



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

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

ISSN 2687-1270

**ИНТЕГРАТИВНАЯ
ФИЗИОЛОГИЯ**

INTEGRATIVE PHYSIOLOGY

T. 1 № 3 2020

Vol. 1 No. 3 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 10.33910/2687-1270-2020-1-3
2020. Том 1, № 3
2020. Vol. 1, no. 3

Интегративная физиология

Integrative Physiology

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

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

Редакция

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

Editorial Team

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

Редакционная коллегия

В. Г. Александров (Санкт-Петербург, Россия)
Н. М. Бажан (Новосибирск, Россия)
Б. Боназ (Гренобль, Франция)
Л. Б. Буравкова (Москва, Россия)
Т. Д. Власов (Санкт-Петербург, Россия)
Дж. Вуд (Колумбус, США)
Н. В. Гуляева (Москва, Россия)
Д. Джебцова (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 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. Duzhikova (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)
Meiczyślaw 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 7,97 Мб
Подписано к использованию 30.09.2020

Published at 30.09.2020

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 А. Ю. Гладкова
Редактор английского текста И. А. Наговицына, О. В. Колотина
Оформление обложки О. В. Рудневой
Верстка Д. В. Лаптухиной

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

СОДЕРЖАНИЕ

Приветствие главного редактора	159
Обзоры	160
<i>Taché Y.</i> Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the brainstem: Role of Pavlov's vagally mediated cephalic phase of gastric secretion	160
<i>Никитина Е. А.</i> Переливание крови: начало	169
<i>Жуков Д. А.</i> Полвека «выученной беспомощности»	181
<i>Бигдай Е. В., Самойлов В. О.</i> Обонятельная дисфункция как индикатор ранней стадии заболевания коронавирусной инфекцией	187
<i>Kemstach V. V., Korostovtseva L. S., Sakovskiy I. V., Bochkarev M. V., Alekhin A. N., Sviryaev Yu. V.</i> Cardiorespiratory feedback training as a non-pharmacological intervention and its application in stroke patients	196
<i>Рябова Е. В., Латыпова Е. М., Сурина Н. В., Комиссаров А. Е., Саранцева С. В.</i> Развитие, структура и функции глиальных клеток <i>Drosophila melanogaster</i>	202
<i>Сергеева С. С.</i> Взаимодействие между нервной и секреторной функциями в осуществлении интегративной деятельности нейросекреторной клетки Ретциуса пиявки. Обзор	212
Экспериментальные статьи	218
<i>Csikota P., Horváth J., Szegedi V., Zsebők S., Zelena D.</i> Sex differences in ultrasonic vocalization and hormonal stress response of an anxious mice strain during the early postnatal period	218
<i>Saifitdinova A. F., Glotov O. S., Poliakova I. V., Bichevaya N. K., Loginova Ju. A., Kuznetsova R. A., Leonteva O. A., Nevskaya E. E., Pavlova O. A., Puppo I. L., Shikov A. E., Urazov S. P., Kuznetsova T. V., Sarana A. M., Scherbak S. G., Baranov V. S.</i> Mosaicism in preimplantation human embryos	225
<i>Лопатина Н. Г., Зачепило Т. Г., Дюжилова Н. А., Камышев Н. Г., Сурма С. В., Серов И. Н., Щеголев Б. Ф.</i> Влияние изменений электромагнитных полей на пищевую и когнитивную активность медоносной пчелы	231
Краткие сообщения	242
<i>Меркульева Н. С., Михалкин А. А., Никитина Н. И.</i> Постнатальное развитие комплекса заднелатеральных ядер дорзального таламуса	242
<i>Шульга П. М.</i> Роль стресса в патогенезе болезни Альцгеймера	249

CONTENTS

A word of salutation by the Editor-in-chief	159
Reviews	160
<i>Taché Y.</i> Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the brainstem: Role of Pavlov's vagally mediated cephalic phase of gastric secretion	160
<i>Nikitina E. A.</i> Blood transfusion: The beginning	169
<i>Zhukov D. A.</i> Half a century of "learned helplessness"	181
<i>Bigday E. V., Samoilov V. O.</i> Olfactory dysfunction as an indicator of early coronavirus infection ...	187
<i>Kemstach V. V., Korostovtseva L. S., Sakovskiy I. V., Bochkarev M. V., Alekhin A. N., Sviryaev Yu. V.</i> Cardiorespiratory feedback training as a non-pharmacological intervention and its application in stroke patients	196
<i>Ryabova E. V., Latypova E. M., Surina N. V., Komissarov A. E., Sarantseva S. V.</i> The development, structure and function of glial cells in the nervous system of <i>Drosophila melanogaster</i>	202
<i>Sergeeva S. S.</i> The interaction between nervous and secretory functions in the integrative activity of the neurosecretory Retzius cell of the leech: A review	212
Experimental articles	218
<i>Csikota P., Horváth J., Szegedi V., Zsebők S., Zelena D.</i> Sex differences in ultrasonic vocalization and hormonal stress response of an anxious mice strain during the early postnatal period	218
<i>Saifitdinova A. F., Glotov O. S., Poliakova I. V., Bichevaya N. K., Loginova Ju. A., Kuznetsova R. A., Leonteva O. A., Nevskaya E. E., Pavlova O. A., Puppo I. L., Shikov A. E., Urazov S. P., Kuznetsova T. V., Sarana A. M., Scherbak S. G., Baranov V. S.</i> Mosaicism in preimplantation human embryos	225
<i>Lopatina N. G., Zachepilo T. G., Dyuzhikova N. A., Kamyshev N. G., Surma S. V., Serov I. N., Shchegolev B. F.</i> The impact of changes in electromagnetic fields on food and cognitive behaviour of the honeybee	231
Short communications	242
<i>Merkulyeva N. S., Mikhalkin A. A., Nikitina N. I.</i> Postnatal development of the LP-Pulvinar complex	242
<i>Shulga P. M.</i> The role of stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease	249

Приветствие главного редактора

Глубокоуважаемые коллеги!

Третий номер журнала «Интегративная физиология» выходит в продолжающееся тревожное для всего мирового сообщества время пандемии коронавирусной инфекции COVID-19, которая изменила жизнь человечества во многих аспектах. В условиях пандемии электронная форма общения через глобальную коммуникационную компьютерную сеть стала для многих преобладающей. Благодаря интернету сохраняется возможность активного общения в научном сообществе.

Наш физиологический журнал «открытого доступа» вносит вклад в научное общение, публикуя обзоры и оригинальные статьи по актуальным для мировой науки вопросам физиологии и физиологических аспектов смежных наук — генетики, молекулярной биологии, биохимии, биофизики, зоологии, анатомии, гистологии, эмбриологии. Одна из важнейших целей журнала — способствовать развитию интегративной физиологии. Мы надеемся, что со временем, с появлением публикаций, рассматривающих каждый изучаемый процесс как часть, интегрированную в функционирование целого организма, естественным путем исчезнет граница между публикациями по «вопросам физиологии» и «по вопросам физиологических аспектов смежных наук». Журнал приветствует публикации о механизмах, координирующих взаимодействие систем организма и обеспечивающих его целостность.

Актуальной для мировой науки стала проблема коронавирусной инфекции, и мировое научное сообщество фокусирует внимание на решении вопросов о механизмах патологических изменений, индуцированных коронавирусом у пациентов, в том числе в зависимости от возраста и/или сопутствующих заболеваний. Выявленные и ставшие известными факты (например, особая уязвимость пожилых людей или пациентов с диабетом) ожидают ответа ученых на вопрос «почему». Наш журнал начинает публикацию обзорных статей, посвященных этой проблеме. Первая из них, представленная в номере, анализирует известный факт: обонятельная дисфункция как индикатор раннего заболевания коронавирусной инфекцией.

Приветствую читателей третьего номера журнала «Интегративная физиология» и благодарю всех, кто сделал реальностью его выпуск.

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

Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the brainstem: Role of Pavlov's vagally mediated cephalic phase of gastric secretion

Y. Taché✉¹

¹ University of California, Los Angeles, 115 Wilshire Blvd, Los Angeles 11301, USA

Author

Yvette Taché,
Scopus AuthorID: 35430815800,
e-mail: ytache@mednet.ucla.edu

For citation: Taché, Y. (2020) Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the brainstem: Role of Pavlov's vagally mediated cephalic phase of gastric secretion. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 160–168. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-160-168

Received 29 May 2020; reviewed 9 June 2020; accepted 9 June 2020.

Funding: The author's work was supported by the NIHDDK grant DK 33061, the Center grant DK 41301 (Animal Core), VA Merit Award and VA Research Career Scientist Award.

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

Abstract. Pavlov's seminal observation that sham feeding in dogs stimulates gastric acid secretion through the vagus nerve pioneered the concept of the cephalic phase of digestion. This has been subsequently extended to a wide range of mammals including humans. In the last decades, experimental evidence in rats established that the three amino acid peptide thyrotropin-releasing hormone (TRH) expressed in the brainstem plays a key role in the vagal stimulation of digestive secretory-motor function. The dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) neurons expresses TRH receptor subtype 1 (TRH-R1) and receives input of TRH containing fibers arising from TRH synthesizing neurons in medullary raphe nuclei. The activation of TRH-TRH-R1 signaling excites the firing of DMN neurons leading to the activation of vagal efferent discharges and gastric myenteric cholinergic neurons. This results in a vagally mediated and atropine-sensitive stimulation of gastric secretory and propulsive motor function, along with duodenal and pancreatic secretion. Importantly, the blockade of TRH or TRH-R1 in the brainstem inhibits the gastric acid response to sham feeding in rats. Collectively, these convergent data support the physiological relevance of medullary TRH-TRH-R1 signaling as the end effector of the vagally mediated stimulation of digestive process in the cephalic phase.

Keywords: dorsal vagal complex, cephalic phase, gastric secretion, thyrotropin releasing hormone (TRH), TRH receptor, sham feeding, vagus.

Introduction

At the beginning of the last century, Ivan Pavlov pioneered contributions to the field of integrative physiology by providing experimental evidence of the existence of a “psychic” stimulation of gastric acid secretion now known as the cephalic phase of digestion (Pavlov 1910). This was achieved by developing an experimental model in dogs equipped with an esophagus and gastric fistula whereby sham feeding consisting of swallowing food without reaching the stomach was shown to stimulate gastric acid secretion. Pavlov (1910) also found that in dogs with gastric intact and vagally denervated pouches (Heidenhain pouch) the gastric response to the vision and smell of food

along with gustative input in the oral cavity required the integrity of the vagus nerve.

Thereafter, the cephalic phase has been extended to a wide range of experimental mammals (Zafra et al. 2006). In humans, the gastric acid secretion initiated by meal expectations, visual, olfactory, and gustatory stimuli contributes up to 50% of the postprandial gastric secretory output and is mediated by vagal cholinergic pathways (Feldman, Richardson 1986). Subsequent investigations also showed that, in addition to acid, the cephalic phase encompasses the stimulation of a vast number of gastrointestinal (GI) digestive processes (Katschinski et al. 1992; Power, Schulkin 2008). Among those, the saliva is the first secretion to be increased by cephalic stimuli and the presence of food

in the mouth (Mattes 1997). Others relevant important secretory components are the enhanced GI hormone release, namely, gastrin (Goldschmiedt et al. 1990; Kovacs et al. 1997), ghrelin (Simonian et al. 2005), leptin (Sobhani et al. 2002) localized in the gastric mucosa within the gastric G, X/A, and mucosal cells respectively (Rindi et al. 2004), insulin (Guemes et al. 2019) and pancreatic polypeptide (Simonian et al. 2005) secreted from the pancreatic endocrine cells, as well as enzyme and bicarbonate from exocrine pancreatic secretion (Ohara et al. 1988). Concomitantly with the secretions, sham feeding increases GI motility (Rogers et al. 1993; Power, Schulkin 2008). The anticipatory GI secretory-motor responses induced by the cephalic phase are integrative and adaptive in nature to prime the gut to optimize the digestive, metabolic and absorptive processes under conditions of impending nutrient ingestion (Giduk et al. 1987; Katschinski 2000; Power, Schulkin 2008; Smeets et al. 2010).

Contrasting with the extended characterization of the peripheral GI changes evoked by the cephalic phase (Smeets et al. 2010), the underlying chemical coding in the brain mediating the vagally mediated response lagged behind. This was largely due to the lack of methodological approaches in dogs or humans to investigate the activation of these circuitries particularly in the brainstem (DelParigi et al. 2005). By contrast, a number of experimental studies in rodents have unraveled transmitters involved in vagal regulation of GI function in the brainstem (Hornby et al. 1991; Taché et al. 1995; Powley et al. 2000).

The present review will focus on convergent neuroanatomical and functional evidence accumulated during the past decades in rats supporting a role of thyrotropin releasing hormone (TRH)-TRH receptor 1 (TRH-R1) signaling in the brainstem in the vagal dependent stimulation of GI function and the possible physiological relevance as local medullary effector of the vagally mediated cephalic phase of digestion.

Hindbrain TRH-TRH receptor signaling and gastric vagal myenteric activation

We made the initial observation in rats that TRH injected the hindbrain cerebrospinal fluid at the level of the cisterna magna induces a rapid and potent increase of gastric acid secretion through vagal and atropine-sensitive pathways while peripherally administered, the peptide had no effect (Taché et al. 1980). This provided the first evidence of the central action of a peptide to induce a vagal stimulation of gastric secretion (Taché et al. 1981). However, to delineate the physiological relevance

of this observation in the vagal stimulation of gastric function several criteria had to be fulfilled. Namely, TRH should be present in fibers/terminals projecting on preganglionic vagal motor neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus (DMN) innervating the gut. TRH receptors (TRH-R) should be expressed in DMN neurons and TRH-TRH-R activation should induce activation of vagal efferent fibers activity that innervate target cells involved in stimulating GI function. Importantly, blockade of TRH and/or TRH-R within the dorsal vagal complex (DVC) should inhibit the vagal dependent stimulation of gastric function evoked by stimuli acting through brain-vagal pathways as those recruited during the cephalic phase. So far, TRH-TRH-R signaling in the brainstem is the only ligand-receptor interaction for which these combined neuroanatomical, electrophysiological and functional criteria have been fulfilled (Taché et al. 1993; 2006; 2014).

Brain distribution by immunostaining showed that dense TRH-immunoreactive (IR) fibers are present in the rat DVC composed of the nucleus tractus solitarius (NTS) and DMN (fig. 1A). Electron microscopic studies further provided neuroanatomical evidence that TRH-IR localized in the DVC nerve terminals create asymmetric synaptic (excitatory) contacts on dendrites of DMN neurons contributing vagal efferent innervation of the stomach in rodents (Rinaman et al. 1989; Rinaman, Mieslis 1990). Of translational relevance, TRH-IR fibers innervating the DMN in humans constitute the most prominent network compared to twelve other peptides immunostained under the same conditions (Fodor et al. 1994). Additional brainstem mapping studies with the combined use of knife cut and tracing methods have identified that TRH-IR fibers localized in the DVC do not originate from the hypothalamus but from TRH expressing neurons located in medullary raphe nuclei. Namely, the raphe obscurus (Rob), raphe pallidus (Rpa), and parapyramidal region synthesizing TRH containing neurons send direct projections to the DVC in rats (Lynn et al. 1991) and rabbits (Iwase et al. 1988) (fig. 1B-C).

The abundance of TRH-IR fibers and terminals in the DVC is paired with the presence of TRH-R expression. The initial autoradiography studies showed that TRH binding sites have the highest density within the medial column of the DMN (Manaker, Rizio 1989; Bayliss et al. 1994) (fig. 1D) where neurons contributing to the vagal efferent innervation to the stomach are most prominently localized (Powley et al. 1991; Holst et al. 1997). The subsequent cloning of G-protein coupled membrane bound proteins TRH-R subtype 1

(TRH-R1) and TRH-R2 in rodents (Gershengorn, Osman 1996) showed that only the TRH-R1 mRNA subtype is expressed in the DMN and NTS (Barnes et al. 2010). The TRH-R2 is found mainly in cortical and thalamic areas implicated in the processing of somatosensory signals (Heuer et al. 2000; O'Dowd et al. 2000).

The activation of TRH-R1 by exogenously applied TRH on *in vitro* rat brainstem slice preparations or *in vivo* results in the excitation of gastric projecting DMN neurons in rats and guinea pigs (McCann et al. 1989; Raggenbass et al. 1990; Travagli et al. 1992; Livingston, Berger 1993). This represents a direct excitatory action by TRH on DMN neurons since synaptic blockade and glutamate or muscarinic antagonists did not alter the response (McCann et al. 1989; Raggenbass et al. 1990; Travagli et al. 1992; Livingston, Berger 1993). Along with the activation of preganglionic vagal motor neurons, there is a robust increase in efferent discharges in the cervical or ventral gastric branch of the vagus evoked by TRH or the stable TRH agonist — dimethyl proline TRH (RX-77368) — injected into the cerebrospinal fluid of anesthetized rats (Somiya, Tonoue 1984; O-Lee et al. 1997). Additionally, RX-77368 injected intracisternally, at a dose that stimulates efferent activity in the gastric branch of the vagus (fig. 2A), activates 90% of submucosal and myenteric cholinergic neurons located in the gastric corpus and antrum in rats (Miamipamba et al. 2001; 2011; Yuan et al. 2005). This was demonstrated in conscious rats by double immunostaining of gastric enteric neurons with Fos, the nuclear marker of synaptic activation and PGP 9.5, a neuronal marker (Krammer et al. 1993), or peripheral acetyl cholinergic transferase (Yuan et al. 2005) (fig. 2B) that was blocked by hexamethonium (Miamipamba et al. 2001). Collectively, these data indicate that TRH injection into the brainstem increases vagal efferent outflow to the stomach leading to a nicotinic-mediated activation of gastric enteric postganglionic cholinergic neurons in rats (fig. 2).

Brainstem TRH and the stimulation of gastrointestinal function

To assess whether the endogenous TRH circuitry in the medulla oblongata plays a physiological role in the vagal activation, we used low doses of kainic acid to activate TRH synthesizing neurons located in the medullary raphe nuclei or parapyramidal region and innervating the DVC (Taché et al. 1995). This resulted in a vagal-dependent, atropine-sensitive stimulation of gastric acid and pepsin secretion, mucosal blood flow and motility mimicking the gastric responses to microinjection of TRH

or a TRH stable agonist into the DMN in rats and cats (Taché et al. 1984; Yang et al. 1993; 2000; Kaneko et al. 1998; Kiraly et al. 1998; White et al. 1991; Garrick et al. 1994). It also resulted in stimulation of pancreatic secretion (Okumura et al. 1995; Yang et al. 2002; Yoneda et al. 2005). Moreover, polyclonal TRH antibody selectively microinjected bilaterally into the DVC to neutralize endogenous TRH or antisense oligodeoxynucleotides pretreatment given intracisternally to block TRH-R1 prevented the stimulation of gastric acid secretion, motility, and blood flow induced by the microinjection of kainic acid into the Rpa, Rob or parapyramidal region (Yang et al. 1993; 2000; Kaneko, Yang, Ohning, Taché 1995; Kaneko, Kaunitz, Taché 1998; Garrick et al. 1994; Sivarao et al. 1997).

Next, we assess in rats whether the TRH-TRH-R1 signaling pathway plays a role as part of hindbrain mechanisms stimulating the vagus under conditions of central-vagally mediated gastric secretion. Martínez et al. (Martínez et al. 2002) developed a new model of gastric acid secretion in response to sham feeding induced by exposing fasted rats to sensory, visual and olfactory stimuli of smell and vision of Purina Chow without accessing to it. This induced an elevation of basal acid secretion within 10 min after the onset of sham-feeding reaching a peak increase of 130% over baseline at 20 min followed by a decline to basal levels thereafter. Moreover, the intracisternal injection of TRH-R1 antisense oligodeoxynucleotides given at doses that suppress gastric acid output stimulated by intracisternal TRH, blocked the acid response to the sight and smell of food while a TRH-R1 mismatched oligodeoxynucleotide had no effect under similar experimental conditions (Martínez et al. 2002) (fig. 3).

Of interest is also the demonstration that TRH in the brainstem induce vagal stimulation of gastric secretory and motor function can be inhibited by several peptides innervating the DVC including those that play a role in the immune (interleukin-1, tumor necrosis factor- α) or stress (corticotrophin releasing factor, urocortin 1) responses, as well as other peptides innervating the DVC through their projections from the paraventricular nucleus of the hypothalamus (gastrin releasing peptide/bombesin) or central amygdala (calcitonin gene related peptide/adrenomedullin) (Morrow et al. 1995; Hughes et al. 1984; Martínez, Taché 2000; Hermann et al. 1999; Heymann et al. 1991; Chen et al. 2002; Taché, Bonaz 2007). It may be speculated that the centrally mediated inhibitory action of these peptides may have significance to curtail the cephalic phase of digestion under conditions of infections, stress, pain or fear, although it remains to be investigated.

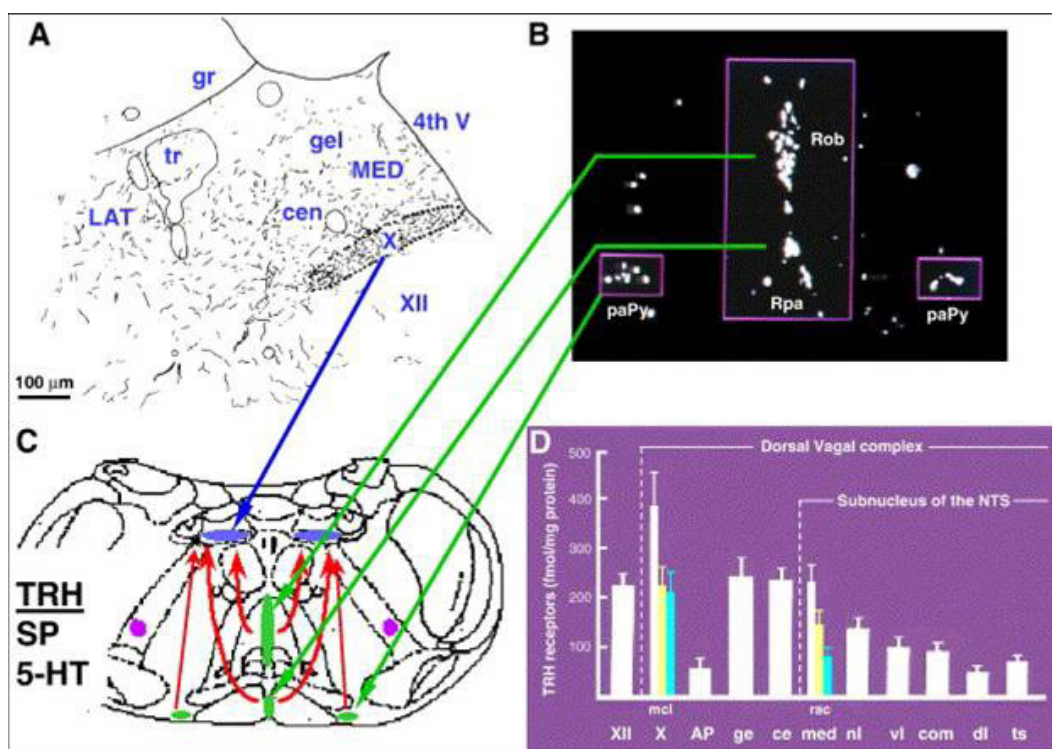
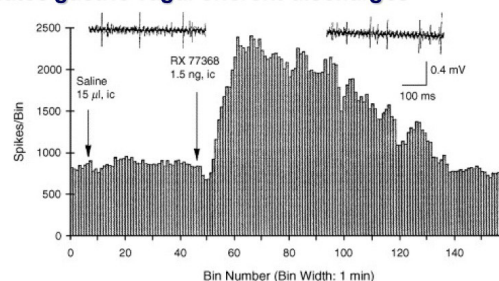


Fig. 1. TRH/TRH-R1 signaling pathways in the rat brain stem. Neuroanatomical evidence for a physiological role of brain medullary TRH. (A): Drawing of dense distribution of TRH-IR fibers in rats dorsal vagal complex (DVC) rostrocaudal to the obex. (B): TRH synthesizing neurons shown by *in situ* hybridization in the rat raphe obscurus (Rob), pallidus (Rpa) and bilateral parapyramidal nuclei (paPy). (C): Schematic representation of the rat medulla and projections of TRH synthesizing neurons to the dorsal motor nucleus. (D): High expression of TRH binding sites in the dorsal motor nucleus (X) including the medial portion projecting to the stomach

Intracisternal (ic) injection of RX 77368 (a stable TRH analog):

➤ A. Stimulates gastric vagal efferent discharges



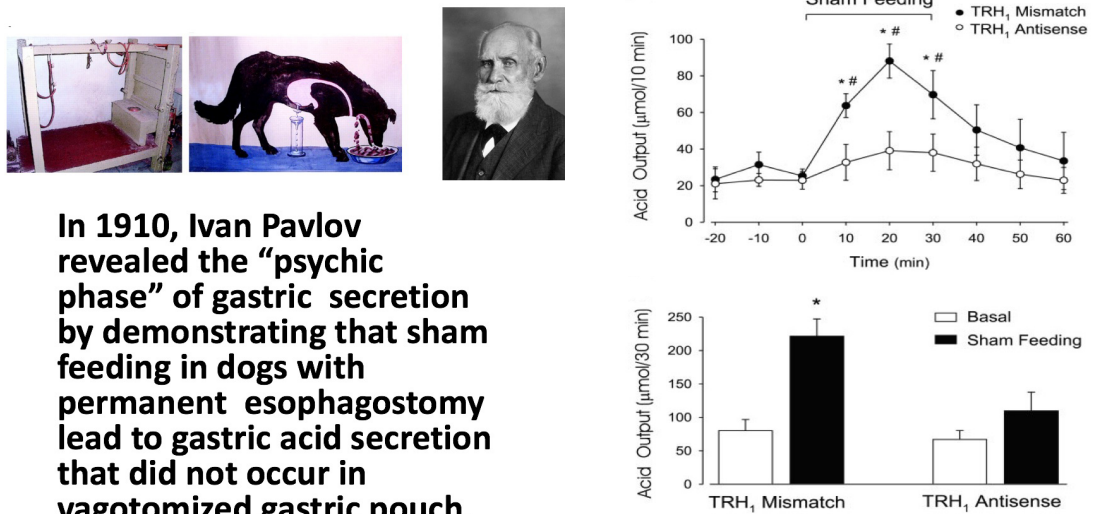
O-Lee et al. *al. Peptides* 1997; 18:3-9

➤ B. induces a vagal dependent activation of gastric cholinergic myenteric neurons



Fig. 2. Intracisternal injection of TRH analog activates efferent spike activity in the gastric branch of the vagus in urethane anesthetized rats (A) and gastric myenteric cholinergic neurons in conscious rats as showed by double labeling of Fos, a marker of neuronal activation, and peripheral acetyl cholinergic transferase as a marker of cholinergic neurons (B). (From O-Lee et al. 1997 and Yuan et al. 2005)

The cephalic phase of gastric acid secretion in rats: role of medullary TRH shown by blocking TRH-R1 synthesis



Perspectives

Convergent experimental evidence supports that TRH synthesizing neurons in medullary raphe nuclei projecting to the DVC and TRH-R1 recep-

tors in the DVC have a physiological relevance in the vagal cholinergic dependent regulation of GI and pancreatic secretion and other vagally mediated gut response during the cephalic phase (fig. 4).

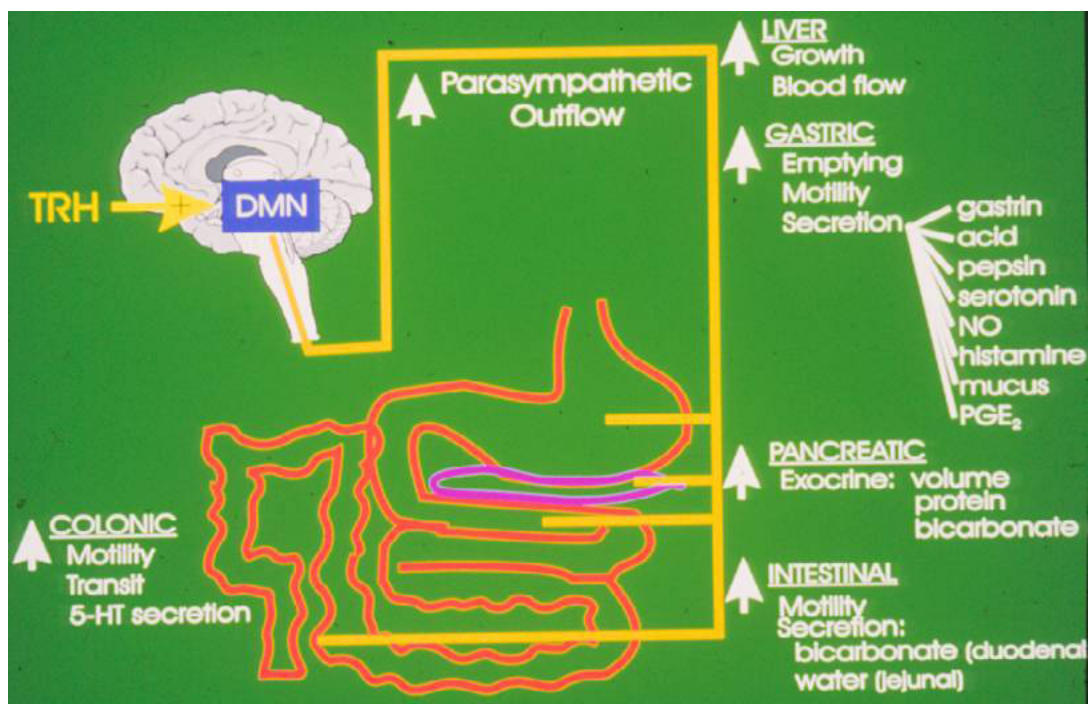


Fig. 4. Schematic representation of TRH interacting with TRH 1 receptor expressed on dorsal motor nucleus neurons as well as stimulation of gastric, pancreatic and intestinal function through the activation of vagal pathways

The DVC receives direct projections from forebrain sites including the parabrachial nucleus, mesencephalic periaqueductal gray, paraventricular and dorsomedial nucleus of the hypothalamus, lateral hypothalamus, central nucleus of amygdala, bed nucleus of stria terminalis, insular cortex, anterior cingulate cortex, and orbitofrontal cortex (Van der Kooy et al. 1984). It also gets input from gustatory afferents in the oral cavity (Van der Kooy et al. 1984). These circuits offer potential pathways by which sensory information of gustatory, olfactory, or visual nature

involved in the cephalic phase can influence neurons of the DVC. Whether the activation of TRH-TRH-R1 signaling in the brainstem represents a common final effector mechanism activated by forebrain and hindbrain neuronal circuit recruited during the cephalic phase warrant further investigations.

Conflict of interest

The author confirms that this article content has no conflict of interest.

References

- Barnes, M. J., Rogers, R. C., Van Meter, M. J., Hermann, G. E. (2010) Co-localization of TRHR1 and LepRb receptors on neurons in the hindbrain of the rat. *Brain Research*, vol. 1355, pp. 70–85. PMID: 20691166. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.07.094 (In English)
- Bayliss, D. A., Viana, F., Kanter, R. K. et al. (1994) Early postnatal development of thyrotropin-releasing hormone (TRH) expression, TRH receptor binding, and TRH responses in neurons of rat brainstem. *Journal of Neurosciences*, vol. 14, no 2, pp. 821–833. PMID: 8301363. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-02-00821.1994 (In English)
- Chen, C.-Y., Million, M., Adelson, D. W. et al. (2002) Intracisternal urocortin inhibits vagally stimulated gastric motility in rats: Role of CRF(2). *British Journal of Pharmacology*, vol. 136, no. 2, pp. 237–247. PMID: 12010772. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704713 (In English)
- DelParigi, A., Chen, K., Salbe, A. D. et al. (2005) Sensory experience of food and obesity: A positron emission tomography study of the brain regions affected by tasting a liquid meal after a prolonged fast. *Neuroimage*, vol. 24, no. 2, pp. 436–443. PMID: 15627585. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2004.08.035 (In English)
- Feldman, M., Richardson, C. T. (1986) Role of thought, sight, smell and taste of food in the cephalic phase of gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology*, vol. 90, no. 2, pp. 426–433. PMID: 3940915. DOI: 10.1016/0016-5085(86)90943-1 (In English)
- Fodor, M., Pammer, C., Görcs, T., Palkovits, M. (1994) Neuropeptides in the human dorsal vagal complex: An immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 7, no. 3, pp. 141–157. PMID: 7848571. DOI: 10.1016/0891-0618(94)90025-6 (In English)
- Garrick, T., Prince, M., Yang, H. et al. (1994) Raphe pallidus stimulation increases gastric contractility via TRH projections to the dorsal vagal complex in rats. *Brain Research*, vol. 636, no. 2, pp. 343–347. PMID: 7912160. DOI: 10.1016/0006-8993(94)91035-9 (In English)
- Gershengorn, M. C., Osman, R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiological Reviews*, vol. 76, no. 1, pp. 175–191. PMID: 8592728. DOI: 10.1152/physrev.1996.76.1.175 (In English)
- Giduck, S. A., Threatte, R. M., Kare, M. R. (1987) Cephalic reflexes: Their role in digestion and possible roles in absorption and metabolism. *The Journal of Nutrition*, vol. 117, no. 7, pp. 1191–1196. PMID: 3302135. DOI: 10.1093/jn/117.7.1191 (In English)
- Goldschmiedt, M., Redfern, J. S., Feldman, M. (1990) Food coloring and monosodium glutamate: Effects on the cephalic phase of gastric acid secretion and gastrin release in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 51, no. 5, pp. 794–797. PMID: 2333838. DOI: 10.1093/ajcn/51.5.794 (In English)
- Güemes, A., Herrero, P., Bondia, J., Georgiou, P. (2019) Modeling the effect of the cephalic phase of insulin secretion on glucose metabolism. *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 57, no. 6, pp. 1173–1186. PMID: 30685858. DOI: 10.1007/s11517-019-01950-x (In English)
- Hermann, G. E., Tovar, C. A., Rogers, R. C. (1999) Induction of endogenous tumor necrosis factor- α : Suppression of centrally stimulated gastric motility. *The American Journal of Physiology*, vol. 276, no. 1, pp. R59–R68. PMID: 9887178. DOI: 10.1152/ajpregu.1999.276.1.R59 (In English)
- Heuer, H., Schäfer, M. K., O'Donnell, D. et al. (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 428, no. 2, pp. 319–336. PMID: 11064370 (In English)
- Heymann-Mönnikes, I., Taché, Y., Trauner, M. et al. (1991) CRF microinjected into the dorsal vagal complex inhibits TRH analog- and kainic acid-stimulated gastric contractility in rats. *Brain Research*, vol. 554, no. 1–2, pp. 139–144. PMID: 1933296. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90181-t (In English)

- Holst, M. C., Kelly, J. B., Powley, T. L. (1997) Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 381, no. 1, pp. 81–100. PMID: 9087421. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19970428)381:1<81::aid-cne7>3.0.co;2-g (In English)
- Hornby, P. J., Rossiter, C. D., Kuhn, D. H. Jr. et al. Neuroactive substances in medullary nuclei that control parasympathetic outflow to the stomach. In: Y. Taché, D. L. Wingate (eds.). *Brain-gut interactions*. Boca Raton: CRC Press, pp. 23–43. (In English)
- Hughes, J. J., Levin, A. S., Morley, J. E. et al. (1984) Intraventricular calcitonin gene-related peptide inhibits gastric acid secretion. *Peptides*, vol. 5, no. 4, pp. 665–667. PMID: 6436796. DOI: 10.1016/0196-9781(84)90003-2 (In English)
- Iwase, M., Homma, I., Shioda, S., Nakai, Y. (1988) Thyrotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in rabbit medulla oblongata. *Neuroscience Letters*, vol. 92, no. 1, pp. 30–33. PMID: 3141847. DOI: 10.1016/0304-3940(88)90737-9 (In English)
- Kaneko, H., Kaunitz, J., Taché, Y. (1998) Vagal mechanisms underlying gastric protection induced by chemical activation of the raphe pallidus in rats. *The American Journal of Physiology*, vol. 275, no. 5, pp. G1056–G1062. PMID: 9815036. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.275.5.G1056 (In English)
- Kaneko, H., Yang, H., Ohning, G., Taché, Y. (1995) Medullary TRH is involved in gastric protection induced by low dose of kainic acid into the raphe pallidus. *The American Journal of Physiology*, vol. 268, no. 4, pp. G548–G552. PMID: 7733282. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.268.4.G548 (In English)
- Katschinski, M. (2000) Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses. *Appetite*, vol. 34, no. 2, pp. 189–196. PMID: 10744909. DOI: 10.1006/appe.1999.0280 (In English)
- Katschinski, M., Dahmen, G., Reinshagen, M. et al. (1992) Cephalic stimulation of gastrointestinal secretory and motor responses in humans. *Gastroenterology*, vol. 103, no. 2, pp. 383–391. PMID: 1634057. DOI: 10.1016/0016-5085(92)90825-j (In English)
- Király, A., Sütő, G., Guth, P. H., Taché, Y. (1998) Peripheral mediators involved in gastric hyperemia to vagal activation by central TRH analog in rats. *The American Journal of Physiology*, vol. 274, no. 1, pp. G170–G177. PMID: 9458786. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.274.1.G170 (In English)
- Kovacs, T. O., Lloyd, K. C., Lawson, D. C. et al. (1997) Inhibition of sham feeding-stimulated acid secretion in dogs by immunoneutralization of gastrin. *The American Journal of Physiology*, vol. 273, no. 2, pp. G399–G403. PMID: 9277419. DOI: 10.1152/ajpgi.1997.273.2.G399 (In English)
- Krammer, H. J., Karahan, S. T., Rumpel, E. et al. (1993) Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. *Anatomischer Anzeiger*, vol. 175, no. 4, pp. 321–325. PMID: 8363037. DOI: 10.1016/s0940-9602(11)80029-4 (In English)
- Livingston, C. A., Berger, A. J. (1993) Response of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus to thyrotropin-releasing hormone. *Brain Research*, vol. 621, no. 1, pp. 97–105. PMID: 8221078. DOI: 10.1016/0006-8993(93)90302-4 (In English)
- Lynn, R. B., Kreider, M. S., Miselis, R. R. (1991) Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive projections to the dorsal motor nucleus and the nucleus of the solitary tract of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 311, no. 2, pp. 271–288. PMID: 1753019. DOI: 10.1002/cne.903110208 (In English)
- Manaker, S., Rizio, G. (1989) Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone and substance P receptors in the rat dorsal vagal complex. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 290, no. 4, pp. 516–526. PMID: 2559109. DOI: 10.1002/cne.902900406 (In English)
- Martínez, V., Barrachina, M. D., Ohning, G., Taché, Y. (2002) Cephalic phase of acid secretion involves activation of medullary TRH receptor subtype 1 in rats. *American Journal of Physiology*, vol. 283, no. 6, pp. G1310–G1319. PMID: 12388176. DOI: 10.1152/ajpgi.00222.2002 (In English)
- Martínez, V., Taché, Y. (2000) Bombesin and the brain-gut axis. *Peptides*, vol. 21, no. 11, pp. 1617–1625. PMID: 11090915. DOI: 10.1016/s0196-9781(00)00293-x (In English)
- Mattes, R. D. (1997) Physiologic responses to sensory stimulation by food: Nutritional implications. *Journal of American Dietetic Association*, vol. 97, no. 4, pp. 406–413. DOI: 10.1016/S0002-8223(97)00101-6 (In English)
- McCann, M. J., Hermann, G. E., Rogers, R. C. (1989) Thyrotropin-releasing hormone: Effects on identified neurons of the dorsal vagal complex. *Journal of Autonomic Nervous System*, vol. 26, no. 2, pp. 107–112. PMID: 2498419. DOI: 10.1016/0165-1838(89)90158-6 (In English)
- Miampamba, M., Million, M., Taché, Y. (2011) Brain-gut interactions between central vagal activation and abdominal surgery to influence gastric myenteric ganglia Fos expression in rats. *Peptides*, vol. 32, no. 5, pp. 1078–1082. PMID: 21376096. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.02.018 (In English)
- Miampamba, M., Yang, H., Sharkey, K. A., Taché, Y. (2001) Intracisternal TRH analog induces Fos expression in gastric myenteric neurons and glia in conscious rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 280, no. 5, pp. G979–G991. PMID: 11292608. DOI: 10.1152/ajpgi.2001.280.5.G979 (In English)
- Morrow, N. S., Quinonez, G., Weiner, H. et al. (1995) Interleukin-1 beta in the dorsal vagal complex inhibits TRH analogue-induced stimulation of gastric contractility. *The American Journal of Physiology*, vol. 269, no. 2, pp. G196–G202. PMID: 7653558. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.269.2.G196 (In English)

- O'Dowd, B. F., Lee, D. K., Huang, W. et al. (2000) TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology*, vol. 14, no. 1, pp. 183–193. PMID: 10628757. DOI: 10.1210/mend.14.1.0407 (In English)
- Ohara, I., Otsuka, S., Yugari, Y. (1988) Cephalic phase response of pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *The American Journal of Physiology*, vol. 254, no. 3, pp. G424–G428. PMID: 3348407. DOI: 10.1152/ajpgi.1988.254.3.G424 (In English)
- Okumura, T., Taylor, I. L., Pappas, T. N. (1995) Microinjection of TRH analogue into the dorsal vagal complex stimulates pancreatic secretion in rats. *American Journal of Physiology*, vol. 269, no. 3, pp. G328–G334. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.269.3.G328 (In English)
- O-Lee, T. J., Wei, J. Y., Taché, Y. (1997) Intracisternal TRH and RX 77368 potently activate vagal efferent discharge in rats. *Peptides*, vol. 18, no. 2, pp. 213–219. PMID: 9149293. DOI: 10.1016/s0196-9781(96)00281-1 (In English)
- Pavlov, I. P. (1910) *The work of the digestive glands*. 2nd ed. London: C. Griffin & Company limited, 266 p. (In English)
- Power, M. L., Schulkin, J. (2008) Anticipatory physiological regulation in feeding biology: Cephalic phase responses. *Appetite*, vol. 50, no. 2–3, pp. 194–206. PMID: 18045735. DOI: 10.1016/j.appet.2007.10.006 (In English)
- Powley, T. L. (2000) Vagal circuitry mediating cephalic-phase responses to food. *Appetite*, vol. 34, no. 2, pp. 184–188. PMID: 10744908. DOI: 10.1006/appe.1999.0279 (In English)
- Powley, T. L., Berthou, H.-R., Precht, J. C., Fox, A. E. (1991) Fibers of the vagus regulating gastrointestinal function. In: Y. Taché, D. Wingate (eds.). *Brain-gut interactions*. Boca Raton: CRC Press, pp. 73–82. (In English)
- Raggenbass, M., Vozzi, C., Tribollet, E. et al. (1990) Thyrotropin-releasing hormone causes direct excitation of dorsal vagal and solitary tract neurones in rat brainstem slices. *Brain Research*, vol. 530, no. 1, pp. 85–90. PMID: 2125519. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90659-y (In English)
- Rinaman, L., Miselis, R. R. (1990) Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive nerve terminals synapse on the dendrites of gastric vagal motoneurons in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 294, no. 2, pp. 235–251. PMID: 2110196. DOI: 10.1002/cne.902940208 (In English)
- Rinaman, L., Miselis, R. R., Kreider, M. S. (1989) Ultrastructural localization of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the dorsal vagal complex in rat. *Neuroscience Letters*, vol. 104, no. 1–2, pp. 7–12. PMID: 2510095. DOI: 10.1016/0304-3940(89)90320-0 (In English)
- Rindi, G., Leiter, A. B., Kopin, A. S. et al. (2004) The “normal” endocrine cell of the gut: Changing concepts and new evidences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1014, pp. 1–12. PMID: 15153415. DOI: 10.1196/annals.1294.001 (In English)
- Rogers, J., Raimundo, A. H., Misiewicz, J. J. (1993) Cephalic phase of colonic pressure response to food. *Gut*, vol. 34, no. 4, pp. 537–543. PMID: 8491403. DOI: 10.1136/gut.34.4.537 (In English)
- Simonian, H. P., Kresge, K. M., Boden, G. H., Parkman, H. P. (2005) Differential effects of sham feeding and meal ingestion on ghrelin and pancreatic polypeptide levels: Evidence for vagal efferent stimulation mediating ghrelin release. *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 17, no. 3, pp. 348–354. PMID: 15916622. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2004.00634.x (In English)
- Sivarao, D. V., Krowicki, Z. K., Abrahams, T. P., Hornby, P. J. (1997) Intracisternal antisense oligonucleotides to TRH receptor abolish TRH-evoked gastric motor excitation. *The American Journal of Physiology*, vol. 272, no. 6, pp. G1372–G1381. PMID: 9227472. DOI: 10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1372 (In English)
- Smeets, P. A. M., Erkner, A., de Graaf, C. (2010) Cephalic phase responses and appetite. *Nutrition Reviews*, vol. 68, no. 11, pp. 643–655. PMID: 20961295. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00334.x (In English)
- Sobhani, I., Buyse, M., Gojot, H. et al. (2002) Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. *Gastroenterology*, vol. 122, no. 2, pp. 259–263. PMID: 11832440. DOI: 10.1053/gast.2002.31385 (In English)
- Somiya, H., Tonoue, T. (1984) Neuropeptides as central integrators of autonomic nerve activity: Effects of TRH, SRIF, VIP and bombesin on gastric and adrenal nerves. *Regulatory Peptides*, vol. 9, no. 1–2, pp. 47–52. PMID: 6150518. DOI: 10.1016/0167-0115(84)90006-5 (In English)
- Taché, Y., Adelson, D., Yang, H. (2014) TRH/TRH-R1 receptor signaling in the brain medulla as a pathway of vagally mediated gut responses during the cephalic phase. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, no. 16, pp. 2725–2730. PMID: 23886382. DOI: 10.2174/13816128113199990578 (In English)
- Taché, Y., Bonaz, B. (2007) Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 1, pp. 33–40. PMID: 17200704. DOI: 10.1172/JCI30085 (In English)
- Taché, Y., Goto, Y., Hamel, D. et al. (1985) Mechanisms underlying intracisternal TRH-induced stimulation of gastric acid secretion in rats. *Regulatory Peptides*, vol. 13, no. 1, pp. 21–30. PMID: 3937184. DOI: 10.1016/0167-0115(85)90083-7 (In English)
- Taché, Y., Goto, Y., Lauffenburger, M., Lesiege, D. (1984) Potent central nervous system action of p-Glu-His-(3,3'-dimethyl)-Pro NH₂, a stabilized analog of TRH, to stimulate gastric secretion in rats. *Regulatory Peptides*, vol. 8, no. 1, pp. 71–78. DOI: 10.1016/0167-0115(84)90030-2 (In English)
- Taché, Y., Stephens, R. L., Ishikawa, T. (1989) Central nervous system action of TRH to influence gastrointestinal function and ulceration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 553, pp. 269–285. PMID: 2497674. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb46649.x (In English)

- Taché, Y., Vale, W., Brown, M. (1980) Thyrotropin-releasing hormone-CNS action to stimulate gastric acid secretion. *Nature*, vol. 287, no. 5778, pp. 149–151. PMID: 6776408. DOI: 10.1038/287149a0 (In English)
- Taché, Y., Vale, W., Rivier J., Brown, M. (1981) Brain regulation of gastric acid secretion in rats by neurogastrointestinal peptides. *Peptides*, vol. 2, suppl. 2, pp. 51–55. PMID: 6123991. DOI: 10.1016/0196-9781(81)90010-3 (In English)
- Taché, Y., Yang, H., Kaneko, H. (1995) Caudal raphe-dorsal vagal complex peptidergic projections: Role in gastric vagal control. *Peptides*, vol. 16, no. 3, pp. 431–435. PMID: 7544464. DOI: 10.1016/0196-9781(94)00212-o (In English)
- Taché, Y., Yang, H., Miampamba, M. et al. (2006) Role of brainstem TRH/TRH-R1 receptors in the vagal gastric cholinergic response to various stimuli including sham-feeding. *Autonomic Neurosciences: Basic and Clinical*, vol. 125, no. 1–2, pp. 42–52. PMID: 16520096. DOI: 10.1016/j.autneu.2006.01.014 (In English)
- Taché, Y., Yang, H., Yoneda, M. (1993) Vagal regulation of gastric function involves thyrotropin-releasing hormone in the medullary raphe nuclei and dorsal vagal complex. *Digestion*, vol. 54, no. 2, pp. 65–72. PMID: 8319841. DOI: 10.1159/000201015 (In English)
- Travagli, R. A., Gillis, R. A., Vicini, S. (1992) Effects of thyrotropin-releasing hormone on neurons in the rat dorsal motor nucleus of the vagus, in vitro. *The American Journal of Physiology*, vol. 263, no. 4, pp. G508–G517. PMID: 1329553. DOI: 10.1152/ajpgi.1992.263.4.G508 (In English)
- Van der Kooy, D., Koda, L. Y., McGinty, J. F. et al. (1984) The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 224, no. 1, pp. 1–24. PMID: 6715573. DOI: 10.1002/cne.902240102 (In English)
- White, R. L. Jr., Rossiter, C. D., Hornby, P. J. et al. (1991) Excitation of neurons in the medullary raphe increases gastric acid and pepsin production in cats. *The American Journal of Physiology*, vol. 260, no. 1, pp. G91–G96. PMID: 1899009. DOI: 10.1152/ajpgi.1991.260.1.G91 (In English)
- Yang, H., Ohning, G., Taché, Y. (1993) TRH in dorsal vagal complex mediates acid response to excitation of raphe pallidus neurons in rats. *The American Journal of Physiology*, vol. 265, no. 5, pp. G880–G886. PMID: 8238517. DOI: 10.1152/ajpgi.1993.265.5.G880 (In English)
- Yang, H., Taché, Y., Ohning, G., Go, V. L. W. (2002) Activation of raphe pallidus neurons increases insulin through medullary thyrotropin-releasing hormone (TRH)-vagal pathways. *Pancreas*, vol. 25, no. 3, pp. 301–307. PMID: 12370543. DOI: 10.1097/00006676-200210000-00014 (In English)
- Yang, H., Yuan, P.-Q., Wang, L., Taché, Y. (2000) Activation of the parapyramidal region in the ventral medulla stimulates gastric acid secretion through vagal pathways in rats. *Neuroscience*, vol. 95, no. 3, pp. 773–779. PMID: 10670444. DOI: 10.1016/s0306-4522(99)00490-x (In English)
- Yoneda, M., Goto, M., Nakamura, K. et al. (2005) Thyrotropin-releasing hormone in the dorsal vagal complex stimulates pancreatic blood flow in rat. *Regulatory Peptides*, vol. 131, no. 1–3, pp. 74–81. PMID: 16040141. DOI: 10.1016/j.regpep.2005.06.010 (In English)
- Yuan, P.-Q., Kimura, H., Million, M. et al. (2005) Central vagal stimulation activates enteric cholinergic neurons in the stomach and VIP neurons in the duodenum in conscious rats. *Peptides*, vol. 26, no. 4, pp. 653–664. PMID: 15752581. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.11.015 (In English)
- Zafra, M. A., Molina, F., Puerto, A. (2006) The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 30, no. 7, pp. 1032–1044. PMID: 16678262. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.03.005 (In English)

Переливание крови: начало

Е. А. Никитина^{✉1, 2}

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,
191186, Россия, Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48

² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторе

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

Для цитирования:

Никитина, Е. А. (2020) Переливание
крови: начало. *Интегративная
физиология*, т. 1, № 3, с. 169–180.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-
169-180

Получена 23 февраля 2020; прошла
рецензирование 11 марта 2020;
принята 11 марта 2020.

Права: © Автор (2020).

Опубликовано Российским
государственным педагогическим
университетом им. А. И. Герцена.
Открытый доступ на условиях
лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Переливание крови, то есть перенос крови из кровотока одного человека другому в терапевтических целях, возникло относительно недавно. Однако история переливания крови начинается еще в древнейшие времена. Ранняя история использования крови в лечебных целях связана с приданием ей мистических свойств. Кровопускание широко практиковалось с IV века до н. э. и было основано на предположении Гиппократов, что болезнь может быть вызвана дисбалансом между четырьмя основными жидкостями тела. Хотя в Античности и Средневековье известно несколько описаний «переливаний крови», но путь к практическим попыткам гемотрансфузии проложила теория кровообращения Уильяма Гарвея (1628 г.) и работы Кристофера Рена и Роберта Бойля. Первое переливание крови от животного животному осуществил Ричард Лоуэр в 1665 г., в то время как Жан Батист Дени в 1667 г. провел первое переливание крови от животных человеку. Одновременно с работами Ричарда Лоуэра в Англии и Жана Батиста Дени во Франции, подобные эксперименты проводили и в других странах. Практическое переливание крови во многих случаях являлось следствием развития других наук. В этом обзоре кратко изложены основные аспекты ранней истории переливания крови.

Ключевые слова: кровообращение, переливание крови, история физиологии, Уильям Гарвей, Ричард Лоуэр, Жан Батист Дени.

Blood transfusion: The beginning

Е. А. Nikitina^{✉1, 2}

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika River Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

² Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb.,
Saint Petersburg 199034, Russia

Abstract. Blood transfusion, that is the transference of blood from the circulation of one individual to that of another for practical therapeutic purposes, is of relatively recent origin. However, the history of blood transfusion dates back to ancient times. The early history of the use of blood for medical purposes is associated with mystical properties attached to it in those days. Blood-letting has been widely practiced since the 4th century BC and was based on Hippocrates' precept that illnesses originated in an imbalance of the four humors that constitute living matter. Although there are a number of descriptions of "blood infusion" in Antiquity and the Middle Ages, it was the publication of the discovery of the circulation of blood in 1628 by William Harvey and the work of Christopher Wren and Robert Boyle that paved the way to the possible practical attempts at actual blood transfusion.

Author

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

For citation: Nikitina, E. A. (2020) Blood transfusion: The beginning. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 169–180. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-169-180

Received 23 February 2020; reviewed 11 March 2020; accepted 11 March 2020.

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

The first blood transfusion from an animal to an animal was performed by Richard Lower in 1665, while Jean Baptiste Denis in 1667 carried out the first blood transfusion from animals to humans. At the same time similar experiments were carried out in other countries. Practical blood transfusion in many instances was the consequence of developments in other sciences. This review summarises some of the major aspects relating to the early history of blood transfusion.

Keywords: circulation, blood transfusion, history of physiology, William Harvey, Richard Lower, Jean-Baptiste Denis.

От античности до Уильяма Гарвея

История переливания крови своими корнями уходит вглубь веков. Люди издавна оценили значение крови для жизнедеятельности организма, и первые мысли о применении крови с лечебной целью появились задолго до нашей эры. В древности в крови видели источник жизненной силы и с ее помощью искали исцеления от тяжелых болезней. Значительная кровопотеря служила причиной смерти, что неоднократно подтверждалось в ходе войн и стихийных бедствий. Все это способствовало возникновению идеи о перемещении крови из одного организма в другой (Никитина 2012).

Имеются сведения об использовании крови в ритуалах различных культур как источника жизненной силы. Есть упоминания, что еще во время древнеегипетских войн за войсками гнали стада баранов для использования их крови при лечении раненых воинов. В древности были попытки использовать кровь для лечения различных заболеваний. Применяемая для лечения кровь употреблялась внутрь. Древние норвежцы пили кровь тюленей и китов как лекарство от эпилепсии и цинги (Learoyd 2012).

Кровопускание с помощью игл для освобождения от злых духов описано в китайских медицинских текстах IV века до н. э. Использование кровопускания в медицине независимо появляется в разных культурах по всему миру (Schmidt, Ness 2006).

Аристотель (384–322 до н. э.) считал, что сердце является центром физиологического механизма, местом души и источником всех кровеносных сосудов (Aird 2011). Гиппократ (460–370 до н. э.) полагал, что тело состоит из четырех жидкостей (черная желчь, желтая желчь, мокрота и кровь),

а здоровье связано с балансом этих жидкостей. В случае болезни врач должен устранить дисбаланс тканевых жидкостей, в том числе путем кровопускания (Yarujakis 2009). Кровопускания и диета влияют также и на характер.

Все это нашло отражение и в классических литературных произведениях. Одиссей у Гомера давал пить кровь теням подземного царства, чтобы вернуть им речь и сознание. Мифы Гомера и медицину Гиппократ объединяет представление о жизненной силе крови. В обоих случаях кровь — точка жизненного пересечения между внешней средой и внутренней личностью (Pelis 1997).

Подобные примеры приводит и Публий Овидий (43 до н. э. — 17/18 н. э.) в 15-томном каталоге греческой и римской мифологии «Метаморфозы». В 7 книге Овидий описывает, как Медея, жена Ясона, омоложила своего свекра Эсона, влив в его вены эликсир (Learoyd 2012). После того как Медею удалось вернуть молодость Эсону, она решила, составив коварный план, отомстить старому Пелию за то, что он обманул Ясона. Она убеждает дочерей Пелия убить своего отца, чтобы омоложить его (рис. 1).

Римский философ Плиний старший (23–79) в книге «*Naturae Historiae*» описывает, как зрители бросались на арену пить кровь умирающих гладиаторов, желая получить их храбрость (Learoyd 2012).

Гален (129 (131) — ок. 200) советовал пить кровь собак как лекарство от бешенства (Learoyd 2012). Он на основе обнаружения на трупах недоношенных младенцев овального отверстия в межжелудочковой перегородке, а также отсутствия крови в левом сердце и артериях (следствие острой смерти животных и гладиаторов) создал по существу первую в истории науки концепцию



Рис. 1. Медея убеждает дочерей Пелия убить его. Гравюра Антонио Темпеста для серии «Метаморфозы» Овидия, л. 65. Амстердам, 1606 (URL: <https://collections.lacma.org/node/234482>)

Fig. 1. Medea Urging the Daughters of King Pelias to Murder their Father. Antonio Tempesta's etching for Ovid's "The Metamorphoses", plate 65. Amsterdam, 1606 (available at: <https://collections.lacma.org/node/234482>)

о движении крови. Согласно этой концепции, центр кровообращения — печень, ею вырабатывается кровь из материала, всасывающегося после приема пищи (хилус). Из печени кровь попадает в правое сердце, из которого разносится по всему телу и поглощается тканями. Небольшая часть крови через межжелудочковую перегородку попадает в левое сердце для питания «пневмы», наполняющей артерии. Как таковое движение крови было отнесено к теории питания (Aird 2011).

После падения Римской империи длительный период времени практически не происходило приобретения нового знания посредством экспериментирования. На протяжении всего Средневековья считалось, что физические и психические заболевания есть результат «плохих соков» или ядов в крови, удаление которых излечит пациента. Это достигалось путем кровопусканий, которые широко практиковались в то время, что отражено, в частности, в «Книге Пиявки», написанной в X веке на англо-саксонском языке. Центрами здравоохранения по всей Европе становятся монастыри, где осуществляли кровопускания, удаление зубов и мелкие операции (Schmidt, Ness 2006).

В XII веке, впервые начиная с Античности, вскрытие животных было возрождено в Салерно. Вскрытие человеческих тел возобновляется в конце XIII века в Болонском университете. Следующие два века цель вскрытий состояла

не в том, чтобы проводить исследования, а скорее в изучении и преподавании работ Галена. В 1400-х гг. Ренессанс в Италии провозгласил начало новой эры в истории естественных наук (Aird 2011).

История переливания крови в эти годы также крайне бедна на события и факты. Есть лишь разрозненные и не всегда достоверные упоминания о единичных попытках в этом направлении. Итальянский историк Паскуале Виллари (1827–1917) описывает необычный факт о «переливании» крови, произведенном папе Иннокентию VIII для лечения и омоложения (1492 г.) (Sturgis 1942). Состояние здоровья папы Иннокентия VIII (1432–1492) в последние годы жизни было крайне тяжелым, в 1488 г. он перенес инсульт. Врач Авраам Мейр перелил Папе Римскому кровь трех мальчиков десяти лет. Этот эксперимент был повторен трижды, но закончился печально: дети погибли от кровопотери, а Папа 25 июля 1492 г. скончался от болезни и старости (Lindeboom 1954).

Возрождение экспериментальных изысканий в 1500-х гг. привело к тому, что исследователи вплотную приблизились к переливанию крови. Упоминание о переливании крови имеется в трудах А. Либавия (1540–1616), опубликованных в 1615 г., где он описывает процедуру переливания крови с помощью серебряной канюли от артерии к артерии, но не утверждает, что проводил ее (Chandler et al. 2012; Learoyd 2012). Подобные эксперименты также приписывают итальянскому врачу Дж. Кардано (1501–1576), однако нет документированных подтверждающих данных.

Уильям Гарвей — создатель теории кровообращения и роль его идей

Идеи о циркуляции крови высказывались и до Гарвея. Арабский врач Ибн ан-Нафис (1213–1288) описал легочный кровоток, а также капиллярное и коронарное кровообращение в книге «Комментарий к анатомии» (1242), содержащей много анатомических открытий. Он писал, что кровь из правой камеры сердца должна прибыть в левую камеру, проходя через легкие, где она смешивается с воздухом. Это открытие опровергало теорию Галена, но в Европе его труды были практически неизвестны (Learoyd 2012).

Мысль о циркуляции крови в организме высказывал и испанский врач Мигель Сервет (1511–1553), который в 1553 г. выдвинул идею о существовании малого круга кровообращения. Его книга «Christianismi Restitutio» была уничтожена, а сам он признан еретиком и сожжен на костре инквизиции (Aird 2011).

Итальянский хирург Маттео Реальдо Коломбо (1516–1559), ученик Везалия, также предложил теорию о малом круге кровообращения (Eknoyan, De Santo 1997), что отражено в блистательной книге «De Re Anatomica», опубликованной в 1559 г. уже после его смерти. Эта книга была переведена на английский язык в 1578 г. и на немецкий в 1609 г., широко использовалась в качестве учебника по анатомии (рис. 2). Сам Коломбо был приглашен Козимо Медичи преподавать в Пизанском университете. Наблюдения Коломбо впоследствии были оценены Гарвеем.

Но, в отличие от своих предшественников, Гарвей впервые сформулировал теорию кровообращения и привел ее экспериментальные доказательства. И новый этап в истории переливания крови связан именно с открытием Уильямом Гарвеем (1578–1657) двух кругов кровообращения. Во времена Гарвея в Англии было мало возможностей для изучения медицины. Преподавание в лондонском Колледже врачей сводилось к обучению основам анатомии и простейшим хирургическим процедурам. Поэтому неудивительно, что некоторые из наиболее предприимчивых молодых людей отправлялись в медицинские школы на континенте,



Рис. 2. Титульная страница «De Re Anatomica» (Eknoyan, De Santo 1997)

Fig. 2. Title page of “De Re Anatomica” (Eknoyan, De Santo 1997)

во Франции или Италии. Андро Скотт, хирург Джеймса VI, был в Париже вместе с Питером Лоу за несколько лет до того, как Гарвей отправился в Италию. В конце XVI века французская и итальянская школы оказались на пике своей славы. Париж, Рим и Падуя славились преподаванием анатомии. Наибольшую известность Падуе принес Везалий и его преемники. Именно в Падую в 1597 г. в возрасте девятнадцати лет отправился учиться Гарвей. Четыре года, проведенные в Падуе, и обучение у Джироламо Фабрицио д’Аквапенденте оказали решающее влияние на формирование взглядов Уильяма Гарвея. В 1602 г. он возвращается в Лондон, где уделяет очень много времени экспериментам на животных, которые в конечном итоге подтвердили правильность его теорий. Когда Гарвей был избран лектором Ламлианских чтений в 1615 г. в возрасте тридцати шести лет, он стал сразу самым влиятельным учителем анатомии своего времени. Именно на одной из ранних лекций в 1616 г. он впервые упомянул о своих представлениях о циркуляции крови (Graham 1953).

В 1628 г. он публикует 72-страничную книгу «Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus» («Анатомическое исследование о движении сердца и крови у животных»), где окончательно отверг «приливно-отливную» схему движения крови Галена и описал замкнутую систему кровообращения с ее малым и большим кругом (рис. 3).

В предисловии к русскому переводу произведения английского ученого выдающийся физиолог Иван Петрович Павлов написал: «Труд Гарвея не только редкой ценности плод его ума, но и подвиг его смелости и самоотвержения». Он говорил, что Гарвей своим доказательством кровообращения заложил фундамент нового направления науки — физиологии животных.

С этого момента благодаря правильному пониманию принципов движения крови в живом организме влияние лечебных растворов и переливание крови получило анатомо-физиологическое обоснование (Ribatti 2009). В 1628 г. Джованни Колле, профессор Университета Падуи писал о переливании крови как возможном методе продления жизни, хотя нет никаких доказательств, что он пытался сделать переливание на практике (Maluf 1954).

Френсис Поттер (1594–1678), бывший викарием Килмартона в Сомерсете, в 1639 г. высказал мысль о переливании крови от одного человека другому для лечения. В декабре 1652 г. Поттер в письме Джону Обери описывает процедуру переливания крови двум курицам:



Рис. 3. Титульная страница «Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus»
(по: Auffray, Noble 2009)

Fig. 3. Title page of “Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus”
(Auffray, Noble 2009)

«Я пока разочарован (но это результат моей собственной неопытности, так как я никогда не делал этого ранее), не получается, хотя я много раз пытался рассечь вену. Я приготовил небольшой прозрачный сосуд из зоба, прикрепил трубку из слоновой кости к шее одной из них [куриц] и поместил ее в вену нижнего сустава ноги, и все же я не могу получить больше 2–3 капель крови» (Leaoyd 2012).

Поттер сообщал о нескольких модификациях своего аппарата для переливания, но нет письменных доказательств, что он действительно использовал аппарат на практике.

В 1654 г. врач Франческо Фолли (1624–1685) из местечка Поппи в Италии предложил герцогу Тосканскому Фердинанду II производить переливание крови с помощью серебряных или золотых канюль. Идея не впечатлила герцога, и вскоре после этого Фолли был удален в маленький городок Ситернэл вне герцогских областей, где вел столь изолированную жизнь, что даже не знал о фактах переливания крови Лоуэром в Англии и Дени во Франции. Однако в 1680 г. Фолли внезапно предъявляет права на приоритет как первооткрыватель переливания крови.

Фолли не имел намерения лечить заболевания переливанием. Его метод был разработан для омоложения пожилых людей. Он выдвинул идею «обменного переливания», при котором вся кровь в теле реципиента постепенно заменялась бы кровью 20 молодых доноров путем ежедневных переливаний. Но экспериментально Фолли никогда переливания не производил, его идеи были исключительно умозрительными. Несомненной заслугой Фолли является описание аппарата, с помощью которого прямое переливание крови могло быть выполнено. Он изображает канюлю из золота или серебра, введенную в локтевую вену реципиента и соединенную с трубкой из кишечника кошки, собаки или зайца либо из артерии козы. На другом конце трубка соединяется с маленьким костяным рас-трубом, присоединенном к руке донора таким способом, чтобы в него поступала кровь из надреза вены. Фолли указывал на необходимость избегать попадания воздуха и предлагал способствовать продвижению крови по трубке проталкиванием пальцами. Кроме того, он говорил о преимуществе внутривенного введения лекарств по сравнению с пероральным. В этой связи совершенно заслуженным выглядит тот факт, что в 1936 г. участники I Международного конгресса по переливанию крови отдали должное идеям Фолли и прикрепили мемориальную доску на доме в Казентино, где он родился (Gilder 1954).

В 1658 г. монах-бенедиктинец Роберт де Габез описал так называемое «общение» крови, под которым он понимал «эффективное прохождение крови здорового человека или другого животного по венам слабого или больного человека» и утверждал, что 7 годами ранее монах Элой Пичо сконструировал для этой цели аппарат из двух маленьких серебряных трубок.

Самые ранние инъекции в кровотоки приписывают немцу Георгу фон Варендорфу, который в 1642 г. для лечения больных охотничьих собак впрыскивал в их вены вино, используя для этого мелкие кости птиц (Maluf 1954). Также имеются сведения, что в Германии в 1664 г. Иоганн Даниель Майор (1634–1693) применял лекарства внутривенно, а возможно, и осуществлял переливание крови, используя серебряный цилиндр с канюлей (Maluf 1954).

Восторженно встретили учение Гарвея в Англии участники так называемого «Оксфордского экспериментального философского клуба». В эту исследовательскую группу, которой руководил Роберт Бойль (1627–1691), входили Ричард Лоуэр (1631–1691), Томас Уиллис (1621–1675),

Уильям Петти (1623–1687), Кристофер Рэн (1632–1723), Джон Локк (1632–1704), Джон Мейоу (1643–1679), Роберт Гук (1635–1703) и многие другие. Участники клуба в своих экспериментах стремились к дальнейшему развитию теории кровообращения. А с 1656 г. основным объектом их исследований стала кровь.

В этот период в активе «Оксфордского клуба» уже были первые в мире документированные внутривенные вливания, выполненные Кристофером Реном (Weaver 1923). Диапазон его интересов был феноменально широк. Записки Королевского научного общества свидетельствуют, что научная работа Рена включала труды по механике, архитектуре, инженерному делу, астрономии, оптике, метеорологии, микроскопии, медицине и анатомии. Большое влияние на формирование его естественно-научных взглядов оказала теория кровообращения Гарвея. Циркуляция крови привлекала внимание Кристофера Рена на протяжении всей жизни. Около 1656 г. он начал проводить эксперименты по внутривенным введениям собакам настойки опия, пива, вина, эля, молока и т. д. Изобретение Реном внутривенной терапии имело колоссальное значение для хирургической практики. В письме сэру Уильяму Петти Рен дает краткое описание своих экспериментов, подчеркивая их клиническое значение. Он пишет: «Самый значительный эксперимент, проделанный мной в последнее время, таков: я влил вино и эль в кровоток живой собаки, в вену, достаточно много, пока она не стала крайне пьяна; но вскоре после этого они вышли с мочой. Слишком долго рассказывать о последствиях опиума, который я вводил таким же образом. Я стремлюсь к продолжению этого эксперимента, который прольет свет на теорию и практику врачевания» (Gibson 1970).

В качестве инъекционной иглы К. Рен использовал птичье перо, а вместо шприца пузыри рыб и животных (Weaver 1923). Таким образом, знаменитого английского архитектора Кристофера Рена можно причислить к основоположникам современной инфузионной терапии и внутривенного наркоза (Gibson 1970).

Первые эксперименты по переливанию крови

Первое официально зарегистрированное переливание крови животным осуществлено англичанином Ричардом Лоуэром. С начала 1662 г. он приступил к участию в экспериментах по внутривенным вливаниям, адаптировав технику проведения эксперимента Кристофера

Рена. Он работал совместно с Томасом Уиллисом. Вскоре у Лоуэра родилась идея: перелить кровь от одного живого организма другому, о чем впервые упоминается в его письме Роберту Бойлю в июне 1664 г. Лоуэр изначально планировал провести два разных эксперимента. Суть одного эксперимента, проведенного уже в августе 1665 г., заключалась в переливании крови от большой собаки (мастифа) к маленькой собаке и в последующем наблюдении, будет ли четвероногий реципиент обладать той же силой, что и донор. Он рассек сонную артерию собаки, пустив ей кровь, пока от кровопотери собака не оказалась на грани гибели. А затем при помощи серебряных канюль соединил яремную вену собаки-реципиента и сонную артерию собаки-донора, осуществив таким образом прямое переливание. Разумеется, опыт не подтвердил возможность передачи силы с помощью гемотрансфузии, но зато состоялся факт первого документированного переливания крови от одного животного другому. Результаты этих исследований были опубликованы в 1666 г. в «Философских трудах Лондонского Королевского общества». В книге Ричарда Лоуэра «Tractatus de Corde» (1669) (рис. 4) содержится

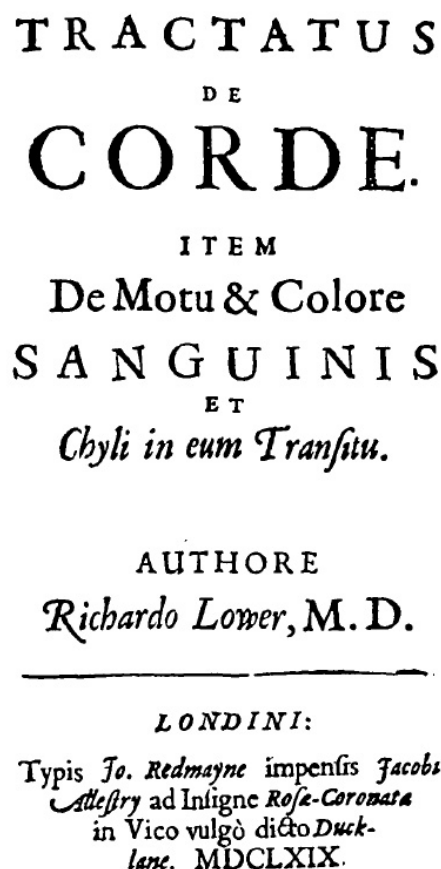


Рис. 4. Титульная страница «Tractatus de Corde» (Maluf 1954)

Fig. 4. Title page of “Tractatus de Corde” (Maluf 1954)

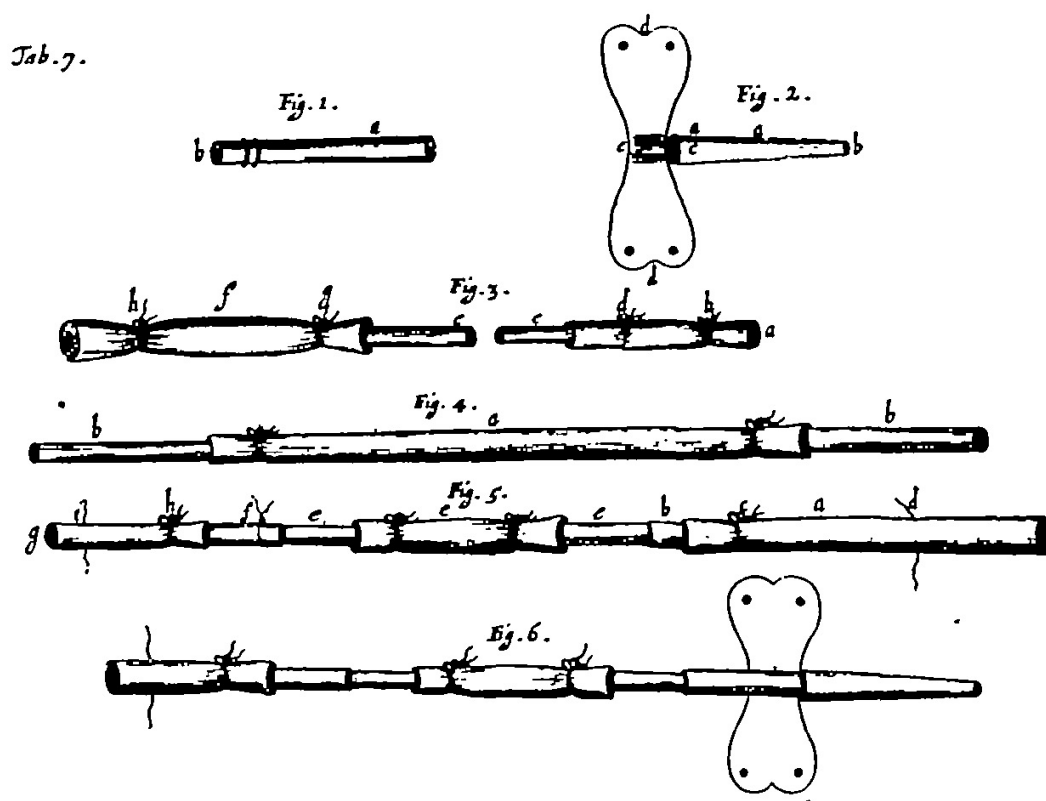


Рис. 5. Таблица 7 из «Tractatus de Corde» Лоуэра, показывающая серебряные трубки для соединения сонной артерии одного животного и яремной вены другого (Maluf 1954)

Fig. 5. Table 7 in R. Lower's "Tractatus de corde" (1669) showing the silver tube fittings used to connect the carotid artery of an animal with the jugular vein of another (Maluf 1954)

подробный отчет о первом успешном переливании крови и приводится описание использованных при этом инструментов (рис. 5).

В другом эксперименте Лоуэр планировал использовать двух собак одинакового размера для переливания крови, что и было выполнено совместно с Томасом Уиллисом в феврале 1666 г. Они перелили кровь из артерии по очереди от двух мастифов в вену третьей собаке. При этом собаки-доноры погибли, а собака-реципиент осталась живой. Лоуэр считал, что переливание крови может быть осуществлено при остром кровотечении (Fastag et al. 2013).

Сэмюэл Пепс, который впоследствии (в 1684 г.) был избран на должность президента Королевского общества, описывает в своем дневнике события 14 ноября 1666 г., когда в Грешем-колледже он стал свидетелем такого эксперимента: «В Грешем-колледже сегодня вечером был интересный эксперимент. Одной собаке пустили кровь, пока она не умерла. Ее кровь перелили другой собаке, одновременно пуская ей кровь с другой стороны тела. Первая из них умерла на месте, а другая чувствует себя очень хорошо, и с большой вероятностью с ней все будет в порядке. Это дает повод надеяться на возможность

улучшения здоровья человека таким путем» (Giangrande 2000).

Приоритет в переливании крови человеку принадлежит Жану Батисту Дени (1643–1704). Когда известия об экспериментах «Оксфордского клуба» в конце 1666 г. — начале 1667 г. достигли Парижа, Французская Академия наук решила немедленно повторить их ввиду крайней актуальности и назначила для этого специальный комитет, включавший анатома Луи Гайана, доктора Клода Перро и астронома Адриэна Озу. 22 января 1667 г. Луи Гайан выполнил первое в Париже переливание крови от животного животному (использовал двух собак). Это событие привлекло внимание оппозиционной Академии наук философской группы Анри Луи Хабера де Монтмора (1600–1679), в которую входил придворный врач Людовика XIV Жан Батист Дени. Альтернативные эксперименты было поручено провести Жану Батисту Дени и Полю Эммерецу, хирургу больницы Св. Квентина. 3 марта 1667 г. они провели переливание крови от одной собаки другой. 2 апреля 1667 г. Жан Батист Дени успешно перелил кровь от трех телят трем собакам, о чем можно узнать из опубликованных писем

Дени де Монтмору (копия отослана 22 июля 1667 г. в Лондонское Королевское научное общество) (рис. 6).

Первое в истории медицины успешное переливание крови животных человеку было осуществлено 15 июня 1667 г. Жан Батист Дени вместе с Полем Эммерецем перелили около 250 мл артериальной крови ягненка 15-летнему душевнобольному юноше, находившемуся в очень тяжелом состоянии после более 20 «лечебных» кровопусканий. Переливание оказалось успешным. Наступившее улучшение в состоянии пациента дало повод к дальнейшим попыткам производить трансфузию крови больным, и Дени стал очень активным пропагандистом переливания крови (Farr 1980; Chandler et al. 2012). Он подчеркивал именно терапевтическое значение переливания крови (Chin-Yee, Chin-Yee 2016).

Второе переливание крови овцы было проведено сорокапятилетнему крепкому мужчи-

не, плетенщику кресел, который на следующий же день вернулся к своей работе. Третьим реципиентом стал Байрон Бонд, молодой шведский дворянин, тяжело заболевший в Париже, во время своего большого путешествия по Европе. Он был в таком безнадежном состоянии, что все врачи отступились от попыток вылечить его, и родственники обратились к Дени с просьбой лишь только поддержать немного беднягу перед смертью. После первой трансфузии крови теленка больной почувствовал себя несколько лучше и даже начал разговаривать. Во время второй трансфузии он умер, но претензий от родственников к Дени не последовало (Chandler et al. 2012).

Однако с четвертым пациентом у Дени возникли серьезные неприятности. Это был 34-летний Антуан Моруа, который периодически сбегал из дома. Его жена надеялась, что переливание крови поможет утихомирить буйный нрав Моруа. 19 декабря 1667 г. Дени и Эммерец перелили ему около 175 мл крови теленка, пациенту стало лучше. Процедура была повторена несколько дней спустя; когда вливание приближалось к завершению, Моруа пожаловался на поясничную боль, которая совпала с неровным пульсом. На следующий день у него пошла носом кровь, моча стала темной. Через два месяца его психическое состояние снова ухудшилось, и жена настояла на новом переливании. Однако оно оказалось неудачным, и к вечеру следующего дня Моруа умер при известных современной медицине симптомах гемолитического шока. Его жена обвинила Дени в смерти мужа. За врачебные действия, приведшие к смерти больного, Дени был привлечен к суду. Возможно, женщина сделала это заявление, чтобы снять с себя всякие подозрения в убийстве, так как впоследствии было доказано, что именно она дала своему супругу яд. Суд принял во внимание это обстоятельство и 17 апреля 1668 г. полностью оправдал Дени, но запретил любые попытки переливания крови человеку без официального разрешения медицинского факультета Парижского университета, представители которого выступали против подобных экспериментов. Палата депутатов Франции рассмотрела обстоятельства дела и в 1678 г. законодательно запретила переливание крови от животных человеку (Maluf 1954).

В том же 1667 г. Ричард Лоуэр совместно с Эдмундом Кингом выполнил первое в Англии переливание крови человеку (Walton 1974). Этим человеком, согласившимся на переливание себе крови овцы, был 22-летний

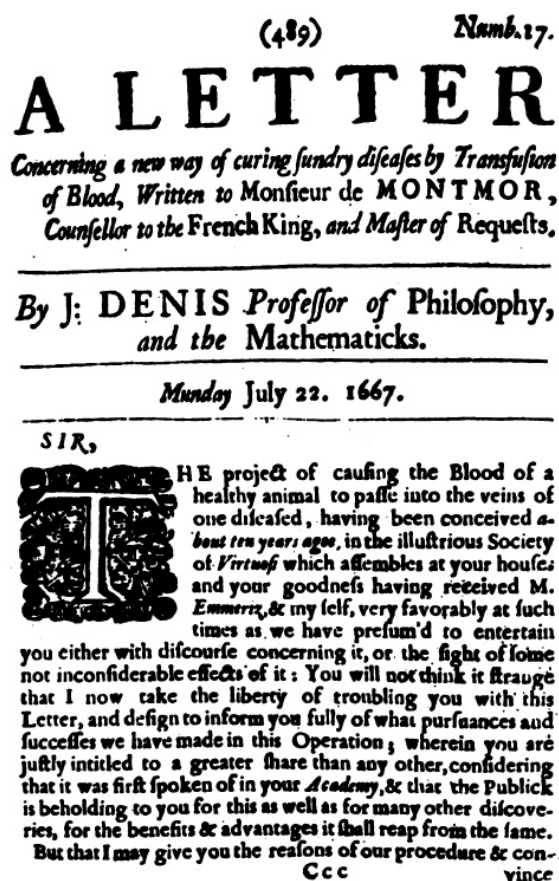


Рис. 6. Титульная страница «A letter concerning a new way of curing sundry diseases by transfusion of blood» (Farr 1980)

Fig. 6. Title page of "A letter concerning a new way of curing sundry diseases by transfusion of blood" (Farr 1980)



Рис. 7. Переливание крови от ягненка человеку (Chandler et al. 2012)

Fig. 7. Lamb-to-human transfusion (Chandler et al. 2012)

душевнобольной студент богословия Артур Кога (рис. 7). Первое переливание было осуществлено 23 ноября. Больной почувствовал себя лучше и дал согласие на второе переливание через 3–4 дня (Lower 2002). Повторное переливание состоялось 12 декабря 1667 г. и оказалось удачным (Chandler et al. 2012).

Вопрос о приоритете первого переливания крови вызвал бурную дискуссию между Дени и Лоуэром. Дени написал Генри Олденбургу, секретарю Лондонского королевского общества, заявляя о своем приоритете первого переливания от животного к человеку, добавив, что «проект переливания больным крови здорового животного» была задуман 10 лет назад (1657 г.) на собрании «прославленного Общества Виртуозов». Олденбург возразил, что «англичане вполне могли бы быть первыми, если бы они не были столь деликатными в вопросах безопасности жизни человека» (Hall, Hall 1980).

Согласно хронологии событий, Ричард Лоуэр выполнил первое переливание крови от животного животному (1665 г.), в то время как Жан Батист Дени осуществил первое переливание крови от животных человеку (1667 г.). Путаница и последующие претензии на приоритет первого переливания связаны с действиями редактора «Философских трудов Лондонского Королевского общества» Генри Олденбурга. Копия

письма Жана Батиста Дени де Монтмору была отослана 22 июля 1667 г. в Лондонское Королевское научное общество и должна была быть опубликована в июльском номере «Философских трудов». Однако письмо увидело свет только в сентябре 1667 г. (Keynes 1967).

После получения известия об осложнениях переливания крови, полученных Дени во Франции, «Оксфордский клуб» также прекратил свои эксперименты с гемотрансфузиями. В 1673 г. Дени был приглашен в Англию королем Чарльзом II. Во время беседы король пожелал узнать подробнее об экспериментах Дени с переливанием крови. Находясь в Англии, Дени довольно успешно лечил французского посла. Несмотря на предложения остаться, он вернулся в Париж, где продолжил свои занятия математикой и другими точными науками, но никогда больше не возвращался к медицине и тем более к проблеме переливания крови. Он умер 3 октября 1704 г. в Париже (Chandler et al. 2012).

Одновременно с работами Ричарда Лоуэра в Англии и Жана Батиста Дени во Франции, подобные эксперименты проводились и в других странах. В Голландии Ренье де Грааф проводил эксперименты по переливанию крови на животных. В Германии было проведено несколько переливаний крови от овец человеку Балтазаром Кауфманном и Маттеусом Готфридом Пурманном (1648–1721). Иоганн Сигизмунд Эльсгольц (1623–1688), врач барона Бранденбургского, также выполнил несколько переливаний. Он известен в основном благодаря своей монографии «Clysmatica nova» (1667), в которой появилась первая иллюстрация внутривенной инъекции человеку с помощью шприца (рис. 8). Он предположил, что взаимные переливания крови между мужем и женой могут урегулировать семейные разногласия (Maluf 1954).

Джованни Гульельмо Рива (1627–1677) пытался провести такие же эксперименты в Риме. Рива был хирургом в «Ospedale della Consolazione» (Больнице утешения) и служил с 20 июня 1667 г. по 9 декабря 1669 г. главным врачом папы Климента IX. Рива провел три публичные демонстрации переливания крови 10 декабря 1667 г. в Риме. Одним из пациентов был Франческо Синибальди, профессор медицины Римского университета, страдавший тяжелым заболеванием, которому перелили кровь ягненка. Операция прошла успешно, хотя Синибальди умер от болезни в феврале 1668 г. Второй пациент был «болен в течение 16 лет, страдая от непрерывной лихорадки», а третий страдал от малярийной лихорадки. Свидетелями этих



Рис. 8. Первая иллюстрация внутривенной инъекции человеку из «Clysmatica nova» И. С. Эльсгольца (Maluf 1954)

Fig. 8. The first illustration of an intravenous injection in man from J. S. Elsholtz' "Clysmatica nova" (Maluf 1954)

экспериментов стали известные врачи того времени, включая Джованни Мария Костанци, Джованни Трулли, Антонио Эгидио Петрагилия, Джакомо Синибальди. В день проведения переливания они составили доклад, который был подписан и нотариально заверен (Marinozzi et al. 2018).

Итальянские врачи использовали для переливания крови приборы, отличавшиеся от используемых в других европейских странах. Например, об устройстве из двух небольших пипеток, соединенных вместе, сообщалось в «Ragguaglio» Тинасси и в архивных источниках XVII века, проанализированных А. Симили (рис. 9). Тинасси сообщает о работе хирурга И. Магнани, который был главным врачом папы Иннокентия XI с 21 сентября 1676 г. по 12 августа 1689 г. В 1667–1668 гг. Магнани успешно экспериментировал с переливанием крови животным разных видов, демонстрируя, что новая кровь оживляет умирающих собак.

В 1668 г. Паоло Манфреди, ученик Ривы, провел в Риме ряд экспериментов с С. Каннаджи и Б. Симончелли. Вместе с Симончелли,

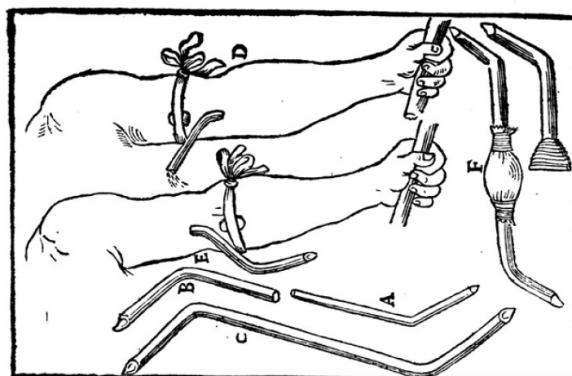


Рис. 9. Устройства для переливания крови, используемые итальянскими врачами в XVII веке (Marinozzi et al. 2018)

Fig. 9. Blood transfusion devices used by Italian doctors in the 17th century (Marinozzi et al. 2018)

который был анатомом и хирургом в «Ospedale della Carità» (Больнице благотворительности), Манфреди повторил опыты переливания крови на собаках по французскому методу, с переливанием из черепной артерии одного животного в яремную вену другого. 2 января 1668 г. Симончелли перелил кровь из сонной артерии ягненка в вену человека по имени Анджело ди Утина. К сожалению, Манфреди не уточняет, как долго прожил пациент после переливания. Он утверждал, что кровь животных питает и оживляет точно так же, как человеческая кровь. Манфреди считал причинами неудач некоторых своих предшественников не технические ошибки и использование животных, а чрезмерное количество переливаемой крови в один прием. Он полагал более безопасным проведение множественных переливаний с использованием небольших количеств крови, как было показано Г. Рива и И. Магнани (Marinozzi et al. 2018).

Однако неоднократные неудачные попытки переливания крови, повлекшие за собой гибель людей, привели к тому, что к 1678 г. британский и французский парламенты запретили переливание крови, а в 1679 г. Папа Римский издал запретительный эдикт на переливание крови. Этот запрет более чем на сто лет затормозил изучение данного вопроса. Лишь в 1749 г. Кантвелл, представитель медицинского факультета Парижского университета, заявил, что переливание могло бы быть очень важным в чрезвычайных ситуациях, связанных с большой кровопотерей (Learoyd 2012).

В XVIII веке известно лишь несколько упоминаний о переливании крови. В «Общей системе хирургии» («General System of Surgery») (1763) Лоренц Хейстер (1683–1758), профессор

медицины университета Хельмштадта, описал и проиллюстрировал оборудование, которое он полагал важным использовать для переливания, но признался, что сам этого не пробовал. Он предложил использовать полые цилиндры из металла или кости, сегмент сонной артерии, мочеточник быка, теленка или ягненка и даже трахею утки (рис. 10).

В XVIII веке были открыты важные компоненты крови. Уильям Гарвей, Ричард Лоуэр, Роберт Гук и другие ученые отмечали, что кровь в легочных венах светлее, чем в легочных артериях. Отсюда следовал вывод, что легкие потребляют что-то важное из воздуха, но знания об атмосфере были расплывчатыми. В 1774 г. Джозеф Пристли (1733–1804) открыл новый газ и назвал его «дефлогистированный воздух». В 1775 г. Антуан Лоран Лавуазье (1743–1794) описал свойства этой части воздуха и назвал ее кислородом. После открытия кислорода и его свойств итальянец Микеле Роза вместе с анатомом Антонио Скарпа (1747–1832) провел эксперименты, показавшие, что животное после сильной кровопотери не может быть реанимировано введением сыворотки, для этого необходимы все компоненты крови. Он полагал, что при острой кровопотере возможно применение гетерологичного переливания. Однако в ходе его опытов две черепахи погибли после переливания крови теленка.

Мари Франсуа Ксавье Биша (1771–1802), французский физиолог, изучал эффекты переливания темной деоксигенизированной крови, проведя в 1805 г. первые опыты с перекрестной циркуляцией. Он соединял проксимальный конец сонной артерии одной собаки с дистальным концом сонной артерии другой собаки. Когда собака-донор стала задыхаться и ее артериальная кровь потемнела, собака-реципиент также потеряла сознание.

Осветление венозной крови при воздействии воздуха привело к открытию антикоагулянтного эффекта нейтральных солей, при добавлении которых цвет крови становился ярче. Английский анатом Уильям Хьюсон (1739–1774) отмечал антикоагулянтные свойства различных нейтральных солей, добавление которых предотвращало свертывание крови. О влиянии различных солей на цвет и свертывание крови упоминали Дж. Хендли (1721) и Томас Швенке (1743) (Maluf 1954).

Возрождение интереса к переливанию крови связано с именем Эразмуса Дарвина (1731–1802), деда Чарльза Дарвина. В своей книге «Zoonomia» (1794–1796) он предложил в качестве оборудо-

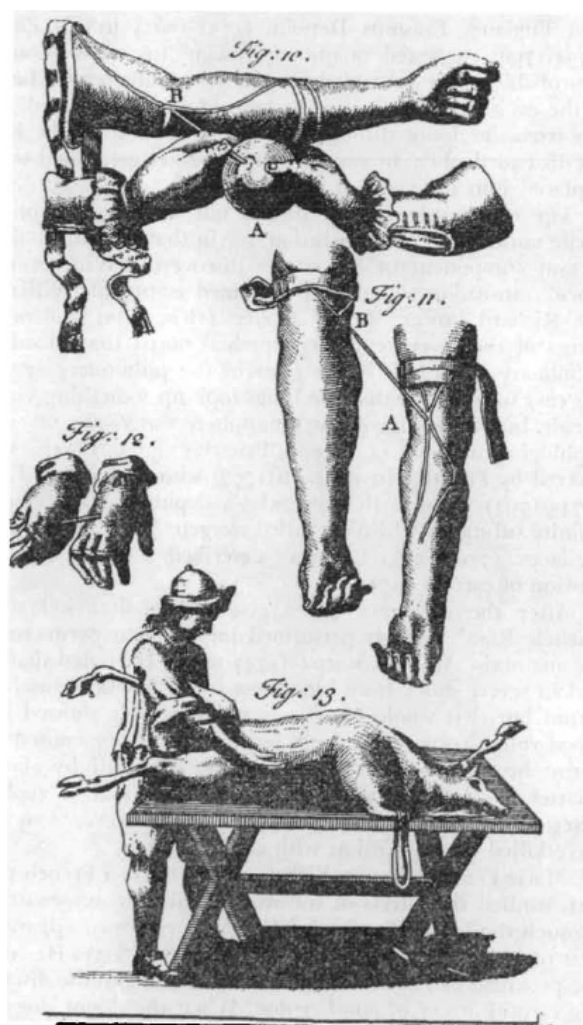


Рис. 10. Иллюстрация из «Общей системы хирургии» Лоренса Хейстера (1763), показывающая гипотетические переливания:

Fig: 10 — не прямое переливание;

Fig: 11 и Fig: 12 — переливания из вены в вену без насоса; Fig: 13 — переливание из бедренной артерии овцы в локтевую вену человека

(Maluf 1954)

Fig. 10. Illustration from Lorenz Heister's "General System of Surgery" (1763) showing purely hypothetical transfusions: Fig: 10 — an indirect transfusion; Fig: 11 and Fig: 12 — vein-to-vein "transfusions" without a pump; Fig: 13 — transfusion from the femoral artery of a sheep into an antecubital vein of man (Maluf 1954)

вания для переливания крови два гусиных пера, соединенных кишечником курицы (Maluf 1954). В 1796 г. Эразмус Дарвин выступил за переливание крови в случаях, связанных с недостаточным питанием (Hajdu 2003).

Таким образом, становление переливания крови во многом было следствием прогресса других наук и получило бурное развитие в XIX веке.

References

- Aird, W. C. (2011) Discovery of the cardiovascular system: From Galen to William Harvey. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 9, suppl. 1, pp. 118–129. PMID: 21781247. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04312.x (In English)
- Auffray, C., Noble, D. (2009) Origins of systems biology in William Harvey's masterpiece on the movement of the heart and the blood in animals. *International Journal of Molecular Science*, vol. 10, no. 4, pp. 1658–1669. PMID: 19468331. DOI: 10.3390/ijms10041658 (In English)
- Chandler, J. G., Chin, T. L., Wohlaue, M. V. (2012) Direct blood transfusions. *Journal of Vascular Surgery*, vol. 56, no. 4, pp. 1173–1177. PMID: 22925733. DOI: 10.1016/j.jvs.2012.04.072 (In English)
- Chin-Yee, B. H., Chin-Yee, I. H. (2016) Blood transfusion and the body in early modern France. *Canadian Bulletin of Medical History*, vol. 33, no. 1, pp. 82–102. PMID: 27344904. DOI: 10.3138/cbmh.33.1.82 (In English)
- Eknoyan, G., De Santo, N. G. (1997) Realdo Colombo (1516–1559). A reappraisal. *American Journal of Nephrology*, vol. 17, no. 3–4, pp. 261–268. PMID: 9189244. DOI: 10.1159/000169111 (In English)
- Farr, A. D. (1980) The first human blood transfusion. *Medical History*, vol. 24, no. 2, pp. 143–162. PMID: 6990126. DOI: 10.1017/s0025727300040138 (In English)
- Fastag, E., Varon, J., Sternbach, G. (2013) Richard Lower: The origins of blood transfusion. *The Journal of Emergency Medicine*, vol. 44, no. 6, pp. 1146–1150. PMID: 23499352. DOI: 10.1016/j.jemermed.2012.12.015 (In English)
- Giangrande, P. L. (2000) The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*, vol. 110, no. 4, pp. 758–767. PMID: 11054057. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x (In English)
- Gibson, W. C. (1970) The bio-medical pursuits of Christopher Wren. *Medical History*, vol. 14, no. 4, pp. 331–341. PMID: 5500188. DOI: 10.1017/s0025727300015787 (In English)
- Gilder, S. S. B. (1954) Francesco Folli and blood transfusion. *Canadian Medical Association Journal*, vol. 71, no. 2, p. 172. PMID: 13182659. (In English)
- Graham, J. M. (1953) William Harvey and the early days of blood transfusion. *Edinburg Medical Journal*, vol. 60, no. 2, pp. 65–76. PMID: 13033783. (In English)
- Hajdu, S. I. (2003) Blood transfusion from antiquity to the discovery of the Rh factor. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 33, no. 4, pp. 471–473. PMID: 14584763. (In English)
- Hall, A. R., Hall, M. B. (1980) The first human blood transfusion: Priority disputes. *Medical History*, vol. 24, no. 4, pp. 461–465. PMID: 6999258. DOI: 10.1017/s0025727300040588 (In English)
- Keynes, G. (1967) Medical history: Tercentenary of blood transfusion. *British Medical Journal*, vol. 4, no. 5576, pp. 410–411. PMID: 4861535. DOI: 10.1136/bmj.4.5576.410 (In English)
- Learoyd, P. (2012) The history of blood transfusion prior to the 20th century — Part 1. *Transfusion Medicine*, vol. 22, no. 5, pp. 308–314. PMID: 22994447. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2012.01180.x (In English)
- Lindeboom, G. A. (1954) The story of a blood transfusion to a Pope. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, vol. 9, no. 4, pp. 455–459. PMID: 13212030. DOI: 10.1093/jhmas/ix.4.455 (In English)
- Lower, R. (2002) An account of the experiment of transfusion, practiced upon a man in London. 1667. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 75, no. 5–6, pp. 293–297. PMID: 14580110. (In English)
- Maluf, N. S. (1954) History of blood transfusion. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 59–107. PMID: 13118144. DOI: 10.1093/jhmas/ix.1.59 (In English)
- Marinozzi, S., Gazzaniga, V., Iorio, S. (2018) The earliest blood transfusions in 17th-century in Italy (1667–1668). *Transfusion Medicine Reviews*, vol. 32, no. 1, pp. 1–5. PMID: 29126578. DOI: 10.1016/j.tmr.2017.09.003 (In English)
- Nikitina, E. A. (2012) *Nasledovanie grupp krovi [The inheritance of blood groups]*. Saint Petersburg: Herzen State Pedagogical University of Russia Publ., 105 p. (In Russian)
- Pelis, K. (1997) Moving blood. *Vox Sanguinis*, vol. 73, no. 4, pp. 201–206. DOI: 10.1046/j.1423-0410.1997.7340201.x (In English)
- Ribatti, D. (2009) William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *Journal of Angiogenesis Research*, vol. 1, article 3. PMID: 19946411. DOI: 10.1186/2040-2384-1-3 (In English)
- Schmidt, P. J., Ness, P. M. (2006) Hemotherapy: From bloodletting magic to transfusion medicine. *Transfusion*, vol. 46, no. 2, pp. 166–168. PMID: 16441589. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00697.x (In English)
- Sturgis, C. C. (1942) The history of blood transfusion. *Bulletin of the Medical Library Association*, vol. 30, no. 2, pp. 105–112. PMID: 16016531. (In English)
- Walton, M. T. (1974) The first blood transfusion: French or English? *Medical History*, vol. 18, no. 4, pp. 360–364. PMID: 4618310. DOI: 10.1017/s0025727300019803 (In English)
- Weaver, L. (1923) *Sir Christopher Wren. Scientist, scholar and architect*. London: Country Life, 173 p. (In English)
- Yapjajakis, C. (2009) Hippocrates of Kos, the father of clinical medicine, and Asclepiades of Bithynia, the father of molecular medicine. Review. *In Vivo*, vol. 23, no. 4, pp. 507–514. PMID: 19567383. (In English)

Полвека «выученной беспомощности»

Д. А. Жуков^{✉1}

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

Сведения об авторе

Дмитрий Анатольевич Жуков,
РИНЦ AuthorID: 79722, e-mail:
dazhukov0@gmail.com

Для цитирования: Жуков, Д. А.
(2020) Полвека «выученной
беспомощности». *Интегративная
физиология*, т. 1, № 3, с. 181–186.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-
181-186

Получена 24 марта 2020; прошла
рецензирование 23 мая 2020;
принята 2 июня 2020.

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

Аннотация. Дается краткий обзор изучения выученной беспомощности — состояния, формирующегося у животного, подвергнутого неконтролируемому стрессу. Выученная беспомощность характеризуется угнетением когнитивных, эмоциональных и моторных функций. Поэтому выученная беспомощность рассматривается как модель депрессивного состояния человека. Теоретическое значение изучения выученной беспомощности в том, оно затрагивает некие фундаментальные свойства нервной системы, поскольку это состояние получено не только у представителей всех классов позвоночных животных, но и у беспозвоночных животных и даже смоделировано на отдельных ганглиях тараканов. Ключевым фактором для формирования выученной беспомощности является неконтролируемость воздействия — невозможность приспособиться к стимулу, невозможность избежать или избавиться от его действия или же невозможность предсказать появление этого стимула.

Ключевые слова: выученная беспомощность, стресс, неконтролируемость, непредсказуемость, неизбежность.

Half a century of “learned helplessness”

D. A. Zhukov^{✉1}

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

Author

Dmitry A. Zhukov, RSCI AuthorID:
79722, e-mail: dazhukov0@gmail.com

For citation: Zhukov, D. A. (2020)
Half a century of “learned
helplessness”. *Integrative Physiology*,
vol. 1, no. 3, pp. 181–186. DOI:
10.33910/2687-1270-2020-1-3-
181-186

Received 24 March 2020; reviewed
23 May 2020; accepted 2 June 2020.

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

Abstract. The paper provides a brief review of the study of learned helplessness — a state formed in animals subjected to uncontrollable stress. Learned helplessness is characterized by inhibition of cognitive, emotional, and motor functions. Therefore, learned helplessness is considered as a model of human depression. The study of learned helplessness is theoretically viable because this phenomenon affects certain fundamental properties of the nervous system — this condition is observed not only in the representatives of all classes of vertebrates, but also in invertebrates. Besides, the condition was modeled on certain ganglia of the cockroach. The key factor for the formation of learned helplessness is the stimulus uncontrollability, i. e. the inability to adapt to the stimulus, the inability to avoid or get rid of its action, or the inability to predict the appearance of this stimulus.

Keywords: learned helplessness, stress, uncontrollability, unpredictability, unescapability.

Около полувека назад в научной литературе появился термин «выученная беспомощность» (ВБ) для обозначения состояния животного с дефицитом когнитивных, моторных и эмоциональных функций, возникающего после применения к нему неконтролируемого стрессорного воздействия (Overmier, Seligman 1967; Seligman et al. 1968). В дальнейших работах было показано, что причиной выученной беспомощности является не стресс сам по себе — каким бы сильным он ни был, — а фактор неконтролируемости (Drugan et al. 1997; Maier et al. 1972; Weiss 1970; 1971; Seligman, Beagley 1975). Воздействие является неконтролируемым, если оно характеризуется одним или несколькими следующими свойствами: животное не может приспособиться к нему; животное не может ни избавиться, ни избежать его; животное не может предсказать его появление.

Практическое значение ВБ в том, что оно рассматривается как модель депрессивного расстройства человека. Теоретическое значение изучения ВБ в том, оно затрагивает некие фундаментальные свойства нервной системы, поскольку ВБ получена не только у представителей всех классов позвоночных животных, но и у беспозвоночных животных и даже смоделирована на отдельных ганглиях тараканов (Eisenstein et al. 2016).

Нельзя не отметить, что впервые ВБ была получена в лаборатории И. П. Павлова (Шенгер-Крестовникова 1921). Модель была получена случайно, в ходе эксперимента, имевшего совсем другие цели — исследование возможностей зрительной сенсорной системы. С помощью метода условных рефлексов собаку обучали отличать круг от эллипса. Форму эллипса постепенно, от опыта к опыту, меняли так, чтобы он все больше и больше походил на круг. Когда соотношение осей эллипса достигло 8:9, собака стала ошибаться. Она не смогла научиться различать фигуры даже за три недели занятий, а потом у нее внезапно исчезла способность отличать круг даже от ярко выраженного, вытянутого эллипса. Более того, у собаки пропали и все другие условные рефлексы, выработанные прежде. Собака, ранее спокойно стоявшая в станке, теперь «была постоянно в движении и повизгивала». Таким образом, впервые в эксперименте было показано, что неконтролируемая ситуация приводит к нарушениям в поведении, которые укладываются в триаду депрессивного синдрома: когнитивный, моторный и эмоциональный дефицит.

Обратим внимание на то, что собака не испытывала ни боли, ни голода, ни каких-либо

других неприятных физических ощущений. Единственным фактором, изменившим поведение и психику животного, оказалась невозможность установить закономерность появления пищи, т. е. неконтролируемость ситуации.

К сожалению, значение этого результата для науки о поведении осталось непонятым современниками, хотя в те годы нарушения поведения экспериментальных животных активно изучались, в том числе и в лаборатории самого И. П. Павлова. Экспериментальные неврозы (как тогда называли животные модели психических расстройств человека) исследователи вызывали стимулами, связанными с болью и испугом животного. Видимо, это было связано с тем, что тогда только недавно закончилась Первая мировая война и гражданская война в России и имелось огромное количество больных нервными и психическими болезнями, вызванными сражениями, голодом, лишениями. Книги по психиатрии содержали множество примеров расстройств, вызванных войной. Врачи и биологи сосредоточили свое внимание на последствиях сильнейших воздействий, а возможность или невозможность контролировать жизненную ситуацию как фактор воздействия на психику даже не рассматривали. Как бы то ни было, теперь термин «выученная беспомощность» является переводом с английского.

Поскольку ключевым фактором для формирования ВБ является невозможность для экспериментального животного контролировать ситуацию, то для выработки этого состояния не обязательно прибегать к болевому воздействию, даже очень слабому. Хорошая модель ВБ — неконтролируемый доступ к витальным ресурсам (Job, Barnes 1995). Двух крыс помещают в клетки с поилками, вода из которых поступает при нажатии педали. Но в одной из клеток педаль «холостая», то есть нажатие на нее не влияет на работу поилки. Вода поступает только тогда, когда на педаль нажимает крыса в другой клетке. Через неделю такого режима у крыс, которые находились в неконтролируемой ситуации, отмечаются все симптомы ВБ. Существенно, что никаких признаков обезвоживания организма у этих животных не обнаруживали. Это означает, что стрессирующим фактором явилась не жажда, а фактор неконтролируемости.

В модели хронического умеренного стресса ВБ у крыс получают в результате того, что на протяжении четырех недель их подвергают различным воздействиям: наклон клетки, мокрая подстилка, инверсия светового дня (темнота днем, свет по ночам), лишение корма, лишение

воды, рассаживание в клетки поодиночке, ссаживание в одну клетку животных из двух клеток (социальный стресс плюс перенаселенность) (Willner 2016). Каждую неделю порядок воздействий меняется в квазислучайном порядке, чтобы сохранялась непредсказуемость ситуации. Результатом такой процедуры была стабильная ВБ у животных. На этой модели показано, что ВБ сопровождается агедонией — снижением потребления раствора сахараина, — что является объективным показателем эмоционального дефицита. Эта модель интересна тем, что использованное воздействие копирует «стресс повседневности» (everyday life stress), развивающийся у многих людей в результате множества мелких неприятностей. Каждое из воздействий, которое было применено к крысам и мышам, если применять только его одно, тоже вызовет стресс и последующие нарушения в поведении. Но все параметры поведения и физиологические показатели быстро вернутся к норме по окончании воздействия или даже во время него. Однако после длительной череды непредсказуемых воздействий животные демонстрировали ВБ, которая сохранялась несколько месяцев. Эта модель депрессии человека адекватна еще и длительностью сохранения полученных изменений в поведении.

Для человека основной источник стресса — не физические воздействия, а социальные. Постоянное социальное давление тоже приводит к ВБ. Две незнакомые мыши вступают в агонистический контакт. Проигравшая поединок особь испытывает стресс, однако все физиологические и биохимические параметры возвращаются к норме через несколько часов. Если животное постоянно терпит поражения при социальных контактах, то ситуация становится для него неконтролируемой, и в результате у животных с опытом постоянных поражений в социальных конфликтах возникает стойкое, сохраняющееся неделями, расстройство функций, характерное для выученной беспомощности (Кудрявцева и др. 2017).

Для развития ВБ не обязательно непосредственное участие в контактах. Если самок мышей содержать рядом с агрессивным самцом, который постоянно побеждает в поединках, то у самок развивается ВБ. При такой постановке опыта самка отделена от самца прозрачным барьером с многочисленными отверстиями. Животные видят друг друга и воспринимают запах соседа, но не могут вступать в непосредственный контакт. Отметим, что ВБ была вызвана отнюдь не недоступностью самца для самки, которая приходила в половое возбужде-

ние. Самки держались в дальнем углу своей половины клетки, как можно дальше от самца — он явно был аверсивным и, увы, неизбежным стимулом (Августиневич 2003). Эта модель является первой моделью ВБ, полученной на самках, которые, вообще говоря, устойчивее самцов к социальному стрессу (Dadomo et al. 2018).

Достоинства двух последних моделей ВБ в том, что в них не использованы факторы физической среды, а только социальные контакты. Обе модели воспроизводят реальную ситуацию человеческой жизни: люди часто страдают от своей, может быть только субъективной, неуспешности и порой вынуждены постоянно находиться бок о бок с неприятными им людьми.

Чувствительность к неконтролируемому стрессу и, соответственно, вероятность формирования ВБ зависит от наследственных факторов. В частности, имеет значение врожденная стратегия поведения животных. Крысы, генетически селективированные по высокой и низкой скорости выработки условного рефлекса активного избегания, демонстрировали различную реакцию на неконтролируемый стресс (Жуков 1996). Животные с высокой скоростью выработки активного избегания демонстрировали ВБ, а животные с низкой скоростью выработки активного избегания, подвергнутые стрессующей процедуре в неконтролируемых условиях, проявляли повышенную тревогу, но не ВБ. Этот вывод подкрепляется тем, что различия в реактивности двух линий крыс не ограничивались изменениями в поведении. У крыс с ВБ была ослаблена регуляция гипотиз-адреналовой системы по механизму отрицательной обратной связи (положительный дексаметазоновый тест — один из биологических маркеров депрессии человека (Nelson, Davis 1997)). У крыс, резистентных к ВБ, несмотря на повышенную секрецию кортикостерона, торможение гипотиз-адреналовой системы по механизму отрицательной обратной связи сохранялось.

Следует подчеркнуть, что две линии крыс, селективированные по противоположной способности в выработке активного избегания, различаются именно своими врожденными стратегиями поведения, а не способностью к обучению вообще или памятью. Животные, хорошо обучающиеся активному избеганию, плохо обучаются пассивному избеганию, и наоборот: низкая скорость выработки активного избегания сочетается с высокой способностью к выработке избегания пассивного (Виноградова, Жуков 1998; Vinogradova, Zhukov 1999).

Большая чувствительность к неконтролируемому воздействию и склонность к формированию ВБ у животных с активной стратегией поведения (высокой скоростью формирования условного рефлекса активного избегания) была показана и для генетически гетерогенной популяции крыс Вистар, селективных фенотипически по тому же признаку. Животных подвергали хроническому умеренному стрессу и тестировали их поведение. У животных с активной стратегией поведения резко возрастало время неподвижности в тесте Порсолта, возрастала тревожность и снижалось потребление сладкого раствора. Напротив, животные с изначально пассивным поведением после четырехнедельного стресса демонстрировали изменения в поведении,

противоположные «активным» особям (Виноградова и др. 2013).

В заключение отметим, что с использованием модели ВБ за последние полвека исследованы многие нейрохимические механизмы формирования и предрасположенности к депрессивно-подобным состояниям. Изучены и продолжают интенсивно изучаться и биологические маркеры ВБ, в частности нарушения иммунной системы, которые могут явиться одним из новых подходов терапии депрессии человека (Кудрявцева и др. 2017).

Несмотря на более чем полувековую историю, ВБ является актуальным инструментом в исследовании мозговых механизмов, в особенности механизмов постстрессорных расстройств (Maier, Seligman 2016).

Литература

- Августинович, Д. Ф. (2003) Тревожность самок, вызванная длительным психоэмоциональным воздействием. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 89, № 7, с. 858–867.
- Виноградова, Е. П., Жуков, Д. А. (1998) Выработка пассивного избегания у крыс линий КНА и КЛА. *Физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 84, № 1–2, с. 131–132.
- Виноградова, Е. П., Немец, В. В., Жуков, Д. А. (2013) Активная стратегия поведения как фактор риска депрессивноподобных нарушений после хронического умеренного стресса. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*, т. 63, № 5, с. 589–596. DOI: 10.7868/S0044467713050109
- Жуков, Д. А. (1996) Реакция особи на неконтролируемое воздействие зависит от стратегии поведения. *Физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 82, № 4, с. 21–29.
- Кудрявцева, Н. Н., Шурлыгина, А. В., Галямина, А. Г. и др. (2017) Иммунопатология смешанного тревожно/депрессивного расстройства: экспериментальный подход к коррекции иммунодефицитных состояний (обзор). *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова*, т. 67, № 6, с. 671–692. DOI: 10.7868/S0044467717060016
- Шенгер-Крестовникова, Н. Р. (1921) К вопросу о дифференцировке зрительных раздражителей. *Известия Педагогического научного института им. П. Ф. Лесгафта*, т. 3, с. 1–41.
- Dadomo, H., Gioiosa, L., Cigalotti, J et al. (2018) What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Hormones and Behavior*, vol. 98, pp. 22–32. PMID: 29187314. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.11.013
- Drugan, R. C., Basile, A. S., Ha, J. H. et al. (1997) Analysis of the importance of controllable versus uncontrollable stress on subsequent behavioral and physiological functioning. *Brain Research. Brain Research Protocols*, vol. 2, no. 1, pp. 69–74. PMID: 9438074. DOI: 10.1016/s1385-299x(97)00031-7
- Eisenstein, E. M., Eisenstein, D. L., Sarma, J. S. M. (2016) An exploration of how to define and measure the evolution of behavior, learning, memory and mind across the full phylogenetic tree of life. *Communicative & Integrative Biology*, vol. 9, no. 3, article e1166320. PMID: 27489578. DOI: 10.1080/19420889.2016.1166320
- Job, R. F., Barnes, B. W. (1995) Stress and consumption: Inescapable shock, neophobia, and quinine finickiness in rats. *Behavioral Neuroscience*, vol. 109, no. 1, pp. 106–116. PMID: 7734066. DOI: 10.1037/0735-7044.109.1.106
- Maier, S. F., Anderson, C., Lieberman, D. A. (1972) Influence of control of shock on subsequent shock-elicited aggression. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 81, no. 1, pp. 94–100. PMID: 4672574. DOI: 10.1037/h0033329
- Maier, S. F., Seligman, M. E. P. (2016) Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. *Psychological Review*, vol. 123, no. 4, pp. 349–367. PMID: 27337390. DOI: 10.1037/rev0000033
- Nelson, J. C., Davis, J. M. (1997) DST studies in psychotic depression: A meta-analysis. *The American Journal of Psychiatry*, vol. 154, no. 11, pp. 1497–1503. PMID: 9356556. DOI: 10.1176/ajp.154.11.1497
- Overmier, J. B., Seligman, M. E. (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 63, no. 1, pp. 28–33. PMID: 6029715. DOI: 10.1037/h0024166
- Seligman, M. E., Beagley, G. (1975) Learned helplessness in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 88, no. 2, pp. 534–541. DOI: 10.1037/h0076430

- Seligman, M. E., Maier, S. F., Geer, J. H. (1968) Alleviation of learned helplessness in the dog. *Journal of Abnormal Psychology*, vol. 73, no. 3, pp. 256–262. PMID: 5658526. DOI: 10.1037/h0025831
- Vinogradova, E. P., Zhukov, D. A. (1999) Development of passive avoidance in KHA and KLA rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 29, no. 2, pp. 125–126. DOI: 10.1007/bf02465315
- Weiss, J. M. (1970) Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosomatic Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 397–408. PMID: 5535207. DOI: 10.1097/00006842-197007000-00008
- Weiss, J. M. (1971) Effects of coping behavior with and without a feedback signal on stress pathology in rats. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 77, no. 1, pp. 22–30. PMID: 5166077. DOI: 10.1037/h0031581
- Willner, P. (2016) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, vol. 6, pp. 78–93. PMID: 28229111. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002

References

- Avgustinovich, D. F. (2003) Trevozhnost' samok, vyzvannaya dlitel'nym psykhoemotsional'nym vozdejstviem [Anxiety in females caused by long-term psycho-emotional stress]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 89, no. 7, pp. 858–867. (In Russian)
- Dadomo, H., Gioiosa, L., Cigalotti, J. et al. (2018) What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Hormones and Behavior*, vol. 98, pp. 22–32. PMID: 29187314. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.11.013 (In English)
- Drugan, R. C., Basile, A. S., Ha, J. H. et al. (1997) Analysis of the importance of controllable versus uncontrollable stress on subsequent behavioral and physiological functioning. *Brain Research. Brain Research Protocols*, vol. 2, no. 1, pp. 69–74. PMID: 9438074. DOI: 10.1016/s1385-299x(97)00031-7 (In English)
- Eisenstein, E. M., Eisenstein, D. L., Sarma, J. S. M. (2016) An exploration of how to define and measure the evolution of behavior, learning, memory and mind across the full phylogenetic tree of life. *Communicative & Integrative Biology*, vol. 9, no. 3, article e1166320. PMID: 27489578. DOI: 10.1080/19420889.2016.1166320 (In English)
- Job, R. F., Barnes, B. W. (1995) Stress and consumption: Inescapable shock, neophobia, and quinine finickiness in rats. *Behavioral Neuroscience*, vol. 109, no. 1, pp. 106–116. PMID: 7734066. DOI: 10.1037/0735-7044.109.1.106 (In English)
- Kudryavtseva, N. N., Shurlygina, A. V., Galyamina, A. G. et al. (2017) Immunopatologiya smeshannogo trevozhno/depressivnogo rasstrojstva: eksperimental'nyj podkhod k korrektsii immunodefitsitnykh sostojanij (obzor) [Immunopathology of mixed anxiety/depression disorder: An experimental approach to the study of immunodeficiency (review)]. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 67, no. 6, pp. 671–692. DOI: 10.7868/S0044467717060016 (In Russian)
- Maier, S. F., Anderson, C., Lieberman, D. A. (1972) Influence of control of shock on subsequent shock-elicited aggression. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 81, no. 1, pp. 94–100. PMID: 4672574. DOI: 10.1037/h0033329 (In English)
- Maier, S. F., Seligman, M. E. P. (2016) Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. *Psychological Review*, vol. 123, no. 4, pp. 349–367. PMID: 27337390. DOI: 10.1037/rev0000033 (In English)
- Nelson, J. C., Davis, J. M. (1997) DST studies in psychotic depression: A meta-analysis. *The American Journal of Psychiatry*, vol. 154, no. 11, pp. 1497–1503. PMID: 9356556. DOI: 10.1176/ajp.154.11.1497 (In English)
- Overmier, J. B., Seligman, M. E. (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 63, no. 1, pp. 28–33. PMID: 6029715. DOI: 10.1037/h0024166 (In English)
- Seligman, M. E., Beagley, G. (1975) Learned helplessness in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 88, no. 2, pp. 534–541. DOI: 10.1037/h0076430 (In English)
- Seligman, M. E., Maier, S. F., Geer, J. H. (1968) Alleviation of learned helplessness in the dog. *Journal of Abnormal Psychology*, vol. 73, no. 3, pp. 256–262. PMID: 5658526. DOI: 10.1037/h0025831 (In English)
- Shenger-Krestovnikova, N. R. (1921) K voprosu o differentsirovke zritel'nykh razdrashitelej [On the issue of differentiation of visual stimuli]. *Izvestija Pedagogicheskogo nauchnogo instituta im. P. F. Lesgafta*, vol. 3, pp. 1–41. (In Russian)
- Vinogradova, E. P., Nemetz, V. V., Zhukov, D. A. (2013) Aktivnaya strategiya kak faktor riska depressivnopodobnykh narushenij posle khronicheskogo umerennogo stressa [Active coping style as a risk factor of depressive-like disorders after chronic mild stress]. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 63, no. 5, pp. 589–596. DOI: 10.7868/s0044467713050109 (In Russian)
- Vinogradova, E. P., Zhukov, D. A. (1999) Development of passive avoidance in KHA and KLA rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 29, no. 2, pp. 125–126. DOI: 10.1007/bf02465315 (In English)
- Vinogradova, E. P., Zhukov, D. A. (1998) Vyrabotka passivnogo izbeganiya u krysa linij KNA i KLA [Passive avoidance conditioning in KHA and KLA rats]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 84, no. 1–2, pp. 131–132. (In Russian)
- Weiss, J. M. (1970) Somatic effects of predictable and unpredictable shock. *Psychosomatic Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 397–408. PMID: 5535207. DOI: 10.1097/00006842-197007000-00008 (In English)

- Weiss, J. M. (1971) Effects of coping behavior with and without a feedback signal on stress pathology in rats. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, vol. 77, no. 1, pp. 22–30. PMID: 5166077. DOI: 10.1037/h0031581 (In English)
- Willner, P. (2016) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, vol. 6, pp. 78–93. PMID: 28229111. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002 (In English)
- Zhukov, D. A. (1996) Reaktsiya osobi na nekontroliruemoe vozdejstvie zavisit ot strategii povedenija [The reaction of the individual to an uncontrollable exposure depends on the behavioral strategy]. *Fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 82, no. 4, pp. 21–29. (In Russian)

Обонятельная дисфункция как индикатор ранней стадии заболевания COVID-19

Е. В. Бигдай^{✉1}, В. О. Самойлов¹

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

Сведения об авторах

Елена Владимировна Бигдай,
ORCID: 0000-0001-6773-6141,
e-mail: bigday50@mail.ru

Владимир Олегович Самойлов,
ORCID: 0000-0003-4140-2957,
e-mail: bigday50@mail.ru

Для цитирования: Бигдай, Е. В.,
Самойлов, В. О. (2020)

Обонятельная дисфункция
как индикатор ранней стадии
заболевания COVID-19.

Интегративная физиология, т. 1,
№ 3, с. 187–195. DOI: 10.33910/2687-
1270-2020-1-3-187-195

Получена 20 мая 2020; прошла
рецензирование 22 июня 2020;
принята 28 июля 2020.

Финансирование: Работа
выполнена при финансовой
поддержке Программы
фундаментальных научных
исследований государственных
академий на 2014–2020 годы
(ГП-14, раздел 63).

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

Аннотация. В литературе появились данные о внезапной потере обоняния у больных коронавирусной инфекцией. В этом обзоре приводятся результаты обследования пациентов, подтверждающие связь между COVID-19-инфицированием и anosmией. Anosmia признают как один из самых явных симптомов, что позволяет предполагать нейротропность вируса, который является сайт-специфическим для обонятельной системы. В статье подчеркивается, что обонятельная дисфункция выявляется на ранней стадии заболевания и предшествует его основным симптомам. Поэтому потерю обоняния можно рассматривать как маркер доклинического проявления коронавирусной инфекции. В обзоре рассматриваются механизмы, лежащие в основе обонятельной дисфункции в обонятельном нейроэпителии и центральной нервной системе. В настоящее время возникла необходимость объективной оценки большой выборки пациентов, инфицированных COVID-19, на доклинической стадии заболевания. Для диагностики обонятельной дисфункции разработаны стандартные обонятельные тесты, позволяющие получить количественные данные, характеризующие различную степень нарушения обоняния. Эти тесты хорошо зарекомендовали себя для ранней диагностики таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера. В условиях отсутствия медицинских тестов на коронавирус тестирование обонятельной чувствительности может стать инструментом для выявления инфицирования на начальной стадии заболевания и бессимптомных пациентов для своевременной их самоизоляции.

Ключевые слова: COVID-19, anosmia, стандартные обонятельные тесты UPSIT, Sniffin' Sticks, обонятельный нейроэпителий.

Olfactory dysfunction as an indicator of early coronavirus infection

E. V. Bigday^{✉1}, V. O. Samoilov¹

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

Abstract. Recently published studies provide data on a sudden loss of smell in patients with coronavirus infection. This review discusses the results of a patient survey that confirms the association between COVID-19 infection and anosmia. Anosmia is recognized as one of the most obvious symptoms.

Authors

Elena V. Bigday,
ORCID: 0000-0001-6773-6141,
e-mail: bigday50@mail.ru

Vladimir O. Samoilov,
ORCID: 0000-0003-4140-2957,
e-mail: bigday50@mail.ru

For citation: Bigday, E. V., Samoilov, V. O. (2020) Olfactory dysfunction as an indicator of early coronavirus infection. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 187–195. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-187-195

Received 20 May 2020; reviewed 22 June 2020; accepted 28 July 2020.

Funding: The paper was supported by the Programme for Basic Research of the Russian Academies of Sciences for 2014–2020 (GP-14, Field of Research 63).

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

The article emphasizes that olfactory dysfunction is detected at an early stage of the disease and precedes its main symptoms. Therefore, the loss of smell can be considered as a marker of the preclinical manifestation of coronavirus infection. The review discusses the mechanisms underlying olfactory dysfunction in the olfactory neuroepithelium and central nervous system. Currently, we face the need for an objective assessment of a large sample of patients infected with COVID-19 at the preclinical stage of the disease. Olfactory dysfunction is diagnosed through standard olfactory tests. The tests allow to obtain quantitative data on the degree of dysfunction of the sense of smell. In the absence of medical tests for coronavirus, olfactory sensitivity testing can become a tool for detecting infection at the initial stage of the disease as well as identifying asymptomatic patients for their timely isolation.

Keywords: COVID-19, anosmia, standard olfactory tests UPSIT, Sniffin' Sticks, olfactory neuroepithelium.

Введение

В связи с пандемией COVID-19 в СМИ и в научных публикациях появились данные о характерном признаке коронавирусной инфекции, который выражается в потере обоняния, приводящей к потере вкуса. В отличие от anosмии, которая возникает при всех вирусных заболеваниях (например, риновирус, грипп и аденовирус), особенностью коронавирусной инфекции является внезапная потеря обоняния без признаков насморка и отеков слизистой носа. Исследованиями этих симптомов занимается 38 стран и около 500 врачей со всего мира. Аносмию признают как один из самых явных симптомов, что позволяет предполагать нейротропность вируса, который является сайт-специфическим для обонятельной системы. Замечено, что anosмия проявляется либо на ранней стадии процесса заболевания, либо у пациентов с легкой формой заболевания или без конституциональных симптомов. Американская Академия отоларингологии и британская Ассоциация оториноларингологии рекомендуют добавить потерю обоняния в список первичных симптомов для скрининга COVID-19 (Хыдакис et al. 2020).

Литературные данные свидетельствуют о связи между anosмией и COVID-19. Так, в Иране провели онлайн-анкетирование 14 991 пациентов с подтвержденным COVID-19 в нескольких провинциях. Оказалось, что только в течение марта одновременно с эпидемией

COVID-19 было повышено число случаев внезапной anosмии (Bagheri et al. 2020; Brann et al. 2020; Hopkins, Kumar 2020).

Таким образом, возникла необходимость в исследовании обонятельной дисфункции при коронавирусной инфекции.

Роль обоняния в жизни человека

Обоняние является основной сенсорной модальностью, которая обеспечивает животным и человеку восприятие информации из внешнего мира. Обонятельная система человека представляет собой очень чувствительный детектор летучих химических веществ. Неповрежденная обонятельная система может определить незначительные концентрации пахучих молекул и идентифицировать их среди очень похожих химических структур. Роль обоняния у животных и человека обширна. Чувство запаха помогает идентифицировать пищу, оценивать ее качество и усиливать ее вкус. Активация хемосенсорных клеток предостерегает от потенциальных токсических веществ или патогенов. Активация хемосенсорных клеток в носовой полости инициирует процесс нейронального опознавания, который может влиять на поведение, гормональное состояние и эмоции. Таким образом, все одоранты могут использоваться животными для повышения шансов на выживание, позволяя им определять местонахождение источника пищи и избегать хищника и таких внешних опасностей, как пожар.

Пациенты со стойкой обонятельной дисфункцией подвержены стрессу и риску развития психических расстройств, особенно депрессии. Получены экспериментальные подтверждения тесной связи между потерей обонятельной функции и депрессивным поведением. Поэтому обоняние можно считать маркером депрессии (Croy et al. 2014). Поскольку проекции из обонятельной области перекрываются с областями нейронных сетей, связанных со страхом, специфичным для паники, то у людей, страдающих аносмией, может возникать паническое поведение (Wintermann et al. 2013).

Нарушения обоняния при вирусном инфицировании

Причин обонятельной дисфункции может быть несколько. Среди них выделяют генетические (Kallmann et al. 1944). Обоняние пропадает при черепно-мозговых травмах (Schofield et al. 2014), которые могут привести к ушибу или прямому повреждению обонятельных луковиц, вызывая в конечном итоге вырождение и гибель первичных сенсорных нейронов, расположенных в обонятельном эпителии (Holbrook, Leopold 2006). Из-за своего положения в носовой полости, соприкасающейся с вдыхаемым воздухом, обонятельные сенсорные нейроны считаются очень уязвимыми для действия таких биологически активных веществ, как воспалительные цитокины в слизи, продукты гранул эозинофилов, вдыхаемые токсины или химические вещества, а также патогенные микроорганизмы, бактерии или вирусы, которые могут привести к дегенерации и потере обонятельных клеток (Kern et al. 2000; Seiden 2004; Wrobel, Leopold 2004). Обоняние ухудшается с возрастом в результате нейродегенерации как сенсорных нейронов обонятельного эпителия, так и нейронов в центральной нервной системе (Gilbert et al. 2009; Richard et al. 2010).

Другой хорошо описанной, но не полностью понятной причиной аносмии или гипосмии является поствирусное обонятельное расстройство (PVOD). Поствирусная аносмия является одной из основных причин потери обоняния у почти 30 % пациентов, которая наступает после проявления симптомов простуды. Но аносмия сохраняется и после лечения. Анализ биопсии обонятельной слизистой у пациентов с PVOD выявил признаки дегенеративных изменений, что подтверждает предположение о повреждении периферического отдела обонятельной сенсорной системы, вызывающего потерю обонятельной функции при PVOD (Seiden 2004).

Более 200 различных вирусов вызывают заболевание дыхательных путей. Причем в 15 % случаев они относятся к ранее описанным коронавирусам. Вероятно, новый вирус COVID-19 также может вызвать аносмию у инфицированных пациентов (Hopkins, Kumar 2020).

В работе Ш. Т. Моэйн с соавторами (2020) нарушение обоняния было выявлено почти у всех COVID-19-инфицированных исследованных пациентов, но в разной степени: от аносмии (58 % случаев) до легкой микросмии (13 % случаев), и только у одного из 60 обследуемых (2 %) обоняние сохранялось в норме (Moein et al. 2020). Это свидетельствует о том, что ослабление обонятельной функции является основным маркером инфекции SARS-CoV-2 и в сочетании с другими симптомами, по-видимому, является сильным прогностическим показателем инфицирования COVID-19.

При анализе данных, полученных от 1480 пациентов с гриппоподобными симптомами, в 68 % случаев отмечалась потеря обоняния у COVID-19-позитивных субъектов, по сравнению с 16 % у COVID-19-отрицательных пациентов (Yan et al. 2020).

В эти же сроки проводился анализ данных, полученных при компьютерном анкетировании 10 069 участников через 4 недели после начала эпидемии COVID-19. Результаты анализа подтвердили корреляцию между потерей обоняния и COVID-19, а также внезапное начало аносмии, которое участники отмечали у себя еще до момента заполнения анкеты (Bagheri et al. 2020). Раннее начало обонятельной дисфункции отмечалось у людей в возрасте до 40 лет, не имеющих симптомов коронавирусной инфекции. Следовательно, именно такие пациенты могут быть одними из скрытых носителей, способствующих быстрому распространению COVID-19 (Hopkins, Kumar 2020).

Предполагаемые механизмы нарушения обоняния

Все эти данные ставят вопрос о механизмах, лежащих в основе обонятельной дисфункции при коронавирусной инфекции (Brann et al. 2020). Хотя точная патофизиология поствирусной аносмии неясна, однако полагают, что в качестве одной из вероятных причин является повреждение рецепторных клеток обонятельного нейроэпителия.

Обонятельный нейроэпителий представляет собой структуру, состоящую из нескольких типов клеток. Способность воспринимать запахи принадлежит зрелым обонятельным

сенсорным нейронам. Свои дендриты, увенчанные обонятельными жгутиками, они посылают к апикальной поверхности, обращенной к внешней среде, а аксоны — в обонятельную луковицу (Kulaga et al. 2004; Williams et al. 2014). Обонятельные жгутики экспрессируют молекулярные обонятельные рецепторы, специфические для данного запаха. Таким образом, на поверхности обонятельного эпителия образуется пространственная ринотопическая карта запахов, что свидетельствует о том, что уже на уровне периферического отдела обонятельной сенсорной системы осуществляется кодирование качества запаха. Поэтому сенсорные клетки отвечают за обнаружение запахов, поступающих в полость носа из окружающего воздуха, и за передачу информации о запахах в мозг (Saito et al. 1998).

Обонятельные сенсорные нейроны окружаются опорными клетками, которые, помимо опорной, выполняют фагоцитарную, секреторную (для поддержания местного солевого и водного баланса) функции и функцию детоксикации повреждающих агентов, проникающих в эпителий непосредственно из окружающей среды (Chen et al. 2014; Goldstein et al. 2016; Nomura et al. 2004).

Обонятельный нейроэпителий содержит базальные стволовые клетки, которые непрерывно обновляют популяцию обонятельных сенсорных нейронов, обеспечивая нейрогенез в течение всей жизни для поддержания интактной обонятельной системы (Barber, Coppola 2015; Roisen et al. 2001). Базальная зародышевая зона обонятельного эпителия — это активная нейрогенная ниша, способная вырабатывать новые нейроны из стволовых клеток. Идентифицировано несколько категорий различных популяций стволовых или прогениторных клеток обонятельного нейроэпителия, а также типы клеток-потомков, которые они могут производить (Chen et al. 2014; Goldstein et al. 2016).

Стволовые клетки включают в себя глобулярные базальные клетки, которые в основном отвечают за регенерацию первичных сенсорных нейронов во время нормального эпителиального оборота, и горизонтальные базальные клетки. Последние действуют как активированные резервные стволовые клетки при прямом повреждении эпителия с потерей опорных клеток наряду с рецепторными. Они обеспечивают пролиферацию и способствуют восстановлению обонятельного эпителия (Leung et al. 2007).

Обонятельный эпителий содержит также дополнительные типы клеток, включая микро-

виллярные, которые могут действовать как сенсорные клетки, и секретирующие слизь клетки железы Боумана (Nomura et al. 2004).

Таким образом, обонятельный нейроэпителий является высокоустойчивой нейропролиферативной зоной, содержащей как резервные, так и активные популяции стволовых клеток, реагирующих на сигналы обратной связи и множественные регуляторные механизмы для поддержания эпителиального гомеостаза (Choi, Goldstein 2018).

Показано, что коронавирус CoV-2 — как SARS-CoV — заражает клетки посредством взаимодействия между его спайковым (S) белком и белком ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) на клетках-мишенях; это взаимодействие требует расщепления S белка протеазой клеточной поверхности TMPRSS2 (мембрано-связанная сериновая протеаза, продукт гена *TMPPRSS2*). Результаты показывают, что опорные клетки, клетки железы Боумана и горизонтальные стволовые клетки в обонятельном эпителии коэкспрессируют ассоциированный с входом CoV молекулы ACE2 и TMPRSS2, не экспрессирующиеся в зрелых рецепторных нейронах.

Следовательно, CoV-2 напрямую не входит в сенсорные нейроны, а вместо этого нацеливается на опорные и стволовые клетки, инфицирование которых может быть причиной аносмии и связанной с ней обонятельной дисфункции у пациентов с COVID-19. Поэтому паттерны экспрессии генов в обонятельных опорных и стволовых клетках имеют важное значение для клинического наблюдения аносмии у пациентов с COVID-19 (Brann et al. 2020; Hoffmann et al. 2020; Li et al. 2003). Таким образом, считается, что ACE2 и TMPRSS2 обязывают CoV-2 инфицировать клетки.

Выявлено значительное разнообразие среди вирусов по характеру и степени повреждения обонятельного эпителия. Так, заражение крыс коронавирусом также вызывает повреждение опорных клеток в нем. Однако при инфицировании SDAV (Sialodacryoadenitis virus — коронавирус) заражение нейроэпителиальной ткани возникает через несколько дней после повреждения респираторного эпителия и сопровождается потерей не только его ресничек, но и обонятельных жгутиков сенсорных нейронов (Bihun, Percy 1995).

Вероятно, и при инфекции CoV-2 у человека повреждение опорных клеток в обонятельном эпителии может вызывать удаление обонятельных жгутиков с поверхности сенсорных нейронов, исключая возможность их взаимодействия

с обонятельным стимулом с последующим нарушением всей архитектуры обонятельного эпителия.

Обонятельные рецепторные нейроны экспрессируют белки обонятельных рецепторов в жгутиковой мембране наряду с другими компонентами сигнальной трансдукции, такими как специфические для обоняния G-белки и ионные каналы (Williams et al. 2014). Следовательно, если жгутики отсутствуют или имеют дефекты, обнаружение запахов не может осуществиться.

Таким образом, коронавирусная инфекция опорных клеток может быть достаточной, чтобы вызвать каскадное повреждение в обонятельном эпителии, которое завершается нарушением функции обонятельных клеток.

Считают, что потеря обонятельных сенсорных нейронов может возникать из-за аномалий в функции базальных клеток (Lauman et al. 2009). Возможно, что инфекция горизонтальных базальных клеток, которые экспрессируют ACE2 и TMPRSS2, также способствует обонятельной дисфункции.

Полагают, что при коронавирусном инфицировании повреждение этих клеток является причиной развития аносмии. Это обуславливается тем, что при медленной скорости нейрогенеза, наблюдаемой в обонятельном эпителии, гибель опорных клеток и неспособность горизонтальных базальных клеток эффективно возобновлять популяцию зрелых сенсорных нейронов приводит к аносмии. Кроме того, повреждение горизонтальных базальных клеток может вызвать нарушение дифференцировки предшественников нейронов, подавляя текущий нейрогенез (Lin et al. 2017).

В результате в эпителиальной ткани могут накапливаться незрелые сенсорные нейроны, не способные реагировать на специфические обонятельные стимулы и, вследствие этого, адекватно выполнять обонятельную функцию.

ACE2 и TMPRSS2 экспрессируются также в микровиллярных клетках и клетках железы Боумена, входящих в состав обонятельного эпителия. Эти клетки регулируют локальный ионный баланс. Поэтому повреждение микровиллярных клеток в обонятельной выстилке может изменить ионные градиенты в окружающей среде и, следовательно, изменить функциональные свойства сенсорных нейронов. Повреждение клеток железы Боумена также может способствовать обонятельной дисфункции, так как поражения этого типа клеток связаны с широким нарушением не только обонятельного нейроэпителия, но и обонятельной луковицы (Eriksson, Brittebo 1995).

Выявлена одна интересная особенность, которая заключается в том, что обонятельные сенсорные нейроны мыши и человека способны экспрессировать несколько молекул, имеющих отношение к проникновению коронавируса в клетки. Этот вывод предполагает механизмы, с помощью которых различные коронавирусы могут заражать обонятельные рецепторные клетки.

Интересно отметить, что у юных мышей, в отличие от взрослых, наблюдались более низкие уровни экспрессии ACE2 и TMPRSS2 в клетках респираторного и обонятельного эпителиев (Brann et al. 2020). Вероятно, с этим связано поражение новым вирусом главным образом пожилых пациентов.

Поскольку распознавание, трансдукция и начальное кодирование запаха происходит в периферическом отделе обонятельной сенсорной системы, очевидно, что для нормальной обонятельной функции необходимо поддержание популяции зрелых обонятельных сенсорных нейронов, экспрессирующих данный обонятельный рецептор, аксоны которых сходятся только к конкретным гломерулам в луковице, где они образуют синапсы с митральными или тафтинговыми клетками, образуя в ней пространственную карту запахов (Mombaerts et al. 1996).

Несмотря на то, что многие исследования были сосредоточены на нейроэпителиальных изменениях у пациентов с поствирусной обонятельной дисфункцией, исследования на животных показали, что вирусы могут повредить центральные обонятельные пути и различные области мозга, включая обонятельные структуры высшего порядка. Дисфункция центральной нервной системы наблюдалась у 36,4 % пациентов с COVID-19 и проявлялась в различных неврологических симптомах, связанных с ЦНС (Mao et al. 2020).

Многие вирусы, в том числе коронавирусы, распространяются из носового эпителия к обонятельной луковице и грушевидной коре. Предполагается, что эта форма центральной инфекции опосредует обонятельный дефицит даже в отсутствие длительного повреждения обонятельного эпителия (Barnett, Perlman 1993; Bohmwald et al. 2018; Doty et al. 2019; Li et al. 2020; Netland et al. 2008; Wheeler et al. 2017; Youngentob et al. 2001).

Многие вирусы, размножаясь в клетках легочной ткани, вызывают снижение скорости диффузии газов в легких, уменьшая альвеолярный газообмен. В результате в ЦНС развивается гипоксия, увеличивается анаэробный

метаболизм в митохондриях клеток головного мозга. В результате возникает серьезное повреждение структуры и функции нервной системы, включая ишемические изменения нейронов, обусловленные метаболическими нарушениями и гипоксией во время острой фазы болезни (Abdenmour et al. 2012).

Анализ данных, полученных от пациентов с COVID-19, показал, что они страдают от тяжелой гипоксии. Почти у 40 % пациентов с коронавирусной инфекцией развиваются симптомы дисфункции головного мозга, которая может вызывать инфекционную токсическую энцефалопатию (Wu et al. 2020).

Ослабление функции ЦНС может привести к нарушению когнитивных функций у больных коронавирусной инфекцией. Это предположение подтверждается потерей способности инфицированных пациентов идентифицировать запахи, которую наблюдали Доти и др. (Doty et al. 2019).

Предложено несколько механизмов поражения ЦНС нейротропными вирусами. К их числу относится нейронный путь их проникновения в центральную нервную систему через обонятельные нейроны. Прямые проекции аксонов обонятельных сенсорных нейронов в обонятельную луковицу формируют уникальную анатомическую организацию обонятельных нервов и обонятельной луковицы, напрямую соединяющую полость носа с передним мозгом. Через этот канал между назальным эпителием и ЦНС коронавирус может попасть в мозг через обонятельный тракт на ранних стадиях инфекции или назальной вакцинации (Desforges et al. 2020; Mori 2015).

Однако, возможно, коронавирус из слизистой оболочки носа может достигать головного мозга через механизмы, независимые от аксонального транспорта из сенсорных нейронов, через обонятельный нерв и обонятельную луковицу и через 7 дней после заражения вызвать воспалительную и демиелинизирующую реакции (Gu et al. 2005).

Таким образом, CoV может проникать в ЦНС с периферии через нервные пути. Этот вывод относится и к COVID-19-инфицированным, поскольку пациенты часто страдают от тяжелой гипоксии, которая может вызвать последующее повреждение нервной системы, сопровождающееся нарушениями когнитивных функций.

Такое развитие событий убеждает в необходимости объективной оценки большой выборки пациентов, инфицированных COVID-19, на доклинической стадии заболевания.

Заключение

По сведениям врачей, заражение COVID-19 сопровождается внезапной потерей обоняния, которая предшествует основным характерным симптомам заболевания и является признаком более легкой формы COVID-19. Чтобы понять, является ли ранняя anosmia предшественником коронавирусной инфекции, в 38 странах ведется беспрецедентное международное исследование симптомов COVID-19 у страдающих этой инфекцией пациентов с потерей обоняния. Полагают, что если вирус SARS-CoV-2 изначально концентрируется в верхних дыхательных путях, вызывая обонятельную дисфункцию, то ее выявление может снизить риски более тяжелой и быстро развивающейся пневмонии.

Полагают, что тестирование обоняния может помочь идентифицировать пациентов с COVID-19, которые нуждаются в раннем лечении или карантине (Moein et al. 2020). Поскольку обонятельная дисфункция наблюдается у бессимптомных субъектов, объективная количественная оценка обонятельной функции позволит своевременно изолировать их и уменьшить количество бессимптомных лиц, которые не осознают необходимости самоизоляции (Hopkins, Kumar 2020).

Разработаны различные стандартные обонятельные тесты, среди которых особой популярностью пользуется UPSIT (University of Pennsylvania Smell Identification Test), применявшийся в большом количестве исследований, особенно касающихся нейродегенеративных заболеваний (Doty et al. 1984).

По способности человека идентифицировать запахи появляется возможность характеризовать обонятельную функцию не только периферического, но и центрального отдела обонятельного анализатора, что дает в руки исследователя инструмент для выявления ранних когнитивных нарушений, частным случаем которых является ослабление рабочей памяти, которые могут быть последствием коронавирусной инфекции (Verneti et al. 2016).

В работах по исследованию пациентов с COVID-19 использовали главным образом UPSIT. Но он не выявляет дисфункцию обонятельного нейроэпителия, так как не предусматривает определения порогов обонятельного обнаружения запахов. Однако, как следует из выше сказанного, уже на ранних этапах заболевания коронавирусной инфекцией страдает именно сенсорный эпителий. Для оценки периферического отдела обонятельного анализатора в качестве стандартного обонятельного

теста исследователи пользуются «Sniffin' Sticks» (Oleszkiewicz et al. 2019). Преимуществом этого теста является возможность получить информацию также по способности дискриминировать и идентифицировать запахи. Тестирование каждого человека занимает до 30 минут. В результате за короткое время врач получает полную характеристику функционального состояния обонятельной сенсорной системы от периферии

до центральной нервной системы уже на раннем этапе коронавирусной инфекции.

Следовательно, в условиях отсутствия медицинских тестов на коронавирус тестирование обонятельной чувствительности может стать инструментом для выявления инфицирования на начальной стадии заболевания и бессимптомных пациентов для своевременной их самоизоляции.

References

- Abdenmour, L., Zeghal, C., Deme, M., Puybasset, L. (2012) Interaction cerveau-poumon [Interaction brain-lungs]. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol. 31, no. 6, pp. e101–e107. PMID: 22694980. DOI: 10.1016/j.annfar.2012.04.013 (In French)
- Bagheri, S. H., Asghari, A., Farhadi, M. et al. (2020) Coincidence of COVID-19 epidemic and olfactory dysfunction outbreak in Iran. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*, vol. 34, no. 1, pp. 446–452. DOI: 10.1101/2020.03.23.20041889 (In English)
- Barber, C. N., Coppola, D. M. (2015) Compensatory plasticity in the olfactory epithelium: Age, timing, and reversibility. *Journal of Neurophysiology*, vol. 114, no. 3, pp. 2023–2032. PMID: 26269548. DOI: 10.1152/jn.00076.2015 (In English)
- Barnett, E. M., Perlman, S. (1993) The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology*, vol. 194, no. 1, pp. 185–191. PMID: 8386871. DOI: 10.1006/viro.1993.1248 (In English)
- Bihun, C. G., Percy, D. H. (1995) Morphologic changes in the nasal cavity associated with sialodacryoadenitis virus infection in the Wistar rat. *Veterinary Pathology*, vol. 32, no. 1, pp. 1–10. PMID: 7725592. DOI: 10.1177/030098589503200101 (In English)
- Bohmwald, K., Gálvez, N.M.S., Ríos, M., Kalergis, A. M. (2018) Neurologic alterations due to respiratory virus infections. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, article 386. PMID: 30416428. DOI: 10.3389/fncel.2018.00386 (In English)
- Brann, D. H., Tsukahara, T., Weinreb, C. et al. (2020) Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Science Advances*, vol. 6, no. 31, article eabc5801. DOI: 10.1126/sciadv.abc5801 (In English)
- Chen, C. R., Kachramanoglou, C., Li, D. et al. (2014) Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: A review. *Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base*, vol. 75, no. 5, pp. 293–300. PMID: 25302141. DOI: 10.1055/s-0033-1361837 (In English)
- Choi, R., Goldstein, B. J. (2018) Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, vol. 3, no 1, pp. 35–42. PMID: 29492466. DOI: 10.1002/lio2.135 (In English)
- Croy, I., Symmank, A., Schellong, J. et al. (2014) Olfaction as a marker for depression in humans. *Journal of Affective Disorders*, vol. 160, pp. 80–86. PMID: 24445134. DOI: 10.1016/j.jad.2013.12.026 (In English)
- Desforges, M., Coupanec, A. L., Dubeau, P. et al. (2020) Human coronaviruses and other respiratory viruses: Underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? *Viruses*, vol. 12, no. 1, article 14. PMID: 31861926. DOI: 10.3390/v12010014 (In English)
- Doty, R. L. (2019) Systemic diseases and disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 164, pp. 361–387. PMID: 31604558. DOI: 10.1016/B978-0-444-63855-7.00021-6 (In English)
- Doty, R. L., Shaman, P., Dann, M. (1984) Development of the University of Pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiology & Behavior*, vol. 32, no. 3, pp. 489–502. PMID: 6463130. DOI: 10.1016/0031-9384(84)90269-5 (In English)
- Doty, R. L., Wylie, C., Potter, M. (2019) Clinical validation of the olfactory detection threshold module of the Snap & Sniff® olfactory test system. *International Forum of Allergy & Rhinology*, vol. 9, no. 9, pp. 986–992. PMID: 31283113. DOI: 10.1002/alr.22377 (In English)
- Eriksson, C., Brittebo, E. B. (1995) Dichlobenil in the fetal and neonatal mouse olfactory mucosa. *Toxicology*, vol. 96, no. 2, pp. 93–104. PMID: 7886688. DOI: 10.1016/0300-483x(94)02914-g (In English)
- Gilbert, P. E., Pirogovsky, E., Brushfield, A. M. et al. (2009) Age-related changes in associative learning for olfactory and visual stimuli in rodents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1170, no. 1, pp. 718–724. PMID: 19686218. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.03929.x (In English)

- Goldstein, B. J., Goss, G. M., Choi, R. et al. (2016) Contribution of Polycomb group proteins to olfactory basal stem cell self-renewal in a novel c-KIT1 culture model and in vivo. *Development*, vol. 143, no. 23, pp. 4394–4404. PMID: 27789621. DOI: 10.1242/dev.142653 (In English)
- Gu, J., Gong, E., Zhang, B. et al. (2005) Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 3, pp. 415–424. PMID: 16043521. DOI: 10.1084/jem.20050828 (In English)
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S. et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 271–280. PMID: 32142651. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052 (In English)
- Holbrook, E. H., Leopold, D. A. (2006) An updated review of clinical olfaction. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, vol. 14, no. 1, pp. 23–28. PMID: 16467634. DOI: 10.1097/01.moo.0000193174.77321.39 (In English)
- Hopkins, C., Kumar, N. (2020) Loss of sense of smell as marker of COVID-19 infection. *ENT UK*. [Online]. Available at: <https://www.entuk.org/loss-sense-smell-marker-covid-19-infection> (accessed 20.06.2020). (In English)
- Kallmann, F., Schoenfeld, W. A., Barrera, S. E. (1944) The genetic aspects of primary eunuchoidism. *American Journal of Mental Deficiency*, vol. 48, pp. 203–236. (In English)
- Kern, R. C., Quinn, B., Rosseau, G., Farbman, A. I. (2000) Post-traumatic olfactory dysfunction. *Laryngoscope*, vol. 110, no. 12, pp. 2106–2109. PMID: 11129030. DOI: 10.1097/00005537-200012000-00025 (In English)
- Kulaga, H. M., Leitch, C. C., Eichers, E. R. et al. (2004) Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nature Genetics*, vol. 36, no. 9, pp. 994–998. PMID: 15322545. DOI: 10.1038/ng1418 (In English)
- Layman, W. S., McEwen, D. P., Beyer, L. A. et al. (2009) Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in *Chd7* deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 11, pp. 1909–1923. PMID: 19279158. DOI: 10.1093/hmg/ddp112 (In English)
- Leung, C. T., Coulombe, P. A., Reed, R. R. (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 6, pp. 720–726. PMID: 17468753. DOI: 10.1038/nn1882 (In English)
- Li, Y.-C., Bai, W.-Z., Hashikawa, T. (2020) The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, vol. 92, no. 6, pp. 552–555. PMID: 32104915. DOI: 10.1002/jmv.25728 (In English)
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N. et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, vol. 426, no. 6965, pp. 450–454. PMID: 14647384. DOI: 10.1038/nature02145 (In English)
- Lin, B., Coleman, J. H., Peterson, J. N. et al. (2017) injury induces endogenous reprogramming and dedifferentiation of neuronal progenitors to multipotency. *Cell Stem Cell*, vol. 21, no. 6, pp. 761–774. PMID: 29174332. DOI: 10.1016/j.stem.2017.09.008 (In English)
- Mao, L., Jin, H., Wang, M. et al. (2020) Neurological manifestations of hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Neurology*, vol. 77, no. 6, pp. 683–690. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.1127 (In English)
- Moein, Sh. T., Hashemian, S. M. R., Mansourafshar, B. et al. (2020) Smell dysfunction: A biomarker for COVID-19. *International Forum of Allergy & Rhinology*, vol. 10, no. 8, pp. 944–950. PMID: 32301284. DOI: 10.1002/alar.22587 (In English)
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C. et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, vol. 87, no. 4, pp. 675–686. PMID: 8929536. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81387-2 (In English)
- Mori, I. (2015) Transolfactory neuroinvasion by viruses threatens the human brain. *Acta Virologica*, vol. 59, no. 4, pp. 338–349. PMID: 26666182. DOI: 10.4149/av_2015_04_338 (In English)
- Netland, J., Meyerholz, D. K., Moore, S. et al. (2008) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *Journal of Virology*, vol. 82, no. 15, pp. 7264–7275. PMID: 18495771. DOI: 10.1128/JVI.00737-08 (In English)
- Nomura, T., Tokahashi, S., Ushiki, T. (2004) Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: Light and scanning microscopic studies. *Archives of Histology and Cytology*, vol. 67, no. 2, pp. 159–170. PMID: 15468955. DOI: 10.1679/aohc.67.159 (In English)
- Oleszkiewicz, A., Schriever, V. A., Croy, I. et al. (2019) Updated Sniffin' Sticks normative data based on an extended sample of 9139 subjects. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 276, no. 3, pp. 719–728. PMID: 30554358. DOI: 10.1007/s00405-018-5248-1 (In English)
- Richard, M., Taylor, S. R., Greer, C.A. (2010) Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 35, pp. 15613–15618. PMID: 20679234. DOI: 10.1073/pnas.1007931107 (In English)
- Roisen, F. J., Klueber, K. M., Lu, C. L. et al. (2001) Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, vol. 890, no. 1, pp. 11–22. PMID: 11164764. DOI: 10.1016/s0006-8993(00)03016-x (In English)
- Saito, H., Mimmack, M., Kishimoto, J. et al. (1998) Expression of olfactory receptors, G-proteins and AxCAMs during the development and maturation of olfactory sensory neurons in the mouse. *Developmental Brain Research*, vol. 110, no. 1, pp. 69–81. PMID: 9733924. DOI: 10.1016/s0165-3806(98)00096-0 (In English)

- Schofield, P. W., Moore, T. M., Gardner, A. (2014) Traumatic brain injury and olfaction: A systematic review. *Frontiers in Neurology*, vol. 5, article 5. PMID: 24478752. DOI: 10.3389/fneur.2014.00005 (In English)
- Seiden, A. M. (2004) Postviral olfactory loss. *Otolaryngologic Clinics of North America*, vol. 37, no. 6, pp. 1159–1166. PMID: 15563908. DOI: 10.1016/j.otc.2004.06.007 (In English)
- Vernetti, P. M., Rossi, M., Cerquetti, D. et al. (2016) Comparison of olfactory identification patterns among Parkinson's disease patients from different countries. *Chemical Senses*, vol. 41, no. 1, pp. 77–83. PMID: 26512070. DOI: 10.1093/chemse/bjv062 (In English)
- Wheeler, D. L., Athmer, J., Meyerholz, D. K., Perlman, S. (2017) Murine olfactory bulb interneurons survive infection with a neurotropic coronavirus. *Journal of Virology*, vol. 91, no. 22, article e01099-17. PMID: 28835503. DOI: 10.1128/JVI.01099-17 (In English)
- Williams, C. L., McIntyre, J. C., Norris, S. R. et al. (2014) Direct evidence for BBSome-associated intraflagellar transport reveals distinct properties of native mammalian cilia. *Nature Communications*, vol. 5, article 5813. PMID: 25504142. DOI: 10.1038/ncomms6813 (In English)
- Wintermann, G.-B., Donix, M., Joraschky, P. et al. (2013) Altered olfactory processing of stress related body odors and artificial odors in patients with panic disorder. *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e74655. PMID: 24086358. DOI: 10.1371/journal.pone.0074655 (In English)
- Wrobel, B. B., Leopold, D. A. (2004) Clinical assessment of patients with smell and taste disorders. *Otolaryngologic Clinics of North America*, vol. 37, no. 6, pp. 1127–1142. PMID: 15563906. DOI: 10.1016/j.otc.2004.06.010 (In English)
- Wu, Y., Xu, X., Chen, Z. et al. (2020) Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 87, pp. 18–22. PMID: 32240762. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.03.031 (In English)
- Xydakis, M. S., Dehgani-Mobaraki, P., Holbrook, E. H. et al. (2020) Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 20, no. 9, pp. 1015–1016. PMID: 32304629. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30293-0 (In English)
- Yan, C. H., Faraji, F., Prajapati, D. P. et al. (2020) Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. *International Forum of Allergy & Rhinology*, vol. 10, no. 7, pp. 806–813. PMID: 32279441. DOI: 10.1111/alf.22579 (In English)
- Youngentob, S. L., Schwob, J. E., Saha, S. et al. (2001) Functional consequences following infection of the olfactory system by intranasal infusion of the olfactory bulb line variant (OBLV) of mouse hepatitis strain JHM. *Chemical Senses*, vol. 26, no. 8, pp. 953–963. PMID: 11595672. DOI: 10.1093/chemse/26.8.953 (In English)

Cardiorespiratory feedback training as a non-pharmacological intervention and its application in stroke patients

V. V. Kemstach^{✉1}, L. S. Korostovtseva², I. V. Sakovskiy¹, M. V. Bochkarev²,
A. N. Alekhin¹, Yu. V. Sviryaev^{2,3}

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika River Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

² Almazov National Medical Research Centre, 2 Akkuratova Str., Saint Petersburg 197341, Russia

³ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
44 Toreza Avenue, Saint Petersburg 194223, Russia

Authors

Valeria V. Kemstach, SPIN: 6370-8744, ORCID: 0000-0002-0047-3428,
e-mail: v.kemstach@icloud.com

Lyudmila S. Korostovtseva,
SPIN: 2587-1588,
ORCID: 0000-0001-7585-6012,
e-mail: lyudmila_korosto@mail.ru

Igor V. Sakowsky, SPIN: 1090-3333,
ORCID: 0000-0001-8947-1463,
e-mail: Igor.sakowsky@yandex.ru

Anatoly N. Alekhin, SPIN: 8042-3024,
ORCID: 0000-0002-6487-0625,
e-mail: termez59@mail.ru

Mikhail V. Bochkarev, SPIN: 5518-3304, ORCID: 0000-0002-7408-9613,
e-mail: michail_bv@list.ru

Yurii V. Sviryaev, SPIN: 5907-1097,
ORCID: 0000-0002-3170-0451,
e-mail: yusvyr@yandex.ru

For citation: Kemstach, V. V., Korostovtseva, L. S., Sakowsky, I. V., Alekhin, A. N., Bochkarev, M. V., Sviryaev, Yu. V. (2020) Cardiorespiratory feedback training as a non-pharmacological intervention and its application in stroke patients. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 196–201. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-196-201

Received 11 April 2020; reviewed 13 May 2020; accepted 14 May 2020.

Funding: This research was funded by research grant No. 20-013-00874 (Russian Foundation for Basic Research).

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

Abstract. The interaction between cardiovascular and respiratory systems is a reciprocal one mediated by mechanical factors, autonomic nervous system, and baroreflex regulation and manifested in the changes in heart rate, blood pressure and ventilation. These changes can be rather easily registered and measured, which opens the opportunity for clinical use (both in diagnostics and therapy).

In the paper we briefly review the potential role and implementation of cardiorespiratory biofeedback in treating patients with neurological diseases, in particular, stroke survivors. The available evidence suggests that this method based on the existing cardiorespiratory coupling mechanisms may prove its efficacy in treating a range of medical conditions including cerebrovascular disorders. The prospects of cardiorespiratory biofeedback application in improving a stroke patient's quality of life (including physical, emotional, and cognitive levels) and clinical status require further investigation. The topicality of determining the long-term effect of novel non-pharmacological interventions as an adjunct to conventional therapies is defined by their limitations and significant pharmacological load.

Keywords: cardiorespiratory coupling, cardiorespiratory feedback, biofeedback, cerebrovascular diseases, neurological diseases, stroke, heart rate variability biofeedback, non-pharmacological intervention.

Interaction between cardiovascular system and respiration

The interaction between cardiovascular and respiratory systems has been extensively studied and described in its physiological and pathological variants. It is a reciprocal interaction which is mediated by mechanical factors (location of the lungs and the heart in the thoracic cavity, changes of the thoracic pleural pressure during respiration), autonomic nervous system (in particular, vagal activity), and baroreflex regulation, and is manifested in the changes in heart rate, blood pressure and ventilation (well-known manifestations are cardiopulmonary reflexes, respiratory sinus arrhythmia, etc.) (Bronicki et al. 2016). These changes can be rather easily registered and measured, which opens an opportunity for clinical use (both in diagnostics and therapy).

In this paper we will discuss the available therapeutic approaches based on (bio)feedback, which involve cardiorespiratory coupling and can be used in the comprehensive treatment of stroke.

Heart rate variability biofeedback

One of the non-pharmacological interventions targeting cardiovascular homeostatic reflexes (Gevirtz 2013) is heart rate variability biofeedback (HRVB), also referred to as respiratory sinus arrhythmia (RSA) biofeedback.

Heart rate variability refers to a measure of the variation among the intervals between consecutive heartbeats over time (Thayer et al. 2012). There is a range of measures used in order to assess HRV, among them standard deviation of all intervals between heartbeats in 24 hours, standard deviation of 5 minute intervals, root mean square of successive differences, and RSA.

RSA corresponds to the increase in heart rate with inhalation and the decrease in heart rate with exhalation and is considered to be a measure of physical and emotional resilience and a reliable physiological marker of autonomic balance, homeostatic regulation, and adaptive stress-response. Low HRV is associated with increased risk of mortality, and HRV has been proposed as a marker for disease (Thayer, Lane 2007).

In HRVB a participant practices a diaphragmatic breathing technique during which their breathing slows down to 6–7 breaths per minute, and RSA is maximized and matched to heart rate patterns. When the pre-assigned training threshold is surmounted, the participant receives feedback which helps to promote and reinforce this physiological pattern.

Operant conditioning model

To some extent we can refer to operant conditioning model (described by B. F. Skinner) when we explore different types of biofeedback (HRVB, EMG biofeedback, EEG biofeedback, galvanic skin response biofeedback, etc.). Operant conditioning as a method of learning establishes the link between a particular type of behaviour and its consequences. Thus, the target physiological pattern (“behaviour”) is positively rewarded, and after sufficient training tends to become reinforced. Essentially, the efficacy of the training significantly depends on a patient’s motivation and compliance, as well as the ability of the therapist to design optimal training protocol, determine and adjust training thresholds and keep biofeedback in line with other interventions which are being applied, i. e. psychotherapy.

HRVB: applications and possible mechanisms

Gevirtz (2013) summarizes scientific sources on the application of HRVB in various disorders and distinguishes the following clusters:

1. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease, functional gastrointestinal disorders, cardiovascular disorders, fibromyalgia, hypertension, and chronic muscle pain are considered to be affected by HRVB by means of improved autonomic regulation.

2. Depression, anxiety, and sleep disorders are considered to respond to HRVB via central effects by way of the vagal afferent nerve. Optimal performance is considered to be another intervention target within this proposed mechanism.

3. Lehrer et al. (2010) suggest that HRVB decreases autonomic dysfunction produced by lipopolysaccharide-induced inflammation in patients with inflammatory conditions. Thus, further research is necessary to determine the utility of HRVB in modulating dysfunctional inflammatory responses.

According to Eddie et al. (2015), HRB has potential as an add-on intervention for established substance use disorders treatment protocols as a method to ameliorate autonomic nervous system dysregulation in key processes implicated in the development and maintenance of addictive pathology — affecting dysregulation and craving.

Biofeedback application in stroke: targets and delivery

Here we will focus on stroke as a leading cause of disability among neurological diseases. Effective non-pharmacological rehabilitation methods are

constantly being sought to complement conventional therapies, among them non-invasive brain stimulation, brain-machine interfaces, biofeedback, various types of psychotherapy, etc.

The most common biofeedback therapeutic targets in stroke patients are gait biomechanics and upper limb and lower limb sensorimotor deficits. Recent research also investigates the effects of neurofeedback on brain plasticity and cognitive processes (Kober et al. 2017).

Biofeedback is traditionally delivered via visual, acoustic or haptic modalities. It means that the information on physiological changes (muscle tension, heart rate, breathing, electrical activity of the brain, skin conductance, temperature, etc.) is measured by electrical sensors and fed back to the patient via stimuli of different modalities (pictures/video, sound, or multimodal biofeedback). As well as a training tool, biofeedback equipment can serve diagnostic purposes: it can be used to register and analyze the above-mentioned data.

Virtual reality (VR) environment is a novel biofeedback delivery channel. It is an environment generated by technical means replicating reality as closely as possible, which is transmitted to a person via visual, acoustic or haptic modalities. VR simulates both exposure and response to exposure. In order to create a convincing image of reality, a computer synthesis of the characteristics of and reactions to VR is performed in real time, involving various technologies.

VR, which began its development in the form of computer games, quickly proved itself as an effective method of neurorehabilitation. A major experience in using VR has been accumulated in the field of motor function recovery after stroke (Cirstea, Levin 2000; Bourbonnais, Vanden Noven 1989; Bourbonnais et al 1992).

One possible feature determining the efficacy of VR in motor function recovery after stroke is the stimulation of motor imagery by means of visual feedback. Research literature distinguishes two components of motor imagery: the visual and the kinaesthetic one. In the VR method, positive visual feedback is added to the imagery. To date, therapeutic efficacy of motor imagery (imaginary movements) on the development of motor skills has already been shown in many studies, both in healthy subjects and in pathology. Experiments have shown that in healthy volunteers, the same areas of the brain are activated during motor imagery training as during real movement, but with a slightly lower degree of involvement of the primary motor cortex (M1) and with some difference in topography (Lotze, Halsband 2006; Sharma, Pomeroy 2006; Simmons et al. 2008). Thus,

the movement recreated in a virtual environment is perceived by the brain as a real motor act and is reinforced by positive visual feedback, which in turn activates the undamaged parts of the motor cortex, contributing to the functional restructuring of neural connections and brain plasticity. To our knowledge, the VR environment interface is not currently used in HRVB, however, further development and integration of these technologies cannot be excluded in the future.

Potential levels of cardiorespiratory biofeedback intervention in stroke: opinion

To our knowledge, no systematic research has been undertaken to explore the effects of cardiorespiratory feedback on physical, emotional, cognitive or functional activity levels in stroke survivors. We will discuss the potential effect of this type of biofeedback on selected targets of post-stroke rehabilitation, specifically autonomic regulation, sleep, and emotional regulation.

1. Autonomic regulation

Impaired autonomic regulation, reflected in a predominance of sympathetic activity, is registered in stroke survivors (Hilz et al. 2019). It is yet to be discovered whether interventions (or some specific types of interventions) that target sympathetic activity inhibition or parasympathetic activity promotion might be associated with a better prognosis. Therefore, parasympathetic reflex stimulation by means of HRVB training may reinforce the improvement of autonomic regulation after stroke.

2. Sleep

Sleep disorders are common after stroke and are associated with various adverse outcomes (Seiler et al. 2019).

Sympathetic overactivity including insomnia and obstructive sleep apnoea syndrome is reported in patients with sleep disturbances (Abboud, Kumar 2014). Without timely intervention acute insomnia tends to transform into a chronic form.

Hyperarousal is considered a central element in current etiological models of the insomnia disorder (Kalmbach et al. 2018). Cerebral hyperarousal affects somatic, cognitive and emotional functioning. Common comorbidities of insomnia include anxiety and mood disorders.

Non-pharmacological methods are considered to be the first-choice treatment for stroke-induced sleep problems. HRVB promotes parasympathetic effects via greater vagus nerve traffic, thus helping to initiate and maintain sleep.

3. Emotional regulation

The most common neuropsychiatric disturbances due to stroke are depression, anxiety and apathy (Ferro et al. 2016). About one-third of stroke patients suffer from these conditions resulting in impeded rehabilitation, more disability, a higher risk of stroke recurrence, impaired social functioning, decreased quality of life, and an overall poor prognosis. Moreover, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and stress response are impaired in depressive patients (Pariante, Miller 2001), and stress axis activity correlates with post-stroke cognitive impairment. According to recent TABASCO study, elevated HPA axis activity predicts lower cognitive outcomes after stroke (Ben Assayag et al. 2017).

The relationship between stroke and depression is described differently by the neuroanatomical and the psychological theory (Gainotti, Marra 2002). The neuroanatomical theory suggests that a left frontal stroke might cause a major post-stroke depression, while the psychological theory considers post-stroke depression to be a result of psychosocial adjustment following stroke.

Depression influences several functional levels, i. e. mood, cognition, and physiology. It provokes a shift in autonomic regulation towards sympathetic effects and decreased HRV (Kemp et al. 2014; Koschke et al. 2009).

Research in a group of subjects with major depressive disorder (MDD) suggests that HRVB may promote a decrease in depressive symptoms (Karavidas et al. 2007). The authors presume that regular exercise of homeostatic reflexes contributes to the treatment of depression even when the changes in baseline HRV are less significant. Several other sources have also reported that HRVB might show efficacy in reducing symptoms of depression and anxiety (Patron et al. 2013; Henriques et al. 2011; Tan et al. 2011).

We hypothesize that HRVB may be a promising non-pharmacological intervention targeting baroreflex function and vagus nerve activity in treating post-stroke depression as well. In addition, HRVB helps a patient to transfer his or her attention

to the process of breathing and muscle relaxation and distract it from maladaptive repetitive thoughts and emotional tension.

HRVB may be a useful adjunct to psychotherapy and antidepressants, bearing in mind that antidepressant medications do not increase HRV and may even decrease it, according to some studies (Bassett 2016; Gorman, Sloan 2000), and considering potential cardiotoxic effects of certain tricyclic antidepressants (Kahl 2018).

Conclusion and future work

HRVB is a relatively new area of research, and its potential in complex therapy of stroke is yet to be discovered. Existing research suggests that it may prove its efficacy in treating a range of medical conditions including cerebrovascular disorders. The prospects of cardiorespiratory biofeedback application in improving a stroke patient's quality of life (including physical, emotional, and cognitive levels) and clinical status require further investigation. The topicality of determining the long-term effect of novel non-pharmacological interventions as an adjunct to conventional therapies is defined by their limitations and significant pharmacological load.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contribution statement

V. V. Kemstach conceived and designed the research, examined scientific sources, and took the lead in writing and proofreading the manuscript. L. S. Korostovtseva, Yu. V. Sviryaev, and A. N. Alekhin contributed to the design of the research. All authors provided critical feedback that helped to shape the research and contributed to writing and correcting the manuscript.

References

- Abboud, F., Kumar, R. (2014) Obstructive sleep apnea and insight into mechanisms of sympathetic overactivity. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 124, no. 4, pp. 1454–1457. PMID: 24691480. DOI: 10.1172/JCI70420 (In English)
- Bassett, D. (2016) A literature review of heart rate variability in depressive and bipolar disorders. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, vol. 50, no. 6, pp. 511–519. PMID: 26698824. DOI: 10.1177/0004867415622689 (In English)

- Ben Assayag, E., Tene, O., Korczyn, A. D. et al. (2017) High hair cortisol concentrations predict worse cognitive outcome after stroke: Results from the TABASCO prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 82, pp. 133–139. PMID: 28549269. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.05.013 (In English)
- Bourbonnais, D., Vanden Noven, S. (1989) Weakness in patients with hemiparesis. *The American Journal of Occupational Therapy*, vol. 43, no. 5, pp. 313–319. PMID: 2655457. DOI: 10.5014/ajot.43.5.313 (In English)
- Bourbonnais, D., Vanden Noven, S., Pelletier, R. (1992) Incoordination in patients with hemiparesis. *Canadian Journal of Public Health*, vol. 83, suppl. 2, pp. S58–S63. PMID: 1468052. (In English)
- Bronicki, R. A., Penny, D. J., Anas, N. G., Fuhrman, B. (2016) Cardiopulmonary interactions. *Pediatric Critical Care Medicine*, vol. 17, no. 8, suppl. 1, pp. S182–S193. PMID: 27490598. DOI: 10.1097/PCC.0000000000000829 (In English)
- Cirstea, M. C., Levin, M. F. (2000) Compensatory strategies for reaching in stroke. *Brain*, vol. 123, no. 5, pp. 940–953. PMID: 10775539. DOI: 10.1093/brain/123.5.940 (In English)
- Eddie, D., Vaschillo, E., Vaschillo, B., Lehrer, P. (2015) Heart rate variability biofeedback: Theoretical basis, delivery, and its potential for the treatment of substance use disorders. *Addiction Research and Theory*, vol. 23, no. 4, pp. 266–272. PMID: 28077937. DOI: 10.3109/16066359.2015.1011625 (In English)
- Ferro, J. M., Caeiro, L., Figueira, M. L. (2016) Neuropsychiatric sequelae of stroke. *Nature Reviews. Neurology*, vol. 12, no. 5, pp. 269–280. PMID: 27063107. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.46 (In English)
- Gainotti, G., Marra, C. (2002) Determinants and consequences of post-stroke depression. *Current Opinion in Neurology*, vol. 15, no. 1, pp. 85–89. PMID: 11796955. DOI: 10.1097/00019052-200202000-00013 (In English)
- Gevirtz, R. (2013) The promise of heart rate variability biofeedback: Evidence-based applications. *Biofeedback*, vol. 41, no. 3, pp. 110–120. DOI: 10.5298/1081-5937-41.3.01 (In English)
- Gorman, J. M., Sloan, R. P. (2000) Heart rate variability in depressive and anxiety disorders. *American Heart Journal*, vol. 140, no. 4, suppl., pp. S77–S83. PMID: 11011352. DOI: 10.1067/mhj.2000.109981 (In English)
- Henriques, G., Keffer, S., Abrahamson, C., Horst, S. J. (2011) Exploring the effectiveness of a computer-based heart rate variability biofeedback program in reducing anxiety in college students. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 36, no. 2, pp. 101–112. PMID: 21533678. DOI: 10.1007/s10484-011-9151-4 (In English)
- Hilz, M. J., Liu, M., Roy, S., Wang, R. (2019) Autonomic dysfunction in the neurological intensive care unit. *Clinical Autonomic Research*, vol. 29, no. 3, pp. 301–311. PMID: 30022321. DOI: 10.1007/s10286-018-0545-8 (In English)
- Kahl, K. G. (2018) Direct and indirect effects of psychopharmacological treatment on the cardiovascular system. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, vol. 36, no. 1, article 20180054. PMID: 30427780. DOI: 10.1515/hmbci-2018-0054 (In English)
- Kalmbach, D. A., Cuamatzi-Castelan, A. S., Tonnu, C. V. et al. (2018) Hyperarousal and sleep reactivity in insomnia: Current insights. *Nature and Science of Sleep*, vol. 10, pp. 193–201. PMID: 30046255. DOI: 10.2147/NSS.S138823 (In English)
- Karavidas, M. K., Lehrer, P. M., Vaschillo, E. et al. (2007) Preliminary results of an open label study of heart rate variability biofeedback for the treatment of major depression. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 32, no. 1, pp. 19–30. PMID: 17333315. DOI: 10.1007/s10484-006-9029-z (In English)
- Kemp, A. H., Brunoni, A. R., Santos, I. S. et al. (2014) Effects of depression, anxiety, comorbidity, and antidepressants on resting-state heart rate and its variability: An ELSA-Brasil cohort baseline study. *The American Journal of Psychiatry*, vol. 171, no. 12, pp. 1328–1334. PMID: 25158141. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.13121605 (In English)
- Kober, S. E., Schweiger, D., Reichert, J. L. et al. (2017) Upper alpha based neurofeedback training in chronic stroke: Brain plasticity processes and cognitive effects. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 42, no. 1, pp. 69–83. PMID: 28197747. DOI: 10.1007/s10484-017-9353-5 (In English)
- Koschke, M., Boettger, M. K., Schulz, S. et al. (2009) Autonomy of autonomic dysfunction in major depression. *Psychosomatic Medicine*, vol. 71, no. 8, pp. 852–860. PMID: 19779146. DOI: 10.1097/PSY.0b013e3181b8bb7a (In English)
- Lehrer, P. M., Karavidas, M. K., Lu, S.-E. et al. (2010) Voluntarily produced increases in heart rate variability modulate autonomic effects of endotoxin induced systemic inflammation: An exploratory study. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 35, no. 4, pp. 303–315. PMID: 20635134. DOI: 10.1007/s10484-010-9139-5 (In English)
- Lotze, M., Halsband, U. (2006) Motor imagery. *Journal of Physiology. Paris*, vol. 99, no. 4–6, pp. 386–395. PMID: 16716573. DOI: 10.1016/j.jphysparis.2006.03.012 (In English)
- Pariante, C. M., Miller, A. H. (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: Relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, vol. 49, no. 5, pp. 391–404. PMID: 11274650 DOI: 10.1016/s0006-3223(00)01088-x (In English)
- Patron, E., Messerotti Benvenuti, S., Favretto, G. et al. (2013) Biofeedback assisted control of respiratory sinus arrhythmia as a biobehavioral intervention for depressive symptoms in patients after cardiac surgery: A preliminary study. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 38, no. 1, pp. 1–9. PMID: 22829151. DOI: 10.1007/s10484-012-9202-5 (In English)
- Seiler, A., Camilo, M., Korostovtseva, L. et al. (2019) Prevalence of sleep-disordered breathing after stroke and TIA: A meta-analysis. *Neurology*, vol. 92, no. 7, article e648–e654. PMID: 30635478. DOI: 10.1212/WNL.0000000000006904 (In English)

- Sharma, N., Pomeroy, V. M., Baron, J. C. (2006) Motor imagery: A backdoor to the motor system after stroke? *Stroke*, vol. 37, no. 7, pp. 1941–1952. PMID: 16741183. DOI: 10.1161/01.STR.0000226902.43357.fc (In English)
- Simmons, L., Sharma, N., Baron, J.-C., Pomeroy, V. M. (2008) Motor imagery to enhance recovery after subcortical stroke: Who might benefit, daily dose, and potential effects. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, vol. 22, no. 5, pp. 458–467. PMID: 18780881. DOI: 10.1177/1545968308315597 (In English)
- Tan, G., Dao, T. K., Farmer, L. et al. (2011) Heart rate variability (HRV) and posttraumatic stress disorder (PTSD): A pilot study. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, vol. 36, no. 1, pp. 27–35. PMID: 20680439. DOI: 10.1007/s10484-010-9141-y (In English)
- Thayer, J. F., Åhs, F., Fredrikson, M. et al. (2012) A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: Implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neuroscience and Behavioural Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 747–756. PMID: 22178086. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.11.00 (In English)
- Thayer, J. F., Lane, R. D. (2007) The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. *Biological Psychology*, vol. 74, no. 2, pp. 224–242. PMID: 17182165. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2005.11.013 (In English)

Развитие, структура и функции глиальных клеток *Drosophila melanogaster*

Е. В. Рябова¹, Е. М. Латыпова¹, Н. В. Сурина¹, А. Е. Комиссаров¹, С. В. Саранцева^{✉1}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Россия, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1

Сведения об авторах

Елена Владимировна Рябова,
ORCID: 0000-0003-0813-6722,
e-mail: ryabova_ev@pnpi.nrcki.ru

Евгения Михайловна Латыпова,
SPIN-код: 5623-6543, Scopus
AuthorID: 56071577900, ORCID:
0000-0001-7470-1078, e-mail:
latypova_em@pnpi.nrcki.ru

Нина Владимировна Сурина,
SPIN-код: 8682-1222,
ORCID: 0000-0002-7863-1748,
e-mail: ninasurina96@gmail.com

Артем Евгеньевич Комиссаров,
ORCID: 0000-0002-3564-1698,
e-mail: tem3650@yandex.ru

Светлана Владимировна
Саранцева, SPIN-код: 9532-4407,
ORCID: 0000-0002-3943-7504,
e-mail: Sarantseva_SV@pnpi.nrcki.ru

Для цитирования: Рябова, Е. В.,
Латыпова, Е. М., Сурина, Н. В.,
Комиссаров, А. Е., Саранцева, С. В.
(2020) Развитие, структура
и функции глиальных клеток
Drosophila melanogaster.

Интегративная физиология, т. 1,
№ 3, с. 202–211. DOI: 10.33910/2687-
1270-2020-1-3-202-211

Получена 15 мая 2020; прошла
рецензирование 19 мая 2020;
принята 19 мая 2020.

Финансирование: Работа
выполнена при финансовой
поддержке РФФИ в рамках
научного проекта № 18-34-00982.

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

Аннотация. Глиальные клетки (ГК) являются наиболее распространенным типом клеток в центральной нервной системе. Интерес к ним значительно увеличился за последние десятилетия по мере осознания того, что глия является не только «опорными» клетками для нейронов, но также регулирует важные аспекты развития и функционирования нервной системы. У позвоночных ГК выполняют опорную, трофическую, секреторную, разграничительную и защитную функции. Несмотря на то, что нервная система *Drosophila melanogaster* относительно проста по своей структуре, ей присущи характеристики сложно устроенной глии млекопитающих. Схожесть глии *Drosophila melanogaster* и млекопитающих на молекулярном и морфологическом уровне дает возможность предположить, что исследование глии беспозвоночных позволит лучше понять основные вопросы развития глии у млекопитающих. Использование *Drosophila melanogaster* дает возможность изучать различные нейрон-глиальные взаимодействия в интактном организме, а использование широкого набора молекулярно-генетических методов позволяет исследовать фундаментальные вопросы природы глии. В обзоре дана классификация глиальных клеток *Drosophila melanogaster*, описаны известные на сегодняшний день функции всех типов глии насекомого, а также проведено сравнение функций разных типов глиальных клеток млекопитающих и дрозофилы.

Ключевые слова: глиальные клетки, *Drosophila melanogaster*, нервная система, нейроны, нейропиль.

The development, structure and function of glial cells in the nervous system of *Drosophila melanogaster*

E. V. Ryabova¹, E. M. Latypova¹, N. V. Surina¹, A. E. Komissarov¹, S. V. Sarantseva^{✉1}

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre “Kurchatov Institute”, 1 Orlova Roscha District, Gatchina 188300, Russia

Authors

Elena V. Ryabova,
ORCID: 0000-0003-0813-6722,
e-mail: ryabova_ev@pnpi.nrcki.ru
Evgeniia M. Latypova,
SPIN: 5623-6543,
Scopus AuthorID: 56071577900,
ORCID: 0000-0001-7470-1078,
e-mail: latypova_em@pnpi.nrcki.ru
Nina V. Surina, SPIN: 8682-1222,
ORCID: 0000-0002-7863-1748,
e-mail: ninasurinav96@gmail.com
Artem E. Komissarov,
ORCID: 0000-0002-3564-1698,
e-mail: tem3650@yandex.ru
Svetlana V. Sarantseva, SPIN: 9532-4407, ORCID: 0000-0002-3943-7504,
e-mail: Sarantseva_SV@pnpi.nrcki.ru

For citation: Ryabova, E. V., Latypova, E. M., Surina, N. V., Komissarov, A. E., Sarantseva, S. V. (2020) The development, structure and function of glial cells in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 202–211. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-202-211

Received 15 May 2020; reviewed 19 May 2020; accepted 19 May 2020.

Funding: This paper was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), Project No 18-34-00982.

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

Abstract. Glia is the most common cell type in the central nervous system. Interest in them has increased significantly over the past decades as it has become clear that glia are not just “support” cells for neurons. They also regulate important aspects of the development and functioning of the nervous system. In vertebrates, glial cells perform supporting, trophic, secretory, dividing and protective functions. Despite the fact that the nervous system of *Drosophila melanogaster* has a simple structure, it is similar in function to mammalian glia. The similarity of glia of *Drosophila melanogaster* and mammals at the molecular and morphological levels suggests that the study of invertebrate glia will provide a better understanding of the main issues in the development of glia in mammals. Using *Drosophila melanogaster* makes it possible to study various neuron-glia interactions in an intact organism and the use of a wide range of molecular genetic methods allows us to investigate fundamental questions about the nature of glia. The review presents the classification of glial cells in *Drosophila melanogaster*, describes the currently known functions of all glial cell types in insects, and compares the functions of various glia types of mammals and *Drosophila* glial cells.

Keywords: glial cells, *Drosophila melanogaster*, nervous system, neurons, neuropil.

Введение

Термин «нейроглия» (от древнегреч. «нейрон» — «волокно», «нерв» и «глия» — «клей») ввел Рудольф Вирхов в 1846 году (Gilyarov 1986). Нейроглия представляет собой совокупность специальных вспомогательных клеток нервной ткани, которые участвуют в метаболизме нейронов и заполняют пространство между нейронами и окружающими их капиллярами. Глиальные клетки (ГК) присутствуют практически у всех представителей животного царства. Глия хорошо развита у кольчатых

червей. Пиявки снабжены очень специализированной гигантской клеточной глией, обеспечивающей питание нейронов при длительном голодании животных. Однако существуют организмы, в нервной системе которых на данный момент глия не обнаружена. Таким примером являются кишечнорастворимые (Zavarzin 2000).

Несмотря на важную роль глии, природа глиальных клеток остается малоизученной. Различных насекомых, в первую очередь плодовую мушку *Drosophila melanogaster* (*Dr. melanogaster*) и мотылька *Manduca sexta*, успешно

используют в качестве модельных организмов для исследования функции глии в процессе развития организма. Однако в некоторых работах часто обсуждается вопрос о функциональном и эволюционном различии ГК позвоночных и беспозвоночных. Например, у *Dr. melanogaster* ген *gcm* является необходимым и достаточным фактором, определяющим специализацию ГК, в то время как у млекопитающих *gcm* (*glial cells missing*) ген, по-видимому, не участвует в данном процессе, что может указывать на различные механизмы, определяющие специализацию ГК (Freeman, Doherty 2006). Однако процессы морфогенеза (миграция клеток, деление на различные подтипы, взаимодействие с нейронами и обертывание нейрона) и функции глии в зрелой ЦНС (питание нейронов, формирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), управление нейронной активностью) очень похожи на молекулярном уровне у *Dr. melanogaster* и у позвоночных. Более того, развитие нейрона, начиная с наведения аксона и заканчивая формированием синаптических связей, регулируется глией у *Dr. melanogaster* и млекопитающих одинаково. Использование *Dr. melanogaster* дает возможность изучать различные нейрон-глиальные взаимодействия в интактном организме, а использование широкого набора молекулярно-генетических методов позволяет исследовать фундаментальные вопросы природы ГК (Stork et al. 2012).

Классификация и функции глиальных клеток

Нервная ткань, кроме нейронов, содержит клетки еще одного вида — глиальные клетки. Эти клетки обеспечивают питание и нормальное функционирование нейронов, а также поддерживают постоянство среды вокруг нейронов. Глия играет роль электрического изолятора, а также служит пространственным барьером для распространения медиаторов и ионов. ГК участвуют в процессе навигации аксонов. Благодаря своей способности к делению в течение всей жизни организма ГК участвуют в процессе восстановления и регенерации нервной ткани (Allen, Lyons 2018). У млекопитающих ГК являются наиболее распространенными клетками ЦНС и составляют до 90 % от общего количества клеток мозга (Blinkov, Glezer 1968). У насекомых нервная система содержит значительно меньше ГК. Так, только 10 % из 90 000 клеток зрелой ЦНС *Drosophila melanogaster* являются глиальными (Edwards, Meinertzhagen 2010).

1.1. Типы глиальных клеток млекопитающих

Существует множество способов классификации глии. ГК можно классифицировать по расположению, по ультраструктуре (Hoyle 1986), функции и экспрессии генов (Edwards, Meinertzhagen 2010). У млекопитающих все клетки нейроглии по анатомическим критериям делят на клетки нейроглии в мозге, к которым относятся астроциты, олигодендроциты, эпендима и микроглия, и на клетки в ПНС — шванновские клетки. Астроциты, олигодендроциты, эпендиму и шванновские клетки объединяют в макроглию.

1.1.1. Астроциты

Астроциты составляют примерно 30 % клеток центральной нервной системы млекопитающих (Vasile et al. 2017). Это — большие звездообразные клетки с многочисленными тонкими отростками, оплетающими нейроны и стенки капилляров. Отростки астроцитов образуют характерные сплетения, «обкладку» вокруг кровеносных сосудов, тел и отростков нервных клеток, а также на поверхности серого вещества нервных центров и под слоем эпендимной глии. Таким образом, формируется система межклеточных щелей и пространств, по которой осуществляется транспорт веществ, необходимых для жизнедеятельности нервных клеток (Zavarzin 2000). Кроме того, эта система вместе с сосудистым эндотелием образует структурную основу ГЭБ, обуславливающего строгий специфический контроль за поступающими к нервным клеткам химическими соединениями (Obermeier et al. 2016). Астроциты делят на две подгруппы: фибриллярные астроциты и плазматические астроциты. Фибриллярные астроциты имеют тонкие и сильно ветвящиеся отростки, содержащие большое количество специализированных фибриллярных структур. Они преобладают среди пучков миелинизированных волокон (в белом веществе мозга). Плазматические астроциты содержат меньше фибриллярного материала и распространены в сером веществе вблизи тел нейронов, дендритов и синапсов. Плазматические астроциты характеризуются слабо ветвящимися отростками (Zavarzin 2000). Оба типа астроцитов образуют контакты с капиллярами и нейронами (Leiserson et al. 2000).

1.1.2. Олигодендроциты

Олигодендроциты (около 25–30 % от общего числа ГК) представляют собой округлые клетки меньшего размера с короткими отростками. Как правило, ГК этого типа непосредственно контактируют с телами нервных клеток. Олигоден-

дрокциты формируют миелиновые оболочки крупных аксонов, тем самым обеспечивая их изоляцию. Кроме того, олигодендроциты выполняют трофическую функцию по отношению к нейронам, принимая активное участие в их метаболизме (Dimou, Simons 2017).

1.1.3. Эпендима

Эпендима состоит из клеток цилиндрической формы, на свободном конце располагаются реснички, биение которых способствует циркуляции спинномозговой жидкости. На противоположном конце клетки в мозг отходит длинный, ветвящийся отросток. Клетки эпендимы выстилают стенки желудочков ГМ и центральный канал спинного мозга. Эпендима играет роль барьера между кровью и спинномозговой жидкостью (Delgehyr et al. 2015).

1.1.4. Микроглия

Микроглия — класс ГК ЦНС, выполняющих роль фагоцитов, которые убирают омертвевшие участки нервной ткани (Boche et al. 2013). Микроглия образуется из клеток соединительной ткани и составляет около 10 % от общего числа клеток нейроглии. В ЦНС микроглия представлена мелкими клетками с отростками. Клетки микроглии фагоцитируют продукты нервной ткани и посторонние частицы.

1.1.5. Шванновские клетки

Шванновские клетки находятся в ПНС (Kidd et al. 2013). Они участвуют в образовании миелинового слоя вокруг периферийных нервов. Однако в местах контакта шванновских клеток имеются участки, свободные от миелиновой оболочки. Отросток нервной клетки в таких участках изолирован от окружающих тканей лишь тонким слоем шванновских клеток. Наличие таких участков обеспечивает возможность более быстрого проведения нервного импульса.

1.2. Глиальные клетки *Dr. melanogaster*

В процессе развития *Dr. melanogaster* от эмбриона до имаго выделяют три основных типа ГК ЦНС, морфологически и функционально схожие с типами ГК млекопитающих: глия кортекса, глия нейропиля и поверхностная глия, а также периферийная глия в ПНС насекомого.

1.2.1. Поверхностная глия

Клетки поверхностной глии образуют наружный слой ГЭБ, которой отделяет нервную систему от гемолимфы открытой кровеносной системы насекомых. В соответствии с расположением и формой клеток можно выделить два подтипа поверхностных ГК: внешний слой пери-

невральной (апикальной) глии, клетки которой покрыты внеклеточным матриксом, и внутренний слой субпериневральной (основной) глии. Во время эмбриогенеза субпериневральная глия первой формирует непрерывный слой (Bainton et al. 2005; Schwabe et al. 2005), а уже на личиночной стадии формируется второй поверхностный слой — периневральная глия.

Периневральная глия расположена на поверхности ганглиев и образует наружный слой нервной системы. Клетки периневральной глии небольшого размера и характеризуются наличием маленьких ядер вытянутой формы, у имаго их примерно 2250, что составляет примерно 17 % от общего числа глиальной популяции (Kremer et al. 2017). Показано, что нет морфологических и молекулярных различий между данными клетками в ЦНС и ПНС (Yildirim et al. 2019). В отличие от других типов ГК, которые образуются из эпителия, клетки периневральной глии образуются из мезодермы (Edwards et al. 1993).

На данный момент функции периневральных глиальных клеток до конца не ясны, однако предполагается, что данный тип глиальных клеток отвечает за поддержание целостности и формы поверхностного слоя мозга (Kremer et al. 2017). Во время эмбриональной личиночной стадий периневральная глия формирует отростки, покрывающие слой субпериневральной глии, и тем самым, как предполагают, определяет развитие и/или герметичность данного слоя (Stork et al. 2008). Также известно, что на поздней стадии эмбриогенеза молекулы большого размера, такие как декстран сульфат размером 500 kDa, задерживаются внешним слоем данных клеток, что указывает на их барьерную функцию (Stork et al. 2008).

Еще одна важная функция периневральной глии — участие в формировании и регулировании степени жесткости элементов нервной системы. Так, эти клетки способствуют отложению толстого слоя внеклеточного матрикса или так называемой нейрональной ламеллы. В отсутствие нейрональной ламеллы нервная система не приобретает конечную свойственную для имаго форму и соответствует морфологии, характерной для эмбриональной стадии развития (Kim et al. 2014; Meyer et al. 2014; Pandey et al. 2011; Petley-Ragan et al. 2016; Skeath et al. 2017; Tavares et al. 2015).

Под слоем периневральных клеток располагается тонкий слой субпериневральной (Yildirim et al. 2019) глии. ГК данного типа образуют между собой многочисленные изолирующие межклеточные контакты, которые функционируют

как ГЭБ (Juang, Carlson 1992; Baumgartner et al. 1996; Unhavaithaya, Orr-Weaver 2012). Субпериневральные клетки препятствуют проникновению высокой концентрации калия из гемолимфы в нервную систему (Bainton et al. 2005; Desalvo et al. 2011; Mayer et al. 2009; Volkenhoff et al. 2015; Zhang et al. 2018). Ядра клеток субпериневральной глии большего размера, по сравнению с клетками периневральной глии. Кроме того, количество клеток субпериневральной глии меньше количества клеток периневральной глии. В ЦНС и ПНС имаго насчитывают около 300 клеток, что составляет примерно 2 % от общего количества глии *Drosophila* (Kremer et al. 2017). Одно полушарие мозга личинки на ранней стадии развития содержит менее 20 клеток периневральной глии, и их количество в ходе развития *Drosophila* значительно не увеличивается (Pereanu et al. 2005).

В дополнение к своей основной барьерной функции субпериневральная глия также участвует в пролиферации нейробластов, возможно при участии периневральной глии (Kanaï et al. 2018; Sousa-Nunes et al. 2011; Spéder, Brand 2014; Spéder, Brand 2018). Так, в ответ на сигналы гемоцитов или трофоцитов жирового тела насекомого субпериневральная глия секретирует инсулиноподобные пептиды dLIP, тем самым влияя на активность нейробластов (Holcroft et al. 2013; Spéder, Brand 2014).

1.2.2. Глия кортекса

Кортексная глиа, напоминающая астроциты млекопитающих, обволакивает тела нейронов и нейробласты, образуя наружный слой (кортекс) ЦНС (Dumstreit et al. 2003; Hartenstein 2011). Интересно, что одна клетка кортексной глии может обволакивать от 1 до 100 тел нервных клеток и обычно контактирует с субпериневральным слоем и/или глией нейропиля (Stork et al. 2012; Kis et al. 2015; Kremer et al. 2017). Тонкий слой кортексной глии окружает внешнюю поверхность мозга под слоем субпериневральной глии, а также окружает часть нейропиля. Глиальные клетки кортекса небольшие, округлой формы (Pereanu et al. 2005; Awasaki et al. 2008).

Мозг личинки *Dr. melanogaster* содержит около 150 клеток кортексной глии на одно полушарие (Pereanu et al. 2005). Показано, что глиа кортекса во время всей личиночной стадии играет существенную роль в формировании правильной пространственной ориентации нейронов за счет образования структуры «трофосфонгиума» (Dumstreit et al. 2003). Помимо тел нейронов, глиа кортекса также оборачивает их аксоны, которые прорастают в нейропиль

по мере развития нервной системы на личиночной стадии (Pereanu et al. 2005). Показано, что клетки глии кортекса способны накапливать значительное количество липидных капель на стадии личинки (Kis et al. 2015), осуществляя тем самым энергетические функции (Kis et al. 2015; Pennetta, Welte 2018). Подобная функция свойственна также и астроцитам млекопитающих (Bélanger et al. 2011). Кроме того, глиа кортекса совместно с поверхностной глией создает нишу для пролиферации нейробластов, а в условиях окислительного стресса и гипоксии защищает нейроны и их предшественников от действия активных форм кислорода путем накопления липидных капель (Bailey et al. 2015).

У имаго насчитывается около 2600 клеток глии кортекса во всей ЦНС насекомого, что составляет примерно 20 % от количества всех глиальных клеток в ЦНС. Функции глии кортекса у имаго *Drosophila melanogaster* во многом схожи с ее функциями в развивающейся нервной системе. Мембраны ГК кортекса имеют значительный физический контакт с ГЭБ и с трахеями насекомого. Близкая связь глии с основным сайтом ввода газообразных и питательных веществ в ЦНС означает, что ГК кортекса участвуют в процессе поставки газообразных и питательных веществ к нейронам, так же как астроциты млекопитающих (Pereanu et al. 2007; Stork et al. 2012; Freeman 2015).

1.2.3. Глия нейропиля

Клетки глии нейропиля располагаются группами на поверхности нейропиля, но основная масса этих ГК сконцентрирована вокруг компонентов центрального комплекса мозга дрозофилы. Так же как и олигодендроциты, они образуют продолжительные слоистые мембранные структуры вокруг одиночных аксонов или клубков аксонов (Ito et al. 1995; Klämbt et al. 1991), тем самым обеспечивая изоляцию и питание нейронов. Глия нейропиля представлена большим количеством клеток, которые в зависимости от молекулярных характеристик, морфологии и функции можно разделить на три подтипа: астроцитоподобная глиа, обкладочная (ensheathing) и обертывающая (wrapping) глиа. Клетки астроцитоподобной глии связаны с синаптическим нейропилем, плотно заполняя его объем. Их пучкообразная морфология и тесный контакт глиальной мембраны с синапсами напоминают плазматические астроциты позвоночных.

На 15 и 16 стадиях эмбрионального развития предшественники первичной астроцитоподобной глии мигрируют в область нейропиля.

По мере того как формируются основные структуры мозга — грибовидное тело и антеннальные доли, — глия нейропиля занимает свое основное положение относительно данных структур. Первичные клетки астроцитоподобной глии имеют звездчатую форму с большим количеством отростков. Они практически не пролиферируют и не мигрируют во время личиночных стадий (Omoto et al. 2015), однако проходят несколько циклов эндорепликации (Unhavaithaya, Orr-Weaver 2012). Помимо роста тела клеток увеличивается и количество отростков, заполняющих нейропиле. Предполагают, что плотность сети отростков первичной астроцитоподобной глии влияет на расположение аксонов вторичных нейронов (Spindler et al. 2009). В начале метаморфоза отростки клеток первичной астроцитоподобной глии начинают фрагментироваться, а впоследствии подвергаются апоптозу (Omoto et al. 2015).

Предшественники клеток вторичной астроцитоподобной глии были идентифицированы на стадии личинки третьего возраста. Эти клетки гораздо более мелкие по размеру, чем первичная астроцитоподобная глия, и имеют веретенообразную форму. По мере протекания метаморфоза предшественники астроцитоподобной глии мигрируют в пределах нейропиля вдоль аксонов и затем дифференцируются уже в зрелые клетки. Сеть отростков астроцитоподобной глии формируется на поздних стадиях куколки (Omoto et al. 2015).

Основная роль астроцитоподобной глии в развитии *Drosophila melanogaster* — участие в образовании основных структур мозга, а также управление навигацией отростков вторичных нейронов (Spindler et al. 2009).

Показано, что астроцитоподобная глия может участвовать в фагоцитозе в развивающейся нервной системе (Freeman 2015; Omoto et al. 2016; Tasdemir-Yilmaz, Freeman 2014).

Во всей ЦНС имаго *Drosophila melanogaster* насчитывается около 4600 клеток астроцитоподобной глии, что составляет 34 % от всей глиальной популяции (Kremer et al. 2017).

Астроцитоподобная глия продуцирует аминокислотные транспортеры, необходимые для обратного захвата глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Тем самым данный тип глии принимает непосредственное участие в синаптической передаче, обеспечивая баланс возбуждающих и тормозных сигналов (Stacey et al. 2010; Stork et al. 2014).

Опубликование результатов транскриптомного анализа клеток астроцитоподобной глии у личинки и у имаго открывает широкие воз-

можности для дальнейшего исследования функций данного типа клеток (Huang et al. 2015; Ng et al. 2016; Zhang et al. 2014).

Клетки обкладочной глии плоской формы и не имеют отростков. Их тела находятся на поверхности нейропиля, но контактируют не только с кортикальной областью, но и с внутренними структурами мозга (Kremer et al. 2017).

Общее количество клеток обкладочной глии составляет примерно 3100. Эти клетки не делятся на личиночной стадии (Peco et al. 2016), на стадии ранней куколки они гибнут, но снова образуются уже у имаго из нейробластов II типа (Omoto et al. 2015).

Данный тип клеток тесно связан с аксонами и с трахеями (Kremer et al. 2017).

Клетки обертывающей глии имеют плоскую вытянутую форму и похожи на пряди, сложенные в трубки вокруг аксонов (Kremer et al. 2017). Этим они напоминают немиелинизированные шванновские клетки млекопитающих. Однако обертывающая глия, в отличие от шванновских клеток млекопитающих, делает только один оборот вокруг одного аксона. На периферии данный тип клеток оборачивает периферические нервы. На личиночной стадии насекомого клетки данного типа глии не делятся, достигая на периферических нервах гигантских размеров, что позволяет всего трем или четырем клеткам обернуть один нерв (Matzat et al. 2015). У имаго клетки начинают дифференцироваться и даже оборачивают некоторые аксоны индивидуально (Nave, Werner 2014; Stork et al. 2008).

Показано, что обертывающая глия фагоцитирует дебрис от аксонов после их повреждения, оставляя «тоннели», по которым нормализуется рост нейритов (Corty, Freeman 2013; Stork et al. 2012). Общее количество клеток этого типа глии во всей нервной системе насчитывает около 600 у зрелых мух.

1.2.4. Периферийная глия

Периферийная глия поддерживает и заключает в оболочку периферийные нервы, включая двигательные и сенсорные аксоны (Leiserson et al. 2000), подобно шванновским клеткам млекопитающих. Клетки периферийной глии можно разделить на периневральные, субпериневральные ГК, а также обертывающую, вокруг образующихся пучков аксонов. Как и в ЦНС, субпериневральные клетки образуют барьер. И подобно ГК ЦНС, клетки периневральной глии целиком образуют слои только к концу личиночной стадии. Клетки всех трех подклассов периферийной глии большие по размеру, а их число незначительно. Так, например, сегмент

нерва БНС личинки связан только с 12 клетками периферийной глии.

Заключение

Интерес к ГК значительно увеличился за последние десятилетие по мере осознания того, что глия является не только «опорными» клетками для нейронов, но также регулирует важные аспекты развития и функционирования нервной системы. У позвоночных ГК выполняют опорную, трофическую, секреторную, разграничительную и защитную функции. Хотя нервная система *Dr. melanogaster* относительно просто устроена, ГК обладают аналогичными с млекопитающими функциями. Несмотря на то, что мухи не обладают замкнутой кровеносной системой, ГК образуют аналогичный ГЭБ,

чтобы изолировать нейроны от окружающей их гемолимфы. Более того, даже при отсутствии адаптивной иммунной системы ГК дрозофилы проявляют некоторые иммунные функции микроглии позвоночных, такие как поглощение оболочек мертвых нейронов. И наконец, существует особый тип ГК, покрывающих аксон и тем самым выполняющих роль шванновских клеток млекопитающих. Морфологическое и функциональное сходство ГК млекопитающих и *Drosophila* позволяет использовать *Dr. melanogaster* для изучения глии *in vivo*. Еще одним преимуществом использования *Drosophila* является возможность исследовать ГК в интактном организме. Использование различных генетических методов и существующий широкий выбор маркеров ГК позволяют изучать как отдельные типы ГК, так и системы ГК.

References

- Abbott, N. J. (2005) Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 25, no. 1, pp. 5–23. PMID: 15962506. DOI: 10.1007/s10571-004-1374-y (In English)
- Allen, N. J., Lyons, D. A. (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, vol. 362, no. 6411, pp. 181–185. PMID: 30309945. DOI: 10.1126/science.aat0473 (In English)
- Avet-Rochex, A., Kaul, A. K., Gatt, A. P. et al. (2012) Concerted control of gliogenesis by InR/TOR and FGF signalling in the *Drosophila* post-embryonic brain. *Development*, vol. 139, no. 15, pp. 2763–2772. PMID: 22745312. DOI: 10.1242/dev.074179 (In English)
- Awasaki, T., Ito, K. (2004) Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Current Biology*, vol. 14, no. 8, pp. 668–677. PMID: 15084281. DOI: 10.1016/j.cub.2004.04.001 (In English)
- Awasaki, T., Lai, S.-L., Ito, K., Lee, T. (2008) Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 51, pp. 13742–13753. PMID: 19091965. DOI: 10.1523/jneurosci.4844-08.2008 (In English)
- Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C. et al. (2015) Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*. *Cell*, vol. 163, no. 2, pp. 340–353. PMID: 26451484. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.020 (In English)
- Bainton, R. J., Tsai, L. T.-Y., Schwabe, T. et al. (2005) *Moody* encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell*, vol. 123, no. 1, pp. 145–156. PMID: 16213219. DOI: 10.1016/j.cell.2005.07.029 (In English)
- Barres, B. A. (2008) The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, vol. 60, no. 3, pp. 430–440. PMID: 18995817. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.013 (In English)
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K. et al. (1996) A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell*, vol. 87, no. 6, pp. 1059–1068. PMID: 8978610. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81800-0 (In English)
- Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P. J. (2011) Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738. PMID: 22152301. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.016 (In English)
- Blinkov, S. M., Glezer, I. I. (1968) *The human brain in figures and tables: A quantitative handbook*. New York: Plenum Publ., xxxiv + 482 p. (In English)
- Boche, D., Perry, V. H., Nicoll, J. A. R. (2013) Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 39, no. 1, pp. 3–18. PMID: 23252647. DOI: 10.1111/nan.12011 (In English)
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q., Technau, G. M. (1996) The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Developmental Biology*, vol. 179, no. 1, pp. 41–64. PMID: 8873753. DOI: 10.1006/dbio.1996.0240 (In English)
- Colonques, J., Ceron, J., Tejedor, F. J. (2007) Segregation of postembryonic neuronal and glial lineages inferred from a mosaic analysis of the *Drosophila* larval brain. *Mechanisms of Development*, vol. 124, no. 5, pp. 327–340. PMID: 17344035. DOI: 10.1016/j.mod.2007.01.004 (In English)

- Corty, M. M., Freeman, M. R. (2013) Architects in neural circuit design: Glia control neuron numbers and connectivity. *The Journal of Cell Biology*, vol. 203, no. 3, pp. 395–405. PMID: 24217617. DOI: 10.1083/jcb.201306099 (In English)
- Delgehyr, N., Meunier, A., Faucourt, M. et al. (2015) Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells. *Methods in Cell Biology*, vol. 127, pp. 19–35. PMID: 25837384. DOI: 10.1016/bs.mcb.2015.01.004 (In English)
- Desalvo, M. K., Mayer, N., Mayer, F., Bainton, R. J. (2011) Physiologic and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of *Drosophila*. *Glia*, vol. 59, no. 9, pp. 1322–1340. PMID: 21351158. DOI: 10.1002/glia.21147 (In English)
- Dimou, L., Simons, M. (2017) Diversity of oligodendrocytes and their progenitors. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 47, pp. 73–79. PMID: 29078110. DOI: 10.1016/j.conb.2017.09.015 (In English)
- Dumstrei, K., Wang, F., Hartenstein, V. (2003) Role of DE-cadherin in neuroblast proliferation, neural morphogenesis, and axon tract formation in *Drosophila* larval brain development. *The Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 8, pp. 3325–3335. PMID: 12716940. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03325.2003 (In English)
- Ebens, A. J., Garren, H., Cheyette, B. N., Zipursky, S. L. (1993) The *Drosophila anachronism* locus: A glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation. *Cell*, vol. 74, no. 1, pp. 15–27. PMID: 7916657. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90291-w (In English)
- Edwards, J. S., Swales, L. S., Bate, M. (1993) The differentiation between neuroglia and connective tissue sheath in insect ganglia revisited: The neural lamella and perineurial sheath cells are absent in a mesodermless mutant of *Drosophila*. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 333, no. 2, pp. 301–308. PMID: 8345109. DOI: 10.1002/cne.903330214 (In English)
- Edwards, T. N., Meinertzhagen, I. A. (2010) The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Progress in Neurobiology*, vol. 90, no. 4, pp. 471–497. PMID: 20109517. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.01.001 (In English)
- Freeman, M. R. (2015) *Drosophila* central nervous system glia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 7, no. 11, article a020552. PMID: 25722465. DOI: 10.1101/cshperspect.a020552 (In English)
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J. et al. (2003) Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron*, vol. 38, no. 4, pp. 567–580. PMID: 12765609. DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00289-7 (In English)
- Freeman, M. R., Doherty, J. (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends in Neurosciences*, vol. 29, no. 2, pp. 82–90. PMID: 16377000. DOI: 10.1016/j.tins.2005.12.002 (In English)
- Gilmour, D. T., Maischein, H.-M., Nüsslein-Volhard, C. (2002) Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron*, vol. 34, no. 4, pp. 577–588. PMID: 12062041. DOI: 10.1016/s0896-6273(02)00683-9 (In English)
- Gilyarov, M. S. (ed.). (1986) *Biologicheskij entsiklopedicheskij slovar' [Biological encyclopedic dictionary]*. Moscow: Sovetskaya Entsiklopediya Publ., 831 p. (In Russian)
- Hartenstein, V. (2011) Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. *Glia*, vol. 59, no. 9, pp. 1237–1252. PMID: 21438012. DOI: 10.1002/glia.21162 (In English)
- Holcroft, C. E., Jackson, W. D., Lin, W.-H. et al. (2013) Innexins Ogr and Inx2 are required in glial cells for normal postembryonic development of the *Drosophila* central nervous system. *Journal of Cell Science*, vol. 126, no. 17, pp. 3823–3834. PMID: 23813964. DOI: 10.1242/jcs.117994 (In English)
- Hoyle, G. (1986) Glial cells of an insect ganglion. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 246, no. 1, pp. 85–103. DOI: 10.1002/cne.902460106 (In English)
- Huang, Y., Ng, F. S., Jackson, F. R. (2015) Comparison of larval and adult *Drosophila* astrocytes reveals stage-specific gene expression profiles. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, vol. 5, no. 4, pp. 551–558. PMID: 25653313. DOI: 10.1534/g3.114.016162 (In English)
- Ito, K., Urban, J., Technau, G. M. (1995) Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Archives of Developmental Biology*, vol. 204, no. 5, pp. 284–307. PMID: 28306125. DOI: 10.1007/BF02179499 (In English)
- Juang, J. L., Carlson, S. D. (1992) A blood-brain barrier without tight junctions in the fly central nervous system in the early postembryonic stage. *Cell & Tissue Research*, vol. 270, no. 1, pp. 95–103. (In English)
- Kanai, M. I., Kim, M. J., Akiyama, T. et al. (2018) Regulation of neuroblast proliferation by surface glia in the *Drosophila* larval brain. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 3730. PMID: 29487331. DOI: 10.1038/s41598-018-22028-y (In English)
- Kidd, G. J., Ohno, N., Trapp, B. D. (2013) Biology of Schwann cells. *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 115, no. 1, pp. 55–79. PMID: 23931775. DOI: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9 (In English)
- Kim, S. N., Jeibmann, A., Halama, K. et al. (2014) ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models. *Development*, vol. 141, no. 16, pp. 3233–3242. PMID: 25063458. DOI: 10.1242/dev.106039 (In English)
- Kis, V., Barti, B., Lippai, M., Sass, M. (2015) Specialized cortex glial cells accumulate lipid droplets in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, vol. 10, no. 7, article e0131250. PMID: 26148013. DOI: 10.1371/journal.pone.0131250 (In English)

- Klämbt, C., Jacobs, J. R., Goodman, C. S. (1991) The midline of the *Drosophila* central nervous system: A model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell*, vol. 64, no. 4, pp. 801–815. PMID: 1997208. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90509-w (In English)
- Kremer, M. C., Jung, C., Batelli, S. et al. (2017) The glia of the adult *Drosophila* nervous system. *Glia*, vol. 65, no. 4, pp. 606–638. PMID: 28133822. DOI: 10.1002/glia.23115 (In English)
- Kretzschmar, D., Hasan, G., Sharma, S. et al. (1997) The swiss cheese mutant causes glial hyperwrapping and brain 22 degeneration in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 19, pp. 7425–7432. PMID: 9295388. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-19-07425.1997 (In English)
- Leiserson, W. M., Harkins, E. W., Keshishian, H. (2000) Fray, a *Drosophila* serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. *Neuron*, vol. 28, no. 3, pp. 793–806. PMID: 11163267. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)00154-9 (In English)
- Matzat, T., Sieglitz, F., Kottmeier, R. et al. (2015) Axonal wrapping in the *Drosophila* PNS is controlled by glia-derived neuregulin homolog Vein. *Development*, vol. 142, no. 7, pp. 1336–1345. PMID: 25758464. DOI: 10.1242/dev.116616 (In English)
- Mayer, F., Mayer, N., Chinn, L. et al. (2009) Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrier chemoprotective mechanisms in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 11, pp. 3538–3550. PMID: 19295159. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5564-08.2009 (In English)
- Melom, J. E., Littleton, J. T. (2013) Mutation of a NCKX eliminates glial microdomain calcium oscillations and enhances seizure susceptibility. *The Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 3, pp. 1169–1178. PMID: 23325253. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3920-12.2013 (In English)
- Meyer, S., Schmidt, I., Klämbt, C. (2014) Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system. *Mechanisms of Development*, vol. 133, no. 23, pp. 105–116. PMID: 24859129. DOI: 10.1016/j.mod.2014.05.003 (In English)
- Nave, K.-A., Trapp, B. D. (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 31, pp. 535–561. PMID: 18558866. DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309 (In English)
- Nave, K.-A., Werner, H. B. (2014) Myelination of the nervous system: Mechanisms and functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 30, pp. 503–533. PMID: 25288117. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101 (In English)
- Ng, F. S., Sengupta, S., Huang, Y. et al. (2016) TRAP-seq profiling and RNAi-based genetic screens identify conserved glial genes required for adult *Drosophila* behavior. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 9, article 146. PMID: 28066175. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00146 (In English)
- Obermeier, B., Verma, A., Ransohoff, R. M. (2016) The blood-brain barrier. In: S. J. Pittock, A. Vincent (eds.). *Autoimmune neurology*. S. l.: Elsevier Science, pp. 39–59. (Handbook of Clinical Neurology. Vol. 133). PMID: 27112670. DOI: 10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7 (In English)
- Omoto, J. J., Lovick, J. K., Hartenstein, V. (2016) Origins of glial cell populations in the insect nervous system. *Current Opinion in Insect Science*, vol. 18, pp. 96–104. PMID: 27939718. DOI: 10.1016/j.cois.2016.09.003 (In English)
- Omoto, J. J., Yogi, P., Hartenstein, V. (2015) Origin and development of neuropil glia of the *Drosophila* larval and adult brain: Two distinct glial populations derived from separate progenitors. *Developmental Biology*, vol. 404, no. 2, pp. 2–20. PMID: 25779704. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.03.004 (In English)
- Pandey, R., Blanco, J., Udolph, G. (2011) The glucuronyltransferase *GlcAT-P* is required for stretch growth of peripheral nerves in *Drosophila*. *PLoS One*, vol. 6, no. 11, article e28106. PMID: 22132223. DOI: 10.1371/journal.pone.0028106 (In English)
- Peco, E., Davla, S., Camp, D. et al. (2016) *Drosophila* astrocytes cover specific territories of the CNS neuropil and are instructed to differentiate by Prospero, a key effector of Notch. *Development*, vol. 143, no. 7, pp. 1170–1181. PMID: 26893340. DOI: 10.1242/dev.133165 (In English)
- Pennetta, G., Welte, M. A. (2018) Emerging links between lipid droplets and motor neuron diseases. *Developmental Cell*, vol. 45, no. 4, pp. 427–432. PMID: 29787708. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.05.002 (In English)
- Pereanu, W., Shy, D., Hartenstein, V. (2005) Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Developmental Biology*, vol. 283, no. 1, pp. 191–203. PMID: 15907832. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.04.024 (In English)
- Pereanu, W., Spindler, S., Cruz, L., Hartenstein, V. (2007) Tracheal development in the *Drosophila* brain is constrained by glial cells. *Developmental Biology*, vol. 302, no. 1, pp. 169–180. PMID: 17046740. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.09.022 (In English)
- Petley-Ragan, L. M., Ardiel, E. L., Rankin, C. H., Auld, V. J. (2016) Accumulation of laminin monomers in *Drosophila* glia leads to glial endoplasmic reticulum stress and disrupted larval locomotion. *The Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. 4, pp. 1151–1164. PMID: 26818504. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1797-15.2016 (In English)
- Schmid, A., Chiba, A., Doe, C. Q. (1999) Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: Neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development*, vol. 126, no. 21, pp. 4653–4689. PMID: 10518486. (In English)
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D. et al. (2005) GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell*, vol. 123, no. 1, pp. 133–144. PMID: 16213218. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.037 (In English)

- Sepp, K. J., Schulte, J., Auld, V. J. (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Developmental Biology*, vol. 238, no. 1, pp. 47–63. PMID: 11783993. DOI: 10.1006/dbio.2001.041 (In English)
- Skeath, J. B., Wilson, B. A., Romero, S. E. et al. (2017) The extracellular metalloprotease AdamTS-A anchors neural lineages in place within and preserves the architecture of the central nervous system. *Development*, vol. 144, no. 17, pp. 3102–3113. PMID: 28760813. DOI: 10.1242/dev.145854 (In English)
- Sousa-Nunes, R., Yee, L. L., Gould, A. P. (2011) Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature*, vol. 471, no. 7339, pp. 508–512. PMID: 21346761. DOI: 10.1038/nature09867 (In English)
- Spéder, P., Brand, A. H. (2014) Gap junction proteins in the blood-brain barrier control nutrient-dependent reactivation of *Drosophila* neural stem cells. *Developmental Cell*, vol. 30, no. 3, pp. 309–321. PMID: 25065772. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.05.0219867 (In English)
- Spéder, P., Brand, A. H. (2018) Systemic and local cues drive neural stem cell niche remodelling during neurogenesis in *Drosophila*. *eLife*, vol. 7, article e30413. PMID: 29299997. DOI: 10.7554/eLife.30413 (In English)
- Spindler, S. R., Ortiz, I., Fung, S. et al. (2009) *Drosophila* cortex and neuropile glia influence secondary axon tract growth, pathfinding, and fasciculation in the developing larval brain. *Developmental Biology*, vol. 334, no. 2, pp. 355–368. PMID: 19646433. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.07.035 (In English)
- Stacey, S. M., Muraro, N. I., Peco, E. et al. (2010) *Drosophila* glial glutamate transporter Eaet1 is regulated by fringe-mediated notch signaling and is essential for larval locomotion. *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 43, pp. 14446–14457. PMID: 20980602. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1021-10.2010 (In English)
- Stork, T., Bernardos, R., Freeman, M. R. (2012) Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2012, no. 1, pp. 1–17. PMID: 22194269. DOI: 10.1101/pdb.top067587 (In English)
- Stork, T., Engelen, D., Krudewig, A. et al. (2008) Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 3, pp. 587–597. PMID: 18199760. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4367-07.2008 (In English)
- Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O. E., Freeman, M. R. (2014) Neuron-glia interactions through the Heartless FGF receptor signaling pathway mediate morphogenesis of *Drosophila* astrocytes. *Neuron*, vol. 83, no. 2, pp. 388–403. PMID: 25033182. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.06.026 (In English)
- Subramanian, A., Siefert, M., Banerjee, S. et al. (2017) Remodeling of peripheral nerve ensheathment during the larval-to-adult transition in *Drosophila*. *Developmental Neurobiology*, vol. 77, no. 10, pp. 1144–1160. PMID: 28388016. DOI: 10.1002/dneu.22502 (In English)
- Tasdemir-Yilmaz, O. E., Freeman, M. R. (2014) Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes & Development*, vol. 28, no. 1, pp. 20–33. PMID: 24361692. DOI: 10.1101/gad.229518.113 (In English)
- Tavares, L., Pereira, E., Correia, A. et al. (2015) *Drosophila* PS2 and PS3 integrins play distinct roles in retinal photoreceptors-glia interactions. *Glia*, vol. 63, no. 7, pp. 1155–1165. DOI: 10.1002/glia.22806 (In English)
- Unhavaithaya, Y., Orr-Weaver, T. L. (2012) Polyploidization of glia in neural development links tissue growth to blood-brain barrier integrity. *Genes & Development*, vol. 26, no. 1, pp. 31–36. PMID: 22215808. DOI: 10.1101/gad.177436.111 (In English)
- Vasile, F., Dossi, E., Rouach, N. (2017) Human astrocytes: Structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure & Function*, vol. 222, no. 5, pp. 2017–2029. PMID: 28280934. DOI: 10.1007/s00429-017-1383-5 (In English)
- Volkenhoff, A., Weiler, A., Letzel, M. et al. (2015) Glial glycolysis is essential for neuronal survival in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, vol. 22, no. 3, pp. 437–447. PMID: 26235423. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.07.006 (In English)
- Watts, R. J., Schuldiner, O., Perrino, J. et al. (2004) Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. *Current Biology*, vol. 14, no. 8, pp. 678–684. PMID: 15084282. DOI: 10.1016/j.cub.2004.03.035 (In English)
- Xiong, W. C., Montell, C. (1995) Defective glia induce neuronal apoptosis in the *repo* visual system of *Drosophila*. *Neuron*, vol. 14, no. 3, pp. 581–590. PMID: 7695904. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90314-3 (In English)
- Yildirim, K., Petri, J., Kottmeier, R., Klämbt, C. (2019) *Drosophila* glia: Few cell types and many conserved functions. *Glia*, vol. 67, no. 1, pp. 5–26. PMID: 30443934. DOI: 10.1002/glia.23459 (In English)
- Zavarzin, A. A.; Stroeve, O. E. (ed.). (2000) *Sravnitel'naya gistologiya [Comparative histology]*. Saint Petersburg: Saint Petersburg University Publ., 517 p. (In Russian)
- Zhang, S. L., Yue, Z., Arnold, D. M. et al. (2018) A circadian clock in the blood-brain barrier regulates xenobiotic efflux. *Cell*, vol. 173, no. 1, pp. 130–139. PMID: 29526461. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.017 (In English)
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A. et al. (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 36, pp. 11929–11947. PMID: 25186741. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014 (In English)

Взаимодействие между нервной и секреторной функциями в осуществлении интегративной деятельности нейросекреторной клетки Ретциуса пиявки. Обзор

С. С. Сергеева^{✉1}

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

Сведения об авторе

Светлана Сергеевна Сергеева,
SPIN-код: 3683-6538, e-mail:
SergeevaSS@infran.ru

Для цитирования:

Сергеева, С. С. (2020)
Взаимодействие между нервной
и секреторной функциями
в осуществлении интегративной
деятельности нейросекреторной
клетки Ретциуса пиявки. Обзор.
Интегративная физиология, т. 1,
№ 3, с. 212–217. DOI: 10.33910/2687-
1270-2020-1-3-212-217

Получена 24 января 2020; прошла
рецензирование 11 февраля 2020;
принята 16 апреля 2020.

Финансирование: Работа
выполнена при финансовой
поддержке Программы
фундаментальных научных
исследований государственных
академий на 2013–2020 годы
(ГП-14, раздел 64).

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

Аннотация. На основе литературных и собственных экспериментальных данных автор показывает, как две важнейшие функции нейрона Ретциуса медицинской пиявки — секреторная и электрическая — связаны между собой. При низкочастотной активации нейрон Ретциуса ведет себя как типичная нервная клетка, выделяя серотонин из пресинаптических окончаний. При высокочастотном раздражении нейрон Ретциуса проявляет свойства секреторной клетки, выделяя серотонин путем соматического экзоцитоза. Механизм аутоингибирования (секреторная функция), выявленный при высокочастотном синаптическом раздражении нейрона Ретциуса, позволяет предотвратить гиперактивацию его импульсной активности (нервная функция), что, в свою очередь, через аутоингибирование тормозит гиперактивацию соматического экзоцитоза (секреторная функция). Приведенные данные демонстрируют, что нейрон Ретциуса является уникальной нейросекреторной клеткой, обладающей полифункциональной активностью.

Ключевые слова: нейросекреторная клетка Ретциуса пиявки, соматический экзоцитоз, импульсная активность.

The interaction between nervous and secretory functions in the integrative activity of the neurosecretory Retzius cell of the leech A review

S. S. Sergeeva^{✉1}

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

Abstract. Based on the literature review and our own experimental data, it is shown how the two most important functions of the Retzius neuron (RN)

Author

Svetlana S. Sergeeva, SPIN: 3683-6538, e-mail: SergeevaSS@infran.ru

For citation: Sergeeva, S. S. (2020)

The interaction between nervous and secretory functions in the integrative activity of the neurosecretory Retzius cell of the leech. A review. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 212–217. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-212-217

Received 24 January 2020; reviewed 11 February 2020; accepted 16 April 2020.

Funding: The paper was supported by the Programme for Basic Research of the Russian Academies of Sciences for 2013–2020 (GP-14, Field of Research 64).

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

of the medical leech — secretory and electrical — are related to each other. During low-frequency activation, RN behaves like a typical nerve cell, releasing serotonin from the presynaptic endings. During high-frequency stimulation, RN demonstrates properties of a secretory cell, releasing serotonin by somatic exocytosis. The mechanism of autoinhibition (secretory function), revealed during high-frequency synaptic stimulation of RN, allows to prevent hyperactivation of its impulse activity (nervous function), which, in turn, through autoregulation inhibits hyperactivation of somatic exocytosis (secretory function). These data demonstrate that RN is a unique neurosecretory cell with polyfunctional activity.

Keywords: neurosecretory Retzius cell of leeches, somatic exocytosis, impulse activity.

Введение

Нейросекреторные клетки широко представлены как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных, они имеют схожее строение и выполняют в организме схожие функции. Однако изучение многих процессов, связанных с их активностью в ЦНС позвоночных животных, затруднено. Особенно это касается соматического экзцитоза, который часто подтверждается лишь косвенно. Более простое строение нервной системы беспозвоночных, меньшее количество нейросекреторных клеток, их поверхностное расположение в мозге делают эти клетки исключительным объектом для исследования их нервных и секреторных функций. Одним из таких объектов являются нейроны Ретциуса (НР) мозга медицинской пиявки. Несмотря на то, что НР является давно и хорошо изученным объектом с точки зрения морфологии, цитохимии и электрофизиологии (Lent 1981; Carretta 1988), связь между его основными функциями — секреторной и электрической — освещена недостаточно.

Целью нашей работы было на основе литературных и собственных экспериментальных данных показать, как эти две важнейшие функции нейросекреторной клетки связаны между собой.

Нервная и секреторная активность НР

Два парных НР, расположенные на поверхности ганглиев брюшной нервной цепочки медицинской пиявки, являются единственными

нейросекреторными клетками в каждом ганглии (Lent 1981; Carretta 1988). От сомы НР отходит один отросток, который вблизи тела клетки делится на несколько. Самый крупный направляется через центральную коннективу в соседние ганглии — это дендрит. Отходящие в боковые коннективы два крупных отростка и многочисленные мелкие веточки внутри ганглия — аксоны НР. Именно по этим отросткам серотонин, синтезируемый в соме клетки, диффундирует к клеткам-мишеням. Было показано, что и сома НР, и его аксоны содержат большое количество темных и светлых везикул, заполненных серотонином (Bruns et al. 2000).

В экспериментах, совмещающих электрофизиологические и электронномикроскопические исследования, было показано, что при внутриклеточном раздражении НР одиночными импульсами электрического тока частотой 1 Гц наблюдается выделение серотонина из пресинаптических окончаний, расположенных на мелких веточках НР внутри ганглия, где НР контактирует с постсинапсами вставочных и моторных нейронов. При этом не происходит значительного изменения в перегруппировке или движении крупных нейросекреторных гранул, находящихся в теле клетки (Beck et al. 2001; Trueta et al. 2003; De-Miguel, Trueta 2005). Таким образом, при раздражении низкими частотами НР ведет себя как типичная нервная клетка, и серотонин, выступая в роли нейромедиатора, в зависимости от типа 5-НТ-рецепторов на постсинаптической мембране активизирует или тормозит импульсную активность (ИА)

нейронов внутри ганглия (Nusbaum, Kristan 1986). Внутриклеточная стимуляция НР частотами 10–20 Гц, как показано электронно-микроскопическими и люминесцентными методами, вызывает активное продвижение крупных нейросекреторных гранул из внутренних компартментов нейрона к его мембране. В конечном счете происходит экзоцитоз серотонина в межклеточное пространство ганглия (De-Miguel, Trueta 2005; De-Miguel et al. 2012; De-Miguel, Nicholls 2015). Таким образом, при высокочастотном раздражении НР ведет себя как секреторная клетка. Необходимо подчеркнуть, что все эти эксперименты, доказавшие связь между функциональной активностью НР и частотой раздражающего воздействия, выполнены при внутриклеточном раздражении НР.

Эксперименты, модулирующие действие соматического экзогенного серотонина, показали, что аппликация серотонина на нервный ганглий вызывает повышение импульсной активности (ИА) большинства нейронов, начинают генерировать импульсы даже «молчащие» нервные клетки (Mar, Drapeau 1996; Moshtagh-Khorasani et al. 2013). В то же время сама нейросекреторная клетка — НР на аппликацию серотонина отвечает торможением ИА (Kerkut, Walker 1967; Smith, Walker 1973).

Действие экзогенного серотонина не ограничивается его влиянием только на нервные клетки внутри ганглия. Повышение концентрации серотонина в межклеточном пространстве ганглия вызывает деполяризацию глияльной клетки, которая активно поглощает экзогенный серотонин (паракринная функция) и транспортирует его в другие участки не только ганглия, но и в кровь животного. В этом случае НР выполняет эндокринную функцию (Willard 1981; Bruns et al. 1993; 2000). Кроме того, именно путем прямого экзоцитоза из отростков НР, направляющихся через боковые коннективы ганглия, серотонин активирует секрецию слизи железистыми клетками, расположенными в коже животного (Ehinger et al. 1968; Marsden, Kerkut 1969; Mason et al. 1979).

Таким образом, обзор литературных данных позволяет сделать вывод, что от частоты прямого (внутриклеточного) раздражающего воздействия будет зависеть, какую функцию будет исполнять НР — нервную или секреторную. Эти модельные эксперименты позволяют показать по крайней мере три секреторных функций НР: нейрокринную, паракринную и эндокринную.

Взаимодействие между нервной и секреторной функциями при синаптической активации НР

Было показано, что электрическая активность НР увеличивается при механическом раздражении кожного покрова пиявки (Szczupak, Kristan 1995; Velázquez-Ulloa et al. 2003). Выявлены три типа механочувствительных рецепторов в коже животного — N-, P- и T-типа. При сильном болевом воздействии на стенку тела животного N-механочувствительные нейроны генерируют низкочастотные спайки от 0,5 до 2 Гц. Слабое давление или поглаживание вызывает активацию механосенсорных клеток T-типа, генерирующих высокочастотные разряды от 5 до 12 Гц, механосенсорные нейроны P-типа генерируют разряды средней частоты (Fischer et al. 2017). Поскольку НР имеет синаптическую связь с механосенсорными нейронами (De-Miguel, Nicholls 2015; Fischer et al. 2017; De-Miguel, Trueta 2005), то, следовательно, и *in vivo* он может получать раздражающее воздействие самой различной частоты, тесно связанной с жизнедеятельностью животного.

В наших экспериментах мы проводили синаптическую активацию НР, используя частоты, аналогичные диапазону частот сенсорных нейронов при механическом раздражении поверхности тела пиявки от 1 до 10 Гц (Sergeeva 1994; 1995). Было обнаружено, что импульсный ответ НР находится в определенной корреляционной зависимости от частоты раздражающих стимулов. При синаптическом раздражении от 1 до 5 Гц нейрон пропорционально увеличивает частоту ИА, отвечая потенциалом действия (ПД) на каждый раздражающий стимул.

При более высокой частоте синаптической активации от 7 до 10 Гц наблюдается зависимость от частоты раздражения уменьшение частоты импульсной активности НР (табл. 1, контроль).

Наблюдая уменьшение частоты ИА и зная о тормозящем действии экзогенного серотонина на НР (Kerkut, Walker 1967; Smith, Walker 1973), мы предположили, что соматический экзогенный серотонин может формировать эту реакцию по аутокринному типу. То есть серотонин, выделяемый НР, оказывает тормозное воздействие на его импульсную активность. Чтобы проверить эту гипотезу, были проведены эксперименты в бескальциевом растворе, в растворах нимодипина и колхицина (Sergeeva et al. 2018). Известно, что взаимодействие ионов Ca^{+2} с цитоскелетом стимулирует транспорт везикул нейросекрета к пресинаптической мембране НР (Brunns et al.

Табл. 1. Изменение ИА нейрона Ретциуса при синаптическом раздражении частотами от 1 до 10 Гц
 Table 1. Change in the IA of the Retzius neuron during synaptic stimulation at frequencies from 1 to 10 Hz

Частота активации Серии	1 Гц	3 Гц	5 Гц	7 Гц	10 Гц
Контроль n = 30	1,05 ± 0,13	3,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	3,64 ± 0,2	3,07 ± 0,2
Раствор без Ca ⁺² n = 14	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
Нимодипин n = 14	1,0 ± 0,0	3,0 ± 0,01	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
Колхицин n = 14	1,0 ± 0,0	3,2 ± 0,1	5,1 ± 0,1	6,3 ± 0,3	7,90 ± 0,5

2000; De-Miguel, Santamaria-Holek et al. 2012). Поэтому блокада поступления в клетку ионов Ca⁺², которая происходит в бескальциевом растворе и в растворе нимодипина (блокатора кальциевых каналов), предотвращает соматический экзоцитоз серотонина, а следовательно, и вызываемое им торможение импульсной активности НР. То же происходит и при действии колхицина, который предотвращает сборку субъединиц тубулина в микротрубочки, также блокируя транспорт везикул серотонина к мембране нейрона НР. В условиях действия бескальциевого раствора, нимодипина и колхицина при синаптической активации частотами от 7 до 10 Гц НР отвечает ПД на каждый раздражающий стимул — тормозная реакция не развивается (табл. 1, без Ca⁺², нимодипин, колхицин). Таким образом, выявленная при синаптическом раздражении тормозная реакция в условиях, наиболее приближенных к *in vivo*, демонстрирует, что НР обладает еще одной нейросекреторной функцией — аутоингибированием. Для НР наличие реакции ауто-

ингибирования соматического серотонина (секреторная функция) является чрезвычайно важным феноменом, поскольку позволяет предотвратить гиперактивацию ИА (нервная функция) при высокочастотном раздражении, а это, в свою очередь, через аутооторможение будет блокировать и гиперактивацию соматического экзоцитоза (секреторная функция).

Еще одним фактом, доказывающим участие НР в выполнении или нервной, или секреторной активности, является генерация клеткой отличных по амплитуде и длительности ПД при различной частоте синаптической активации. В ответ на низкочастотное синаптическое раздражение НР генерирует высокоамплитудные спайки малой длительности — форма импульса, которая имеет преимущественное значение для активации синаптических процессов. При высокочастотном раздражении нейрон генерирует спайки меньшей амплитуды, но большей длительности, которые будут более значимы для формирования соматического экзоцитоза (табл. 2).

Табл. 2. Изменение амплитуды и длительности потенциала действия при синаптическом раздражении нейрона Ретциуса частотами от 1 до 10 Гц

Table 2. Changes in the amplitude and duration of action potential of the Retzius neuron during synaptic stimulation at frequencies from 1 to 10 Hz

Серии	Контроль	1 Гц	3 Гц	10 Гц
Форма ПД				
Амплитуда мкВ	51,1 ± 0,4	44,0 ± 10,8	58,0 ± 0,2	38,34 ± 1,7
Длительность мс	6,0 ± 0,04	7,2 ± 0,3	5,9 ± 0,02	10,0 ± 0,1

Заключение

Приведенные данные демонстрируют, что НР является уникальной нейросекреторной клеткой, обладающей полифункциональной активностью. Поскольку в каждом ганглии брюшной нервной цепочки находятся только

два нейрона, выполняющих одновременно и нервную, и секреторную функции, эти клетки являются исключительным объектом для понимания того, как специализированная нервная клетка может регулировать многие стороны жизнедеятельности беспозвоночного животного.

References

- Beck, A., Lohr, C., Deitmer, J. W. (2001) Calcium transients in subcompartments of the leech Retzius neuron as induced by single action potentials. *Journal of Neurobiology*, vol. 48, no. 1, pp. 1–18. PMID: 11391646. DOI: 10.1002/neu.1039 (In English)
- Bruns, D., Engert, F., Lux, H. D. (1993) A fast activating presynaptic reuptake current during serotonergic transmission in identified neurons of *Hirudo*. *Neuron*, vol. 10, no. 4, pp. 559–572. PMID: 8386524. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90159-o (In English)
- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., Jahn, R. (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 205–220. PMID: 11086995. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)00097-0 (In English)
- Carretta, M. (1988) The Retzius cells in the leech: A review of their properties and synaptic connections. *Comparative Biochemistry and Physiology — Part A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 91, no. 3, pp. 405–413. PMID: 2906825. DOI: 10.1016/0300-9629(88)90611-1 (In English)
- De-Miguel, F. F., Fuxe, K. (2012) Extrasynaptic neurotransmission as a way of modulating neuronal functions. *Frontiers in Physiology*, vol. 3, article 16. PMID: 22363292. DOI: 10.3389/fphys (in English)
- De-Miguel, F. F., Nicholls, J. G. (2015) Release of chemical transmitters from cell bodies and dendrites of nerve cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 370, no. 1672, article 20140181. PMID: 26009760. DOI: 10.1098/rstb.2014.0181 (In English)
- De-Miguel, F. F., Santamaría-Holek, I., Noguez, P. et al. (2012) Biophysics of active vesicle transport, an intermediate step that couples excitation and exocytosis of serotonin in the neuronal soma. *PLoS One*, vol. 7, no. 10, article e45454. DOI: 10.1371/journal.pone.0045454 (In English)
- De-Miguel, F. F., Trueta, C. (2005) Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 25, no. 2, pp. 297–312. PMID: 16047543. DOI: 10.1007/s10571-005-3061-z (In English)
- Ehinger, B., Falck, B., Myhrberg, H. E. (1968) Biogenic monoamines in *Hirudo medicinalis*. *Histochemi*, vol. 15, no. 2, pp. 140–149. PMID: 5741854. DOI: 10.1007/BF00306364 (In English)
- Fischer, L., Scherbarth, F., Chagnaud, B., Felmy, F. (2017) Intrinsic frequency response patterns in mechano-sensory neurons of the leech. *Biology Open*, vol. 6, no. 7, pp. 993–999. PMID: 28546342. DOI: 10.1242/bio.023960 (In English)
- Kerkut, G. A., Walker, R. J. (1967) The action of acetylcholine, dopamine and 5-hydroxytryptamine on the spontaneous activity of the cells of Retzius of the leech *Hirudo medicinalis*. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, vol. 30, no. 3, pp. 644–654. PMID: 6050503. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1967.tb02171.x (In English)
- Lent, C. M. (1981) Morphology of neurons containing monoamines within leech segmental ganglia. *Journal of Experimental Zoology*, vol. 216, no. 2, pp. 311–316. DOI: 10.1002/jez.1402160212 (In English)
- Mar, A., Drapeau, P. (1996) Modulation of conduction block in leech mechanosensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 14, pp. 4335–4343. PMID: 8699244. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-14-04335.1996 (In English)
- Marsden, C. A., Kerkut, G. A. (1969) Fluorescence microscopy of the 5HT- and catecholamine-containing cells in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 31, no. 6, pp. 851–862. PMID: 5308458. DOI: 10.1016/0010-406x(69)91795-2 (In English)
- Mason, A., Sunderland, A. J., Leake, L. D. (1979) Effects of leech Retzius cells on body wall muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology — Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 63C, no. 2, pp. 359–361. PMID: 40750. DOI: 10.1016/0306-4492(79)90086-8 (In English)
- Moshtagh-Khorasani, M., Miller, E. W., Torre, V. (2013) The spontaneous electrical activity of neurons in leech ganglia. *Physiological Reports*, vol. 1, no. 5, article e00089. PMID: 24303164. DOI: 10.1002 / phy2.89 (In English)
- Nusbaum, M. P., Kristan, W. B. Jr. (1986) Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61. *The Journal of Experimental Biology*, vol. 122, pp. 277–302. PMID: 3723072. (In English)
- Sergeeva, S. S. (1994) Изменение характера импульсной активности нейронов Реттзиуса при возрастании частоты его синaptической активации [Electrophysiological research on the topography of the axodendritic synapses of Retzius' neuron in the leech]. *Zhurnal vysshej nervnoj dejatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 44, no. 6, pp. 1144–1147. (In Russian)

- Sergeeva, S. S. (1995) Elektrofiziologicheskoe issledovanie topografii akso-dendritnykh sinapsov nejrona Retziusa pijavki [Electrophysiological research on the topography of the axodendritic synapses of Retzius' neuron in the leech]. *Fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 81, no. 10, pp. 117–120. (In Russian)
- Sergeeva, S. S., Laktionova, A. A., Fomina, N. Yu. (2018) Effects of nimodipine, calcium-free medium and colchicine on electrogenesis of neurosecretory Retzius cells in the leech *Hirudo medicinalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 54, no. 4, pp. 332–337. DOI: 10.1134/S0022093018040105 (In English)
- Smith, P. A., Walker, R. J. (1973) Studies on 5-hydroxytryptamine receptors of neurones from *Hirudo medicinalis*. *British Journal of Pharmacology*, vol. 47, no. 3, pp. 633P–634P. PMID: 4730849 (In English)
- Szczupak, L., Kristan, W. B. Jr. (1995) Widespread mechanosensory activation of the serotonergic system of the medicinal leech. *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 6, pp. 2614–2624. PMID: 8747219. DOI: 10.1152/jn.1995.74.6.2614 (In English)
- Trueta, C., Méndez, B., De-Miguel, F. F. (2003) Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurons. *The Journal of Physiology*, vol. 547, no. 2, pp. 405–416. PMID: 12562971. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.030684 (In English)
- Velázquez-Ulloa, N., Blackshaw, S. E., Szczupak, L. et al. (2003) Convergence of mechanosensory inputs onto neuromodulatory serotonergic neurons in the leech. *Journal of Neurobiology*, vol. 54, no. 4, pp. 604–617. PMID: 12555272. DOI: 10.1002/neu.10184 (In English)
- Willard, A. L. (1981) Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech. *The Journal of Neuroscience*, vol. 1, no. 9, pp. 936–944. PMID: 7288474. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.01-09-00936.1981 (In English)

Sex differences in ultrasonic vocalization and hormonal stress response of an anxious mice strain during the early postnatal period

P. Csikota¹, J. Horváth², V. Szegedi², S. Zsebők³, D. Zelena^{✉1, 4}

¹ Institute of Experimental Medicine, 43 Szigony Str., Budapest 1083, Hungary

² University of Szeged, 52 Közép fasor, Szeged 6726, Hungary

³ Eötvös Loránd University, 1/C Pázmány Péter sétány, Budapest 1117, Hungary

⁴ University of Pécs, 12 Szigeti Str., Pécs H-7624, Hungary

Authors

Péter Csikota,
Scopus AuthorID: 57189329290,
e-mail: csikotapeter@gmail.com

János Horváth,
Scopus AuthorID: 56261728200,
e-mail: horvath.janos3@gmail.com

Viktor Szegedi,
Scopus AuthorID: 9241506600,
e-mail: szegv@yahoo.com

Sándor Zsebők,
Scopus AuthorID: 35605226100,
e-mail: zsebok.s@gmail.com

Dóra Zelena,
Scopus AuthorID: 6602752896,
e-mail: zelena.dora@koki.mta.hu

For citation: Csikota, P., Horváth, J., Szegedi, V., Zsebők, S., Zelena, D. (2020) Sex differences in ultrasonic vocalization and hormonal stress response of an anxious mice strain during the early postnatal period. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 218–224. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-218-224

Received 3 June 2020; reviewed 10 June 2020; accepted 23 June 2020.

Funding: Supported by NKFIH grant PD-115730, K 120311 and K131406.

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

Abstract. Development of anxiolytics requires animal models; therefore anxious (AX) and nonanxious (nAX) mice have been selectively bred based upon their adult behaviour in reaction to handling. Since inadequate response to postnatal challenges may have lifelong consequences, we aimed to determine whether alterations in postnatal stress-coping may contribute to the state of anxiety in adult AX mice. Maternal separation-induced ultrasonic vocalization (MS-USV) was studied in one-week-old nAX-AX mice and one week later the endocrine stress response was measured after lipopolysaccharide (LPS) stimulation, a model of bacterial infection, with special focus on sex differences. It was established that AX females produced a significantly lower frequency and duration of MS-USV than nAX female mice. USV emitted by AX males showed only a tendency to be reduced compared to nAX males. LPS injection generated a significantly increased adrenocorticotropin release in nAX mice only and with no sex-related difference observed. Resting corticosterone levels were higher in AX mice compared to nAX, however, this difference reached the level of significance only in females. LPS-injection was able to induce significant corticosterone elevation with markedly higher levels in AX females than nAX females. To sum up, we conclude that females are more susceptible to the influence of stressors during the early postnatal period, as they exhibited more pronounced reactions. The adult state anxiety of the strain was not paralleled by MS-USV during the perinatal period. Thus, the question arises if MS-USV indeed reflects anxiety only. According to our expectation, AX animals had higher baseline stress-hormone levels, but their reactivity to stressors was altered, which may have contributed to their supposed adult phenotype.

Keywords: adrenocorticotropin, corticosterone, lipopolysaccharide, pup, ultrasonic vocalization.

Introduction

Pathological anxiety is quite common not only in developed, but also in developing countries, and its consequences lie heavy upon society (Kessler et al. 2009). Although animals can merely mimic the complex anxiety-related behaviour observable in humans, the low genetic variability of inbred rodent strains as well as easy manipulation and availability of tissues make animal models attractive. To study the mechanisms and develop new treatments, anxious mice (AX) were selected on the basis of anticipatory anxiety behaviour during a handling procedure (Szego et al. 2010; Horvath et al. 2013). After several generations, AX mice were more anxious compared to controls (nAX) in different well-established anxiety tests, such as the open field, elevated plus maze, and light dark tests.

Although a difference in the reaction to early-life adversity, such as suboptimal maternal care or exposure to stress, may program the brain differentially and lead to different adult phenotype (Horváth et al. 2013; Maccari et al. 2014; Maniam et al. 2014), little is known about the postnatal reactivity of inbred anxious models and its contribution to the development of their adult anxiety. In this paper we aim to clarify this issue.

Separation from the nest is a distress that induces the activation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in the offspring (Varga et al. 2015). Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin from the hypothalamus control the adrenocorticotropin (ACTH) secretion in the adenohypophysis, which is the main regulator of glucocorticoid (in rodent corticosterone) release in the adrenal cortex (Ise et al. 2008; Walker et al. 2009). The behavioural consequence of maternal separation is the emission of ultrasonic vocalisation (USV) by the pups. Various animal species use USV to communicate with each other and provide information about the environment (Brudzynski 2018). The quality and quantity of emitted USV changes with age (Portfors 2007). Pups in stressful situations use ultrasonic vocalization to call their mothers. The frequency and duration of such USV are considered indices of anxiety, as anxiolytics can attenuate them (Iijima, Chaki 2005), making USV a widely used test of putative anxiolytic drugs.

Infections during the perinatal period are rather common and may contribute to the life-long programming of the brain and behaviour (Nguyen et al. 2015). The adaptability to challenges can be measured by changes in the hormones of the HPA axis. Indeed, lipopolysaccharide (LPS), a section of a Gram negative bacteria wall, induces a severe stress reaction in vulnerable individuals (Lolait et al. 2007; Salome et al. 2008; Walker et al. 2009; Balazsfi et al. 2016).

In the present research we aimed to study maternal separation-induced USV and stress-hormone reactivity to LPS injection in AX and nAX mice pups in order to establish whether their altered behavioural and hormonal stress-sensitivity during the challenges of the postnatal period may contribute to the development of psychopathologies in this strain.

Materials and methods

1. Animals

nAX and AX inbred mouse strains were originally developed at EGIS Pharmaceuticals Co. (Budapest, Hungary) by combination of crossbreeding and behavioural selection (Szego et al. 2010). Selection was made in adult mice on the basis of anticipatory anxiety behaviour during the handling procedure. When mice were moved to another cage, some animals always 'volunteered' earlier, while others always moved away from the experimenter. Animals were separated into two groups, early movers (non-anxious, nAX, control) and late movers (anxious, AX), and were inbred.

Pups were kept with their mothers under a standard 12h light–dark cycle (lights on at 8 a. m.), with food and water available ad libitum, and their body weights were recorded during the tests. All experiments were carried out between 9h and 14h. All manipulations with the animals were approved by the local committee for animal health and care and performed according to the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

2. Experimental design

On postnatal day (PND) 7–8 (both sexes, 10 litters, 6–10 pups/litter) pups were examined in an ultrasonic vocalization test (USV, see details below; $n = 14\text{--}19/\text{group}$), marked and placed back with their mothers. A week later (PND 14–15) LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA; O55:B5; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{kg}$, dissolved in saline) or saline was injected intraperitoneally (i.p.) to the same animals ($n = 5\text{--}9/\text{group}$) (Balázsfi et al. 2016). One hour later blood samples were taken for hormone measurements (ACTH, corticosterone).

3. Ultrasonic vocalization (USV)

Pups were brought to a soundproof room and placed in a 600 ml glass beaker without bedding and heating. Several studies demonstrated that ambient temperature plays a pivotal role in the rates of separation-induced vocalization. USV is lower when the temperature is close to nest or skin temperature (30–37 °C). In contrast, USV rates are higher at room temperature (Portfors 2007; Ise et al. 2008;

Walker et al. 2009). We chose the more stressful room temperature condition for our experiments.

USV was observed for 10 min. as described in one of the previous studies (Varga et al. 2015). To describe the procedure briefly, individual calls were detected by means of an ultrasonic-sensitive frequency division detector (CIEL électronique, CDB205 R2, coupled to a computer), which was fixed on a holder 12 cm above the bottom of the glass beaker. Vocalizations were recorded using free Audacity 2.0.5. software and stored on a personal computer. Data were automatically counted in the power spectrum 30–50 kHz (typically occurring after maternal separation (Varga et al. 2015)) using a USV Counter software (developed by S. Zsebők). The total number and total duration of calls per session were measured. In addition, USV frequency was calculated as the total number /10 min.

4. Hormone measurements

Blood was collected after decapitation in ice-cold plastic tubes, it was centrifuged, and the serum was separated and stored at -20°C until analysis. ACTH and corticosterone were measured by radioimmunoassay in 50 μl or 10 μl unextracted serum, respectively, as described in earlier research (Varga et al. 2015). The intra-assay coefficients of the variations were 4.7% and 7.5% for the two hormones, respectively. All the samples from a particular experiment were measured in one radioimmunoassay.

5. Statistical analysis

Data were expressed as means $\pm$ SEM and analyzed using STATISTICA 12.0 software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) by analysis of variance (ANOVA) using repeated measure (body weight; factors “phenotype”, “time” and “sex”), two (USV; factors “phenotype” and “sex”) or three way ANOVA (LPS; factors “treatment”, “phenotype”, and “sex”). Post-hoc comparison was made by the Newman-Keuls method and the results were presented in figures (shown below). Correlation was calculated by the Pearson analysis. P values under 0.05 were considered as significant and between 0.1 and 0.05 was considered as trends.

Results

1. Weight

At 7–8 PND the body weight of all groups was homogenous (Table 1). However, 7 days later, at the time of LPS injection the AX females were significantly heavier compared both to nAX females and AX males (phenotype $\times$ sex: $F_{(1,55)} = 3.74$, $p = 0.05$; phenotype $\times$ time $\times$ sex: $F_{(1,55)} = 3.19$, $p = 0.07$).

2. Anxiety-like behaviour (USV)

Frequency (number of calls/10 min.) (phenotype: $F_{(1,62)} = 8.02$; $p < 0.01$) as well as duration (phenotype: $F_{(1,62)} = 11.09$; $p < 0.01$) of vocalization were generally lower in AX compared to nAX animals, but during post-hoc comparisons the difference reached the level of significance only in females (fig. 1). Thus,

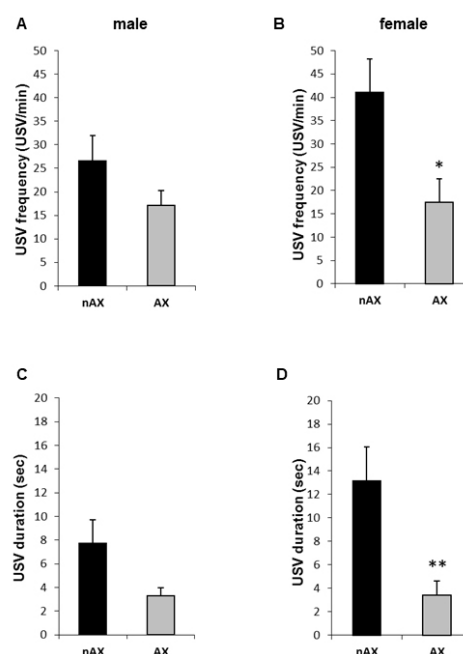


Fig. 1. Maternal separation-induced ultrasonic vocalization (USV) on postnatal day (PND) 7–8 in anxious (AX) ($n = 19$ male and 19 female) and nonanxious (nAX) mice ($n = 15$ male and 13 female). AX mice emitted significantly less USV both in frequency (number of calls per minute; **A**, **B**) and duration (added together during the entire 10 min. observation period; **C**, **D**) than nAX mice, which reached the level of significance in females only. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs nAX

Table 1. Body weight of the animals

Weight (g)	nAX		AX	
	Male	Female	Male	Female
PND 7	4.26 $\pm$ 0.14	4.08 $\pm$ 0.15	4.63 $\pm$ 0.23	4.62 $\pm$ 0.25
PND 14	7.46 $\pm$ 0.23	6.87 $\pm$ 0.19	6.99 $\pm$ 0.47	7.91 $\pm$ 0.44*#
n	19	19	15	14

* $p < 0.05$ vs female nAX; # $p < 0.05$ vs male AX

maternal separation resulted in sex-dependent differences during the USV test.

3. Stressor exposure (LPS)

One hour after LPS injection a robust elevation of plasma ACTH was observed in nAX, but not in AX mice (treatment: $F_{(1,48)} = 37.7$; $p < 0.01$; phenotype $\times$ treatment: $F_{(1,48)} = 22.8$; $p < 0.05$). ACTH levels did not show sex-dependent changes either under control conditions, or after LPS injection (fig. 2A, B).

Plasma corticosterone levels after LPS treatment increased in both phenotypes (treatment: $F_{(1,44)} = 4.81$; $p < 0.05$). AX animals showed a higher level of corticosterone both under basal conditions and after stressor exposure than nAX ones (phenotype: $F_{(1,44)} = 33.2$; $p < 0.01$). During post-hoc comparison this hormonal hyperactivation in AX pups was significant only in females (fig. 2C, D).

Finally, we found a significant negative correlation between the studied USV parameters and corticosterone levels among control conditions (USV frequency — corticosterone: $r = -0.45$, $p < 0.05$; USV duration — corticosterone: $r = -0.46$, $p < 0.05$). There were similar tendencies after stressor expo-

sure also, but it did not reach the level of significance (USV frequency — corticosterone: $r = -0.35$, $p = 0.08$; USV duration — corticosterone: $r = -0.38$; $p = 0.06$).

Discussion

Our findings demonstrated that nAX animals emitted significantly higher USV after maternal separation than AX pups. This difference was also more pronounced in females than males. Acute immune stress had a prominent effect on ACTH response in nAX pups only, whereas corticosterone levels in AX mice appeared constantly higher both in basal and stress conditions.

Previous studies clearly suggested an enhanced maternal separation-induced USV emission as a sign of exaggerated anxiety both in rat and mice pups (Winslow, Insel 1991; Iijima, Chaki 2005; Varga et al. 2015; Balázsfi et al. 2016). Moreover, rats showing higher USV at PND 10 during a 2 min test were more anxious in their adulthood as measured in open field (Brunelli, Hofer 2007). However, we have to emphasize, that their “controls” with low USV during the perinatal period seemed to be more aggressive and emit lower 55 kHz (pro-social,

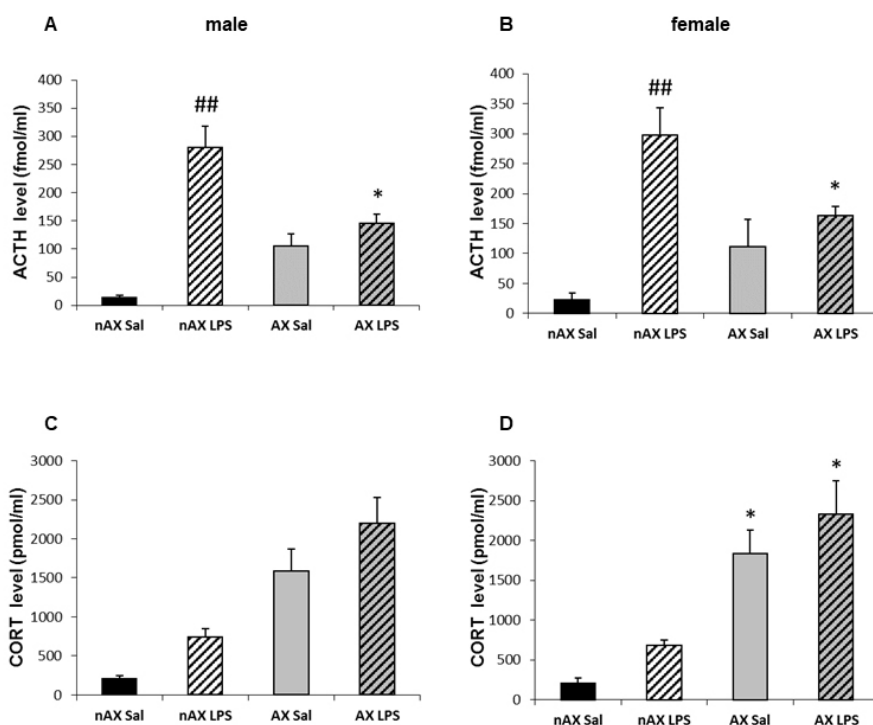


Fig. 2. Changes in stress-hormone levels 60 minutes after intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS, 100 μ g/ml/kg) injection on postnatal day (PND) 14–15 in neonatal anxious (AX) and non-anxious (nAX) mice ($n = 8, 4, 6, 8$ for males and 8, 5, 4, 9 for females, in the order of the columns): (A, B) adrenocorticotropin (ACTH, fmol/ml) levels increased in response to LPS injection only in nAX mice without sex-dependent differences; (C, D) corticosterone (pmol/ml) levels were higher in AX mice both during rest and after LPS stimulation. LPS induced significant elevation in both phenotypes. The AX females showed higher levels than their nAX counterparts. * $p < 0.05$ vs nAX, ** $p < 0.01$ vs saline

marker of positive effects) USV in adulthood, thus, the adult anxiety in these animals was not unequivocal. Indeed, another laboratory found a negative correlation between infant anxiety behaviour examined by maternal separation-induced USV for 10 min. and adult anxiety measured as immobility and 22 kHz USV during fear conditioning (and partly by enhanced open arm frequency on elevated plus maze in high infantile USV group compared to low USV rats; $p = 0.058$) (Wöhr, Schwarting 2008). We agree with the authors that the emission of ultrasonic calls in infancy might reflect an active coping style, based upon positive correlations between calling and overt behaviour observed by them, while in adulthood USV might reflect a passive coping style shown by the same group with a positive correlation between calling and immobility. Moreover, behavioural effects observed during isolation (e. g. USV) are part of stress response, while behaviours during testing in novel, but unthreatening situations (e. g. handling as a selection method in our strain or elevated plus maze) reflect the need for exploration. However, in contrast to our findings, another inbred strain, the high anxiety behaviour (HAB) and low anxiety behaviour (LAB) animals selected based upon their behaviour on elevated plus maze, was found to emit higher USV examined either in 11-day-old rat pups (Wigger et al. 2001), or 5-day-old mice pups (Krömer et al. 2005), or adult rats in response to social defeat (Frank et al. 2006). We might assume that different factors contribute to the anxiety phenotypes in the two anxious strains.

Maternal behaviour has a lasting consequence on the adult anxiety-related behaviour and coping style (Maniam et al. 2014; Nguyen et al. 2015). It was shown that maternal licking and grooming induce certain epigenetic changes in the pups, resulting in altered stress responses and reduced anxiety in adulthood (Weaver 2007; Lester et al. 2018). Increased USV in nAX pups might induce more active maternal care, which might in turn contribute to the development of a non-anxious adult phenotype. On the contrary, the reduced USV in AX pups might not promote sufficient maternal nurturing, affecting the later-life behaviour. We intend to explore the level of maternal care in our mouse strain in a follow-up study.

The higher resting stress hormone levels in AX mice pups may also result in negative consequences later (Musazzi, Marrocco 2016). Moreover, the reduced stress reactivity to an immune challenge in AX mice pups is also a reflection of a disrupted coping style. Previously LPS was able to induce significant stimulation in ACTH and corticosterone levels in adult (Lolait et al. 2007) and postnatal

(Balázsfi et al. 2016) mice, which was replicated in our present experiments. Although HAB rats previously demonstrated a larger increase in corticosterone levels to LPS administration than LAB rats (Salome et al. 2008), their stress reaction to social defeat was also diminished (Frank et al. 2006), similarly to our results. In our case, the lower level of reactivity might be explained by the already enhanced basal stress hormone levels.

Our data confirms the findings of a previous study in a mutant mice strain, which suggested sex-determined differences, particularly a higher stress-hormone release in female subjects compared to males (Lolait et al. 2007), thus supporting the idea of increased vulnerability of females in response to an acute stressor. Moreover, a previous study in C57BL/6J mice found female pups to be more susceptible than males to the effect of maternal separation based on USV call frequency and duration (Yin et al. 2016). In our experiment nAX females showed a tendency towards higher USV than males ($p = 0.08$) while there was no marked sex-related difference observed in the response of AX mice, and this could mean a significantly different rate of USV when comparing AX to nAX in females, but not in males.

Conclusion

According to the three-hit concept of vulnerability and resilience, aside from genetic predisposition and stressful experiences in adulthood, the early perinatal period is of utmost importance (Daskalakis et al. 2013). We might conclude that — in accordance with our expectation — the higher basal corticosterone levels of AX animals and their altered stress reactivity to immune challenges may contribute to their adult phenotype. The adult anxiety phenotype of the strain was not paralleled by higher maternal separation-induced USV, thus, the question arises whether USV is indeed a good model of perinatal anxiety or if it rather resembles social communication or active coping with stress.

Conflict of interest statement

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

Acknowledgements

Funding agencies had no further role in the study design, data collection, analysis and interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Balázsfi, D., Farkas, L., Csikota, P. et al. (2016) Sex-dependent role of vesicular glutamate transporter 3 in stress-regulation and related anxiety phenotype during the early postnatal period. *Stress*, vol. 19, no. 4, pp. 434–438. PMID: 27442776. DOI: 10.1080/10253890.2016.1203413 (In English)
- Brudzynski, S. (ed.). (2018) *Handbook of ultrasonic vocalization: A window into the emotional brain*. San Diego: Academic Press, 580 p. (Handbook of Behavioural Neuroscience. Vol. 25). (In English)
- Brunelli, S. A., Hofer, M. A. (2007) Selective breeding for infant rat separation-induced ultrasonic vocalizations: Developmental precursors of passive and active coping styles. *Behavioural Brain Research*, vol. 182, no. 2, pp. 193–207. PMID: 17543397. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.04.014 (In English)
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J. et al. (2013) The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 9, pp. 1858–1873. PMID: 23838101. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2013.06.008 (In English)
- Frank, E., Salchner, P., Aldag, J. M. et al. (2006) Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behavioral Neuroscience*, vol. 120, no. 1, pp. 60–71. PMID: 16492117. DOI: 10.1037/0735-7044.120.1.60 (In English)
- Horváth, J., Szögi, T., Müller, G., Szegedi, V. (2013) The anxiolytic buspirone shifts coping strategy in novel environmental context of mice with different anxious phenotype. *Behavioural Brain Research*, vol. 250, pp. 32–38. PMID: 23608485. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.04.014 (In English)
- Iijima, M., Chaki, S. (2005) Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: Further pharmacological characterization. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, vol. 82, no. 4, pp. 652–657. PMID: 16359723. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.11.005 (In English)
- Ise, S., Nagano, N., Okuda, S., Ohta, H. (2008) Corticotropin-releasing factor modulates maternal separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups via activation of CRF1 receptor. *Brain Research*, vol. 1234, pp. 59–65. PMID: 18703034. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.07.079 (In English)
- Kessler, R. C., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J. et al. (2009) The global burden of mental disorders: An update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. *Epidemiologia e Psichiatria Sociale*, vol. 18, no. 1, pp. 23–33. PMID: 19378696. DOI: 10.1017/s1121189x00001421 (In English)
- Krömer, S. A., Kessler, M. S., Milfay, D. et al. (2005) Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 17, pp. 4375–4384. PMID: 15858064. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0115-05.2005 (In English)
- Lester, B. M., Conradt, E., LaGasse, L. L. et al. (2018) Epigenetic programming by maternal behavior in the human infant. *Pediatrics*, vol. 142, no. 4, article e20171890. PMID: 30257918. DOI: 10.1542/peds.2017-1890 (In English)
- Lolait, S. J., Stewart, L. Q., Roper, J. A. et al. (2007) Attenuated stress response to acute lipopolysaccharide challenge and ethanol administration in vasopressin V1b receptor knockout mice. *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 19, no. 7, pp. 543–551. PMID: 17561882. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2007.01560.x (In English)
- Maccari, S., Krugers, H. J., Morley-Fletcher, S. et al. (2014) The consequences of early-life adversity: Neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 26, no. 10, pp. 707–723. PMID: 25039443. DOI: 10.1111/jne.12175 (In English)
- Maniam, J., Antoniadis, C., Morris, M. J. (2014) Early-life stress, HPA axis adaptation, and mechanisms contributing to later health outcomes. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, vol. 5, article 73. PMID: 24860550. DOI: 10.3389/fendo.2014.00073 (In English)
- Musazzi, L., Marrocco, J. (2016) Stress response and perinatal reprogramming: Unraveling (Mal)adaptive strategies. *Neural Plasticity*, vol. 2016, article 6752193. PMID: 27057367. DOI: 10.1155/2016/6752193 (In English)
- Nguyen, M. U., Wallace, M. J., Pepe, S. et al. (2015) Perinatal inflammation: A common factor in the early origins of cardiovascular disease? *Clinical Science (London)*, vol. 129, no. 8, pp. 769–784. PMID: 26223841. DOI: 10.1042/CS20150045 (In English)
- Portfors, C. V. (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 46, no. 1, pp. 28–34. PMID: 17203913. (In English)
- Salome, N., Tasiemski, A., Dutriez, I. et al. (2008) Immune challenge induces differential corticosterone and interleukin-6 responsiveness in rats bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuroscience*, vol. 151, no. 4, pp. 1112–1118. PMID: 18207648. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.010 (In English)
- Szego, E. M., Janáky, T., Szabó, Z. et al. (2010) A mouse model of anxiety molecularly characterized by altered protein networks in the brain proteome. *European Neuropsychopharmacology*, vol. 20, no. 2, pp. 96–111. PMID: 20015620. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2009.11.003 (In English)
- Varga, J., Fodor, A., Klausz, B., Zelena, D. (2015) Anxiogenic role of vasopressin during the early postnatal period: Maternal separation-induced ultrasound vocalization in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Amino Acids*, vol. 47, no. 11, pp. 2409–2418. PMID: 26133736. DOI: 10.1007/s00726-015-2034-x (In English)
- Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J. et al. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: Implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 34, no. 10, pp. 1515–1525. PMID: 19524372. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010 (In English)

- Weaver, I. C. G. (2007) Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: Let's call the whole thing off. *Epigenetics*, vol. 2, no. 1, pp. 22–28. PMID: 17965624. DOI: 10.4161/epi.2.1.3881 (In English)
- Wigger, A., Loerscher, P., Weissenbacher, P. et al. (2001) Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: A genetic rat model of anxiety. *Behavior Genetics*, vol. 31, no. 4, pp. 371–382. PMID: 11720123. DOI: 10.1023/a:1012222402346 (In English)
- Winslow, J. T., Insel, T. R. (1991) Infant rat separation is a sensitive test for novel anxiolytics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, vol. 15, no. 6, pp. 745–757. DOI: 10.1016/0278-5846(91)90003-j (In English)
- Wöhr, M., Schwarting, R. K. W. (2008) Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behavioral Neuroscience*, vol. 122, no. 2, pp. 310–330. PMID: 18410171. DOI: 10.1037/0735-7044.122.2.310 (In English)
- Yin, X., Chen, L., Xia, Y. et al. (2016) Maternal deprivation influences pup ultrasonic vocalizations of C57BL/6J mice. *PLoS One*, vol. 11, no. 8, article e0160409. PMID: 27552099. DOI: 10.1371/journal.pone.0160409 (In English)

Mosaicism in preimplantation human embryos

A. F. Saifitdinova^{✉1,2}, O. S. Glotov^{3,4}, I. V. Poliakova³, N. K. Bichevaya², Ju. A. Loginova⁵,
R. A. Kuznetsova², O. A. Leonteva², E. E. Nevskaya^{2,6}, O. A. Pavlova^{2,6}, I. L. Puppo^{7,2},
A. E. Shikov³, S. P. Urazov³, T. V. Kuznetsova⁴, A. M. Sarana⁸, S. G. Scherbak³, V. S. Baranov⁴

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika River Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

² International Centre for Reproductive Medicine, 53/1 Komendantskij Ave., Saint Petersburg 197350, Russia

³ City Hospital No. 40, 9 Borisova Str., Sestroretsk, Saint Petersburg 197706, Russia

⁴ The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott,
3 Mendelevskaya Line, Saint Petersburg 199034, Russia

⁵ DiaCarta, Inc, 2600 Hilltop Drive, Richmond, CA 94806, USA

⁶ Customer Laboratory Service Associate, Beagle Ltd., 152/1 Bukharetskaya Str.,
Saint Petersburg 192289, Russia

⁷ Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
2 Akkuratova Str., Saint Petersburg 197341, Russia

⁸ Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Alsu F. Saifitdinova, SPIN: 5114-4844,
Scopus AuthorID: 6603195889,
ORCID: 0000-0002-1221-479X,
e-mail: saifitdinova@mail.ru

Oleg S. Glotov, SPIN: 4531-3449,
Scopus AuthorID: 23988449900,
ORCID: 0000-0002-0091-2224,
e-mail: olglotov@mail.ru

Irina V. Poliakova, SPIN: 2362-7626,
Scopus AuthorID: 55371136300,
ORCID: 0000-0002-5738-8443,
e-mail: irena.88@inbox.ru

Natalia K. Bichevaya,
ORCID: 0000-0001-8866-5821,
e-mail: bichevaya@mcrm.ru

Julia A. Loginova, SPIN: 9532-4407,
Scopus AuthorID: 55597320200,
ORCID: 0000-0002-1304-5967,
e-mail: j.a.loginova@gmail.com

Rena A. Kuznetsova,
ORCID: 0000-0003-4195-6968,
e-mail: kuznetsova@mcrm.ru

Olga A. Leonteva,
ORCID: 0000-0002-3667-0511,
e-mail: olga_leont@mail.ru

Elizaveta E. Nevskaya,
ORCID: 0000-0003-0626-6048,
e-mail: elizaveta.nevsk@yandex.ru

Olga A. Pavlova, SPIN: 1366-7591,
ORCID: 0000-0001-9488-6903,
e-mail: beagle07@bk.ru

Irina L. Puppo, SPIN: 3817-9200,
Scopus AuthorID: 55201398200,
ORCID: 0000-0001-8538-3845,
e-mail: il_trofimova@list.ru

Abstract. Since the very first publications on preimplantation genetic testing, researchers have faced a serious problem — a high mosaicism level in the preimplantation human embryos obtained by means of in vitro fertilization cycles. The nature of this mosaicism and its high impact on embryo development draws attention to this issue. In this research we studied the cells from different parts of preimplantation human embryos with mosaicism in the trophectoderm cells detected using Next-generation Sequencing (NGS). Six human blastocysts with mosaicism in their trophectoderm cells were each sectioned in three parts: two containing only trophectoderm cells and one predominantly inner cell mass. These parts were then analyzed individually. Our data indicate that the proportion of aneuploid cells in biopsate taken for preimplantation genetic testing does not necessarily reflect the true chromosomal status of the whole embryo and cannot be extrapolated to that in the embryoblast cells. The results of our study strongly suggest that mosaicism revealed in blastocyst reduces the likelihood of finding the euploid chromosome set in the other parts of the embryo. Karyotypes of cells from different parts of mosaic embryos show low concordance. Chromosomal abnormalities in mosaic embryos are unpredictably diverse, which may lead not only to loss of conception, but also to the development of genetic disease in the offspring. According to our data, the mosaic rate tends to increase in the samples containing trophectoderm adjacent to the embryoblast, which may have physiological significance for the implantation. Comparative studies focused on the concordance of mosaicism level of and the type of chromosomal abnormalities detected in different parts of preimplantation human embryos will improve clinical recommendations regarding the transfer of mosaic embryos.

Keywords: mosaicism, human embryos, aneuploidy, preimplantation genetic testing, in vitro fertilization.

Anton E. Shikov,
Scopus AuthorID: 57210888268,
ORCID: 0000-0001-7084-0177,
e-mail: antonshikov96@gmail.com

Stanislav P. Urazov, SPIN: 7280-8107,
Scopus AuthorID: 57203680120,
ORCID: 0000-0002-5441-2911,
e-mail: urasta@list.ru

Tatyana V. Kuznetzova, SPIN: 1000-7522, ORCID: 0000-0003-1738-6782,
e-mail: tkuznetzova@mail.ru

Andrei M. Sarana, SPIN: 7922-2751,
ORCID: 0000-0003-3198-8990,
e-mail: asarana@mail.ru

Sergei G. Scherbak, SPIN: 1537-9822,
ORCID: 0000-0001-5047-2792,
e-mail: sgsherbak@mail.ru

Vladislav S. Baranov,
SPIN: 9196-7297,
Scopus AuthorID: 56057974100,
ORCID: 0000-0002-6518-1207,
e-mail: baranov@vb2475.spb.edu

For citation: Saifitdinova, A. F.,
Glotov, O. S., Poliakova, I. V.,
Bichevaya, N. K., Loginova, Ju. A.,
Kuznetsova, R. A., Leonteva, O. A.,
Nevskaia, E. E., Pavlova, O. A.,
Puppo, I. L., Shikov, A. E.,
Urazov, S. P., Kuznetzova, T. V.,
Sarana, A. M., Scherbak, S. G.,
Baranov, V. S. (2020) Mosaicism
in preimplantation human embryos.
Integrative Physiology, vol. 1, no. 3,
pp. 225–230. DOI: 10.33910/2687-
1270-2020-1-3-225-230

Received 29 November 2019;
reviewed 30 December 2019;
accepted 15 January 2020.

Funding: The study was supported
by the fundamental theme of research
No. AAAA-A19-119021290033-1.

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

Introduction

Postzygous mitotic errors might result in cell clones with unequal chromosomal sets within the same embryo. This phenomenon has been described as embryonic mosaicism. Mosaicism should be considered thoroughly when being examined in preimplantation embryos at blastocyst stage. Numerous data estimate relatively high mosaicism frequency in blastocyst (Weissman et al. 2017). Meanwhile, mosaicism of trophectoderm (TE) cells does not necessarily correspond to the one within the inner cell mass (ICM) (Munné et al. 2017). This fact can significantly complicate the interpretation of preimplantation genetic testing (PGT) results.

The observation that mosaicism in preimplantation human embryos is often identified in vitro fertilization cycle with preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) raises the inevitable question of how a mosaicism level can be reliably estimated. Rapid advancement of Next-generation Sequencing (NGS) in conjunction with a single cell whole genome amplification techniques have stimulated implementation of this approach for PGT-A. The high sensitivity of the NGS method enables researchers to identify with high confidence the mosaicism in TE DNA samples with a single abnormal cell (20% for samples with 5 cells). With the NGS approach it has been shown that mosaicism frequency in preimplantation blastocysts varies

from 17% to 47% in nine diverse artificial reproductive technology (ART) centres (Sachdev et al. 2016). Nevertheless, the available comparative data on chromosomal mosaicism values in TE and ICM cells remains limited and controversial (Munne et al. 2017).

Thus, maintaining the efficiency of ART requires additional investigation of mosaicism. The principal goal of the present paper is to discuss the application of NGS-techniques in evaluating the mosaicism level in diverse cell fractions of preimplantation human embryos with TE mosaicism detected earlier by PGT-A.

Materials and methods

All procedures were fulfilled according to the World Medical Association's Declaration of Helsinki. The Scientific Review Board of the Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott approved the research and endorsed the fundamental research topic No. AAAA-A19-119021290033-1. Informed consent was obtained from all healthy voluntary participants, who provided gametes for the research. Early human embryos were obtained by artificial insemination by means of intracytoplasmic sperm injection procedure. Oocytes from 16 clinically healthy fertile voluntary participants at the age of 20–32 years with a normal karyotype were fertilized in vitro with sperm from 11 clinically healthy donors with a normal karyotype from the International Centre for Reproductive Medicine (ICRM) sperm bank according to the published protocol (Korsak et al. 2019). Pronuclei and polar bodies were checked 16–18 hours after fertilization. Embryos were cultured in sequential culture media solutions (COOK) for 5–6 days up to blastocyst stage. The latter were examined and graded in accordance with Gardner classification (Gardner, Schoolcraft 1999). High quality blastocysts were subjected to TE biopsy and cryopreserved by vitrification in Kitazato medium according to recommended protocol (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japan).

PicoPLEX whole genome amplification (WGA) Kit (Rubicon Genomics) was used for whole genome amplification. The concentration of WGA products was measured with Quantus™ Fluorometer (Promega) and QuantiFluor® dsDNA System reaction kit. DNA libraries were prepared according to VeriSeq PGS kit (Illumina) and assessed for quality with TapeStation 4200 (Agilent). Sequencing of the libraries was performed on Illumina MiSeq. Numerical chromosome abnormalities analysis was carried out in BluFuse Multi v4.3 (Illumina) software. This method provides effective resolution of 20 Mb.

Embryos with detected single or multiple chromosomal mosaicism in TE cells were thawed and incubated until complete expansion. Such blastocysts were sectioned in three parts with two containing TE cells and one — predominantly with ICM cells as previously described (Taylor et al. 2016). WGA, sequencing, and qualitative DNA evaluation were performed for each sample as indicated above.

Results and discussion

After morphological evaluation blastocysts of high quality were subjected to TE biopsy for PGT-A by NGS technique and cryopreserved. Six blastocysts in which TE cells mosaicism was observed were thawed and analyzed further (Table 1).

Embryo 492x94 e5 (No. 1) was characterized by mosaic monosomy for chromosome 16 as indicated by PGT-A. Non-mosaic monosomy 16 was detected in the other two TE sites, however, in ICM it was also detected in mosaic state. Presumably the monosomy 16 had occurred during meiosis and in some cells reduplication restored chromosome set to euploid state. Mosaicism for trisomy of chromosome 1 was detected in a sample containing ICM. It is most likely that trisomy 1 emerged during the cleavage stage, given that monosomy 16 and especially trisomy 1 are not found during prenatal stage.

Embryo 500x97 e15 (No. 2) demonstrated mosaic trisomy for chromosome 8 as detected by PGT-A. However, when analyzing cells from other sites, not only monosomy 8, but also trisomy 8, trisomy 3, monosomy 10, and X and Y aneuploidy were found. All these anomalies most probably resulted from mitotic nondisjunction during cleavage. The presence of reciprocal mosaic aneuploidy on chromosome 8 can indirectly point to this. The transfer of this embryo could result in pregnancy loss during the first trimester with the high probability, as autosomal monosomy and X nullisomy are lethal, and trisomy 3 in the placenta leads to complicated pregnancy whereas trisomy 8 by itself is responsible for 0.7%–0.8% of all spontaneous abortions (Campbell et al. 2001). Mosaic trisomy 8 is compatible with embryonic development and live birth. The prognosis for embryos with the male set of sex chromosomes (XY) is more negative, as they are more likely to be born since the ratio of newborn girls to boys with this syndrome is 1:5 (Gardner, Amor 2018).

Embryo 590x77 e2 (No. 3) was marked by chromosome 6 monosomy in the first sample and trisomy 6 in the ICM+TE sample. Reciprocal mosaic aneuploidy for chromosome 6, as in the previous case No. 2), may arise from chromosome nondisjunction of euploid cell during the cleavage stage.

Table 1. Molecular genetic study of embryos with detected TE mosaicism

Nº	Embryo barcode	Embryo quality	Analysis type	Number of cells	Detected chromosomal anomaly	Percent of abnormal cells
1	492x94 e5	BI3AB	PGT-A	5	Monosomy 16	80
		HBI3AB	TE 1	7	Monosomy 16	100%
			TE 2	7	Monosomy 16	100%
			ICM+TE	10	Trisomy 1	40%
					Monosomy 16	80%
2	500x97 e15	BI3AA	PGT-A	5	Trisomy 8	40%
		HBI6AA	TE 1	10	Trisomy 3	50%
					Trisomy 8	50%
					XYY	10%
			TE 2	7	Monosomy 8	40%
			ICM+TE	10	Nullisomy X, Y	10%
					Monosomy 8	40%
					Monosomy 10	20%
					XYY	10%
3	590x77 e2	BI3AA	PGT-A	5	Monosomy 6	40%
		HBI3AA	TE 1	5–7	Euploid	
			TE 2	10	Nullisomy X, Y	10%
			ICM+TE	10	Trisomy 6	60%
					Trisomy 11	40%
					Monosomy 13	60%
					Nullisomy X, Y	40%
4	605x100 e4	BI3AB	PGT-A	5	Trisomy 2	40%
					Trisomy 9	40%
		HBI6AB	TE 1	5	Trisomy 2	20%
					Trisomy 9	20%
			TE 2	7	Trisomy 2	40%
					Trisomy 9	40%
		ICM+TE		7	Trisomy 2	30%
					Trisomy 9	30%
5	605x100 e8	BI2AB	PGT-A	5	Trisomy 8	70%
					Trisomy 12	70%
					Trisomy 16	70%
					Monosomy 6	40%
					Monosomy 7q	40%
		HBI6AB	TE 1	5–10	Monosomy 6	20%
					Monosomy Xq	40%
			TE 2	5–10	Trisomy 8	30%
					Trisomy 12	30%
					Trisomy 16	30%
					Monosomy Xq	20%
			ICM+TE	15	Trisomy 21	30%
					Trisomy 4p	30%
					Monosomy 6q	60%
					Monosomy Xq	50%
6	597x88 e18	BI2AA	PGT-A	5	Trisomy 13	60%
		HBI6AA	TE 1	5–10	Euploid	
			TE 2	5–10	Monosomy 13	20%
			ICM+TE	15	Monosomy 13	10%

However, it is probable that the nondisjunction occurred later than in embryo No. 2, because embryo No. 3 has a euploid cell line (TE 1) and a line diploid for chromosome 6 (TE 2). Yet, as in the previous case, an overall karyotype destabilization could be suspected with probable aneuploidy for other chromosomes not found in the first sample. The probability of giving birth to a healthy child with monosomy 6 detected in PGT-A sample in definite proportion of its cells was negligible and the embryo would not be recommended for transfer.

Embryo 605x100 e4 (No. 4) was a true mosaic since trisomy for chromosomes 2 and 9 was found in all samples from this embryo, although in different proportions. The stage of its origin is difficult to pinpoint, but it could possibly be a result of multipolar mitosis. Chromosome nondisjunction occurred rather early as the resulted blastocyst contained cells with different chromosomal constitution. It should be emphasized that mosaicism on trisomy 2 is exclusively tissue-specific and was detected only in extraembryonic mesoderm cells during prenatal diagnostics (Griffin 1996; Wolstenholme et al. 1994). There is only one report which describes cases of prenatal diagnosis of acardiac twin pregnancy with mosaic trisomy 2 (Blancher et al. 2000). Full and mosaic trisomy 9 is often detected in spontaneous abortion, but it is sublethal (Baranov, Kuznetsova 2007). Thus the probability of becoming pregnant after the transfer of an embryo with simultaneously mosaic trisomy 2 and 9 seems very low.

Embryo 605x100 e8 (No. 5) contained aneuploid cells with imbalances in the entire chromosomes or their arms. Such anomalies are indicative of karyotype destabilization through mitotic divisions and mitotic recombination in centromeric regions of chromosomes (Giunta, Funabiki 2017). All these chromosomal anomalies could occur during early cleavage divisions (Daughtry, Chavez 2016). The probability of becoming pregnant after the embryo transfer is low.

Embryo 597x88 e18 (No. 6) was marked with chromosome 13 trisomy in 40% of its cells. Analysis of the sample from different parts of the embryo also showed monosomy 13 (reciprocal mosaic aneuploidy) and euploid cells, indicating its origin from mitotic nondisjunction at cleavage and predominant selection of monosomy clone.

The first article about the birth of a healthy child with a normal karyotype as a result of transferring an embryo with mosaic TE was published in 2015 (Greco et al. 2015). The number of relevant publications on the transfer of embryos with mosaicism revealed by PGT-A detected by the NGS method is increasing (Munne et al. 2017; Kushnir et al. 2018; Victor et al. 2019). Hereby, transfer of embryos with

mosaic TE can give rise to pregnancy and result in the birth of a child with a euploid karyotype. Nevertheless, the rate of successful pregnancies is lower compared to that following the transfer of euploid embryos (Kushnir et al. 2018).

The trend to transfer mosaic embryos gradually expands as the efficiency of prenatal testing for chromosome imbalances steadily increases due to further improvements of PGT-A techniques (Sachdev et al. 2016; Victor et al. 2019). It is obvious that the transfer of mosaic embryos should be justified providing the absence of euploid embryos for transfer in the same couple. Our data indicate that the proportion of aneuploid cells in biopsy taken for PGT-A analysis does not necessarily reflect the true chromosomal status of the whole embryo and cannot be extrapolated to that in ICM cells. Meanwhile, our preliminary results indicate that if a mosaic chromosomal imbalance was detected in blastocyst, the probability of an euploid chromosome set in other parts is low. Consequently, mosaic embryo transfers should be considered with caution. Clinical recommendation for embryo transfer describes the requirements on prioritizing the transfer of mosaic embryos respective of PGT-A results (PGDIS position statement... 2019). The main idea of the recommendation is that the decision regarding the transfer should be taken respectively of the level of mosaicism and the data on the effects of the particular chromosome (chromosomal region) on prenatal and postnatal development (Grati 2014). Our data revealed that mosaic rate in the samples containing TE adjacent to ICM tends to increase, which may have physiological significance for implantation. Further comparative studies focused on the concordance of mosaicism level of and the type of chromosomal abnormalities detected in different parts of preimplantation human embryos will improve clinical recommendation for embryo transfer.

Conflict of interest statement

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

We are grateful to Chairman of the Russian Association for Human Reproduction, Prof. V. S. Korsak for actively supporting the development of the most advanced methods of preimplantation genetic research in Russia. We thank Dr. A. S. Komissarov for his assistance in the quality control of the raw reads for sequencing results.

References

- Baranov, V. S., Kuznetsova, T. V. (2007) *Tsitogenetika embrionalnogo razvitiya cheloveka [Human embryonic development cytogenetics]*. Saint Petersburg: N–L Publ., 640 p. (In Russian)
- Blaicher, W., Repa, C., Schaller, A. (2000) Acardiac twin pregnancy: Associated with trisomy 2: Case report. *Human Reproduction*, vol. 15, no. 2, pp. 474–475. PMID: 10655326. DOI: 10.1093/humrep/15.2.474 (In English)
- Campbell, S., Mavrides, E., Prefumo, F. et al. (2001) Prenatal diagnosis of mosaic trisomy 8 in a fetus with normal nuchal translucency thickness and reversed end-diastolic ductus venosus flow. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, vol. 17, no. 4, pp. 341–343. PMID: 11339193. DOI: 10.1046/j.1469-0705.2001.00393.x (In English)
- Daughtry, B. L., Chavez, S. L. (2016) Chromosomal instability in mammalian pre-implantation embryos: Potential causes, detection methods, and clinical consequences. *Cell and Tissue Research*, vol. 363, no. 1, pp. 201–225. PMID: 26590822. DOI: 10.1007/s00441-015-2305-6 (In English)
- Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B. (1999) In vitro culture of human blastocyst. In: R. Jansen, D. Mortimer (eds.). *Towards reproductive certainty: Fertility and genetics beyond*. New York: The Parthenon Publ., pp. 377–388. (In English)
- Gardner, R. J. M., Amor, D. J. (2018) *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. 5th ed. New York: Oxford University Press, 784 p. (In English)
- Giunta, S., Funabiki, H. (2017) Integrity of the human centromere DNA repeats is protected by CENP-A, CENP-C, and CENP-T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 8, pp. 1928–1933. DOI: 10.1073/pnas.1615133114 (In English)
- Grati, F. R. (2014) Chromosomal mosaicism in human feto-placental development: Implications for prenatal diagnosis. *Journal of Clinical Medicine*, vol. 3, no. 3, pp. 809–837. PMID: 26237479. DOI: 10.3390/jcm3030809 (In English)
- Greco, E., Minasi, M. G., Fiorentino, F. (2015) Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *The New England Journal of Medicine*, vol. 373, no. 21, pp. 2089–2090. PMID: 26581010. DOI: 10.1056/NEJMc1500421 (In English)
- Griffin, D. K. (1996) The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. *International Review of Cytology*, vol. 167, pp. 263–296. PMID: 8768496. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)61349-2 (In English)
- Korsak, V. S. (ed.) (2019) *Rukovodstvo po klinicheskoy ehmbriologii [Clinical embryology guide]*. Moscow: SIMK Publ., 224 p. (In Russian)
- Kushnir, V. A., Darmon, S. K., Barad, D. H., Gleicher, N. (2018) Degree of mosaicism in trophectoderm does not predict pregnancy potential: A corrected analysis of pregnancy outcomes following transfer of mosaic embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 16, no. 1, article 6. PMID: 29373974. DOI: 10.1186/s12958-018-0322-5 (In English)
- Munné, S., Blazek, J., Large, M. et al. (2017) Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertility and Sterility*, vol. 108, no. 1, pp. 62–71. PMID: 28579407. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.002 (In English)
- PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos in preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). (2019) *PGDIS (Preimplantation Genetics Diagnosis International Society)*. [Online]. Available from: http://pgdis.org/docs/newsletter_052719.pdf (accessed 12.08.2020). (In English)
- Sachdev, N. M., Ribustello, L., Liu, E. et al. (2016) The rate of mosaic embryos from donor egg as detected by next generation sequencing (NGS) varies by IVF laboratory. *Fertility and Sterility*, vol. 106, no. 3, suppl., e156–e157. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.463 (In English)
- Taylor, T. H., Griffin, D. K., Katz, S. L. et al. (2016) Technique to “map” chromosomal mosaicism at the blastocyst stage. *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 149, no. 4, pp. 262–266. DOI: 10.1159/000449051 (In English)
- Victor, A. R., Tyndall, J. C., Brake, A. J. et al. (2019) One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: Exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertility and Sterility*, vol. 111, no. 2, pp. 280–293. PMID: 30691630. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.019 (In English)
- Weissman, A., Shoham, G., Shoham, Z. et al. (2017) Chromosomal mosaicism detected during preimplantation genetic screening: Results of a worldwide web-based survey. *Fertility and Sterility*, vol. 107, no. 5, pp. 1092–1097. PMID: 28433368. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.119 (In English)
- Wolstenholme, J., Rooney, D. E., Davison, E. V. (1994) Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: A controlled retrospective U.K. collaborative survey. *Prenatal Diagnosis*, vol. 14, no. 5, pp. 345–361. DOI: 10.1002/pd.1970140505 (In English)

Влияние изменений электромагнитных полей на пищевую и когнитивную активность медоносной пчелы

Н. Г. Лопатина¹, Т. Г. Зачепило^{✉1}, Н. А. Дюжикова¹, Н. Г. Камышев¹,
С. В. Сурма¹, И. Н. Серов², Б. Ф. Щеголев¹

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

² Фонд исследований генома человека «Айрэс», 197342, Россия, Санкт-Петербург, Выборгская наб., д. 61А

Сведения об авторах

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

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

Наталья Алековна Дюжикова, SPIN-код: 6206-3889, Scopus AuthorID: 6603486439, ORCID: 0000-0002-7550-118X, e-mail: dyuzhikova@mail.ru

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

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

Игорь Николаевич Серов, e-mail: director@aires.fund

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

Для цитирования:

Лопатина, Н. Г., Зачепило, Т. Г., Дюжикова, Н. А., Камышев, Н. Г., Сурма, С. В., Серов, И. Н., Щеголев, Б. Ф. (2020) Влияние изменений электромагнитных полей на пищевую и когнитивную активность медоносной пчелы. *Интегративная физиология*, т. 1, № 3, с. 231–241. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-231-241

Получена 22 июля 2019; прошла рецензирование 5 февраля 2020; принята 5 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. Прогресс в области информационных технологий, средств глобальной беспроводной связи приводит к изменениям в естественном электромагнитном фоне Земли и экологической безопасности живых организмов. Представляется актуальным исследовать влияние техногенных и естественных электромагнитных полей с использованием модельных биологических объектов, включая медоносную пчелу, особо чувствительную к действию электромагнитных излучений (ЭМИ) в связи с врожденной необходимостью их использования в естественной среде обитания. Разрабатываемые системы защиты от ЭМИ за счет изменения характеристик излучения могут также вызывать специфические магнитобиологические реакции живых систем. В настоящей работе на медоносной пчеле (*Apis mellifera* L.) изучено влияние на врожденные и когнитивные компоненты поведения устройств — резонаторов ЭМИ, действующих изолированно и вкупе с Wi-Fi-роутером, а также изменений (ослабления/усиления) магнитного поля в месте проведения эксперимента относительно магнитного поля Земли. Показано угнетающее действие на процессы формирования памяти всех изучаемых факторов, кроме усиленного магнитного поля (стимулирующее воздействие). При этом наиболее глубокие изменения в процессы формирования памяти вносит изменение магнитных полей. Как ослабление, так и усиление магнитного поля значительно ингибирует долговременную память. Наблюдаемые изменения в процессах формирования памяти неизбежно отразятся на летной пищедобывательной активности и в целом на продуктивности семей медоносных пчел.

Ключевые слова: медоносная пчела, электромагнитные поля, кратковременная память, долговременная память.

The impact of changes in electromagnetic fields on food and cognitive behaviour of the honeybee

N. G. Lopatina¹, T. G. Zachepilo^{✉1}, N. A. Dyuzhikova¹, N. G. Kamyshev¹, S. V. Surma¹,
I. N. Serov², B. F. Shchegolev¹

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

² Aires Human Genome Research Foundation, 61A Vyborgskaya Emb., Saint Petersburg 197342, Russia

Authors

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

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

Natalia A. Dyuzhikova, SPIN: 6206-3889, Scopus Author ID: 6603486439,
ORCID: 0000-0002-7550-118X,
e-mail: dyuzhikova@mail.ru

Nikolai G. Kamyshev, SPIN: 4461-9955, Scopus AuthorID: 6603773316,
ORCID: 0000-0002-3611-7417,
e-mail: kamyshevng@infran.ru

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

Igor N. Serov,
e-mail: director@aires.fund

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

For citation: Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Dyuzhikova, N. A., Kamyshev, N. G., Surma, S. V., Serov, I. N., Shchegolev, B. F. (2020) The impact of changes in electromagnetic fields on food and cognitive behaviour of the honeybee. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 231–241. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-231-241

Received 22 July 2019; reviewed 5 February 2020; accepted 5 February 2020.

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

Abstract. Progress in the field of information technology and global wireless communications leads to changes in the natural electromagnetic background of the Earth and affects living organisms. Therefore, it is relevant to investigate the influence of technogenic and natural electromagnetic fields using model biological objects, including a honeybee, which is particularly sensitive to electromagnetic radiation (EMR). Current EMR protection systems that change the characteristics of electromagnetic radiation can also cause specific magneto-biological reactions in living systems. In this study we used the honeybee (*Apis mellifera* L.) to assess the effect of devices on the innate and cognitive components of the honeybee behavior. The devices included EMR resonators working in isolation and together with a WiFi router. We also changed (weakened/enhanced) the magnetic field relative to the Earth's magnetic field at the experiment location. The experiments found that all the factors under study, except for the enhanced magnetic field that produced a stimulating effect, have an inhibitory effect on the memory formation. Besides, both weakening and enhancement of the magnetic field significantly inhibits long-term memory. The observed changes in memory formation will inevitably affect the flight patterns and food-finding mechanisms in bees and, in general, the productivity of honeybee colonies.

Keywords: honeybee, electromagnetic fields, short-term memory, long-term memory.

Введение

Параллельно прогрессу в области информационных технологий, широкому распространению в связи с этим средств глобальной беспроводной связи, нарастает угроза равновесию биосферы Земли, экологической безопасности живых организмов. О стрессорном отрицатель-

ном воздействии нарушений электромагнитного фона окружающей среды на различные системы организма человека, животных и растений свидетельствуют многочисленные исследования последних 10–20 лет (van Rongen et al. 2009; Saliev et al. 2018). Многолетние исследования, проведенные зарубежными учеными (см. обзор Cucurachi et al. 2013) и нами (Лопатина и др.

2019), подтверждают негативный стрессорный характер влияния электромагнитных излучений (ЭМИ) на поведение и жизнедеятельность насекомых, включая медоносную пчелу. При этом выявлена связь между размерами тела насекомого, диэлектрическими свойствами объекта и величиной абсорбции ЭМИ: максимум абсорбции наблюдали при длине волны, сравнимой с размерами тела насекомого (Thielens et al. 2018). Под воздействием ЭМИ у насекомых изменяется нейрональная активность в центральных и периферических отделах нервной системы (Wyszkowska et al. 2016), а также транскрипционная активность генома (Manta et al. 2017), что приводит, в частности, к повышению продукции стресс-белка HSP70 (Wyszkowska et al. 2016). Полученные данные (Cammaerts et al. 2012; Лопатина и др. 2019; Shepherd et al. 2018; 2019; Zhang et al. 2016; El Halabi et al. 2013 и др.) свидетельствовали о редукции у насекомых, включая пчел, когнитивной, локомоторной и репродуктивной активности. Из обзоров (Лопатина и др. 2018; Cucurachi et al. 2013) можно почерпнуть сведения об ущербе, наносимом электромагнитными загрязнениями среды сельскому хозяйству. Механизмы влияния ЭМИ на поведение и другие формы жизнедеятельности живых организмов интенсивно изучаются, однако биологическая основа рецепции ЭМИ достоверно не выяснена.

Разрабатываемые системы защиты от ЭМИ за счет снижения мощности, изменения пространственных характеристик, отражения ЭМИ (Jasaitis et al. 2018) в совокупности с другими источниками излучения могут также вызывать специфические магнитобиологические реакции живых систем. Представляется актуальным исследовать их влияние с использованием модельных биологических объектов, включая насекомых (медоносная пчела).

Значимым экологическим фактором является магнитное поле Земли. Его изменения приводят к сбою в работе эндогенных механизмов, лежащих в основе деятельности ЦНС (Холодов, Лебедева 1992; Леднев и др. 2008; Cook et al. 2006) и, таким образом, всех систем организма. Ослабление магнитного поля в месте проведения эксперимента является для животного стрессорным фактором (Никитина и др. 2013).

Механизмы восприятия и воздействия магнитных полей активно обсуждаются в литературе. Наиболее обоснованной и значимой в объяснении биологических и медицинских эффектов ЭМИ и магнитных полей многими авторами (см. обзор: Бучаченко 2014) представляется молекулярная концепция, главным структурным элементом которой является ион-

радикальная пара — приемник магнитных полей и источник магнитных эффектов. Следует особо подчеркнуть, что существование таких пар обнаружено в двух главных жизнеобеспечивающих биохимических процессах — в ферментативном синтезе АТФ и ДНК (Бучаченко 2014).

Магниторецепторами у пчелы служат кристаллы Fe_3O_4 , расположенные в клетках жирового тела в брюшке, а хитиновый покров пчелы обладает полупроводниковыми свойствами (Kumar et al. 2011; Wyszkowska et al. 2016). В процессе полета и при передвижении по сотам в улье пчелы генерируют постоянные и модулируемые электрические поля, сенсорами которых служит Джонстонов орган и другие механорецепторы, расположенные на антеннах и теле особи (Еськов 2018; Greggers et al. 2013). Обсуждается роль в рецепции пчелы электромагнитных полей светочувствительного пигмента криптохрома (Sheppard et al. 2017). Пчела, ориентируясь в пространстве в условиях полета к отдаленным источникам корма, использует изменения локального геомагнитного поля Земли (Válková, Vácha 2012).

Влияние изменения магнитного поля на когнитивную способность пчелы ранее не изучалось.

Таким образом, в задачи настоящей работы входило изучение влияний на пищевое поведение медоносной пчелы (обонятельной, пищевой возбудимости, условно-рефлекторной деятельности): 1) резонаторов «Aires Defender Pro» (далее — резонаторы), разработанных Фондом исследований генома человека «Айрэс» (патенты № 2231137 и 2230580 от 20.06.2004), действующие изолированно и в купе с Wi-Fi-роутером; 2) изменений — ослабления/усиления внешнего магнитного поля в месте проведения эксперимента за счет применения экранирующей камеры и кольцевых магнитов.

Материал и методы

Исследования проводили на рабочих особях медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в возрасте 7–30 дней в летний период 2018 года (июнь–август) (Колтуши, Всеволожский р-н, Ленинградская область, Россия). Пчел содержали в небольших ульях в комнатном помещении, в сетчатой камере при t 20–25 °С. Пчелы были обеспечены белковым, углеводным кормом, водой. Очистительные облеты пчелы могли совершать ежедневно.

1. Для оценки влияния резонаторов «Aires Defender Pro» использовали 6 пластин, которые размещали в центре каждой грани клетки

Фарадея, отсекающей внешние электрические поля (рис. 1). Используемая пластина за счет поляризационных свойств и поверхностной структуры ведет себя как многочастотный резонатор, способствующий преобразованию возбуждающего излучения в набор собственных гармоник резонатора (Копыльцов и др. 2007; Серов и др. 2006).

В работе использовали стандартный Wi-Fi роутер (беспроводной маршрутизатор LinkSys E1200-EE/RU) со следующими техническими характеристиками: частота беспроводной связи — 2,4 ГГц, количество и тип антенн — 2 внутренние антенны, коэффициент усиления штатной антенны (антенн) — 4 дБи. Роутер располагали в клетке Фарадея (стальная сетка, размер ячеек — 1 мм) на съемной полке под крышкой строго по центру камеры.

Протокол опыта. Пчел изолировали от семьи и помещали в количестве 20 особей в сетчатую пробирку (объем 120 см³) с кормом. Пробирку выкладывали на дно клетки Фарадея в центр на 24 часа. В опытном варианте в клетке Фарадея находился тот или иной изучаемый источник воздействия. Контролем служили пчелы, помещенные на 24 часа в сетчатую пробирку с кормом, выложенную на дно в центр клетки Фарадея, лишенную резонаторов, а также интактные пчелы в сетчатых пробирках такого же размера с кормом, расположенные вне клетки

в том же помещении с температурой 23 °С. За 3 часа до процедуры обучения корм из пробирки удаляли. Процедуры обучения и тестирования осуществляли вне клетки Фарадея. Каждый опыт повторяли трижды.

2. Для создания условий ослабления внешнего магнитного поля (МП) использовали экранирующую камеру из немагнитного материала, на которую было намотано покрытие, выполненное из аморфного магнитомягкого материала АМАГ-172, что обеспечило уменьшение величины индукции магнитного поля Земли внутри камеры с 45 мкТл в месте проведения экспериментов до 0,1 мкТл внутри камеры. Для контроля использовали имитирующую камеру, которая была изготовлена из того же немагнитного материала, но в качестве покрытия использован черный полиэтилен. Обе камеры были выполнены в виде цилиндров диаметром 10 см и высотой 25 см, закрытые с одного торца и открытые с другого, так чтобы в глубину камеры на середину ее оси легко помещалась сетчатая пробирка с 7 пчелами (размер пробирки: длина — 6 см, диаметр — 2,5 см).

Для создания условий усиления внешнего магнитного поля использовали 2 кольцевых магнита, расположенных по одной оси друг напротив друга, так что в месте помещения пробирки с 7 пчелами индукция суммарного МП составляла 200 мкТл.

«Клетка Фарадея» для исследований

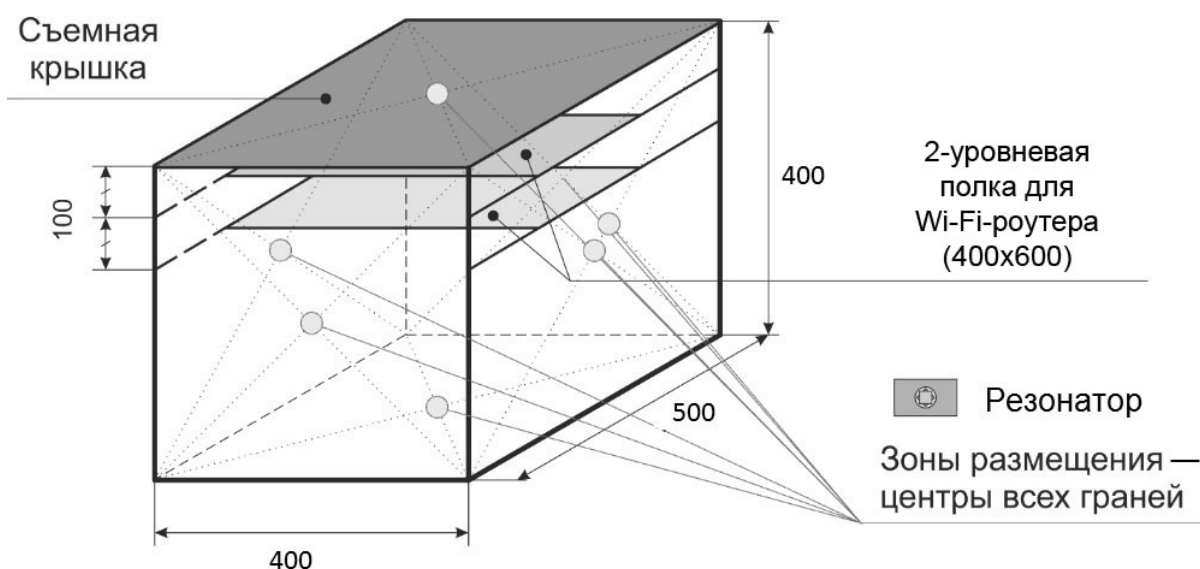


Рис. 1. Схема камеры («клетки Фарадея»), используемой для исследования, с изображением зоны размещения резонаторов

Fig. 1. The layout of the chamber ("the Faraday cage") and the location of resonators used in the study

Величину индукции магнитного поля измеряли трехкомпонентным магнитометром НВ0302.1А (ООО «Магнитные приборы», Россия) с диапазоном измерений 0,1–100 мкТл и трехкомпонентным магнитометром НВ0305.2А на основе датчиков Холла (ООО «Магнитные приборы», Россия) с диапазонами измерений 10 мТл и 100 мТл.

В этих экспериментах участвовали 4 группы пчел: 2 опытные и 2 контрольные. Первая опытная группа находилась в экранирующей камере, ослабляющей внешнее магнитное поле (ОМП). Вторая опытная группа — в условиях усиления магнитного поля (УМП). Третья группа — контроль 1, в камере, имитирующей экранирующий цилиндр. Четвертая группа — контроль 2, интактные пчелы (без воздействия).

Протокол опыта заключался в следующем. Накануне испытаний пчел изолировали из улья, размещали по 4 сетчатым пробиркам с кормом, по 7 особей в каждой, которых далее подвергали описанным выше воздействиям в течение 12 часов (20:00–8:00). Период воздействия совпадал с темновой фазой циркадного ритма. По окончании воздействия у пчел изымали корм и помещали на 1 час в условия с нормальным уровнем магнитного поля и температурой 25 °С. Интактные пчелы находились 13 (12+1) часов вне улья в пробирке такого же размера, но не подвергались воздействиям. Затем приступали к процедуре обучения. Каждую серию опытов повторяли по 6–7 раз.

Использовали **метод условного рефлекса** — вырабатывали условный пищевой рефлекс вытягивания хоботка (*Proboscis Extension Reflex*, PER) на обонятельный раздражитель (Bitterman et al. 1983), однократно сочетая запах гвоздики с пищевым подкреплением (50 % раствор сахара) и проверяли его сохранение в кратковременной (через 1 мин после процедуры обучения) и долговременной (через 180 мин после процедуры обучения) памяти путем дистантного предъявления условного раздражителя — запаха гвоздики. Деление памяти пчелы на фазы приведено согласно работе (Menzel 1999). Для выработки условного рефлекса пчел, обездвиженных с помощью холодового наркоза, иммобилизовали за крылья специальными зажимами и помещали в установку, позволяющую одновременно тестировать 18 особей. Установка представляет собой горизонтальный металлический стержень с отверстиями для фиксаторов пчел, разнесенных друг от друга на 20 см. Обучение начинали через 30 минут после наркоза. Процедура обучения заключалась в следующем. К антеннам пчел (без соприкос-

новения с ними) подносили на стеклянной лопаточке каплю ароматизированного гвоздичной сахарного раствора. На протяжении 5 сек регистрировали число пчел, отвечающих спонтанной реакцией вытягивания хоботка на запах (обонятельная возбудимость). Затем каплю ароматизированного раствора приводили в соприкосновение с антеннами, где у пчел расположены обонятельные и вкусовые рецепторы, регистрируя при этом наличие (отсутствие) безусловного врожденного пищевого рефлекса — вытягивания хоботка (пищевая возбудимость). Далее — пчела, высунувшая хоботок, могла в течение 2 секунд насасывать сахарный раствор (пищевое подкрепление условного сигнала — запаха гвоздики). Пчелы, демонстрирующие спонтанную реакцию и, напротив, не ответившие безусловно-рефлекторной пищевой реакцией, в дальнейших экспериментах не участвовали. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием непараметрических критериев Манна — Уитни и χ^2 .

Результаты и обсуждение

1. Результаты изучения влияния резонаторов на пищевую возбудимость и кратковременную память приведены на рис. 2. Как можно видеть на рисунке, резонаторы изолированно и вкупе с роутером снижали как число пчел, отвечающих безусловно-рефлекторной пищевой реакцией (рис. 2а), так и число пчел, отвечающих условно-рефлекторной реакцией (рис. 2б) через 1 минуту после окончания процедуры обучения. Последнее оказалось сопоставимо с действием роутера (Лопатина и др. 2017).

На долговременную память резонаторы влияния не оказали. В то же время, действуя вкупе с роутером, резонаторы нивелировали его стимулирующий долговременную память эффект (Лопатина и др. 2017). В среднем 88 % пчел ответили условной реакцией через 180 минут по окончании процедуры обучения, как в контрольной группе, так и в двух опытных (воздействие резонатора — изолированно и вкупе с роутером)

Следует отметить, что в опытах на млекопитающих (крысах) резонаторы также купировали вызванные роутером нарушения долговременной памяти (Дюжикова и др. 2018). Различия в действии резонаторов на краткосрочные и долговременно текущие процессы, возможно, связаны с различиями механизмов формирования памяти. Как известно, в основе формирования кратковременной памяти лежит реверберация электрических импульсов в замкнутом

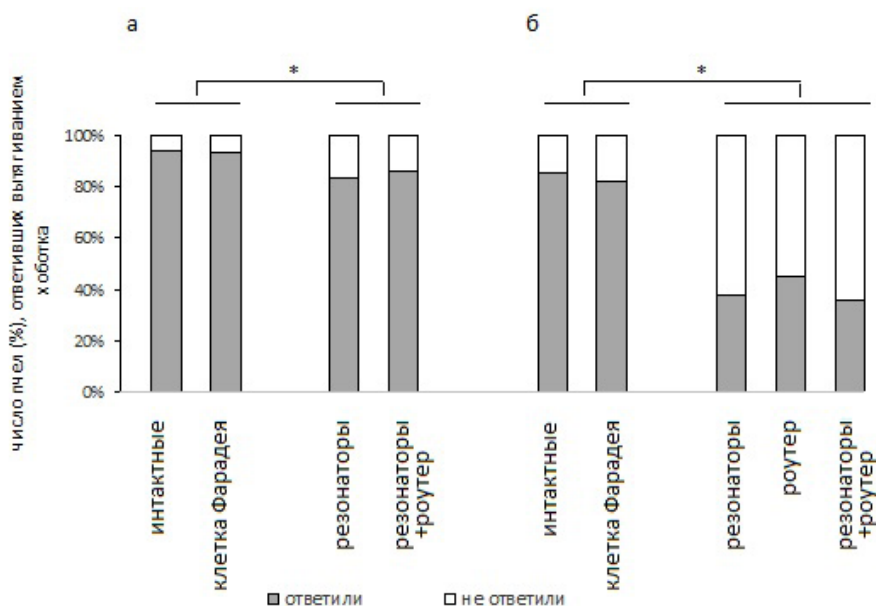


Рис. 2. Влияние резонаторов, действующих изолированно и вкупе с роутером, на пищевую возбудимость (а) и кратковременную память (б) пчелы

Fig. 2. The effect of resonators working in isolation and together with the router on the honeybee feeding excitability (a) and short-term memory (b)

контуре в течение нескольких минут после обучения, тогда как долговременная память требует работы генома, синтеза новых белков и перестройки синаптического аппарата нейронов (Lisman 2017).

На обонятельную возбудимость изучаемые факторы воздействия не оказали. Число пчел, ответивших спонтанной реакцией вытягивания хоботка на запах, составляло в среднем 2,8 % как в контроле, так и в опыте.

Подытоживая эту часть исследований, следует сделать заключение о необходимости тестирования на живых объектах устройств, разрабатываемых с целью устранения негативных последствий влияния ЭМИ.

2. Результаты изучения влияний ОМП

и УМП показали, что ни одно из используемых воздействий не оказало влияния ни на сенсорную, ни на пищевую возбудимость. Спонтанные реакции у пчел в этих испытаниях отсутствовали. Число пчел, ответивших врожденной пищевой реакцией, составило в среднем 56,9 % как в контрольных, так и опытных группах. Результаты исследований кратковременной и долговременной памяти медоносной пчелы представлены на рисунке 3.

Как можно видеть на рисунке 3, двенадцатичасовое пребывание в условиях ОМП резко снизило способность пчел удерживать в кратковременной памяти выработанный условный

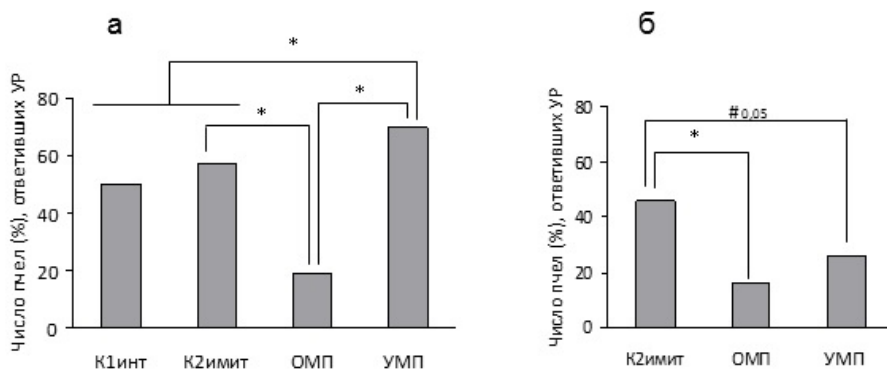


Рис. 3. Влияние ослабленного (ОМП) и усиленного (УМП) магнитного поля на кратковременную (а) и долговременную (б) память пчелы

* — различия достоверны, $p \leq 0,01$. # — различия достоверны, $p \leq 0,05$

Fig. 3. The effect of weakened (WMF) and enhanced (EMF) magnetic field on short-term (a) and long-term (b) honeybee memory

* — difference is significant, $p \leq 0.01$. # — difference is significant, $p \leq 0.05$

пищевой рефлекс на обонятельный раздражитель. Противоположное стимулирующее влияние было выявлено у пчел в группе УМП. Между контрольными пчелами различий не наблюдалось (рис. 3а).

Способность пчел сохранять в долговременной памяти выработанные условные рефлексы оказалась сниженной в обеих группах — ОМП и УМП — по сравнению с контрольной (рис. 3б).

Тормозящее условно-рефлекторную деятельность влияние ОМП было ранее выявлено на другом виде насекомых — дрозофиле (Никитина и др. 2017). На дрозофиле линии дикого типа CS изучали действие ОМП на способность насекомого вырабатывать и сохранять в течение 3 часов в памяти иной вид условного рефлекса — условно-рефлекторное подавление ухаживания, используя идентичную экранирующую камеру. Протокол опыта был также идентичен. Экранирование проводили в течение 12 часов. Нахождение в экранирующей камере совпадало по времени с темновой фазой циркадного ритма (20:00–8:00). После воздействия мух оставляли в течение 1 ч при температуре 25 °C и нормального уровня МП Земли (48 мкТл), а затем использовали в эксперименте. Во всех вариантах опыта применяли интактный контроль (без воздействия). ОМП не повлияло на способность к обучению дрозофилы — непосредственно сразу после тренировки у мух наблюдался высокий индекс обучения (ИО), но через 3 часа ИО достоверно снижался, что свидетельствовало о нарушениях в процессе формирования памяти. Параллельное изучение транскрипционной активности у мух, а также участие в этих экспериментах мутантов дрозофилы *agn^{ts3}* (измененная структура гена *limk1*) позволило авторам работы высказать некоторые соображения по поводу механизмов воздействия ОМП. Изменение в транскрипционной активности у насекомых под влиянием ОМП позволило предположить нарушение в работе различных клеточных сигнальных каскадов, регулирующих процессы, связанные с приобретением индивидуального опыта и его сохранением в памяти.

Парадоксальная реакция на ОМП мутантов *agn^{ts3}* — полное восстановление подавленной действием мутации способности к обучению и сохранению в памяти условной реакции — позволило авторам цитируемой работы говорить об участии в этих процессах гена *limk1*, возможное изменение активности которого под влиянием ОМП ведет к изменению функции фермента LIMK1 — ключевого в ремоделировании актина, многофункциональная роль которого в работе генетического аппарата и синтеза хорошо известна (Bernard 2007).

Таким образом, двенадцатичасовое ослабление магнитного поля оказало влияние на когнитивную деятельность насекомых — пчелы и дрозофилы, — ингибируя процессы, участвующие в формировании как кратковременной (пчела), так и долговременной (пчела и дрозофила) памяти. Действие усиленного магнитного поля на пчелу оказалось разнонаправленным: стимулирующим кратковременную и ингибирующим долговременную память. Полученные данные подтверждают тезис о высокой чувствительности пчел к изменениям магнитного поля. При этом наиболее глубокие изменения в функционировании высших отделов головного мозга пчелы оказывает ОМП.

Нарушение процессов формирования памяти у медоносной пчелы, влияя на процессы мобилизации пчел на посещение источника пищи, снижая способность к пространственной ориентации как при полетах за взятком, так и при возвращении в улей, естественно может пагубно сказываться на пищедобывательной, а следовательно, и опылительной, и в целом продуктивной активности семьи медоносной пчелы (Лопатина и др. 2017).

Влияние изменений МП на когнитивную (условно-рефлекторную) деятельность насекомых показано впервые. Существующая общность механизмов формирования памяти у беспозвоночных и позвоночных животных на молекулярном уровне позволяет использовать насекомых (медоносную пчелу и дрозофилу) в качестве модельных объектов для изучения физиологических и медицинских аспектов действия электромагнитных полей.

Список литературы

- Бучаченко, А. А. (2014) Магнитно-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине. *Успехи химии*, т. 83, № 1, с. 1–12.
- Дюжикова, Н. А., Копыльцов, А. В., Коршунов, К. А. и др. (2018) Действие электромагнитного излучения высокой частоты и влияние резонаторов-преобразователей на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов крыс линии Вистар. *Электромагнитные волны и электронные системы*, т. 23, № 1, с. 12–18.

- Еськов, Е. К. (2018) Статическое электричество в пространственной ориентации и сигнализации медоносной пчелы. *Биофизика*, т. 63, вып. 3, с. 561–566.
- Копыльцов, А. В., Серов, И. Н., Лукьянов, Г. Н. (2007) Математическое моделирование взаимодействия электромагнитного излучения с кремниевой самоаффинной поверхностью. *Вестник ИНЖЭКОНа. Серия: Технические науки*, т. 19, № 6, с. 199–205.
- Леднев, В. В., Белова, Н. А., Ермаков, А. М. и др. (2008) Регуляция вариабельности сердечного ритма человека с помощью крайне слабых переменных магнитных полей. *Биофизика*, т. 53, вып. 6, с. 1129–1137.
- Лопатина, Н. Г., Зачепило, Т. Г., Дюжикова, Н. А., Серов, И. Н. (2017) Влияние электромагнитного излучения на ассоциативное обучение медоносной пчелы *Apis mellifera* L. В кн.: А. В. Баркалов (ред.). *Материалы XV Съезда Русского энтомологического общества*. Новосибирск: Гарамонд, с. 297–298.
- Лопатина, Н. Г., Зачепило, Т. Г., Камышев, Н. Г. (2018) Опасны ли электромагнитные излучения для пчел? *Пчеловодство*, № 8, с. 12–15.
- Лопатина, Н. Г., Зачепило, Т. Г., Камышев, Н. Г. и др. (2019) Влияние неионизирующего электромагнитного излучения на поведение медоносной пчелы *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Энтомологическое обозрение*, т. 98, № 1, с. 35–43. DOI: 10.1134/S0367144519010039
- 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
- Никитина, Е. А., Медведева, А., Долгая, Ю. Ф. и др. (2013) Особенности пространственной организации хроматина у полиморфных вариантов локуса *agnostic* дрозофилы — модели геномных заболеваний человека. В кн.: *Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. Т. 8. Труды VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 21–23 ноября 2013 г. Ч. 2*. СПб.: б. и., с. 977–982.
- Серов, И. Н., Копыльцов, А. В., Лукьянов, Г. Н. (2006) Взаимодействие полупроводниковой пластины с самоаффинным рельефом поверхности с электромагнитным излучением. *Нанотехника*, № 4 (8), с. 44–49.
- Холодов, Ю. А., Лебедева, Н. Н. (1992) *Реакции нервной системы человека на электромагнитные поля*. М.: Наука, 135 с.
- Bernard, O. (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no. 6, pp. 1071–1076. PMID: 17188549. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.11.011
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, vol. 97, no. 2, pp. 107–119. PMID: 6872507.
- Cammaerts, M.-C., De Doncker, P., Patris, X. et al. (2012) GSM 900 MHz radiation inhibits ants' association between food sites and encountered cues. *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 31, no. 2, pp. 151–165. PMID: 22268919. DOI: 10.3109/15368378.2011.624661
- Cook, C. M., Saucier, D. M., Thomas, A., Prato, F. (2006) Exposure to ELF magnetic and ELF-modulated radiofrequency fields: The time course of physiological and cognitive effects observed in recent studies (2001–2005). *Bioelectromagnetics*, vol. 27, no. 8, pp. 613–627. PMID: 16724317. DOI: 10.1002/bem.20247
- Cucurachi, S., Tamis, W. L., Vijver, M. G. et al. (2013) A review of the ecological effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). *Environment International*, vol. 51, pp. 116–140. PMID: 23261519. DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.009
- Greggers, U., Koch, G., Schmidt, V. et al. (2013) Reception and learning of electric fields in bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 280, no. 1759, article 20130528. PMID: 23536603. DOI: 10.1098/rspb.2013.0528
- El Halabi, N., Achkar, R., Haidar, G. A. (2013) The effect of cell phone radiations on the life cycle of honeybees. In: *Eurocon 2013*. S. l.: IEEE, pp. 529–536. DOI: 10.1109/EUROCON.2013.6625032
- Jasaitis, D., Vasiliauskienė, V., Miškinis, P. et al. (2018) Investigation of the circle fractal structure interaction with gigahertz frequency electromagnetic waves. In: L. T. Kóczy, D. Žostautienė, O. Strikuliene, E. Zacharovienė (eds.). *Proceedings of the 12th International Scientific Conference Intelligent Technologies in Logistics and Mechatronics Systems (ITELMS'2018). April 26–27, 2018. Panevėžys, Lithuania*. Bologna: Editografica, pp. 81–87.
- Kumar, N. R., Sangwan, S., Badotra, P. (2011) Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicology International*, vol. 18, no. 1, pp. 70–72. PMID: 21430927. DOI: 10.4103/0971-6580.75869
- Lisman, J. (2017) Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: Long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 372, no. 1715, article 20160260. PMID: 28093558. DOI: 10.1098/rstb.2016.0260
- Manta, A. K., Papadopoulou, D., Polyzos, A. P. et al. (2017) Mobile-phone radiation-induced perturbation of gene-expression profiling, redox equilibrium and sporadic-apoptosis control in the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Fly*, vol. 11, no. 2, pp. 75–95. DOI: 10.1080/19336934.2016.1270487

- Menzel, R. (1999) Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, vol. 185, no. 4, pp. 323–340. DOI: 10.1007/s003590050392
- Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A.-R., Matkarimov, B. (2018) Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 141, pp. 25–36. PMID: 30030071. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009
- Sheppard, D. M. W., Li, J., Henbest, K. B. et al. (2017) Millitesla magnetic field effects on the photocycle of an animal cryptochrome. *Scientific Reports*, vol. 7, article 42228. PMID: 28176875. DOI: 10.1038/srep42228
- Shepherd, S., Lima, M. A. P., Oliveira, E. E. et al. (2018) Extremely low frequency electromagnetic fields impair the cognitive and motor abilities of honey bees. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 7932. PMID: 29785039. DOI: 10.1038/s41598-018-26185-y
- Shepherd, S., Hollands, G., Godley, V. C. et al. (2019) Increased aggression and reduced aversive learning in honey bees exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *PLoS One*, vol. 14, no. 10, article e0223614. DOI: 10.1371/journal.pone.0223614
- Thielens, A., Bell, D., Mortimore, D. B. et al. (2018) Exposure of insects to radio-frequency electromagnetic fields from 2 to 120 GHz. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 3924. PMID: 29500425. DOI: 10.1038/s41598-018-22271-3
- Válková, T., Vácha, M. (2012) How do honeybees use their magnetic compass? Can they see the North? *Bulletin of Entomological Research*, vol. 102, no. 4, pp. 461–467. PMID: 22313997. DOI: 10.1017/S0007485311000824
- van Rongen, E., Croft, R., Juutilainen, J. et al. (2009) Effects of radiofrequency electromagnetic fields on the human nervous system. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 12, no. 8, pp. 572–597. PMID: 20183535. DOI: 10.1080/10937400903458940
- Wyszkowska, J., Shepherd, S., Sharkh, S. et al. (2016) Exposure to extremely low frequency electromagnetic fields alters the behaviour, physiology and stress protein levels of desert locusts. *Scientific Reports*, vol. 6, article 36413. PMID: 27808167. DOI: 10.1038/srep42228
- Zhang, Z.-Y., Zhang, J., Yang, C.-J. et al. (2016) Coupling mechanism of electromagnetic field and thermal stress on *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, vol. 11, no. 9, article e0162675. PMID: 27611438. DOI: 10.1371/journal.pone.0162675

References

- Bernard, O. (2007) Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, no. 6, pp. 1071–1076. PMID: 17188549. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.11.011 (In English)
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., Schäfer, S. (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, vol. 97, no. 2, pp. 107–119. PMID: 6872507. (In English)
- Buchachenko, A. L. (2014) Magnito-zavisimye molekulyarnye i khimicheskie protsessy v biokhimii, genetike i meditsine [Magnetic field-dependent molecular and chemical processes in biochemistry, genetics and medicine]. *Uspekhi khimii*, vol. 83, no. 1, pp. 1–12. (In Russian)
- Cammaerts, M.-C., De Doncker, P., Patris, X. et al. (2012) GSM 900 MHz radiation inhibits ants' association between food sites and encountered cues. *Electromagnetic Biology and Medicine*, vol. 31, no. 2, pp. 151–165. PMID: 22268919. DOI: 10.3109/15368378.2011.624661 (In English)
- Cook, C. M., Saucier, D. M., Thomas, A., Prato, F. (2006) Exposure to ELF magnetic and ELF-modulated radiofrequency fields: The time course of physiological and cognitive effects observed in recent studies (2001–2005). *Bioelectromagnetics*, vol. 27, no. 8, pp. 613–627. PMID: 16724317. DOI: 10.1002/bem.20247 (In English)
- Cucurachi, S., Tamis, W. L., Vijver, M. G. et al. (2013) A review of the ecological effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). *Environment International*, vol. 51, pp. 116–140. PMID: 23261519. DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.009 (In English)
- Dyuzhikova, N. A., Kopyltsov, A. V., Korshunov, K. A. et al. (2018) Dejstvie elektromagnitnogo izlucheniya vysokoj chastoty i vliyanie rezonatorov-preobrazovatelej na chastotu khromosomnykh aberratsij v kletkakh kostnogo mozga samtsov krysa linii Wistar [The effect of high-frequency electromagnetic radiation and the effect of resonator-convertors on the frequency of chromosomal aberrations in the 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)
- El Halabi, N., Achkar, R., Haidar, G. A. (2013) The effect of cell phone radiations on the life cycle of honeybees. In: *Eurocon 2013*. S. l.: IEEE, pp. 529–536. DOI: 10.1109/EUROCON.2013.6625032 (In English)
- Eskov, E. K. (2018) Statcheskoe elektrichestvo v prostranstvennoj orientatsii i signalizatsii medonosnoj pchely [Static electricity in the spatial orientation and signaling of honey bees]. *Biofizika — Biophysics*, vol. 63, no. 3, pp. 561–566. (In Russian)
- Greggers, U., Koch, G., Schmidt, V. et al. (2013) Reception and learning of electric fields in bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 280, no. 1759, article 20130528. PMID: 23536603. DOI: 10.1098/rspb.2013.0528 (In English)

- Jasaitis, D., Vasiliauskienė, V., Miškinis, P. et al. (2018) Investigation of the circle fractal structure interaction with gigahertz frequency electromagnetic waves. In: L. T. Kóczy, D. Žostautienė, O. Strikuliene, E. Zacharovienė (eds.). *Proceedings of the 12th International Scientific Conference Intelligent Technologies in Logistics and Mechatronics Systems (ITELMS'2018)*. April 26–27, 2018. Panevėžys, Lithuania. Bologna: Editografica, pp. 81–87. (In English)
- Kholodov, Yu. A., Lebedeva, N. N. (1992) *Reaktsii nervnoj sistemy cheloveka na elektromagnitnye polya [Reactions of the human nervous system to electromagnetic fields]*. Moscow: Nauka Publ., 135 p. (In Russian)
- Kopyl'tsov, A. V., Serov, I. N., Luk'yanov, G. N. (2007) Matematicheskoe modelirovanie vzaimodejstviya elektromagnitnogo izlucheniya s kremnievoj samoaffinnoj poverkhnost'yu [Mathematical modeling of the interaction of a ring structured surface with high-frequency electromagnetic radiation]. *Vestnik INZhEKONa. Seriya: Tekhnicheskie nauki*, vol. 19, no. 6, pp. 199–205. (In Russian)
- Kumar, N. R., Sangwan, S., Badotra, P. (2011) Exposure to cell phone radiations produces biochemical changes in worker honey bees. *Toxicology International*, vol. 18, no. 1, pp. 70–72. PMID: 21430927. DOI: 10.4103/0971-6580.75869 (In English)
- Lednev, V. V., Belova, N. A., Ermakov, A. M. et al. (2008) Reguljatsiya variabel'nosti serdechnogo ritma cheloveka s pomoshchyu krajne slabых peremennykh magnitnykh poлей [Modulation of cardiac rhythm in the humans exposed to extremely weak alternating magnetic fields]. *Biofizika — Biophysics*, vol. 53, no. 6, pp. 1129–1137. (In Russian)
- Lisman, J. (2017) Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: Long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 372, no. 1715, article 20160260. PMID: 28093558. DOI: 10.1098/rstb.2016.0260 (In English)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Dyuzhikova, N. A., Serov, I. N. (2017) Vliyanie elektromagnitnogo izlucheniya na assotsiativnoe obuchenie medonosnoj pchely *Apis mellifera* L. [Influence of electromagnetic radiation on associative learning honey bee *Apis mellifera* L.]. In: A. V. Barkalov (ed.). *Materialy XV Sezda Russkogo entomologicheskogo obshchestva [Proceedings of XV Congress of the Russian Entomological Society]*. Novosibirsk: Garamond Publ., pp. 297–298. (In Russian)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Kamyshchev, N. G. (2018) Opasny li elektromagnitnye izlucheniya dlya pchel? [Is electromagnetic radiation dangerous to honeybees?]. *Pchelovodstvo*, vol. 8, pp. 12–15. (In Russian)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Kamyshchev, N. G. et al. (2019) Vliyanie neioniziruyushchego elektromagnitnogo izlucheniya na povedeniye medonosnoj pchely *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) [Influence of non-ionizing electromagnetic radiation on the behavior of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)]. *Entomologicheskoye obosrenie*, vol. 98, no. 1, pp. 35–43. DOI: 10.1134/S0367144519010039 (In Russian)
- Manta, A. K., Papadopoulou, D., Polyzos, A. P. et al. (2017) Mobile-phone radiation-induced perturbation of gene-expression profiling, redox equilibrium and sporadic-apoptosis control in the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Fly*, vol. 11, no. 2, pp. 75–95. DOI: 10.1080/19336934.2016.1270487 (In English)
- Menzel, R. (1999) Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, vol. 185, no. 4, pp. 323–340. DOI: 10.1007/s003590050392 (In English)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V., Gerasimenko, M. S. et al. (2017) Oslablennoe magnitnoe pole Zemli: vliyanie na transkripsionnyy aktivnost' genoma, obuchenie i pamyat' u *Dr. melanogaster* [Weakened geomagnetic field: Impact on transcriptional activity of the genome, learning and memory formation in *Dr. melanogaster*]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova — I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*, vol. 67, no. 2, pp. 246–256. DOI: 10.7868/S0044467717020101 (In Russian)
- Nikitina, E. A., Medvedeva, A., Dolgaya, Yu. F. et al. (2013) Osobennosti prostranstvennoj organizatsii khromatina u polimorfnykh variantov lokusa *agnostic* drozofily — modeli genomnykh zabolevaniy cheloveka [Chromatin organization of drosophila *agnostic* locus polymorphic variants — the models of human genomic diseases]. In: *Zdorov'e — osnova chelovecheskogo potentsiala: problemy i puti ikh resheniya. T. 8. Trudy VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. 21–23 noyabrya 2013 g. [Health — the base of human potential: Problems and ways to solve them. Vol. 8. Proceedings of the 8th All-Russian research and practical conference with international participation. 21–23 November]*. Pt 2. Saint Petersburg: s. n., pp. 977–982. (In Russian)
- Saliev, T., Begimbetova, D., Masoud, A.-R., Matkarimov, B. (2018) Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 141, pp. 25–36. PMID: 30030071. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009 (In English)
- Serov, I. N., Kopyl'tsov, A. V., Luk'yanov, G. N. (2006) Vzaimodejstvie poluprovodnikovoy plastiny s samoaffinnyy rel'efom poverkhnosti s elektromagnitnym izlucheniem [Interaction of a semiconductor plate with a self-affine surface topography with electromagnetic radiation]. *Nanotekhnika — Nanotechnics*, no. 4 (8), pp. 44–49. (In Russian)
- Shepherd, S., Hollands, G., Godley, V. C. et al. (2019) Increased aggression and reduced aversive learning in honey bees exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *PLoS One*, vol. 14, no. 10, article e0223614. DOI: 10.1371/journal.pone.0223614 (In English)

- Shepherd, S., Lima, M. A. P., Oliveira, E. E. et al. (2018) Extremely low frequency electromagnetic fields impair the cognitive and motor abilities of honey bees. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 7932. PMID: 29785039. DOI: 10.1038/s41598-018-26185-y (In English)
- Sheppard, D. M. W., Li, J., Henbest, K. B. et al. (2017) Millitesla magnetic field effects on the photocycle of an animal cryptochrome. *Scientific Reports*, vol. 7, article 42228. PMID: 28176875. DOI: 10.1038/srep42228 (In English)
- Thielens, A., Bell, D., Mortimore, D. B. et al. (2018) Exposure of insects to radio-frequency electromagnetic fields from 2 to 120 GHz. *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, article 3924. PMID: 29500425. DOI: 10.1038/s41598-018-22271-3 (In English)
- Válková, T., Vácha, M. (2012) How do honeybees use their magnetic compass? Can they see the North? *Bulletin of Entomological Research*, vol. 102, no. 4, pp. 461–467. PMID: 22313997. DOI: 10.1017/S0007485311000824 (In English)
- van Rongen, E., Croft, R., Juutilainen, J. et al. (2009) Effects of radiofrequency electromagnetic fields on the human nervous system. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 12, no. 8, pp. 572–597. PMID: 20183535. DOI: 10.1080/10937400903458940 (In English)
- Wyszkowska, J., Shepherd, S., Sharkh, S. et al. (2016) Exposure to extremely low frequency electromagnetic fields alters the behaviour, physiology and stress protein levels of desert locusts. *Scientific Reports*, vol. 6, article 36413. PMID: 27808167. DOI: 10.1038/srep42228 (In English)
- Zhang, Z.-Y., Zhang, J., Yang, C.-J. et al. (2016) Coupling mechanism of electromagnetic field and thermal stress on *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, vol. 11, no. 9, article e0162675. PMID: 27611438. DOI: 10.1371/journal.pone.0162675 (In English)

Постнатальное развитие комплекса заднелатеральных ядер дорзального таламуса

Н. С. Меркульева^{✉1, 2}, А. А. Михалкин¹, Н. И. Никитина¹

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

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

Сведения об авторах

Наталья Сергеевна Меркульева, ORCID: 0000-0003-1276-1918, e-mail: merkulyevan@infran.ru

Александр Александрович Михалкин, ORCID: 0000-0003-2342-6357, e-mail: mikhalkin@infran.ru

Нина Ивановна Никитина, e-mail: nnikitina@infran.ru

Для цитирования:

Меркульева, Н. С., Михалкин, А. А., Никитина, Н. И. (2020) Постнатальное развитие комплекса заднелатеральных ядер дорзального таламуса. *Интегративная физиология*, т. 1, № 3, с. 242–248. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-242-248

Получена 27 мая 2020; прошла рецензирование 8 июля 2020; принята 21 июля 2020.

Финансирование: Исследование поддержано проектом ID: 51134206 Санкт-Петербургского государственного университета (для Н. С. Меркульевой).

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

Аннотация. С помощью метода гистохимической визуализации ацетилхолинэстеразы (АХЭ) изучено постнатальное развитие комплекса заднелатеральных ядер и подушки (LP-pulvinar) кошки. У животных возраста 4–21 дня в латеральном ядре комплекса выявлено кластерное распределение АХЭ в нейропиле. Средний размер АХЭ кластеров и расстояние между их центрами составили 200–300 мкм и 430–600 мкм соответственно. Оптический контраст кластеров быстро нарастал в период между 4-м и 14-м постнатальным днем, достигая максимального значения, после чего быстро снижался, достигая минимальных значений у животных возраста 21 дней. Поскольку АХЭ напрямую связана с нейрональной дифференцировкой и развитием, а АХЭ кластеры локализуются в той же области, что и нейроны, организующие таламокорковые связи, полагаем, что последние могут быть функционально связаны с развитием зрительных модулей.

Ключевые слова: комплекс LP-pulvinar, ранний постнатальный онтогенез, ацетилхолинэстераза, временное мечение, кошка.

Postnatal development of the LP-Pulvinar complex

N. S. Merkulyeva^{✉1,2}, A. A. Mikhalkin¹, N. I. Nikitina¹

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

Natalia S. Merkulyeva,
ORCID: 0000-0003-1276-1918,
e-mail: merkulyevan@infran.ru

Aleksandr A. Mikhalkin,
ORCID: 0000-0003-2342-6357,
e-mail: mikhalkin@infran.ru

Nina I. Nikitina,
e-mail: nnikitina@infran.ru

For citation: Merkulyeva, N. S.,
Mikhalkin, A. A., Nikitina, N. I.
(2020) Postnatal development
of the LP-Pulvinar complex.

Integrative Physiology, vol. 1, no. 3,
pp. 242–248. DOI: 10.33910/2687-
1270-2020-1-3-242-248

Received 27 May 2020; reviewed
8 July 2020; accepted 21 July 2020.

Funding: The research was
supported by Saint-Petersburg
University (Project ID 51134206,
for N. S. Merkulyeva).

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

Abstract. Using histochemical stain for acetylcholinesterase (AChE), the lateral posterior pulvinar complex (*LP-P*) was analyzed in kittens aged 0–123 postnatal days and in adult cats. In the lateral nucleus of the complex (*LPl*) of kittens aged 4–21 days, a transient clustered AChE staining of neuropil was revealed. The average size of AChE clusters varied between 200 and 300 mkm; the inter-cluster distance varied between 430 and 600 mkm. Optical contrast of clusters increased rapidly from the 4th to the 14th postnatal day and, thereafter, rapidly decreased up to the 21st–28th postnatal day. Since AChE is directly linked to neuronal differentiation and development and AChE clusters are located in the same area with neurons responsible for thalamocortical connections, the transient clusters of AChE expression could be related to the development of visual structures.

Keywords: LP-pulvinar complex, early postnatal ontogenesis, acetylcholinesterase, transient staining, cat.

Введение

Основной объем аксонов сетчатки принимают зрительные таламические ядра; одно из основных (у хищных и приматов) — комплекс заднелатеральных ядер и подушки (*LP-P*), подразделяемый на латеральное (*LPl*) и медиальное (*LPm*) заднелатеральные ядра и подушку зрительного бугра (*pulvinar*, *Pulv*) (Berson, Graybiel 1983; Raczkowski, Rosenquist 1983). У хищных ядро *LPl* уникально тем, что является единственным из ассоциативных ядер зрительного таламуса, организующим реципрокные связи со зрительной корой (Berson, Graybiel 1983; Kato 1990; Casanova et al. 1997); эти проекции полагают модуляторными (Casanova et al. 2014). Ядро *LPl* вовлечено в высшие этапы обработки информации о движущихся объектах (Dumbrava et al. 2001), а также полагается ответственным за остаточное зрение после повреждения зрительной коры (Payne et al. 1991; Kaas 2015). Несмотря на важную роль *LPl* ядра, о его постнатальном развитии до сих пор

мало известно, поэтому его изучение стало целью данной работы.

Один из надежных гистологических методов архитектурного деления *LP-P* комплекса — гистохимическое выявление фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ), вовлеченного в обратный захват ацетилхолина из синаптической щели (Graybiel, Berson 1980; Kato 1986). Этот же метод позволяет исследовать онтогенетическое формирование мозга, поскольку АХЭ вовлечена в процессы роста и дифференцировки нейронов и образование межнейронных связей (Kristt 1989; Bigbee et al. 1999; Brimijoin 2005). Во время эмбрионального и раннего постнатального периода наблюдают временно высокий синтез АХЭ в разных структурах головного мозга крысы (Robertson et al. 1988; Geula et al. 1995; Sendemir et al. 1996), кошки (Bear et al. 1985), приматов (Kostovic, Goldman-Rakic 1983; Kostovic, Rakic 1984; Barone et al. 1994), что полагают связанным с периодом интенсивного роста аксонов и синаптогенеза. В данной работе мы исследовали распределение и уровень активности

фермента АХЭ в *LP* ядрах мозга кошки в возрасте от рождения до половозрелости. Часть данных по 2-недельным животным уже опубликована (Merkulyeva et al. 2015).

Материалы и методы

Все экспериментальные процедуры были согласованы с Этической Комиссией Института физиологии им. И. П. Павлова РАН и проведены в соответствии с требованиями Директивы № 2010/63/EU Европейского Парламента по защите лабораторных животных. Использованы нормально пигментированные кошки в возрасте 4, 10, 14, 18, 21, 28, 34, 62, 123 дня (по 2–3 животных в каждой группе) и два взрослых животных.

Процедура пробоподготовки подробно описана в (Merkulyeva et al. 2011). Животным возрастом 123 дня (группа «Трейсирование») в зрительную область заднемедиальной латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) вводили ретроградный аксональный маркер пероксидазы хрена (ПХ, Sigma VI, США). Операцию по введению ПХ осуществляли под общим наркозом (смесь «Золетила» (Virbac Colombia Ltd.) и «Рометара» (Bioveta Inc.) из расчета 15 и 2 мг/кг соответственно) с помощью микрошприца Гамильтона, соединенного со стеклянным микроэлектродом. Микроэлектрод погружали в кору на уровне P2.0–A1.5 (по Horsley-Clarke) на глубину 1000–1500 мкм; объем введенного 25 % водного раствора ПХ составил 0,12–0,14 мкл. Через двое суток под глубоким общим наркозом (смесь «Золетила» (Virbac Colombia Ltd.) и «Рометара» (Bioveta Inc.) из расчета 150 и 20 мг/кг соответственно) животных транскардиально перфузировали последовательно 0,9 % NaCl и 4 % параформальдегидом. Затем головной мозг извлекали, последовательно выдерживали в 20 % и 30 % растворах сахарозы, и на замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали фронтальные срезы коры и зрительного таламуса толщиной 50 мкм. Выявление ПХ проводили по методу М.-М. Mesulam (1976). Перфузию животных и изготовление срезов мозга для других возрастных групп производили аналогично описанному выше.

Выявление активности ацетилхолинэстеразы на срезах проводили с помощью модифицированного гистохимического метода Карновского-Рута (Schatz et al. 1992), результатом выполнения которого являлся преципитат изумрудно-зеленого цвета на месте локализации фермента. Процедура подробно описана в (Merkulyeva et al. 2015). Срезы монтировали на пред-

метные стекла, высушивали, проводили по спиртам восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в Bio Mount (Италия). Гистологические препараты оцифровывали с использованием микроскопа Olympus CX33 (Япония) с объективом 10x и камерой Nikon (Япония) в разрешении 4000x6000 пикселей. Для количественной оценки степени выраженности АХЭ кластеров высчитывали их оптический контраст (ОК) — отношение оптической плотности между темными (ОПт) и светлыми (ОПсв) локусами ядра, по формуле Майкельсона: $OK = (OP_t - OP_{sv}) / (OP_t + OP_{sv})$. Для сравнения возрастных групп использовали тест Манна — Уитни (n — число срезов).

Результаты и обсуждение

Паттерн распределения АХЭ в *LP-P* комплексе у взрослых животных соответствует имеющимся литературным данным (Berson, Graybiel 1983): наибольший уровень активности фермента отмечается в *Pulv* и *LPm*, наименьший — в *LPl*. У животных в возрасте 0–4 дней активность АХЭ в ядре *LPm* выше, чем в ядре *LPl*. При этом в ядре *LPl* у 4-дневных животных отмечены одиночные овальные образования с более высоким уровнем активности АХЭ (АХЭ кластеры); в силу вариабельности их формы и размера определяли только оптический контраст АХЭ кластеров, но не их размерность.

У всех животных в возрасте 10–21 дней в пределах светлоокрашенного ядра *LPl* наблюдается от 3 до 5 овальных АХЭ кластеров (схема, рис. 1А), наиболее отчетливо видимых на каудальном полюсе ядра (стереотаксический уровень $A_{3.0}$ – $A_{4.5}$), как и было показано ранее (Merkulyeva et al. 2015). Размер АХЭ кластеров и расстояние между ними сильно варьируют в пределах единой возрастной группы (разброс средних по всем группам: 193–273 мкм и 429–577 мкм соответственно), однако они имеют слабый тренд к уменьшению с возрастом (рис. 1В, С). В это же время происходит значительное нарастание площади и объема зрительного таламуса в районе комплекса *LP-P* (3393 мкм vs 4207 мкм, $n = 8$; $p = 0,0001$) (рис. 1D), соответствующее ранее выявленной динамике постнатального роста таламуса (Villablanca et al. 2000); таким образом, относительный размер АХЭ кластеров в период с 10 по 21 постнатальный день значительно уменьшается.

Как было сказано выше, для количественной оценки степени выраженности АХЭ кластеров высчитывали их оптический контраст (ОК). В короткий период времени, с 4 по 14 день,

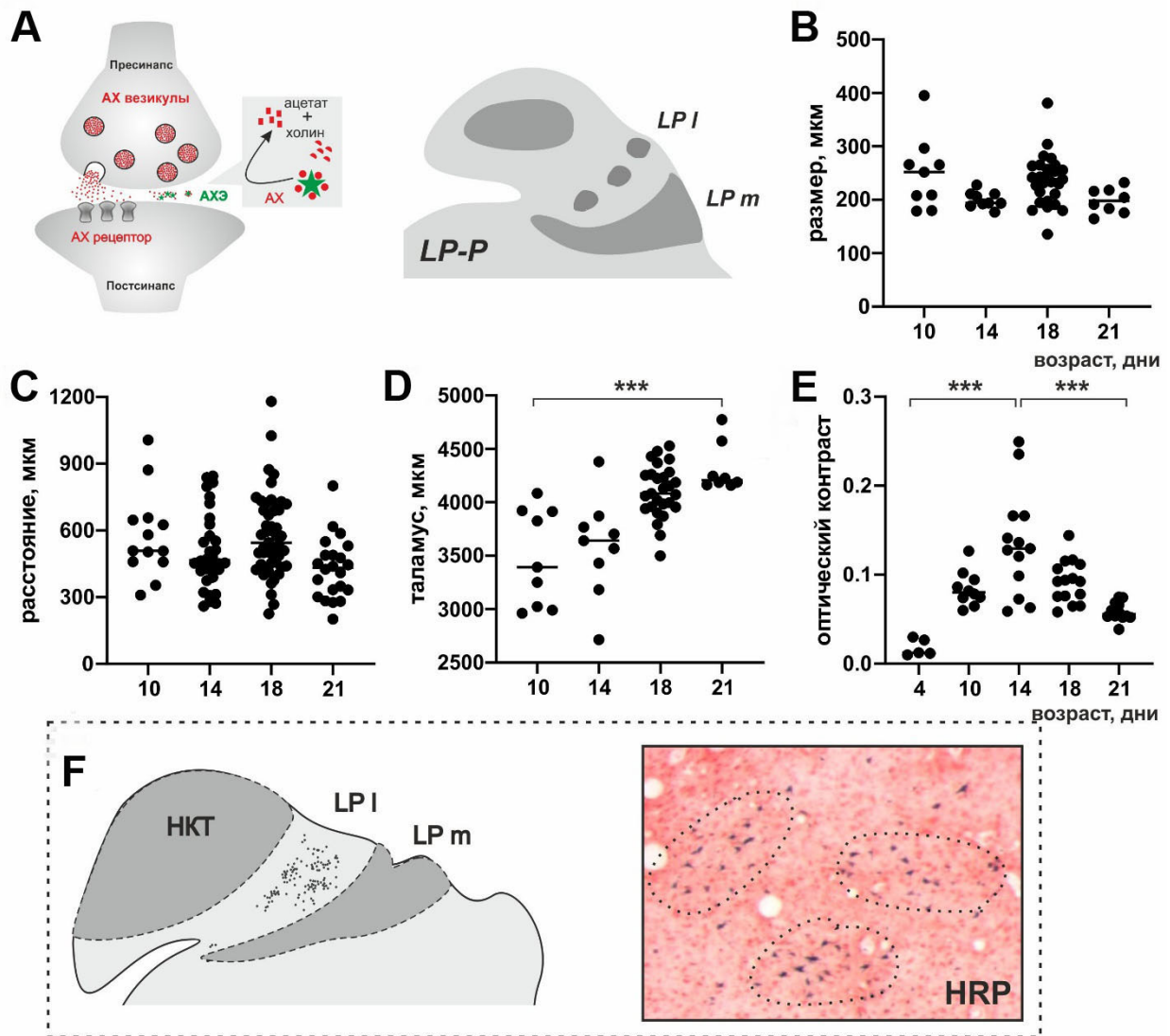


Рис. 1. Распределение фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в комплексе заднелатеральных ядер и подушки (*LP-P*) у кошек возраста 4–21 дней. А — схема локализации АХЭ патчей в ядре *LPI* у животного в возрасте 14 дней; В, С, D — характеристики АХЭ патчей: линейный размер (В), расстояние между патчами (С), оптический контраст (D); Е — линейный размер дорзального таламуса в области *LP-P* комплекса; F — распределение HRP-меченых нейронов после введения маркера в зрительную область заднемедиальной латеральной супрасильвиевой борозды (PMLS) животному возрастом 123 дня

Fig. 1. Distribution of acetylcholinesterase (AChE) in the lateral posterior pulvinar complex (*LP-P*) of cats aged 4–21 days. A — localization of the AChE clusters in the LPI of 14-day-old animals; B, C, D — parameters of AChE clusters: linear size (B), distance between clusters (C), optical contrast (D); E — linear size of the dorsal thalamus within the *LP-P* complex; F — distribution of HRP neurons retrogradely labeled from the posteromedial lateral suprasylvian area (PMLS) in the animal aged 123 days

происходит быстрое нарастание ОК (0,012 vs 0,129; $n = 10$; $p = 0,0002$), за которым следует такое же быстрое его падение к 21 дню (0,129 vs 0,056; $n = 12$; $p = 0,0001$) (рис. 1Е).

У животных в возрасте 3–7 недель АХЭ кластеры могут быть визуализированы только после добавочного контрастирования оцифрованных изображений; у котят старше 7 недель картина распределения АХЭ сходна с таковой у взрослых кошек (Graybiel, Berson 1980): уровень

АХЭ в ядре очень низкий, и кластерных образований в его пределах не выявляется.

Кластерную организацию ядра *LPI* ранее демонстрировали при изучении его кортикоталльных проекций, поскольку нейроны, инициирующие эти проекции, образовывали регулярные группы (Berson, Graybiel 1983; Raczkowski, Rosenquist 1983; Pospichal et al. 1996). У животных группы «Трейнирование», использованных в нашей работе, нейроны ядра *LPI*, ретроградно

меченные НРР, также были сгруппированы в округлые кластеры (рис. 1F) размером $313,7 \pm 11,2$ мкм $\times$ $244,2 \pm 8,1$ мкм, что сопоставимо с размером АХЭ кластеров, выявленных у животных младших возрастов.

Природа кластерной организации ядра *LPl* не ясна до сих пор; она может быть связана с процессами развития самих нейронов, поскольку накопление АХЭ напрямую влияет на дифференцировку нейронов, рост аксонов и дендритов, синаптогенез (Robertson et al. 1988; Kristt 1989; Bigbee et al. 1999; Brimijoin 2005), или отражать ветвление богатых АХЭ волокон, приходящих из соответствующих структур. По крайней мере, неоднородная структура *LPl* ядра была неоднократно выявлена в электрофизиологических работах (Casanova et al. 1989; Chalupa, Abramson, 1989; Dumbrava et al. 2001). Что касается ветвления входящих волокон, когда мы впервые выявили АХЭ кластеры ядра *LPl*, то предположили, что они имеют связь с колликулярными входами, поскольку сходные АХЭ кластеры располагались параллельным рядом в соседнем ядре *LPm* (Merkulyeva et al. 2015), получающим мощные колликулярные проекции (Berson, Graybiel et al. 1991; McHaffie et al. 1991). Ранее колликулярные проекции к ядру *LPm* выявляли лишь в ограниченной области ядра, на границе с *Pulv* (Abramson,

Chalupa 1988); можно предположить, что у молодых животных эти проекции могут быть более широко распространены в пределах ядра. В любом случае, выявленные АХЭ кластеры могут являться элементом общей модульной организации зрительной системы.

Нарастание оптического контраста АХЭ патчей происходит в сжатые сроки: от минимального — в возрасте 4-х дней, до максимального — в возрасте 14 дней, и обратно — к возрасту 21–28 дней. Прежде транзитное усиление активности АХЭ во время раннего постнатального развития было выявлено в передних холмах кошки (Illing, Graybiel 1994), таламических ядрах крысы (Robertson et al. 1989), первичной зрительной коре кошки и макаки (Bear et al. 1985; Dyck, Synader 1993; Barone et al. 1994). Динамика мечения тел нейронов нижних слоев первичной зрительной коры кошки в работе (Bear et al. 1985) точно такая же, как полученная нами для АХЭ кластеров ядра *LPl*. В коре крысы также выявлены популяции нейронов, синтезирующих АХЭ во время узкого этапа раннего постнатального онтогенеза (Geula et al. 1995). Принимая во внимание то, что ядро *LPl* тесно связано с первичной зрительной корой, можно предположить, что формирование кластеров двух этих структур взаимосвязано.

References

- Abramson, B. P., Chalupa, L. M. (1988) Multiple pathways from the superior colliculus to the extrageniculate visual thalamus of the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 271, no. 3, pp. 397–418. PMID: 2454967. DOI: 10.1002/cne.902710308 (In English)
- Barone, P., Dehay, C., Berland, M., Kennedy, H. (1994) Developmental changes in the distribution of acetylcholinesterase in the extrastriate visual cortex of the monkey. *Developmental Brain Research*, vol. 77, no. 2, pp. 290–294. PMID: 8174234. DOI: 10.1016/0165-3806(94)90205-4 (In English)
- Bear, M. F., Carnes, K. M., Ebner, F. F. (1985) Postnatal changes in the distribution of acetylcholinesterase in kitten striate cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 237, no. 4, pp. 519–532. PMID: 3900150. DOI: 10.1002/cne.902370408 (In English)
- Berson, D. M., Graybiel, A. M. (1983) Organization of the striate-recipient zone of the cat's lateralis posterior-pulvinar complex and its relations with the geniculostriate system. *Neuroscience*, vol. 9, no. 2, pp. 337–372. PMID: 6877598. DOI: 10.1016/0306-4522(83)90299-3 (In English)
- Berson, D. M., Graybiel, A. M. (1991) Tectorecipient zone of cat lateral posterior nucleus: Evidence that collicular afferents contain acetylcholinesterase. *Experimental Brain Research*, vol. 84, no. 3, pp. 478–486. PMID: 1713853. DOI: 10.1007/BF00230959 (In English)
- Bigbee, J. W., Sharma, K. V., Gupta, J. J., Dupree, J. L. (1999) Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, suppl. 1, pp. 81–87. PMID: 10229710. DOI: 10.2307/3434475 (In English)
- Brimijoin, S. (2005) Can cholinesterase inhibitors affect neural development? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 19, no. 3, pp. 429–432. PMID: 21783508. DOI: 10.1016/j.etap.2004.12.004 (In English)
- Casanova, C., Freeman, R. D., Nordmann, J. P. (1989) Monocular and binocular response properties of cells in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Journal of Neurophysiology*, vol. 62, no. 2, pp. 544–557. PMID: 2769346. DOI: 10.1152/jn.1989.62.2.544 (In English)

- Casanova, C., Lai, J., Thomas, S. (2014) Impact of pulvinar on contrast response functions in the primary visual cortex. *Journal of Vision*, vol. 14, no. 10, article 1408. DOI: 10.1167/14.10.1408 (In English)
- Casanova, C., Savard, T., Darveau, S. (1997) Contribution of area 17 to cell responses in the striate-recipient zone of the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 9, no. 5, pp. 1026–1036. PMID: 9182955. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01453.x (In English)
- Chalupa, L. M., Abramson, B. P. (1989) Visual receptive fields in the striate-recipient zone of the lateral posterior-pulvinar complex. *The Journal of Neuroscience*, vol. 9, no. 1, pp. 347–357. PMID: 2913211. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.09-01-00347.1989 (In English)
- Dumbrava, D., Faubert, J., Casanova, C. (2001) Global motion integration in the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 13, no. 12, pp. 2218–2226. PMID: 11454024. DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01598.x (In English)
- Dyck, R. H., Cynader, M. S. (1993) An interdigitated columnar mosaic of cytochrome oxidase, zinc, and neurotransmitter-related molecules in cat and monkey visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 19, pp. 9066–9069. PMID: 8415654. DOI: 10.1073/pnas.90.19.9066 (In English)
- Geula, C., Mesulam, M.-M., Kuo, C.-C., Tokuno, H. (1995) Postnatal development of cortical acetylcholinesterase-rich neurons in the rat brain: Permanent and transient patterns. *Experimental Neurology*, vol. 134, no. 2, pp. 157–178. PMID: 7556536. DOI: 10.1006/exnr.1995.1046 (In English)
- Graybiel, A. M., Berson, D. M. (1980) Histochemical identification and afferent connections of subdivisions in the lateralis posterior-pulvinar complex and related thalamic nuclei in the cat. *Neuroscience*, vol. 5, no. 7, pp. 1175–1238. PMID: 7402466. DOI: 10.1016/0306-4522(80)90196-7 (In English)
- Illing, R.-B., Graybiel, A. M. (1994) Pattern formation in the developing superior colliculus: Ontogeny of the periodic architecture in the intermediate layers. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 340, no. 3, pp. 311–327. PMID: 8188853. DOI: 10.1002/cne.903400303 (In English)
- Kaas, J. H. (2015) Blindsight: Post-natal potential of a transient pulvinar pathway. *Current Biology*, vol. 25, no. 4, pp. R155–R157. PMID: 25689912. DOI: 10.1016/j.cub.2014.12.053 (In English)
- Kato, N. (1986) Acetylcholinesterase staining can be used to subdivide the lateral posterior nucleus in newborn kittens. *Developmental Brain Research*, vol. 30, no. 1, pp. 140–143. PMID: 3779431. DOI: 10.1016/0165-3806(86)90144-6 (In English)
- Kato, N. (1990) Cortico-thalamo-cortical projection between visual cortices. *Brain Research*, vol. 509, no. 1, pp. 150–152. PMID: 2306630. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90323-4 (In English)
- Kostovic, I., Goldman-Rakic, P. S. (1983) Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 219, no. 4, pp. 431–447. PMID: 6196382. DOI: 10.1002/cne.902190405 (In English)
- Kostovic, I., Rakic, P. (1984) Development of prestriate visual projections in the monkey and human fetal cerebrum revealed by transient cholinesterase staining. *The Journal of Neuroscience*, vol. 4, no. 1, pp. 25–42. PMID: 6693940. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.04-01-00025.1984 (In English)
- Kristt, D. A. (1989) Acetylcholinesterase in immature thalamic neurons: Relation to afferentation, development, regulation and cellular distribution. *Neuroscience*, vol. 29, no. 1, pp. 27–43. PMID: 2710346. DOI: 10.1016/0306-4522(89)90330-8 (In English)
- McHaffie, J. G., Beninato, M., Stein, B. E., Spencer, R. F. (1991) Postnatal development of acetylcholinesterase in, and cholinergic projections to, the cat superior colliculus. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 313, no. 1, pp. 113–131. PMID: 1761749. DOI: 10.1002/cne.903130109 (In English)
- Merkulyeva, N. S., Mikhalkin, A. A., Nikitina, N. I., Makarov, F. N. (2011) Razvitie svyazey pervichnoj zritel'noj kory s tsentrom analiza dvizhenij: rol' zritel'nogo okruzheniya [Development of primary visual cortex connections with the motion processing center: The role of the visual environment]. *Morfologiya — Morphology*, vol. 140, no. 6, pp. 24–31. (In Russian)
- Merkulyeva, N. S., Mikhalkin, A. A., Veshchitskij, A. A. (2015) Osobennosti raspredeleniya atsetilkholinesterazy v zadnelateral'nom yadre talamusa koshki [Peculiarities of the distribution of acetylcholinesterase in the lateral posterior nucleus of the thalamus of the cat]. *Morfologiya — Morphology*, vol. 148, no. 4, pp. 46–48. (In Russian)
- Mesulam, M. M. (1976) The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: Incubation parameters and visibility. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 24, no. 12, pp. 1273–1280. PMID: 63512. DOI: 10.1177/24.12.63512 (In English)
- Payne, B. R., Connors, C., Cornwell, P. (1991) Survival and death of neurons in cortical area PMLS after removal of areas 17, 18, and 19 from cats and kittens. *Cerebral Cortex*, vol. 1, no. 6, pp. 469–491. PMID: 1822753. DOI: 10.1093/cercor/1.6.469 (In English)
- Pospichal, M. W., Stepniowska, I., Wimborne, B. M., Kaas, J. H. (1996) Lateral division of the lateral posterior region: Connections with area 18 in cats. *Visual Neuroscience*, vol. 13, no. 6, pp. 1167–1172. PMID: 8961545. DOI: 10.1017/S095252380000780X (In English)
- Raczkowski, D., Rosenquist, A. C. (1983) Connections of the multiple visual cortical areas with the lateral posterior-pulvinar complex and adjacent thalamic nuclei in the cat. *The Journal of Neuroscience*, vol. 3, no. 10, pp. 1912–1942. PMID: 6619917. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.03-10-01912.1983 (In English)

- Robertson, R. T., Hanes, M. A., Yu, J. (1988) Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. *Developmental Brain Research*, vol. 41, no. 1–2, pp. 1–23. PMID: 3401792. DOI: 10.1016/0165-3806(88)90165-4 (In English)
- Robertson, R. T., Poon, H. K., Mirrafati, S. J., Yu, J. (1989) Transient patterns of acetylcholinesterase activity in developing thalamus: A comparative study in rodents. *Developmental Brain Research*, vol. 48, no. 2, pp. 309–315. PMID: 2776300. DOI: 10.1016/0165-3806(89)90084-9 (In English)
- Schatz, C. R., Geula, C., Morecraft, R. J., Mesulam, M. M. (1992) A one-step cobalt-ferrocyanide method for histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity in central nervous system tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 431–434. PMID: 1552180. DOI: 10.1177/40.3.1552180 (In English)
- Sendemir, E., Erzurumlu, R. S., Jhaveri, S. (1996) Differential expression of acetylcholinesterase in the developing barrel cortex of three rodent species. *Cerebral Cortex*, vol. 6, no. 3, pp. 377–387. PMID: 8670665. DOI: 10.1093/cercor/6.3.377 (In English)
- Villablanca, J. R., Schmanke, T. D., Crutcher, H. A. et al. (2000) The growth of the feline brain from fetal into adult life: II. A morphometric study of subcortical nuclei. *Developmental Brain Research*, vol. 122, no. 1, pp. 21–33. PMID: 10915902. DOI: 10.1016/S0165-3806(00)00047-X (In English)

УДК 616.894-053.8

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-249-252

Роль стресса в патогенезе болезни Альцгеймера

П. М. Шульга^{✉1}

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

Сведения об авторе

Полина Михайловна Шульга, SPIN-код: 3660-1348, e-mail: shuulgap@gmail.com

Для цитирования: Шульга, П. М. (2020) Роль стресса в патогенезе болезни Альцгеймера. *Интегративная физиология*, т. 1, № 3, с. 249–252. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-249-252

Получена 5 июня 2020; прошла рецензирование 9 июля 2020; принята 15 июля 2020.

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

Аннотация. Болезнь Альцгеймера является мультифакторным нейродегенеративным заболеванием. Ее диагностика, в особенности прижизненная, часто затруднена, а механизмы возникновения до сих пор не ясны. Тем не менее обнаружены некоторые маркеры, самым значимым из которых является избыточное отложение аномально свернутых белков — амилоидного пептида бета в составе амилоидных бляшек и гиперфосфорилированного тау-белка в виде нейрофибриллярных клубков. Точные причины возникновения этих и других маркеров неизвестны, однако установлено, что их появлению могут способствовать факторы самой различной природы, экзогенные и эндогенные. Действительно, риск данной патологии может быть существенно повышен из-за генетических предрасположенностей, так как было выявлено несколько генов, мутации в которых ассоциированы с болезнью Альцгеймера. Факторы внешней среды, неправильный образ жизни и сопутствующие ему заболевания, в том числе и метаболические нарушения, также вносят свой вклад в развитие данной патологии. Одним из важных факторов может являться хронический стресс, известный своей способностью оказывать негативное влияние на различные системы организма и на нервную систему в частности. В данном обзоре кратко рассмотрен вклад хронического стресса в патогенез болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейродегенерация, хронический стресс, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система (ГТАКС), кортизол, глюкокортикоидные гормоны.

The role of stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease

P. M. Shulga^{✉1}

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

Author

Polina M. Shulga, SPIN: 3660-1348, e-mail: shuulgap@gmail.com

For citation: Shulga, P. M. (2020) The role of stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 249–252. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-249-252

Received 5 June 2020; reviewed 9 July 2020; accepted 15 July 2020.

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

Abstract. Alzheimer's disease is a multi-factorial neurodegenerative disease. Its diagnosis, especially in vivo, is often difficult, and the mechanisms of its development are still not clear. However, some markers were found, the most significant of which is the excessive deposition of abnormally folded proteins — beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated neurofibrillar tangles of Tau protein. The exact causes of these and other markers are not known, but it has been established that factors of various nature, both exogenous and endogenous, can contribute to their manifestation. Indeed, the risk of this pathology increases significantly due to genetic predispositions since there are several genes whose mutations are associated with Alzheimer's disease. Environmental factors, improper lifestyle and accompanying diseases, including metabolic disorders, also contribute to the development of this pathology. Another important factor is a chronic stress which has a negative impact on various body systems including the nervous system. This review summarizes the contribution of chronic stress to the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, neurodegeneration, chronic stress, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis (HPA axis), cortisol, glucocorticoid hormones.

Болезнь Альцгеймера, ее маркеры и факторы риска

Болезнь Альцгеймера (БА) — это нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенная форма деменции, характеризующаяся прогрессирующими со временем нарушениями когнитивных функций (Ballard et al. 2011). Лечение, способного существенно замедлить или тем более предотвратить развитие БА, не существует. Диагностика, в особенности ранняя, также затруднена. Наиболее точно диагноз подтверждается при помощи компьютерной томографии головного мозга (Marcus et al. 2014), а также посмертно, посредством гистологического анализа тканей мозга, так как известно, что главными гистопатологическими маркерами БА являются амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки (Braak, Braak 1991). Их образование в различных областях головного мозга, а в особенности в гиппокампе и миндалине, нарушает формирование памяти и эмоциональную регуляцию.

Развитию БА могут способствовать различные факторы, такие как диабет второго типа, гипертония, метаболические синдромы, сердечно-сосудистые заболевания, а также несбалансированный рацион питания, курение, пониженная физическая и когнитивная активность и хронический стресс. Последние исследования привели к более полному пониманию механизмов влияния хронического стресса на течение и прогрессирование заболеваний, а также того, как сами заболевания нарушают нормальную реакцию на стресс, приводя к возникновению психоневрологических симптомов (Caruso et al. 2019).

Стресс как фактор риска болезни Альцгеймера

Со времен Ганса Селье, впервые описавшего стресс как биологический феномен, известно, что хронический стресс может стать причиной развития различных патологий. Стресс активирует гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальную систему (ГГГКС), что приводит к запуску каскада физиологических реакций. Сначала стресс индуцирует высвобождение кортикотропин-релизинг-фактора (КРФ), который, в свою очередь, стимулирует переднюю долю гипофиза для секреции адренокортикотропного гормона (АКТГ). Затем АКТГ стимулирует кору надпочечников, способствуя выделению глюкокортикоидных гормонов — кортизола у человека и кортикостерона у грызунов. В норме торможение ГГГКС осуществляется посредством

механизма отрицательной обратной связи (Tasker, Herman 2011).

Продолжительный стресс приводит к чрезмерно длительной активации и, в дальнейшем, дисрегуляции ГГГКС. В результате гиперсекреции глюкокортикоидов (ГК) может привести к нарушению гомеостаза организма. Так, продолжительное воздействие ГК оказывает негативное влияние на нервную систему, индуцируя атрофию гиппокампа и префронтальной коры (McEwen 2008) и гипертрофию миндалины (Vyas et al. 2004), что впоследствии может привести к нарушениям памяти, эмоциональной нестабильности, окислительному стрессу, нейровоспалению, а следовательно, и к различным нейродегенеративным заболеваниям, включая БА (Canet et al. 2019) (рис. 1).

Доклинические исследования БА проводятся на модельных животных с БА-подобными патологиями, как трансгенных (Götz et al. 2018), так и не трансгенных (Shree et al. 2017). Одни из первых доказательств связи стресса с БА были получены, когда введение экзогенных ГК крысам повысило экспрессию предшественника бета-амилоида (amyloid precursor protein, APP) и способствовало отложению гиперфосфорилированного тау-белка (Elliott et al. 1993; Budas et al. 1999). Повышенное отложение амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков было выявлено и у трансгенных мышей с гиперэкспрессией КРФ и APP (Dong et al. 2012; Campbell et al. 2015b). Однако важно отметить, что отложение обоих белков было снижено у грызунов с дефицитом КРФ или же нокаутных по рецептору КРФ (Filipcik et al. 2012; Campbell et al. 2015a). Стресс, вызванный иммобилизацией, также увеличил

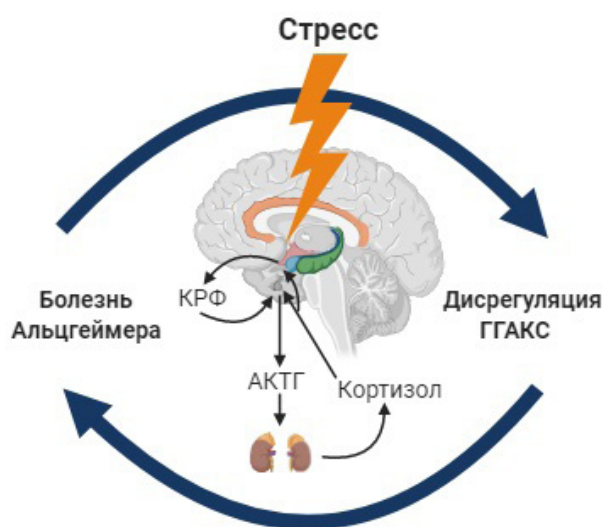


Рис. 1. Болезнь Альцгеймера и ГГГКС
Fig. 1. Alzheimer's disease and the HPA axis

образование бета-амилоидного пептида у трансгенных мышей, причем схожий результат наблюдался и при введении им экзогенного КРФ (Kang et al. 2007). Кроме того, клетки нейробластомы, инкубированные с ГК, показали повышенную экспрессию APP и связанных с ним ферментов (Green et al. 2006). Таким образом, хотя данные модели только схожи с БА и представляют собой скорее БА-подобные невропатологии, а введение ГК или их повышенная экспрессия лишь частично имитирует индуцированную стрессом активацию ГТАКС, вышеуказанные исследования показали, что стресс действительно играет критическую роль в патогенезе БА.

Анализ мутаций у пациентов с БА позволил выявить ассоциацию между данным заболеванием и мутацией в гене 11 β -HSD1, кодирующем 11 β -гидроксистероид дегидрогеназу, катализирующую превращение биологически инертного кортизона в кортизол (de Quervain et al. 2004). Фармакологическое ингибирование 11 β -HSD1 у мышей способствовало улучшению пространственной памяти (Sooy et al. 2010) и снижению количества амилоидных бляшек в коре и миндале (Sooy et al. 2015). Нокаут данного гена привел к снижению уровня ГК в гиппокампе, а также к улучшению долговременной и пространственной памяти (Yau et al. 2015).

Важнейшим молекулярным признаком БА является накопление тау-белка в виде нейрофибриллярных клубков, обладающих нейротоксичностью (Iqbal et al. 2010). Одно из недавних исследований выявило, что в норме тау подвергается эндосомной деградации (Vaz-Silva et al. 2018). Показано, что нокаут гена, кодирующего малую гуанозинтрифосфат гидролазу (ГТФазу) Rab35, играющую ключевую роль в регуляции сортировки тау на пути к лизосомам, значительно замедляет его деградацию. Кроме того, в нейрональной культуре, обработанной ГК, было зафиксировано избирательное сниже-

ние экспрессии Rab35. Затем экспрессия Rab35 и других эндоцитарных ГТФаз была измерена в гиппокампе крыс, которые получали инъекции ГК. Уровень экспрессии Rab35 действительно был снижен, в то время как экспрессия других ГТФаз не менялась. В целом результаты *in vitro* и *in vivo* позволяют предположить, что ГК специфически подавляют транскрипцию Rab35, что и приводит к нарушениям в деградации тау.

Было также продемонстрировано, что вызванное стрессом гиперфосфорилирование тау не было предотвращено адrenaлэктомией, однако его не наблюдалось у мышей с дефицитом рецептора КРФ 1-го типа (КРФР 1) и у мышей, получавших селективный антагонист КРФР 1 (анталармин). На основании вышеописанных данных авторы исследования пришли к заключению, что подобные результаты могут указывать на способность КРФ индуцировать тау-патологию независимо от активации ГТАКС (Rissman et al. 2007).

Таким образом, последние исследования существенно расширили наши представления о патогенезе БА и показали, что хронический стресс является потенциальным фактором риска развития данного заболевания. Более того, механизмы, посредством которых стресс влияет на течение БА, довольно разнообразны и требуют более тщательного изучения. Однако важно отметить, что все вышеизложенные исследования, основанные на введении ГК, не отражают реального ответа организма на стрессорное воздействие, что также открывает широкий простор для дальнейших экспериментов. Вероятно, различные стратегии, направленные на устранение симптомов, связанных со стрессом, а также на повышение устойчивости к нему, могли бы улучшить качество жизни пациентов с деменцией, увеличить ее продолжительность и замедлить, а в дальнейшем и предотвратить развитие подобных заболеваний.

References

- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A. et al. (2011) Alzheimer's disease. *Lancet*, vol. 377, no. 9770, pp. 1019–1031. PMID: 21371747. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9 (In English)
- Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, vol. 82, no. 4, pp. 239–259. PMID: 1759558. DOI: 10.1007/BF00308809 (In English)
- Budas, G., Coughlan, C. M., Seckl, J. R., Breen, K. C. (1999) The effect of corticosteroids on amyloid β precursor protein/amyloid precursor-like protein expression and processing in vivo. *Neuroscience Letters*, vol. 276, no. 1, pp. 61–64. PMID: 10586975. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00790-9 (In English)
- Campbell, S. N., Zhang, C., Monte, L. et al. (2015a) Increased tau phosphorylation and aggregation in the hippocampus of mice overexpressing corticotropin-releasing factor. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 43, no. 3, pp. 967–976. PMID: 25125464. DOI: 10.3233/JAD-141281 (In English)
- Campbell, S. N., Zhang, C., Roe, A. D. et al. (2015b) Impact of CRFR1 ablation on amyloid- β production and accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 45, no. 4, pp. 1175–1184. PMID: 25697705. DOI: 10.3233/jad-142844 (In English)

- Canet, G., Hernandez, C., Zussy, C. et al. (2019) Is AD a stress-related disorder? Focus on the HPA axis and its promising therapeutic targets. *Frontiers in Aging Neuroscience*, vol. 11, article 269. PMID: 31611783. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00269 (In English)
- Caruso, A., Nicoletti, F., Gaetano, A., Scaccianoce, S. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease: Focus on stress. *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, article 976. PMID: 31551781. DOI: 10.3389/fphar.2019.00976 (In English)
- de Quervain, D. J.-F., Poirier, R., Wollmer, M. A. et al. (2004) Glucocorticoid-related genetic susceptibility for Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 1, pp. 47–52. PMID: 14583441. DOI: 10.1093/hmg/ddg361 (In English)
- Dong, H., Murphy, K. M., Meng, L. et al. (2012) Corticotrophin releasing factor accelerates neuropathology and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 28, no. 3, pp. 579–592. PMID: 22045495. DOI: 10.3233/JAD-2011-111328 (In English)
- Elliott, E. M., Mattson, M. P., Vanderklis, P. et al. (1993) Corticosterone exacerbates kainate-induced alterations in hippocampal tau immunoreactivity and spectrin proteolysis in vivo. *Journal of Neurochemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 57–67. PMID: 8515288. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03537.x (In English)
- Filipcik, P., Novak, P., Mravec, B. et al. (2012) Tau protein phosphorylation in diverse brain areas of normal and CRH deficient mice: Up-regulation by stress. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 32, no. 5, pp. 837–845. PMID: 22222439. DOI: 10.1007/s10571-011-9788-9 (In English)
- Götz, J., Bodea, L.-G., Goedert, M. (2018) Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 19, no. 10, pp. 583–598. PMID: 30194347. DOI: 10.1038/s41583-018-0054-8 (In English)
- Green, K. N., Billings, L. M., Roozendaal, B. et al. (2006) Glucocorticoids increase amyloid- β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 35, pp. 9047–9056. PMID: 16943563. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2797-06.2006 (In English)
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., Grundke-Iqbal, I. (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research*, vol. 7, no. 8, pp. 656–664. PMID: 20678074. DOI: 10.2174/156720510793611592 (In English)
- Kang, J.-E., Cirrito, J. R., Dong, H. et al. (2007) Acute stress increases interstitial fluid amyloid- β via corticotropin-releasing factor and neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 25, pp. 10673–10678. PMID: 17551018. DOI: 10.1073/pnas.0700148104 (In English)
- Marcus, C., Mena, E., Subramaniam, R. M. (2014) Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clinical Nuclear Medicine*, vol. 39, no. 10, pp. e413–e426. PMID: 25199063. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000547 (In English)
- McEwen, B. S. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*, vol. 583, no. 2–3, pp. 174–185. PMID: 18282566. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.11.071 (In English)
- Rissman, R. A., Lee, K.-F., Vale, W., Sawchenko, P. E. (2007) Corticotropin-releasing factor receptors differentially regulate stress-induced tau phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 24, pp. 6552–6562. PMID: 17567816. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5173-06.2007 (In English)
- Shree, S., Bhardwaj, R., Deshmukh, K., Deshmukh, R. (2017) Non-transgenic animal models of Alzheimer's disease. In: P. K. Bansal, R. Deshmukh (eds.). *Animal models of neurological disorders: Principle and working procedure for animal models of neurological disorders*. Singapore: Springer, pp. 3–22. DOI: 10.1007/978-981-10-5981-0_2 (In English)
- Sooy, K., Noble, J., McBride, A. et al. (2015) Cognitive and disease-modifying effects of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition in male Tg2576 mice, a model of Alzheimer's disease. *Endocrinology*, vol. 156, no. 12, pp. 4592–4603. PMID: 26305888. DOI: 10.1210/en.2015-1395 (In English)
- Sooy, K., Webster, S. P., Noble, J. et al. (2010) Partial deficiency or short-term inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves cognitive function in aging mice. *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 41, pp. 13867–13872. PMID: 20943927. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2783-10.2010 (In English)
- Tasker, J. G., Herman, J. P. (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*, vol. 14, no. 4, pp. 398–406. PMID: 21663538. DOI: 10.3109/10253890.2011.586446 (In English)
- Vaz-Silva, J., Gomes, P., Jin, Q. et al. (2018) Endolysosomal degradation of Tau and its role in glucocorticoid-driven hippocampal malfunction. *The EMBO Journal*, vol. 37, no. 20, article e99084. PMID: 30166454. DOI: 10.15252/embj.201899084 (In English)
- Vyas, A., Pillai, A. G., Chattarji, S. (2004) Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, vol. 128, no. 4, pp. 667–673. PMID: 15464275. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.013 (In English)
- Yau, J. L. W., Wheelan, N., Noble, J. et al. (2015) Intrahippocampal glucocorticoids generated by 11 β -HSD1 affect memory in aged mice. *Neurobiology of Aging*, vol. 36, no. 1, pp. 334–343. PMID: 25109766. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.007 (In English)