse the distribution of activity in the human brain and the state of neural networks during the perception of the gradual increase in the contour of the image and in the process of insight development, we applied the method of functional magnetic resonance imaging (fMRI).

Keywords: insight, heuristic type of thinking, stress, functional magnetic resonance imaging (fMRI), neural networks.

Introduction

Insight, which may also be defined as the heuristic type of thinking, is a sudden, unexpected, and surprising appearance of a solution in the problem solver's consciousness, which is accompanied by positive emotions. Insight possesses special attributes: the effect of uncertainty, the stage of preliminary (unconscious) accumulation of information, and an emotional reaction to the recognition.

Methods and results

Our study consisted of 2 stages, and in the first stage we used psycho-physiological and psychological markers.

As a model of insight we chose the determination of the recognition threshold for incomplete fragmentary images — the computerised Gollin figure test (Foreman, Hemmings 1987). The test is a psychophysical method which can be used for measuring recognition thresholds of incomplete fragmented figures. We found that on average the recognition threshold coincides with the first presentation of 20% of the contour.

Eye tracking was used to objectively control the subject's attention in the direction of the subject's gaze in the process of figure recognition during the test.

Insight should contain an emotional component. During the Gollin test 92% of respondents informed us about their emotional reaction.

In the second stage of our study we used the fMRI method to measure the state of the brain at the time of insight occurrence. It is one of the leading methods used in mapping the func-

tional areas of the brain, and with its help it becomes possible to see the neural networks of the brain functioning during rest, as well as when performing certain tasks.

The fMRI stage was carried out in 2 phases. During phase 1 the volunteers lying in the tomograph were shown a screen with a white fixation point against a black background, and their task was to look at the point. This step enabled us to assess the subjects' resting state. During phase 2 the subjects were shown pictures with a gradual extension of the outline and instructed to determine what was pictured on the screen as quickly as possible.

The activation was averaged over all the stimuli in phase 2. The data were divided into three periods: 1 — sub-threshold, before the occurrence of the recognition threshold, from 0 to 10% of the increase in the image contour; 2 — threshold, the threshold of insight occurrence — between 10 and 25%; 3 — above-threshold, after the recognition threshold — from 25 to 60%.

Each of the studied periods in phase 2 (sub-threshold, threshold, and above-threshold) was compared with phase 1 (the subjects looking at the fixation point).

The analysis of brain activity was carried out based on the change in the BOLD signal in time in response to stimulation developed in time, consistent with the inertia of changes in blood flow (fig. 1).

The activity of the cytoarchitectonic fields (zones) of the brain according to Brodmann was investigated, including prefrontal cortex (BA9, BA10, BA11), temporal and parietal cortex (BA7, BA39, BA40, BA22), limbic cortex (BA23, BA24, BA29, BA30, BA31), post-temporal (BA37), occipital cortex (BA17, BA18, BA19), insula (BA13, BA14, BA16, BA44, BA55), and subcortical nuclei, such as amygdala. The state of these structures was investigated, guided by modern ideas about the activity of large-scale neural networks connecting these structures.

In the BOLD-signal dynamics, some fields of the temporal, lower-tempered, occipital, posterior-dark and frontal lobes of the cortex clearly indicated two responses: the first — in the pre-threshold presentation of the image contour, the second — at the moment corresponding to the recognition threshold (at the time of insight). The data show that the maximum response is observed in the area BA37 which coincides with the moment of recognition — the presentation of 20% of the image contour.

In addition, the multidirectional responses of brain neurons were revealed in the fields BA37 and BA7, which can be characterised as contrasting response. It was observed that in the right hemisphere the opposing responses of the zones BA37 and BA7 are significantly more pronounced than in the left hemisphere. The peak of the discrepancy coincided with the recognition threshold and the subject's positive emotional reaction (the moment of insight occurrence). At the moment of insight, activation of the frontal lobe zones, namely, BA44, BA45, and BA46, was observed. On the left, these areas correspond to Broca's area — the speech zone. A change in the BOLD signal

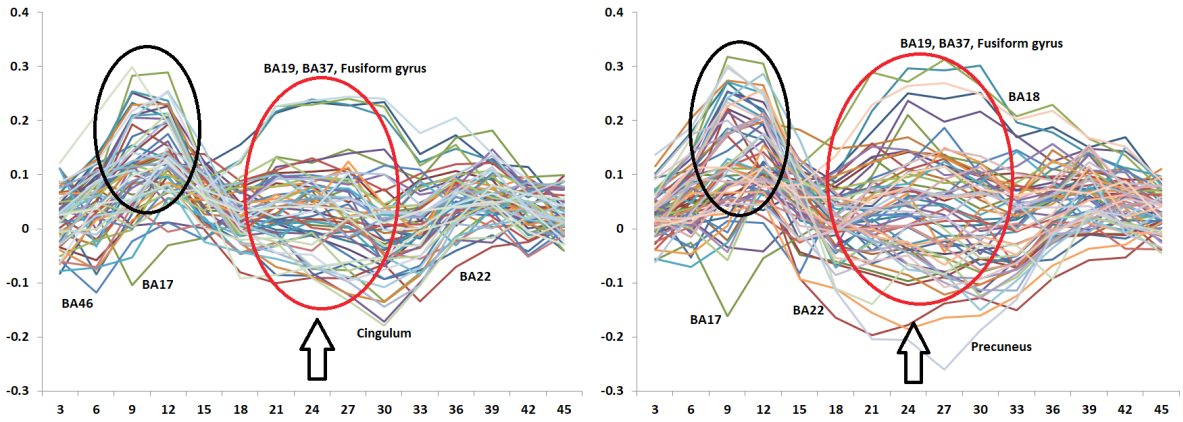

Fig. 1. The change in time of the BOLD signal of some brain fields according to Brodmann, selected as areas of interest. X-axis: time and percentage of filling the contour of the test image, numerically equal to the moment of presentation. Y-axis: change in blood flow in relative units Z-estimates. In the dynamics of the BOLD-signal two responses were clearly traced: the response to the "incubation" pre-threshold period is outlined by a black oval. The response to the moment of insight is outlined by a red oval

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-147-150

in time in the right and left hemispheres of the brain was revealed; statistically significant differences between the responses of BA45 and BA46 in the right and left hemispheres were shown. Thus, in the right hemisphere in zones BA45 and BA46 distinct reactions associated with the threshold of recognising an object in a fragmented contour stimulus were clearly observed. In the left hemisphere (BA44) in the dorsal part of Broca's area, there was no response registered either at the introduction of visual stimulation, or at the time of recognition of the object (Ardila, Bertolucci, Braga et al. 2010).

Summary

In our study we proposed to use the recognition threshold of incomplete images as the model of insight with all its attributes — the stage of information accumulation, the sudden occurrence of the solution under the conditions of uncertainty accompanied by a pronounced emotional reaction, and a post-insight "relaxation". The outcomes of the study show the neuronal activity of insight as a result of the balance of neuronal nets working in opponent interactions (Saaty 2008). For example, the peak of activity in BA37 is accompanied by a maximum decrease in BA7 activity including the precuneus of parietal cortex. We have established that there are also opposing relationships between the activity of the neural network of the cingulate cortex and that of the prefrontal cortex at the moment of reaching the threshold (Kraft, Grimsen, Kehrer et al. 2006). In addition, an increased right-lateral activity of the frontal cortex BA9, BA13 (anterior right insula, amygdala) was identified (fig. 2).

In phylogenesis, insight appeared much earlier than the analytical way of solving problems, which involves inner speech. Our study suggests that it is not a separate area of the brain that ensures decision-making under insight conditions, but a complex network of mutual connections mainly in the parietal temporal and occipital cortex and the opponent interactions of the prefrontal cortex with the anterior sections of the cingulate gyrus. We applied our new version of slow incomplete image presentation fitted to the slow (bad temporal resolution) fMRI method to measure the response of the brain to dynamically changing signals in time. This was facilitated by the fact that it is possible to control the time interval of the computerised Gollin figure test. The development of modern psychology requires mandatory control of the hormonal status and human genetic differences of the study participants (Shelepin, Pronin, Shelepin 2015; Shelepin, Shelepin 2015; Shelepin, Trufanov, Fokin et al. 2018).

The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Saint Petersburg State University (12.06.2017, no. 02-124).

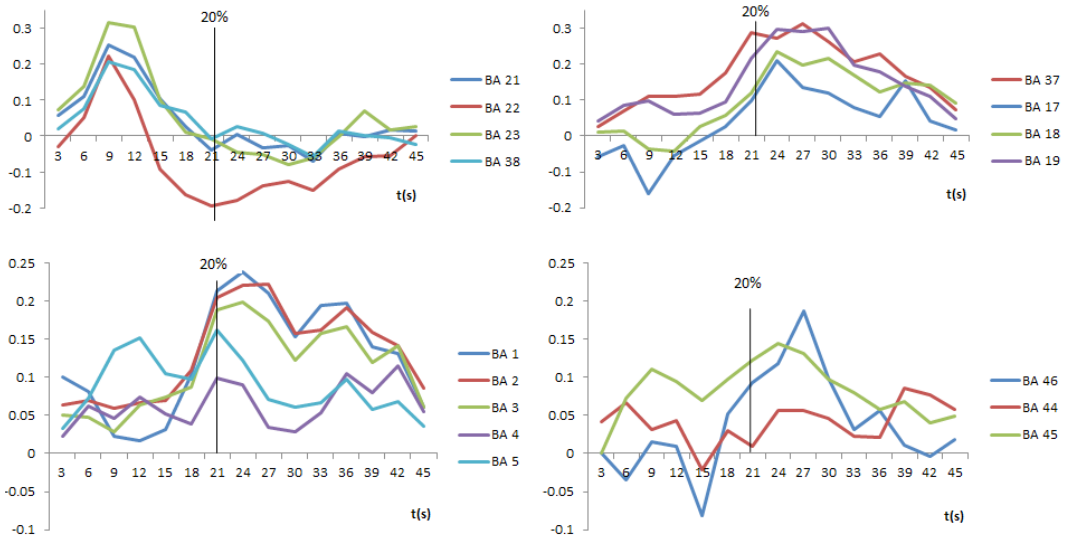

Fig. 2. A generalised demonstration of the whole brain response to a dynamic visual stimulus showing the responses of selected areas of the frontal, parietal, temporal and occipital cortex

References

Ardila, A., Bertolucci, P. H., Braga, L. W. et al. (2010) Illiteracy: The neuropsychology of cognition without reading. *Archives of Clinical Neuropsychology*, vol. 25, no. 8, pp. 689–712. PMID: 21075867. DOI: 10.1093/arclin/acq079 (In English)

Foreman, N., Hemmings, R. (1987) The Gollin incomplete-figures test: A flexible, computerised version. *Perception*, vol. 16, no. 16, pp. 543–548. PMID: 3444734. DOI: 10.1068/p160543 (In English)

Hess, R., Field, D. (1999) Integration of contours: New insights. *Trends in Cognitive Sciences*, vol. 3, no. 12, pp. 480–486. PMID: 10562727. DOI: 10.1016/s1364-6613(99)01410-2 (In English)

Kounios, J., Beeman, M. (2014) The cognitive neuroscience of insight. *Annual Review of Psychology*, vol. 65, pp. 71–93. PMID: 24405359. DOI: 10.1146/annurev-psych-010213-115154 (In English)

Kraft, A., Grimsen, C., Kehrer, S. et al. (2006) Neurological and neuropsychological characteristics of occipital, occipito-temporal and occipito-parietal infarction. *Cortex*, vol. 56, pp. 38–50. PMID: 23206528. DOI: 10.1016/j.cortex.2012.10.004 (In English)

Saaty, T. L. (2008) The analytic hierarchy and analytic network measurement processes: Applications to decisions under risk. *European Journal of Pure and Applied Mathematics*, vol. 1, no. 1, pp. 122–196. (In English)

Shelepin, K. Yu., Pronin, S. V., Shelepin, Yu. E. (2015) Recognizing fragmented images and the appearance of "insight". *Journal of Optical Technology*, vol. 82, no. 10, pp. 700–706. DOI: 10.1364/JOT.82.000700 (In English)

Shelepin, K. Yu., Shelepin, Yu. E. (2015) Neirofiziologija "insajta" [Neurophysiology of the "insight"]. *Peterburgskij psikhologičeskij žurnal*, vol. 11, pp. 19–38. (In Russian)

Shelepin, K. Yu., Trufanov, G. E., Fokin, V. A. et al. (2018) Digital visualization of the activity of neural networks of the human brain before, during, and after insight when images are being recognized. *Journal of Optical Technology*, vol. 85, no. 8, pp. 468–475. DOI: 10.1364/JOT.85.000468 (In English)

Wechsler, H. (2014) *Neural networks for perception. Vol. 1: Human and machine perception*. New York: Academic Press, 542 p. (In English)

 DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-147-150

Краткие сообщения

UDC 577.1

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-151-155

Progesterone and anxiety during the oestrus cycle in rats genetically selected for high and low active avoidance

D. A. Zhukov✉[1], N. A. Arutunan[1], E. P. Vinogradova[2]

[1] Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia
[2] Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors
Dmitry A. Zhukov,
Scopus AuthorID: 7005656352,
ORCID: 0000-0002-5716-0027,
e-mail: dazhukov0@gmail.com

Natalya A. Arutunan

Ekaterina P. Vinogradova,
SPIN: 4899-1537,
Scopus AuthorID: 7007105677,
ORCID: 0000-0003-2275-4084,
e-mail: katvinog@yahoo.com

For citation: Zhukov, D. A., Arutunan, N. A., Vinogradova, E. P. (2020) Progesterone and anxiety during oestrus cycle in rats genetically selected for high and low active avoidance. *Integrative Physiology,* vol. 1, no. 2, pp. 151–155.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-151-155

Received 5 July 2019;
reviewed 18 July 2019;
accepted 9 October 2019.

Copyright: © The Authors (2020). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. In this research, the changes of anxiety and blood progesterone levels during the oestrus cycle were studied in rats genetically selected for high (KHA) and low (KLA) acquisition of active avoidance. Anxiety levels were measured by the time spent in open arms of the elevated plus-maze. Progesterone levels were determined by radioimmunoassay. KLA rats exhibited no significant changes in anxiety levels during the oestrus cycle. KHA rats showed a significant variation of anxiety during the oestrus cycle with a high level in the diestrus phase and a low level in proestrus. Moreover, anxiety in diestrus in KHA rats was higher than in KLA rats. Additionally, increased progesterone levels were observed in KLA rats in comparison with the KHA strain, during both diestrus and proestrus. Anxiety levels corresponded to plasma progesterone during the oestrus cycle in both rat strains.

Keywords: progesterone, anxiety, oestrus cycle, active avoidance, coping style.

Progesterone is a sex steroid hormone associated with female reproductive functions, including sexual behaviour, uterus preparation for embryo implantation and maintenance of pregnancy. This hormone is mainly synthesized in the ovaries and placenta, but it is also produced by the adrenal cortex and the central nervous system (CNS) of both male and female mammals (Gutai et al. 1977; Mensah-Nyagan et al. 1999; Tuckey 2005). The fact that both males and females synthesize this hormone indicates that its functions are not limited to the female reproductive physiology. For example, progesterone regulates various non-reproductive functions in the CNS related to neurogenesis, neuroprotection, neural circuit organisation, oligodendrogenesis, myelination, neuronal plasticity, and mood (Snyder, Hull 1980; Schumacher et al. 2017). Therefore, given that progesterone is synthesised, metabolised and exerts its functions in the CNS, it is referred to as a neurosteroid.

Neurons and glial cells in the brain can synthesise progesterone *de novo* from cholesterol as they express the enzymes responsible for its synthesis and metabolism (Testas et al. 1989; Mellon, Deschepper 1993; Schumacher et al. 2017). Thereafter, the progesterone resulting from either circulating plasma or CNS local synthesis binds to its specific intracellular and membrane receptors to regulate

the molecular and cellular processes underlying the brain functions.

We studied plasma progesterone levels in female rats of two psychogenetically selected strains. Koltushi High Avoidance (KHA) and Koltushi Low Avoidance (KLA) rat strains have been developed based on selective breeding at Pavlov Institute of Physiology from Wistar rats using divergent performances in avoidance conditioning in two-way shuttle-boxes during five consecutive days as the criterion (Ryzhova et al. 1983). KHA and KLA strains of rats demonstrate different levels of anxiety (Zhukov, Vinogradova 1994). In the present study the females of 46th and 47th generation of the selection were used.

Three-month old females were tested in the elevated plus-maze (length of beams — 100 cm, width — 10 cm, and height of closed arms walls — 20 cm) during diestrus and proestrus. Vaginal smears were taken daily during at least three weeks before a behavioural test. Diminished time spent in open arms during five minute plus-maze test was used as a measure of anxiety. Blood samples from tail veins were collected immediately after plus-maze testing.

Samples were assayed radioimmunologically as described previously (Savchenko, Proimina 1986) in duplicate using an antiserum obtained in our laboratory and a tritiated hormone from the State Institute of Applied Chemistry (St Petersburg, Russia). The average intra-assay coefficient of variation was 2.05%, and the average inter-assay coefficients across high and low controls were 4.85%.

Data are presented in Table 1.

In KHA rats both progesterone levels and anxiety levels differed considerably during diestrus and proestrus. In KLA rats there was no significant difference for anxiety levels between the two stages, and the difference for progesterone levels was less pronounced. We found significant interstrain differences for both progesterone and anxiety levels. Progesterone levels were higher and anxiety levels were lower in KLA rats during both stages of the oestrus cycle.

Interstrain differences in progesterone levels may be one of the causes of different maternal behaviour in KHA and KLA rats found earlier (Vinogradova, Zhukov 2004). The latency of the first approach to pups after their removal from the nest has been lower in KHA rats, and they needed more time to return all pups to the nest. The link between blood plasma progesterone levels and maternal behaviour has also been found in humans (Glynn et al. 2017).

The interstrain differences of progesterone variations in the oestrus cycle are in agreement with the types of female infertility in KHA and KLA rats found in preliminary studies. During breeding we encountered problems with infertility during everyday transportation of the animals from the vivarium to the lab. However, the infertility was of a different nature: a permanent anestrus was found in KLA females, while foetal resorption was observed in KHA rats.

The most interesting discovery of our present study is the correspondence between progesterone levels and anxiety: the higher the progesterone the lower the anxiety. As we noted above, progesterone plays a key role in development, differentiation, and diverse reproductive and non-reproductive functions. Particularly in the CNS, where progesterone regulates various functions such as reproductive behaviour (Gómez-Camarillo et al. 2011), learning and memory (Yousuf et al. 2017), neuroprotection (Singh, Su 2013), and mood (Conway et al. 2007; Dichtel et al. 2017; Studd 2014).

Table 1. Blood progesterone level (nM) and time spent in open arms of the plus-maze (s) in KHA and KLA rats during diestrus and proestrus

	KHA		**KLA**	
	Diestrus n = 17	Proestrus n = 14	Diestrus n = 16	Proestrus n = 15
Progesterone	1.2 ± 0.1 **	3.3 ± 0.5	4.3 ± 0.5 * ##	6.2 ± 0.4 ##
Open arms time	44.4 ± 7.0 **	115.4 ± 8.2	118.1 ± 10.0 ##	143.7 ± 10.7 #

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ — *vs* proestrus (for each rat strain)
# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ — *vs* similar parameter in KHA rats
Mann–Whitney U test

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-151-155

Progesterone receptors are widely distributed in the brain. A significant number of progesterone receptors has been found in the hippocampus and other emotiogenic structures (Camacho-Arroyo et al. 2017; Meffre et al. 2013).

Progesterone exerts its effects on its target cells through three central pathways, namely the classical (first) and non-classical (second and third) ones (González-Orozco, Camacho-Arroyo 2019). In the classical pathway, progesterone binds to an intracellular receptor, activating such a transcription factor which dimerises and translocates to the nucleus. There, it binds to specific DNA sequences, called progesterone response elements, which are mainly located in the gene promoter regions, thus regulating their expression. In contrast, one of the non- classical pathways involves progesterone receptor ligand-independent activation by membrane-associated kinases and the activation of the multiple G protein-coupled membrane receptors of progesterone, which in turn activates pathways related to cAMP-dependent protein kinase A, Ca^{2+}-dependent protein kinase C, PI3K/Akt and ERK/MAPK. Furthermore, the other non-classical pathway of progesterone action includes the modulation of the gamma-aminobutyric acid receptors of type A ($GABA_A$) following its conversion into allopregnanolone.

Allopregnanolone was recognized as a 5*α*-reduced metabolite of progesterone (Beall, Reichstein 1938). It was named a *neurosteroid* in 1981 by Baulieu's team, who discovered that the brain "acting like a peripheral gland" expresses the enzymatic machinery required to synthesise allopregnanolone *de novo* starting from pregnenolone, the precursor of all neurosteroids (Corpéchot et al. 1981). Allopregnanolone's anti-convulsant, anxiolytic and anti-depressant pharmacological effects after its administration in animals and humans were soon recognised to be mediated by a mechanism of action that includes the fast allosteric modulation of the action of GABA at $GABA_A$ receptors (Majewska et al. 1986; Belelli et al. 2018). The neurophysiological role of allopregnanolone in permitting the fine-tuning and regulation of the strength of $GABA_A$ receptors to agonists, positive allosteric modulators, and GABAmimetic agents, was also unveiled (Pinna et al. 2000). By affecting $GABA_A$ receptors, allopregnanolone also regulates emotional animal behaviour in rodent stress models and humans with posttraumatic stress disorder and major unipolar depression (Rasmusson et al. 2019; Pineles et al. 2018).

The changes in the brain progesterone levels can be independent of blood circulating hormones because of neurosteroidogenesis (Compagnone, Mellon 2000). Yet, obviously, for the regulation of brain functions the peripheral progesterone also is important. For example, in rats anxiety can be induced by progesterone withdrawal (Islas-Preciado et al. 2016), and in women premenstrual syndrome is associated with rapid fall of progesterone synthesis at the end of the menstrual cycle (Bäckström et al. 2014).

The present findings suggest that circulating progesterone may account at least in part for the behavioural differences characterising two strains selected for contrasting learning abilities.

References

Bäckström, T., Bixo, M., Johansson, M. et al. (2014) Allopregnanolone and mood disorders. *Progresses in Neurobiology*, vol. 113, pp. 88–94. PMID: 23978486. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.07.005 (In English)

Beall, D., Reichstein, T. (1938) Isolation of progesterone and allopregnanolone from the adrenal. *Nature*, vol. 142, no. 3593, p. 479. DOI: 10.1038/142479b0 (In English)

Belelli, D., Brown, A. R., Mitchell, S. J. et al. (2018) Endogenous neurosteroids influence synaptic $GABA_A$ receptors during postnatal development. *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 30, no. 2, article e12537. PMID: 28905487. DOI: 10.1111/jne.12537 (In English)

Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E. R., Cerbón, M. (2017) Mechanism of progesterone action in the brain. In: D. W. Pfaff, M. Joëls (eds.). *Hormones, brain and behavior*. 3rd ed. Vol. 3. S. p.: Academic Press, pp. 181–214. DOI: 10.1016/B978-0-12-803592-4.00053-5 (In English)

Compagnone, N. A., Mellon, S. H. (2000) Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 21, no. 1, pp. 1–56. PMID: 10662535. DOI: 10.1006/frne.1999.0188 (In English)

Conway, C. A., Jones, B. C., DeBruine, L. M. et al. (2007) Salience of emotional displays of danger and contagion in faces is enhanced when progesterone levels are raised. *Hormones and Behavior*, vol. 51, no. 2, pp. 202–206. PMID: 17150220. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2006.10.002 (In English)

Corpéchot, C., Robel, P., Axelson, M. et al. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 8, pp. 4704–4707. PMID: 6458035. DOI: 10.1073/pnas.78.8.4704 (In English)

Dichtel, L. E., Lawson, E. A., Schorr, M. et al. (2017) Neuroactive steroids and affective symptoms in women across the weight spectrum. *Neuropsychopharmacology*, vol. 42, no. 6, pp. 1436–1444. PMID: 29090684. DOI: 10.1038/npp.2017.269 (In English)

Glynn, L. M., Poggi Davis, E., Sandman, C. A., Goldberg, W. A. (2016) Gestational hormone profiles predict human maternal behavior at 1-year postpartum. *Hormones and Behavior*, vol. 85, pp. 19–25. PMID: 27427279. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2016.07.002 (In English)

Gómez-Camarillo, M. A., Beyer, C., Lucio, R. A. et al. (2011) Differential effects of progesterone and genital stimulation on sequential inhibition of estrous behavior and progesterone receptor expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, vol. 85, no. 3–4, pp. 201–206. PMID: 21515343. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2011.04.004 (In English)

González-Orozco, J. C., Camacho-Arroyo, I. (2019) Progesterone actions during central nervous system development. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, article 503. PMID: 31156378. DOI: 10.3389/fnins.2019.00503 (In English)

Gutai, J. P., Meyer, W. J., Kowarski, A. A., Migeon, C. J. (1977) Twenty-four hour integrated concentrations of progesterone, 17-hydroxyprogesterone and cortisol in normal male subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 44, no. 1, pp. 116–120. DOI: 10.1210/jcem-44-1-116 (In English)

Islas-Preciado, D., López-Rubalcava, C., González-Olvera, J. et al. (2016) Environmental enrichment prevents anxiety-like behavior induced by progesterone withdrawal in two strains of rats. *Neuroscience*, vol. 336, pp. 123–132. PMID: 27600948. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.08.050 (In English)

Jung-Testas, I., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E., Robel, P. (1989) Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*, vol. 125, no. 4, pp. 2083–2091. PMID: 2791979. DOI: 10.1210/endo-125-4-2083 (In English)

Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D. et al. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, vol. 232, no. 4753, pp. 1004–1007. PMID: 2422758. DOI: 10.1126/science.2422758 (In English)

Meffre, D., Labombarda, F., Delespierre, B. et al. (2013) Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience*, vol. 231, pp. 111–124. PMID: 23211561. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.039 (In English)

Mellon, S. H., Deschepper, C. F. (1993) Neurosteroid biosynthesis: Genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Research*, vol. 629, no. 2, pp. 283–292. PMID: 8111631. DOI: 10.1016/0006-8993(93)91332-m (In English)

Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D. et al. (1999) Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*, vol. 51, no. 1, pp. 63–81. PMID: 10049998. (In English)

Pineles, S. L., Nillni, Y. I., Pinna, G. et al. (2018) PTSD in women is associated with a block in conversion of progesterone to the GABAergic neurosteroids allopregnanolone and pregnanolone measured in plasma. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 93, pp. 133–141. PMID: 29727810. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.04.024 (In English)

Pinna, G. (2019) Animal models of PTSD: The socially isolated mouse and the biomarker role of allopregnanolone. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 13, article 114. PMID: 31244621. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00114 (In English)

Pinna, G., Uzunova, V., Matsumoto, K. et al. (2000) Brain allopregnanolone regulates the potency of the $GABA_A$ receptor agonist muscimol. *Neuropharmacology*, vol. 39, no. 3, pp. 440–448. PMID: 10698010. DOI: 10.1016/s0028-3908(99)00149-5 (In English)

Rasmusson, A. M., King, M. W., Valovski, I. et al. (2019) Relationships between cerebrospinal fluid GABAergic neurosteroid levels and symptom severity in men with PTSD. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 102, pp. 95–104. PMID: 30529908. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.11.027 (In English)

Ryzhova, L. Yu., Koulagin, D. A., Lopatina, N. G. (1983) Skorrelirovannaya izmenchivost' dvigatel'noj aktivnosti i emotsional'nosti pri selektsii krys na vysokie i nizkie velichiny uslovnykh refleksov aktivnogo izbeganiya [The motor activity and emotionality of the rats selected for high and low level avoidance learning]. *Genetika*, vol. 19, no. 2, pp. 121–125. (In Russian).

Savchenko, O. N., Proimina, F. I. (1986) Interrelationship of the circadian and ovulatory rhythms of secretion of sex and gonadotropic hormones in intact and neonatally androgenized female rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 16, no. 6, pp. 534–538. PMID: 3102996. DOI: 10.1007/bf01191462 (In English)

Schumacher, M., Zhu, X., Guennoun, R. (2017) Progesterone: Synthesis, metabolism, mechanism of action, and effects in the nervous system. In: D. W. Pfaff, M. Joëls (eds.). *Hormones, brain and behavior*. 3rd ed. Vol. 3. S p.: Academic Press, pp. 215–244. DOI: 10.1016/B978-0-12-803592-4.00054-7 (In English)

Singh, M., Su, C. (2013) Progesterone and neuroprotection. *Hormones and Behavior*, vol. 63, no. 2, pp. 284–290. PMID: 22732134. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.06.003 (In English)

Snyder, A. M., Hull, E. M. (1980). Perinatal progesterone affects learning in rats. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 5, no. 2, pp. 113–119. PMID: 7394127. DOI: 10.1016/0306-4530(80)90014-1 (In English)

Studd, J. (2014) Hormone therapy for reproductive depression in women. *Post Reproductive Health*, vol. 20, no. 4, pp. 132–137. PMID: 25398672. DOI: 10.1177/2053369114557883 (In English)

Tuckey, R. C. (2005) Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta*, vol. 26, no. 4, pp. 273–281. PMID: 15823613. DOI: 10.1016/j.placenta.2004.06.012 (In English)

Vinogradova, E. P., Zhukov, D. A. (2004) Materinskoe povedenie u krys s razlichnoj strategiej prisposobleniya [Patterns of maternal behavior of rats genetically selected for opposite coping styles]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 54, no. 4, pp. 548–553. PMID: 15481393. (In Russian)

Yousuf, S., Brat, D. J., Shu, H.-K. et al. (2017) Progesterone improves neurocognitive outcomes following therapeutic cranial irradiation in mice. *Hormones and Behavior*, vol. 96, pp. 21–30. PMID: 28866326. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.08.004 (In English)

Zhukov, D. A., Vinogradova, K. P. (1994) Inescapable shock induces the opposite changes of the plus-maze test behavior in rats with divergent coping strategy. *Physiology & Behavior*, vol. 56, no. 5, pp. 1075–1079. PMID: 7824574. DOI: 10.1016/0031-9384(94)90346-8 (In English)