



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. 2 № 1 2021**

**Vol. 2 No. 1 2021**



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

ISSN 2687-1270 (online)  
[intphysiology.ru](http://intphysiology.ru)  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1>  
2021. Том 2, № 1  
2021. Vol. 2, no. 1

## Интегративная физиология Integrative Physiology

Свидетельство о регистрации СМИ ЭЛ № ФС 77 – 75141,  
выдано Роскомнадзором 07.03.2019

Рецензируемое научное издание  
Журнал открытого доступа  
Учрежден в 2019 году  
Выходит 4 раза в год  
16+

Mass Media Registration certificate EL No. FS 77 – 75141,  
issued by Roskomnadzor on 7 March 2019

Peer-reviewed journal  
Open Access  
Published since 2019  
4 issues per year  
16+

### Редакция

*Главный редактор*

А. П. Филаретова (Санкт-Петербург, Россия)

*Заместитель главного редактора*

Е. А. Никитина (Санкт-Петербург, Россия)

*Ответственный редактор*

О. А. Любашина (Санкт-Петербург, Россия)

### Editorial Team

*Editor-in-chief*

Lyudmila P. Filaretova (St Petersburg, Russia)

*Deputy Editor-in-chief*

Ekaterina A. Nikitina (St Petersburg, Russia)

*Executive Editor*

Olga A. Lyubashina (St Petersburg, Russia)

### Редакционная коллегия

В. Г. Александров (Санкт-Петербург, Россия)

Н. М. Бажан (Новосибирск, Россия)

Б. Боназ (Гренобль, Франция)

А. Б. Буравкова (Москва, Россия)

Т. Д. Власов (Санкт-Петербург, Россия)

Дж. Вуд (Колумбус, США)

Н. В. Гуляева (Москва, Россия)

Д. Джебзова (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. Dyuzhikova (St Petersburg, Russia)

Irina Zhdanova (Boston, USA)

Dora Zelena (Pécs, Hungary)

Benedito Machado (São Paulo, Brazil)

Mikhail P. Moshkin (Novosibirsk, Russia)

Pavel E. Musienko (St Petersburg, Russia)

Mieczysław Pokorski (Warsaw, Poland)

Elena A. Rybnikova (St Petersburg, Russia)

Sandor Szabo (Irvine, USA)

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](mailto:izdat@herzen.spb.ru)  
Телефон: +7 (812) 312-17-41

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

Объем 8,35 Мб

Подписано к использованию 30.04.2021

Published at 30.04.2021

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

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

Редактор *В. М. Махтина*  
Редактор английского текста *И. А. Наговицына*  
Корректор *А. Ю. Гладкова*  
Оформление обложки *О. В. Рудневой*  
Верстка *А. М. Ходан*



Санкт-Петербург, 2021

© Российский государственный  
педагогический университет им. А. И. Герцена, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

Приветствие главного редактора.....	4
<b>Обзоры</b> .....	<b>6</b>
<i>Bánrévi K., Chaves T., Correia P., Fazekas C. L., Szabó A., Török B., Zelena D.</i> Brain corticotropin releasing hormone and stress reactivity .....	6
<i>Polevshchikov A. V., Guseynikova V. V.</i> Thymic mast cells: From morphology to physiology .....	15
<i>Фетисов С. О.</i> О роли кишечных бактерий в физиологической регуляции аппетита и энергетического обмена .....	21
<i>Лосева Е. В.</i> Психосоциальный стресс перенаселенности (скученности): негативные последствия для организма человека и грызунов .....	33
<b>Экспериментальные статьи</b> .....	<b>41</b>
<i>Lanshakov D. A., Sukhareva E. V., Bulygina V. V., Lagunov T. A., Kalinina T. S.</i> Effects of neonatal dexamethasone and CpD <sub>A</sub> on the expression of genes for apoptosis regulator proteins in the neonatal hippocampus .....	41
<i>Никитина Е. А., Журавлев А. В., Савватеева-Попова Е. В.</i> Влияние нарушения синтеза кинуренинов на память у дрозофилы .....	49
<i>Ордян Н. Э., Малышева О. В., Акулова В. К., Холова Г. И., Пивина С. Г.</i> Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс — рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2 .....	61
<i>Любашина О. А., Михалкин А. А., Сиваченко И. Б.</i> Нейрональные перестройки на супраспинальном уровне, способствующие кишечной гипералгезии при колите .....	71
<i>Груздков А. А., Громова Л. В.</i> Исследование всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс на интегративных экспериментальных моделях .....	79
<i>Лобов Г. И., Иванова Г. Т.</i> Роль К <sup>+</sup> -каналов и сероводорода в регуляции тонуса церебральных артерий нефрэктомированных крыс .....	88
<i>Пеннийнен В. А., Плахова В. Б., Подзорова С. А., Терехин С. Г., Крылов Б. В.</i> Возможная физиологическая функция эндогенного убаина .....	96
<i>Буткевич И. П., Михайленко В. А., Вершинина Е. А.</i> Модуляция воспалительного болевого и гормонального ответов стрессом в препубертатный период развития у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс .....	102

## CONTENTS

Letter from the Editor-in-Chief . . . . .	4
<b>Reviews . . . . .</b>	<b>6</b>
<i>Bánrévi K., Chaves T., Correia P., Fazekas C. L., Szabó A., Török B., Zelena D.</i> Brain corticotropin releasing hormone and stress reactivity . . . . .	6
<i>Polevshchikov A. V., Guseynikova V. V.</i> Thymic mast cells: From morphology to physiology . . . . .	15
<i>Fetissov S. O.</i> Role of gut bacteria in the physiological regulation of appetite and energy metabolism . . . . .	21
<i>Loseva E. V.</i> Psychosocial stress of overpopulation (crowding): Negative consequences for the human body and rodents. . . . .	33
<b>Experimental articles . . . . .</b>	<b>41</b>
<i>Lanshakov D. A., Sukhareva E. V., Bulygina V. V., Lagunov T. A., Kalinina T. S.</i> Effects of neonatal dexamethasone and CpdA on the expression of genes for apoptosis regulator proteins in the neonatal hippocampus . . . . .	41
<i>Nikitina E. A., Zhuravlev A. V., Savvateeva-Popova E. V.</i> Effect of impaired kynurenine synthesis on memory in <i>Drosophila</i> . . . . .	49
<i>Ordyan N. E., Malysheva O. V., Akulova V. K., Kholova G. I., Pivina S. G.</i> Cognitive impairment in the offspring of male rats exposed to stress in “stress — restress” or “learned helplessness” paradigms: The role of insulin-like growth factor 2 . . . . .	61
<i>Lyubashina O. A., Mikhalkin A. A., Sivachenko I. B.</i> Supraspinal neuronal alterations promoting intestinal hyperalgesia in colitis . . . . .	71
<i>Gruzdkov A. A., Gromova L. V.</i> Study of glucose absorption in the small intestine of rats on the integrative experimental models. . . . .	79
<i>Lobov G. I., Ivanova G. T.</i> Role of K <sup>+</sup> -channels and hydrogen sulfide in the regulation of cerebral arteries in nephrectomized rats. . . . .	88
<i>Pennyaynen V. A., Plakhova V. B., Podzorova S. A., Terekhin S. G., Krylov B. V.</i> Possible physiological function of endogenous ouabain . . . . .	96
<i>Butkevich I. P., Mikhailenko V. A., Vershinina E. A.</i> Modulation of inflammatory pain and hormonal responses by stress in the prepubertal period of development in prenatally stressed adult male and female rats . . . . .	102

## Приветствие главного редактора

*Глубокоуважаемые коллеги!*

Перед вами первый в 2021 году номер журнала «Интегративная физиология». За плечами у журнала опыт первого года, который, благодаря авторам и слаженной активной работе редколлегии и редакции, можно оценить как успешный. В четырех первых выпусках 2020 года опубликованы 43 статьи, среди которых 9 статей зарубежных авторов. В 2020 году журнал вошел в базу РИНЦ, что, несомненно, свидетельствует о его признании в научном сообществе.

Журнал «Интегративная физиология» выступает за укрепление позиций физиологии. В последние десятилетия естественные пути развития науки привели к тому, что в физиологии, как и в других науках, появились узкие специалисты, и произошло дробление знаний. Специализация исследований, несомненно, способствует детализации знаний о глубинных физиологических процессах. Однако такой ход развития науки имеет и обратную, негативную, сторону: чрезмерная специализация заслоняет от исследователей целостный живой организм, общие закономерности его функционирования и механизмы, координирующие взаимодействие физиологических систем. В этой ситуации особо востребованным становится развитие интегративной физиологии, нацеленной на понимание, каким образом каждый компонент организма работает как часть, интегрированная в функционирование организма как единого целого, в здоровье и болезни.

Чрезвычайно высокая актуальность развития интегративной физиологии определяется и ее востребованностью для медицины, особенно в связи с все большим пониманием того, что основные хронические заболевания, такие как онкологические, неврологические и сердечно-сосудистые, заболевания желудочно-кишечного тракта, являются по своей природе комплексными. Интегративная физиология — важнейшая для медицины область физиологии, ее вершина.

Для выяснения принципов и механизмов регуляции функционирования целостного организма требуется комплексный подход с вовлечением сотрудничества исследователей, специализирующихся на разных уровнях организации жизни: от отдельных молекул до поведения. Основателем интегративной физиологии по праву считается Иван Петрович Павлов. В год 170-летия со дня рождения Ивана Петровича (2019) Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН организовал и успешно провел Первую Всероссийскую конференцию с международным участием «Интегративная физиология», которая была нацелена на укрепление научного сотрудничества физиологов и позиций интегративной физиологии. Материалы размещены на сайтах Института и Международного союза физиологических наук (IUPS), президент которого, профессор Джулия Чен (IUPS President Julia Chan), принимала участие в конференции. Вторая Всероссийская конференция с международным участием «Интегративная физиология» была организована и успешно проведена в декабре 2020 года, когда Институт, созданный И. П. Павловым, отмечал свое 95-летие. Четвертый номер журнала ушедшего года был посвящен этому юбилейному событию.

В первом номере журнала «Интегративная физиология» за 2021 год вниманию читателей предлагаются статьи, подготовленные на основе пленарных лекций и устных докладов избранных участников недавно прошедшей конференции «Интегративная физиология». В представленных статьях отражены фундаментальные научные проблемы, исследование которых является важным с точки зрения развития интегративной физиологии.

Приветствую читателей журнала «Интегративная физиология» и благодарю всех, кто обеспечил успешный выпуск всех первых четырех номеров журнала в 2020 году и выпуск нового номера.

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

## Letter from the Editor-in-Chief

*Dear colleagues,*

This is the first issue of *Integrative Physiology* in 2021. The journal is one year old and it has been a success due to the authors and the effective work of the editorial board and staff. The first four issues of 2020 feature 43 articles, including 9 contributions from foreign scholars. In 2020, the journal was included in the RSCI database which means it is now recognized by the research community.

*Integrative Physiology* aims to raise the profile of physiology. In recent decades, due to the natural development of science, physiology as well as other fields of knowledge witnessed the emergence of field experts and a growing body of specialized knowledge. The trend has both pros and cons. On the one hand, more focused and specialised research provides more insights into the deep physiological processes. On the other hand, this narrow specialization does not allow researchers to get a complete picture of a living organism, the general laws of its functioning and the mechanisms that coordinate the interaction of physiological systems. In this context, integrative physiology is a very much wanted field of knowledge that aims to understand how each component of the body works as a part integrated into the functioning of the body as a whole, whether healthy or sick.

Another factor that makes further development of integrative physiology paramount is its high relevance for medicine. It is especially true in connection with the growing awareness that the reasons for major chronic diseases—oncological, neurological, cardiovascular and gastrointestinal—are complex. Integrative physiology is the key field of physiology capable of making the most effective contribution into the development of medicine.

It is impossible to clarify the principles and mechanisms that regulate the functioning of an organism as a whole without a holistic approach. This requires contributions from a plethora of researchers specializing in different levels of life organization: from individual molecules to behavior. It is widely acknowledged that integrative physiology was founded by Ivan P. Pavlov. The year 2019 celebrated his 170th anniversary. To mark the occasion, the Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences hosted the conference “Integrative Physiology”, the First Russian Conference that attracted international participants. It was organised to enhance networking and cooperation between physiologists and raise the profile of integrative physiology. The materials are available on the websites of the Pavlov Institute of Physiology and the International Union of Physiological Sciences (IUPS), whose President, Professor Julia Chan, took part in the conference. The Second Russian Conference with international participants “Integrative Physiology” took place in December 2020 and was also a success. It was held to mark the 95th anniversary of the foundation of the Institute established by I. P. Pavlov. Another initiative to mark the occasion in 2020 was the release of the fourth issue of the journal.

The first issue of *Integrative Physiology* in 2021 is a collection of selected articles based on the plenary lectures and reports made by the participants of the recent conference “Integrative Physiology”. The articles focus on fundamental issues in integrative physiology crucial for its further effective development.

Welcome to *Integrative Physiology* and a thank-you to all those who contributed to the success of the first four issues of the journal in 2020 and the release of its new issue.

*Ludmila P. Filaretova,  
Editor-in-Chief*



UDC 612.018

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-6-14>

## Brain corticotropin releasing hormone and stress reactivity

K. Bánrévi<sup>1</sup>, T. Chaves<sup>1,2</sup>, P. Correia<sup>1,2</sup>, C. L. Fazekas<sup>1,2</sup>, A. Szabó<sup>1,2</sup>, B. Török<sup>1,2</sup>, D. Zelena<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, 43 Szigony Str., 1083 Budapest, Hungary

<sup>2</sup> Semmelweis University, 26 Üllői Str., 1085 Budapest, Hungary

<sup>3</sup> University of Pécs, 20 Ifjúság Str., 7624 Pécs, Hungary

### Authors

Krisztina Bánrévi,  
e-mail: [banrevi.krisztina@koki.mta.hu](mailto:banrevi.krisztina@koki.mta.hu)

Tiago Chaves,  
e-mail: [tiago.chaves@koki.hu](mailto:tiago.chaves@koki.hu)

Pedro Correia,  
e-mail: [marques.correia.pedro@koki.hu](mailto:marques.correia.pedro@koki.hu)

Csilla Lea Fazekas,  
Scopus AuthorID: 57195292451,  
e-mail: [fazekas.csilla@koki.hu](mailto:fazekas.csilla@koki.hu)

Adrienn Szabó,  
e-mail: [szabo.adrienn@koki.hu](mailto:szabo.adrienn@koki.hu)

Bibiána Török,  
Scopus AuthorID: 56471449500,  
e-mail: [torok.bibiana@koki.hu](mailto:torok.bibiana@koki.hu)

Dóra Zelena,  
Scopus AuthorID: 6602752896,  
ORCID: 0000-0001-5616-1100,  
e-mail: [zelena.dora@koki.mta.hu](mailto:zelena.dora@koki.mta.hu)

### For citation:

Bánrévi, K., Chaves, T., Correia, P. et al. (2021) Brain corticotropin releasing hormone and stress reactivity. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 6–14.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-6-14>

**Received** 30 January 2021;  
reviewed 21 February 2021;  
accepted 28 February 2021.

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** The hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis is one of the main components of stress adaptation. Corticotropin-releasing hormone (CRH) coming from the nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) is the canonical central regulator of the axis. This CRH acts on the CRH-R1 receptors of the pituitary, and, through adrenocorticotropin, stimulates glucocorticoid release from the adrenal cortex. However, it may be synthesized in other parts of the brain as well, and may act both on CRH-R1 and CRH-R2 receptors. These areas form the central CRH network. Many of them are also stress reactive and participate in physical and psychological stress response. The central nucleus of the amygdala and bed nucleus of stria terminalis are two areas best known for their role in emotions, while hippocampus is mostly involved in glucocorticoid feedback as well as memory formation, all heavily connected to stress adaptation. Among others, the brainstem raphe nuclei get dense CRHergic innervation that, through CRH-R1 receptors, may influence the serotonergic tone of the brain. Both stress and serotonin are strongly implicated in depression, therefore, it is not surprising that CRH-R1 antagonists were developed as therapeutic tools that extensively act on the brain CRH system. Our review suggests a general role of brain CRH network in stress adaptation which is not restricted to PVN.

**Keywords:** corticotropin-releasing hormone (CRH), paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), bed nucleus of stria terminalis (BNST), amygdala, raphe nuclei, corticotropin-releasing hormone receptor of type 1 (CRH-R1).

## Introduction

Stress, as a biological response of an organism to internal and external stimuli, has important physiological and psychological implications. Stress-induced changes are often temporary and reversible whenever the stressor is removed, however,

the time and efficacy of the recovery vary (Charmandari et al. 2005). The main role of adaptation is to guarantee a quick and effective reaction to life-threatening situations. The sympathetic adrenomedullary system (SAS) as well as the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis (HPA) are responsible for the activation of biological mechanisms

of fighting or fleeing (Johnson et al. 1992). Feedback inhibition is an integral part of the optimal stress response (Backström, Winberg 2013).

Depending on chronicity, intensity, frequency and modality of stressors as well as on individual's inner state (determined by genes and early environment), the activation of stress adaptation processes may be manifested in many forms, being either adaptive or maladaptive (pathological) (Adler 2009). Chronic stress load may supersaturate the adaptive systems and lead to various pathological states, including psychiatric disorders (Chrousos 2009; Phillips et al. 2021). In fact, anxiety and depression are generally related to malfunctioning stress adaptation (Yehuda et al. 2015).

Here, we would like to focus on the HPA axis and on its hypothalamic component — the corticotropin-releasing hormone (CRH), and highlight its general role in stress adaptation, which seems to be general in the whole brain.

## Stress regulation by CRH

### *How neurohormone systems respond to stress — the HPA axis*

The HPA axis is a regulatory pathway of stress adaptation, ensuring homeostatic maintenance of the body, partly mediated by the bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems (Dunlavey 2018; Joseph, Whirlledge 2017). This complex network is activated in response to physical or psychological stressors (Herman et al. 2016).

After a stressful event, initially noradrenaline and adrenaline are secreted as part of SAS. Reacting to the signal from A2 noradrenergic and C2 adrenergic brainstem neurones, parvocellular cells of the nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) secrete CRH into the hypophyseal portal blood. In the pituitary CRH binds to G-protein coupled receptors (corticotropin releasing hormone R1 receptors (CRH-R1)) and activates adenylate cyclase that results in the secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH, reaching the adrenal gland, binds to melanocortin 2 receptors in the zona fasciculata of the adrenal cortex that leads to increased intracellular cAMP levels, which cause a rapid elevation in cholesterol biosynthesis. Cholesterol is the precursor for glucocorticoids (corticosterone in rodents, cortisol in primates). Glucocorticoids reach various peripheral organs and also provide feedback to the central nervous system. Indeed, bilateral adrenalectomy (ADX), removing the glucocorticoids, induced a robust increase of the CRH mRNA in the PVN measured by in situ hybridization (Makino et al. 1994a).

However, stress itself activates CRH transcription (Imaki et al. 1995). Expression of the protooncogene c-Fos has been validated as a biomarker of neuronal activation. Rapid alterations in c-Fos mRNA expression were demonstrated in the PVN, followed by CRH mRNA accumulation in response to acute stressors (among others, restraint). The intensity of the c-Fos mRNA signal peaked at 30 min, then decreased and was undetectable 120 min after stress onset. In contrast, the concentration of CRH mRNA increased gradually and a significant elevation was first detected 60 min after the beginning of stress. ADX enhanced while administration of glucocorticoids inhibited c-Fos mRNA and CRH mRNA induction after stress.

### *Corticotropin-releasing hormone (CRH) and its receptors*

CRH is a 41-amino-acid peptide that is present on many brain areas as well as at the periphery (adrenal gland, testis (Thompson et al. 1987), thymus, spleen (Keegan et al. 1994)). Its best known role is the regulation of the HPA axis and the physiological response to stress (Nezi et al. 2000). In this regard, CRH is primarily synthesized in the PVN located in the hypothalamus not only in rodents (Backström, Winberg 2013), but also in humans (Goncharuk et al. 2002). As a neuropeptide, its synthesis is secondary to the main, classical neurotransmitter — glutamate in hypophysiotropic cells of the PVN (as well as of the piriform cortex (Dedic et al. 2019)) characterised by vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2) (Hrabovszky et al. 2005). In other areas, CRH colocalises with GABA (Dedic et al. 2019).

Anyhow, CRH is produced in many areas of the brain (Swanson et al. 1983). It is generally accepted that the area of synthesis (i. e., the cell body of the neurones) is where the mRNA of the peptide can be found as the peptide synthesis happens near the nucleus. By RNA blot analysis in rats (Thompson et al. 1987) as well as by in situ hybridization histochemistry in mice (Keegan et al. 1994), it was confirmed that the brainstem (medulla/pons) contained significant amount of CRH mRNA, but it was also detected in the hypothalamus, hippocampus, cerebral cortex and striatum, but not in the cerebellum. On the other hand, the peptide is transported rapidly to the axon terminals, thus, it can be detected mainly on the target areas. Therefore, at the peptide level, the area of synthesis can be detected only after administration of colchicine — an axonal transport inhibitor. All in all, based upon immunohistochemical distribution and functional considerations three major distinct CRH-producing networks were detected in rats

(Swanson et al. 1983) (Figure): (i) PVN forming the HPA axis; (ii) telencephalon, hypothalamus and brainstem regulating autonomous responses (central nucleus of the amygdala (CeA), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), substantia innomina, medial and lateral preoptic areas, lateral hypothalamic area, central gray matter, laterodorsal tegmental nucleus, locus coeruleus (LC), parabrachial nucleus, dorsal vagal complex, and regions containing the A1 and A5 catecholamine cell groups); (iii) scattered CRH-cells can be found in interneurons of the cerebral cortex (prefrontal areas) and hippocampus as part of the limbic system regulating emotions. Similarly, after colchicine treatment in male golden hamsters CRH immunopositivity was detected in the hypothalamus, especially, in the PVN and preoptic area as well as in CeA, BNST and cortical areas (Delville et al. 1992). Interestingly, only the PVN was sensitive to glucocorticoid negative feedback modelled by ADX (Makino et al. 1994a).

In these areas CRH executes the function of neurotransmitter and neuromodulator (Kovács 2013) and its expression is linked to a wide range

of stress adaptive responses, including behavioural, autonomic, endocrine, reproductive, cardiovascular, metabolic and immunosuppressive (Kageyama et al. 2003; de Kloet et al. 2005; Slominski 2009; Takefuji, Murohara 2019). *In vitro* CRH proved to be neuroprotective against  $\beta$ -amyloid toxicity (Pedersen et al. 2001). Similarly, *in vivo* models of neuronal injury suggest that CRH may be protective. For instance, the levels of CRH mRNA rapidly and profoundly increased after focal cerebral ischemia in the cerebral cortex and amygdala of rats (Wong et al. 1995).

CRH effects are regulated by two distinct types of receptors, the CRH-R1 and CRH-R2. These G protein-coupled receptors are widespread in the brain (Wong et al. 1994), having high affinity to the neuropeptides urocortin, sauvagine and urotensin (Backström, Winberg 2013), and are responsible for mediating the stress response. CRH-R1 is involved in HPA axis regulation at the level of the pituitary, strongly connected to, e. g., anxiety. On the other hand, CRH-R2 appears to be linked to the regulation of other physiological responses to stress, also participating in the anxiety control

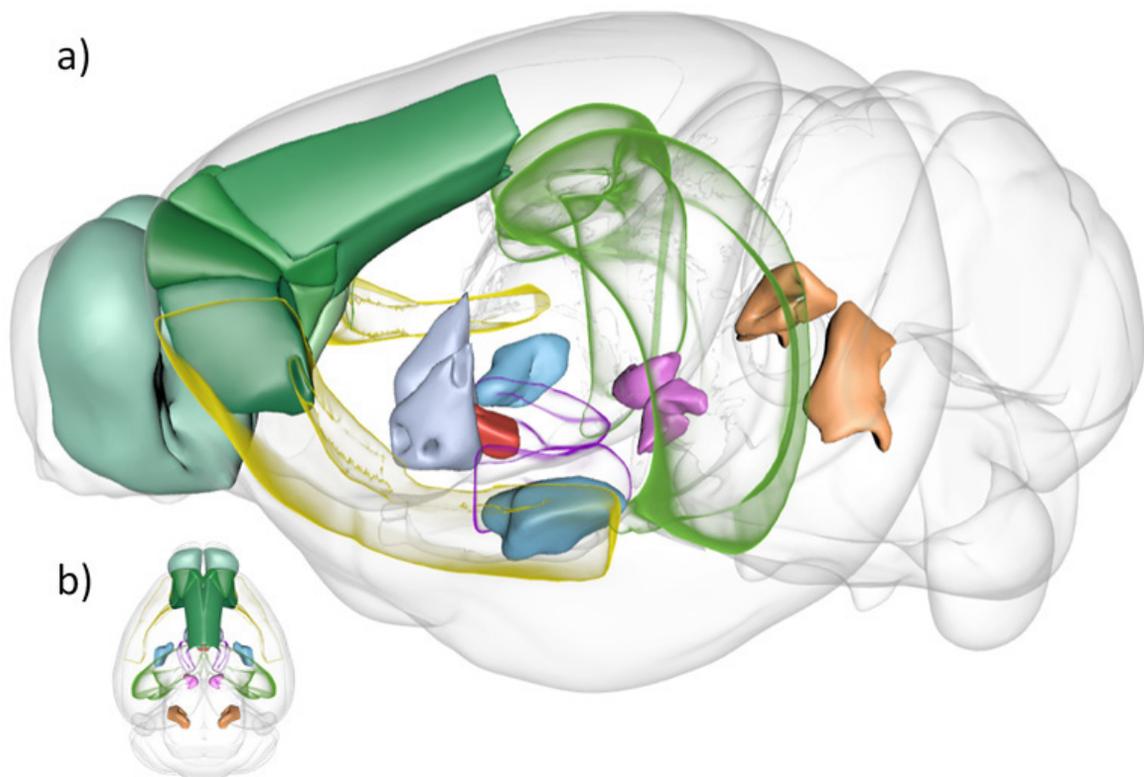


Fig. Brain corticotropin releasing hormone expression and stress reactivity (adapted from: Futch et al. 2017).

3D brain atlas: [https://scalablebrainatlas.incf.org/composer/?template=ABA\\_v3](https://scalablebrainatlas.incf.org/composer/?template=ABA_v3). a) side view, b) top view;

Abbreviations: PVN: paraventricular hypothalamic nucleus, LH: lateral hypothalamic area, VTA: ventral tegmental area, PB: parabrachial nucleus, CeA: central amygdalar nucleus, BNST: bed nuclei of the stria terminalis, HC: hippocampus, FrCx: frontal pole, cerebral cortex, CCx: cingular cortex, IA: insular area, OB: olfactory bulb

(Grammatopoulos, Chrousos 2002). Interestingly, CRH-R2 can also be found in the pituitary (Klenkova et al. 2008), providing a link to the gonadal axis (Kageyama et al. 2003) and in amphibian participating in thyroid-stimulating hormone regulation (De Groef et al. 2003). In many studied brain areas (PVN, CeA, hippocampus) CRH co-localised with CRH-R1 and R2, suggesting a well-developed autoregulation (Fan et al. 2014). As a result, the two receptors are often involved in opposite responses, e. g., amygdala neurones are activated by CRH-R1 and inhibited by CRH-R2 (Ji, Neugebauer 2008).

We have to mention that CRH binding protein (CRH-BP) modulates CRH-R function (Ketchesin et al. 2017). Although not much is understood about this process, CRH-BP binds CRH with high affinity, reducing the availability of the free ligands. This suggests that CRH-BP functions as a negative regulator of CRH activity.

## CRH producing brain areas reactive to stress

### *Amygdaloid complex*

#### *Central nucleus of amygdala (CeA)*

Amygdala is known for its complex role in emotional behaviour, especially in fear responses (Janak, Tye 2015). The complex is made up of more than a dozen sub-nuclei, which have intricate inter- and intranuclear connectivity, as well as extensive afferent and efferent projections (see review: Duvarci, Pare 2014). According to the proposed functional model of the amygdala, different sensory information (e. g.: sound, light, pain) is directly relayed via sensory cortical areas and indirectly via the thalamus, and converge mostly, but not exclusively, on the basolateral nuclei (BLA). Additionally, other already processed information, such as memories and past experiences, are mediated by the hippocampus to the amygdala. This information is thoroughly processed via intranuclear connections and reciprocal projections. Most, but not all outputs arise from the CeA (LeDoux 2007). These efferents include projections to major behaviour and autonomic response regulating areas, such as the prefrontal cortex, the nuclei of the monoaminergic system, ventral tegmental area (VTA), striatum or the hypothalamus (PVN) (Sah et al. 2003), modulating stress induced behavioural and autonomic responses.

CRH is expressed in the CeA (Gray, Magnuson 1992), mainly in GABAergic neurones (Dedic et al. 2019). With in situ hybridization histochemistry, increased CRH mRNA was found in the CeA after corticosterone administration (Makino et al. 1994a).

This increased signalling was accompanied by elevated viscerosomatic sensitivity (Myers, Greenwood-Van Meerveld 2010). In line with these findings, pharmacogenetic activation of CeA elicited anxiety-like behaviour, impaired short-term memory and object recognition (Paretkar, Dimitrov 2018). On the other hand, disruption of CRH signalling by RNA interference (Regev et al. 2012) or short hairpin RNA (Bolton et al. 2018) attenuated anxiety-like behaviour in response to restraint stress (Regev et al. 2012), or reversed early-life stress induced anhedonia (Bolton et al. 2018) without affecting depressive-like behaviour or fear learning. However, another study showed that activation of CRH positive amygdala neurones via pharmacogenetics had a positive effect on stress-induced depressive-like behaviour, a phenomenon at least partially mediated by dorsal raphe (DR) serotonergic neurones (Prakash et al. 2020). In connection with fear, deletion of CeA glucocorticoid receptors (GR) via LoxP-Cre system resulted in a decreased CRH mRNA expression and impaired fear behaviour (Kolber et al. 2008).

Thus, CRH synthesized in CeA seems to be highly stress sensitive and may orchestrate behavioural adaptation.

#### *Bed nucleus of stria terminalis (BNST)*

BNST plays a pivotal role in regulating trait anxiety, contextual fear memory and appetitive behaviour (Kalin et al. 2005), but it is also critical for mediating the neuroendocrine stress response (Vranjkovic et al. 2014). BNST is one of the most complex structures in the central nervous system (Larriva-Sahd 2006), which is densely connected with amygdala, hypothalamus, midbrain, and lower brainstem regions (Dong et al. 2001; Kalin et al. 2005).

CRH is highly expressed in BNST, especially in the oval nucleus of dorsolateral BNST (ovBNST) (Daniel, Rainnie 2016; Ju, Swanson 1989), colocalising with GABA (Dedic et al. 2019). The highest concentration of CRH neurones in the brain can be found in this area, however, high CRH fibres density has been also shown here (Daniel, Rainnie 2016; Morin et al. 1999).

A growing body of evidence suggests that stress activates the CRH system in the BNST and the dysfunction of CRH signalling here is associated with mood disorders, such as anxiety and depression (Walker et al. 2009). Chronic (2 weeks) high dose corticosterone administration increased CRH mRNA in BNST similarly to amygdala, with higher sensitivity of the dorsolateral than ventral parts (Makino et al. 1994b). However, ADX was ineffective (Pedersen et al. 2001), and the restrain stress-induced c-Fos expression was blocked by intracerebroventricular

(icv) administration of a competitive CRH-R antagonists (Arnold et al. 1992). Moreover, the ICV injection of CRH induced c-Fos expression in BNST (Arnold et al. 1992) and CRH microinjection into BNST increased heart rate (Nijsen et al. 2001). Based upon pharmacogenetic examinations CRH neurones of the BNST do not seem to participate in modulation of fear (Bruzsik et al. 2021).

All these changes suggest that CRH innervation, rather than locally produced CRH, is implicated in stress regulation. However, chronic variable stress, a model of depression, was able to enhance the cellular excitability of ovBNST CRH neurones in *ex vivo* slices, suggesting stress-related plasticity of this local system (Bock et al. 2005; Hu et al. 2020).

### Brainstem

RNA blot analysis in rats suggested that rat brainstem (medulla/pons) contained the largest amount of CRH mRNA (Thompson et al. 1987). VTA, a well-known brain centre of reward consisting of dopaminergic neurones, also co-expresses CRH both in rodents and humans (Grieder et al. 2014). These dopamine-CRH cells were activated not only by nicotine administration, but by the highly stressful, adverse effect of nicotine withdrawal as well, providing a link between the stress system and drug abuse-induced brain changes. Of the brainstem nuclei, even **nucleus tractus solitarius** (NTS)/vagal complex plays an important role in the regulation of acute and chronic stress (Herman 2018). Indeed, NTS provides a link between the periphery, the SAS and the HPA by transmitting the vagal information to the PVN.

At the same time, CRH-Rs are also highly expressed in the brainstem (Fan et al. 2014), modulating serotonergic activity in the DR (Kirby et al. 2000), noradrenergic activity in the LC (Valentino et al. 1983) and dopaminergic activity in the VTA (Refojo et al. 2011). Several evidences indicated that CRHergic projections to these brain areas are deeply implicated in stress-induced behavioural alteration (e. g., DR in the depression model of learned helplessness (Hammack et al. 2003), amygdala-induced anxiety (McCall et al. 2015)). The CRH-R1 in the dorsal periaqueductal grey matter might also have an important role in anxiety disorders (Del-Ben, Graeff 2009).

One of the most common biological changes reported in depressed patients is HPA axis hyperactivity with enhanced CRH synthesis (Pariante, Lightman 2008), which might also be detected in extra-hypothalamic brain regions, including brainstem (Austin et al. 2003). Indeed, 30% higher CRH immunoreactivity was detected in the LC, 39% in the median raphe, and 45% in the caudal DR. How-

ever, this radioimmunocytochemistry study concluded on the role of CRH innervation (i. e. CRH in axon terminals) rather than locally produced CRH.

### Cortical areas

**Prefrontal** (PFC), cingulate, and insular cortical areas contain CRH producing cells, which might also contribute to psychological and behavioural consequences of stress (Pedersen et al. 2001). Indeed, depressed patients who committed suicide showed enhanced CRH mRNA level in their PFC in comparison to age-matched controls (Zhao et al. 2015). However, during the fearful stimulus of fear conditioning there was no measurable increase in extracellular CRH concentration of the PFC (Mountney et al. 2011). Moreover, CRH-Rs are also present here, which might bind CRH coming from other areas (e. g. amygdala) and contribute to habituation (Jaferi, Bhatnagar 2007).

CRH is also expressed in the **olfactory bulb** (Delville et al. 1992). A specific area of the olfactory cortex of mice may transmit volatile predator odour-induced fearful olfactory signal directly to the PVN, thereby promoting CRH release (Kondoh et al. 2016). However, the role of locally synthesized CRH in stress adaptation is not clear yet.

In chicken, CRH neurones in the nucleus of the **hippocampal** commissure initiate, while PVN CRH neurones sustain the early response of the HPA axis to stress (Kadhim et al. 2019). In rodents and humans, through mineralocorticoid receptors, hippocampus is highly involved in negative feedback regulation of the HPA axis (Reul et al. 1990). Moreover, hippocampus is well known for its role in memory formation. CRH expressing interneurons of the hippocampus form local regulatory circuitry (Gunn et al. 2019). Not only in rodents but also in humans this hippocampal CRH/CRH-R system regulates neurogenesis, affecting spatial memory (Koutmani et al. 2019). Indeed, local administration of a CRH-R1 antagonist prevented acute stress-induced cognitive impairment (Chen et al. 2010).

### CRH-R antagonists and depression

In the past years, a lot of attention has been given to CRH-R1 antagonists by the pharmaceutical industry. However, despite all the interest, no phase III study has revealed a definitive advantage of these compounds over different types of placebo (active and inactive). In fact, many studies were discontinued due to the strong adverse effects (Contoreggi 2015). Nonetheless, there are still growing evidences that these antagonists have the potential to become a new standard for the pharmacological treatment of stress-related diseases, including depression, as

CRH-R1 antagonist compounds NBI-30775/RS121919 and NBI-34041 have shown promising results in reducing the secretion of the stress hormone and having antidepressive effects without serious side effects (Kunzel et al. 2003; Spierling, Zorrilla 2017).

### Conclusion

CRH is widely expressed in the brain, and the whole network seems to be stress sensitive, forming an ancient, unified stress regulatory system. How-

ever, in some brain areas CRH innervation (i.e., CRH-Rs) rather than the locally synthesized neuropeptide seems to be more important (see BNST, raphe). We cannot disregard the local auto-regulation of CRH biosynthesis either (Aguilera, Liu 2012). Moreover, different stress stimuli may induce CRH synthesis in cells normally lacking this neuropeptide, e. g., hypertonic load in oxytocin producing magnocellular PVN cells (Kovács, Sawchenko 1993), which should be taken into consideration as well.

### References

- Adler, R. H. (2009) Engel's biopsychosocial model is still relevant today. *Journal of Psychosomatic Research*, vol. 67, no. 6, pp. 607–611. <https://www.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2009.08.008> (In English)
- Aguilera, G., Liu, Y. (2012) The molecular physiology of CRH neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 33, no. 1, pp. 67–84. <https://www.doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.08.002> (In English)
- Arnold, F. J. L., de Lucas Bueno, M., Shiers, H. et al. (1992) Expression of *c-fos* in regions of the basal limbic forebrain following intra-cerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience*, vol. 51, no. 2, pp. 377–390. [https://www.doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90322-s](https://www.doi.org/10.1016/0306-4522(92)90322-s) (In English)
- Austin, M. C., Janosky, J. E., Murphy, H. A. (2003) Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men. *Molecular Psychiatry*, vol. 8, no. 3, pp. 324–332. <https://www.doi.org/10.1038/sj.mp.4001250> (In English)
- Backström, T., Winberg, S. (2013) Central corticotropin releasing factor and social stress. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 7, article 117. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2013.00117> (In English)
- Bock, J., Thode, C., Hannemann, O. et al. (2005) Early socio-emotional experience induces expression of the immediate-early gene *Arc/arg3.1* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity-regulated gene) in learning-relevant brain regions of the newborn chick. *Neuroscience*, vol. 133, no. 3, pp. 625–633. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.048> (In English)
- Bolton, J. L., Molet, J., Regev, L. et al. (2018) Anhedonia following early-life adversity involves aberrant interaction of reward and anxiety circuits and is reversed by partial silencing of amygdala corticotropin-releasing hormone gene. *Biological Psychiatry*, vol. 83, no. 2, pp. 137–147. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.023> (In English)
- Bruzsik, B., Biro, L., Zelena, D. et al. (2021) Somatostatin neurons of the bed nucleus of stria terminalis enhance associative fear memory consolidation in mice. *Journal of Neuroscience*, vol. 41, no. 9, pp. 1982–1995. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1944-20.2020> (In English)
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*, vol. 67, pp. 259–284. <https://www.doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816> (In English)
- Chen, Y., Rex, C. S., Rice, C. J. et al. (2010) Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 29, pp. 13123–13128. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1003825107> (In English)
- Chrousos, G. P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 5, no. 7, pp. 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106> (In English)
- Contoreggi, C. (2015) Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis. *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 42, no. 4, pp. 323–339. <https://www.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.11.008> (In English)
- Daniel, S. E., Rainnie, D. G. (2016) Stress modulation of opposing circuits in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology*, vol. 41, no. 1, pp. 103–125. <https://www.doi.org/10.1038/npp.2015.178> (In English)
- Dedic, N., Kühne, C., Gomes, K. S. et al. (2019) Deletion of CRH from GABAergic forebrain neurons promotes stress resilience and dampens stress-induced changes in neuronal activity. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, article 986. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2019.00986> (In English)
- Del-Ben, C. M., Graeff, F. G. (2009) Panic disorder: Is the PAG involved? *Neural Plasticity*, vol. 2009, article 108135. <https://www.doi.org/10.1155/2009/108135> (In English)
- Delville, Y., Stires, C., Ferris, C. F. (1992) Distribution of corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in golden hamster brain. *Brain Research Bulletin*, vol. 29, no. 5, pp. 681–684. [https://www.doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90138-n](https://www.doi.org/10.1016/0361-9230(92)90138-n) (In English)
- Dong, H.-W., Petrovich, G. D., Watts, A. G., Swanson, L. W. (2001) Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 436, no. 4, pp. 430–455. <https://www.doi.org/10.1002/cne.1079> (In English)

- Dunlavey, C. J. (2018) Introduction to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Healthy and dysregulated stress responses, developmental stress and neurodegeneration. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education*, vol. 16, no. 2, pp. R59–R60. PMID: 30057514. (In English)
- Duvarci, S., Pare, D. (2014) Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, vol. 82, no. 5, pp. 966–980. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.042> (In English)
- Fan, J.-M., Chen, X.-Q., Wang, X. et al. (2014) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 colocalizes with type 2 in corticotropin-releasing factor-containing cellular profiles in rat brain. *Neuro Endocrinology Letters*, vol. 35, no. 5, pp. 417–426. PMID: 25275258. (In English)
- Futch, H. S., Croft, C. L., Truong, V. Q. et al. (2017) Targeting psychologic stress signaling pathways in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, vol. 12, article 49. <https://www.doi.org/10.1186/s13024-017-0190-z> (In English)
- Goncharuk, V. D., van Heerikhuize, J., Swaab, D. F., Buijs, R. M. (2002) Paraventricular nucleus of the human hypothalamus in primary hypertension: Activation of corticotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 443, no. 4, pp. 321–331. <https://www.doi.org/10.1002/cne.10124> (In English)
- Grammatopoulos, D. K., Chrousos, G. P. (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 13, no. 10, pp. 436–444. [https://www.doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00670-7](https://www.doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00670-7) (In English)
- Gray, T. S., Magnuson, D. J. (1992) Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides*, vol. 13, no. 3, pp. 451–460. [https://www.doi.org/10.1016/0196-9781\(92\)90074-d](https://www.doi.org/10.1016/0196-9781(92)90074-d) (In English)
- Grieder, T. E., Herman, M. A., Contet, C. et al. (2014) VTA CRF neurons mediate the aversive effects of nicotine withdrawal and promote intake escalation. *Nature Neuroscience*, vol. 17, no. 12, pp. 1751–1758. <https://www.doi.org/10.1038/nn.3872> (In English)
- Gunn, B. G., Sanchez, G. A., Lynch, G. et al. (2019) Hyper-diversity of CRH interneurons in mouse hippocampus. *Brain Structure and Function*, vol. 224, no. 2, pp. 583–598. <https://www.doi.org/10.1007/s00429-018-1793-z> (In English)
- Hammack, S. E., Pepin, J. L., DesMarteau, J. S. et al. (2003) Low doses of corticotropin-releasing hormone injected into the dorsal raphe nucleus block the behavioral consequences of uncontrollable stress. *Behavioural Brain Research*, vol. 147, no. 1–2, pp. 55–64. [https://www.doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00133-5](https://www.doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00133-5) (In English)
- Herman, J. P. (2018) Regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to stressors by the nucleus of the solitary tract/dorsal vagal complex. *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 38, no. 1, pp. 25–35. <https://www.doi.org/10.1007/s10571-017-0543-8> (In English)
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S. et al. (2016) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, vol. 6, no. 2, pp. 603–621. <https://www.doi.org/10.1002/cphy.c150015> (In English)
- Hrabovszky, E., Wittmann, G., Turi, G. F. et al. (2005) Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology*, vol. 146, no. 1, pp. 341–347. <https://www.doi.org/10.1210/en.2004-0856> (In English)
- Hu, P., Liu, J., Maita, I. et al. (2020) Chronic stress induces maladaptive behaviors by activating corticotropin-releasing hormone signaling in the mouse oval bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Neuroscience*, vol. 40, no. 12, pp. 2519–2537. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2410-19.2020> (In English)
- Imaki, T., Xiao-Quan, W., Shibasaki, T. et al. (1995) Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 96, no. 1, pp. 231–238. <https://www.doi.org/10.1172/JCI118026> (In English)
- Jaferi, A., Bhatnagar, S. (2007) Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Research*, vol. 1186, pp. 212–223. <https://www.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.100> (In English)
- Janak, P. H., Tye, K. M. (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, vol. 517, no. 7534, pp. 284–292. <https://www.doi.org/10.1038/nature14188> (In English)
- Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992) Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 16, no. 2, pp. 115–130. [https://www.doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80175-7](https://www.doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80175-7) (In English)
- Joseph, D. N., Whirledge, S. (2017) Stress and the HPA axis: Balancing homeostasis and fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 10, article 2224. <https://www.doi.org/10.3390/ijms18102224> (In English)
- Ju, G., Swanson, L. W. (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 280, no. 4, pp. 587–602. <https://www.doi.org/10.1002/cne.902800409> (In English)
- Kadhim, H. J., Kang, S. W., Kuenzel, W. J. (2019) Differential and temporal expression of corticotropin releasing hormone and its receptors in the nucleus of the hippocampal commissure and paraventricular nucleus during

- the stress response in chickens (*Gallus gallus*). *Brain Research*, vol. 1714, pp. 1–7. <https://www.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.02.018> (In English)
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., Fox, A. S. et al. (2005) Brain regions associated with the expression and contextual regulation of anxiety in primates. *Biological Psychiatry*, vol. 58, no. 10, pp. 796–804. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.05.021> (In English)
- Keegan, C. E., Herman, J. P., Karolyi, I. J. et al. (1994) Differential expression of corticotropin-releasing hormone in developing mouse embryos and adult brain. *Endocrinology*, vol. 134, no. 6, pp. 2547–2555. <https://www.doi.org/10.1210/endo.134.6.8194481> (In English)
- Ketchesin, K. D., Stinnett, G. S., Seasholtz, A. F. (2017) Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: From invertebrates to humans. *Stress*, vol. 20, no. 5, pp. 449–464. <https://www.doi.org/10.1080/10253890.2017.1322575> (In English)
- Kirby, L. G., Rice, K. C., Valentino, R. J. (2000) Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, vol. 22, no. 2, pp. 148–162. [https://www.doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00093-7](https://www.doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00093-7) (In English)
- Kolber, B. J., Roberts, M. S., Howell, M. P. et al. (2008) Central amygdala glucocorticoid receptor action promotes fear-associated CRH activation and conditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 33, pp. 12004–12009. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.0803216105> (In English)
- Kondoh, K., Lu, Z., Ye, X. et al. (2016) A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature*, vol. 532, no. 7597, pp. 103–106. <https://www.doi.org/10.1038/nature17156> (In English)
- Koutmani, Y., Gampierakis, I. A., Polissidis, A. et al. (2019) CRH Promotes the neurogenic activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Reports*, vol. 29, no. 4, pp. 932–945. <https://www.doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.037> (In English)
- Kovács, K. J. (2013) CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 54, pp. 25–33. <https://www.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2013.05.003> (In English)
- Kovács, K. J., Sawchenko, P. E. (1993) Mediation of osmoregulatory influences on neuroendocrine corticotropin-releasing factor expression by the ventral lamina terminalis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 16, pp. 7681–7685. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.90.16.7681> (In English)
- Kunzel, H. E., Zobel, A. W., Nickel, T. et al. (2003) Treatment of depression with the CRH-1-receptor antagonist R121919: Endocrine changes and side effects. *Journal of Psychiatric Research*, vol. 37, no. 6, pp. 525–533. (In English)
- Larriva-Sahd, J. (2006) Histological and cytological study of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat. II. Oval nucleus: Extrinsic inputs, cell types, neuropil, and neuronal modules. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 497, no. 5, pp. 772–807. <https://www.doi.org/10.1002/cne.21011> (In English)
- LeDoux, J. (2007) The amygdala. *Current Biology*, vol. 17, no. 20, pp. R868–R874. <https://www.doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005> (In English)
- Makino, S., Gold, P. W., Schulkin, J. (1994a) Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, vol. 640, no. 1–2, pp. 105–112. [https://www.doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91862-7](https://www.doi.org/10.1016/0006-8993(94)91862-7) (In English)
- Makino, S., Gold, P. W., Schulkin, J. (1994b) Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis; comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, vol. 657, no. 1–2, pp. 141–149. [https://www.doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90961-x](https://www.doi.org/10.1016/0006-8993(94)90961-x) (In English)
- McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R. et al. (2015) CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. *Neuron*, vol. 87, no. 3, pp. 605–620. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.002> (In English)
- Morin, S. M., Ling, N., Liu, X.-J. et al. (1999) Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience*, vol. 92, no. 1, pp. 281–291. [https://www.doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00732-5](https://www.doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00732-5) (In English)
- Mountney, C., Anisman, H., Merali, Z. (2011) In vivo levels of corticotropin-releasing hormone and gastrin-releasing peptide at the basolateral amygdala and medial prefrontal cortex in response to conditioned fear in the rat. *Neuropharmacology*, vol. 60, no. 2–3, pp. 410–417. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.013> (In English)
- Myers, B., Greenwood-Van Meerveld, B. (2010) Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity. *Behavioural Brain Research*, vol. 214, no. 2, pp. 465–469. <https://www.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.049> (In English)
- Nijssen, M. J. M. A., Croiset, G., Diamant, M. et al. (2001) CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. *Neuropsychopharmacology*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10. [https://www.doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00167-6](https://www.doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00167-6) (In English)

- Paretkar, T., Dimitrov, E. (2018) The central amygdala corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons modulation of anxiety-like behavior and hippocampus-dependent memory in mice. *Neuroscience*, vol. 390, pp. 187–197. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.019> (In English)
- Pariante, C. M., Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, vol. 31, no. 9, pp. 464–468. <https://www.doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006> (In English)
- Pedersen, W. A., McCuller, D., Culmsee, C. et al. (2001) Corticotropin-releasing hormone protects neurons against insults relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, vol. 8, no. 3, pp. 492–503. <https://www.doi.org/10.1006/nbdi.2001.0395> (In English)
- Phillips, R., Kraeuter, A.-K., McDermott, B. et al. (2021) Human nail cortisol as a retrospective biomarker of chronic stress: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 123, article 104903. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104903> (In English)
- Prakash, N., Stark, C. J., Keisler, M. N. et al. (2020) Serotonergic plasticity in the dorsal raphe nucleus characterizes susceptibility and resilience to anhedonia. *The Journal of Neuroscience*, vol. 40, no. 3, pp. 569–584. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1802-19.2019> (In English)
- Refojo, D., Schweizer, M., Kuehne, C. et al. (2011) Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. *Science*, vol. 333, no. 6051, pp. 1903–1907. <https://www.doi.org/10.1126/science.1202107> (In English)
- Regev, L., Tsoory, M., Gil, S., Chen, A. (2012) Site-specific genetic manipulation of amygdala corticotropin-releasing factor reveals its imperative role in mediating behavioral response to challenge. *Biological Psychiatry*, vol. 71, no. 4, pp. 317–326. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.036> (In English)
- Reul, J. M. H. M., Sutanto, W., van Eekelen, J. A. M. et al. (1990) Central action of adrenal steroids during stress and adaptation. In: J. C. Porter, D. Ježová (eds.). *Circulating regulatory factors and neuroendocrine function*. Boston: Springer Publ., pp. 243–256. (Advances in experimental medicine and biology. Vol. 274). [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5799-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5799-5_15) (In English)
- Sah, P., Faber, E. S., Lopez de Armentia, M., Power, J. (2003) The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, vol. 83, no. 3, pp. 803–834. <https://www.doi.org/10.1152/physrev.00002.2003> (In English)
- Slominski, A. (2009) On the role of the corticotropin-releasing hormone signalling system in the aetiology of inflammatory skin disorders. *British Journal of Dermatology*, vol. 160, no. 2, pp. 229–232. <https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08958.x> (In English)
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, vol. 36, no. 3, pp. 165–186. <https://www.doi.org/10.1159/000123454> (In English)
- Thompson, R. C., Seasholtz, A. F., Douglass, J. O., Herbert, E. (1987) The rat corticotropin-releasing hormone gene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 512, no. 1, pp. 1–11. <https://www.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb24947.x> (In English)
- Valentino, R. J., Foote, S. L., Aston-Jones, G. (1983) Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Research*, vol. 270, no. 2, pp. 363–367. [https://www.doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90615-7](https://www.doi.org/10.1016/0006-8993(83)90615-7) (In English)
- Vranjkovic, O., Gasser, P. J., Gerndt, C. H. et al. (2014) Stress-induced cocaine seeking requires a beta-2 adrenergic receptor-regulated pathway from the ventral bed nucleus of the stria terminalis that regulates CRF actions in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 37, pp. 12504–12514. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0680-14.2014> (In English)
- Walker, D. L., Miles, L. A., Davis, M. (2009) Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 33, no. 8, pp. 1291–1308. <https://www.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.06.022> (In English)
- Wong, M. L., Licinio, J., Pasternak, K. I., Gold, P. W. (1994) Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology*, vol. 135, no. 5, pp. 2275–2278. <https://www.doi.org/10.1210/endo.135.5.7956950> (In English)
- Wong, M.-L., Loddick, S. A., Bongiorno, P. B. et al. (1995) Focal cerebral ischemia induces CRH mRNA in rat cerebral cortex and amygdala. *NeuroReport*, vol. 6, no. 13, pp. 1785–1788. <https://www.doi.org/10.1097/00001756-199509000-00019> (In English)
- Yehuda, R., Hoge, C. W., McFarlane, A. C. et al. (2015) Post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1, article 15057. <https://www.doi.org/10.1038/nrdp.2015.57> (In English)
- Zhao, J., Qi, X.-R., Gao, S.-F. et al. (2015) Different stress-related gene expression in depression and suicide. *Journal of Psychiatric Research*, vol. 68, pp. 176–185. <https://www.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.06.010> (In English)



UDC 612.438:616-008.3/.5

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-15-20>

## Thymic mast cells: From morphology to physiology

A. V. Polevshchikov<sup>✉1</sup>, V. V. Guselnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Str., Saint Petersburg 197376, Russia

### Authors

Alexander V. Polevshchikov,  
SPIN: 9627-6694,  
Scopus AuthorID: 6603923475,  
ORCID: 0000-0002-3342-178X,  
e-mail: [ALEXPOL512@yandex.ru](mailto:ALEXPOL512@yandex.ru)

Valeriia V. Guselnikova,  
SPIN: 5115-4320,  
Scopus AuthorID: 55354616100,  
ORCID: 0000-0002-9499-8275,  
e-mail:  
[Guselnikova.Valeriia@yandex.ru](mailto:Guselnikova.Valeriia@yandex.ru)

### For citation:

Polevshchikov, A. V.,  
Guselnikova, V. V.  
(2021) Thymic mast cells: From  
morphology to physiology.  
*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 15–20.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-15-20>

**Received** 28 January 2021;  
reviewed 17 February 2021;  
accepted 22 February 2021.

**Funding:** The work was carried out  
as part of the State Assignment  
(No. 075-00786-19-00) on the topic  
“Immunological basis of the body’s  
defensive reactions”  
(code 0557-2019-0006).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** This minireview summarizes some of our results on the structure, origin, and functions of thymic mast cells, as well as their role in stress-induced thymic atrophy. A comparison of the thymic mast cells with the connective tissue and mucosa mast cells is carried out. The morphological and cytochemical similarity of thymic and mucosa mast cells has been proven. The mechanisms of neuro-mast cell interaction, as well as the features of intercellular signaling are analyzed. Another aspect of the review is related to the assessment of thymic mast cell functions in stress-induced atrophy. It is hypothesized that the main function of these cells under stress is to regulate the T-cell emigration. The role of the thymus as an endocrine gland is also discussed. Probably, its endocrine function is mainly associated with the thymic mast cells which are regulated by the nervous system. Regardless of their localization and despite their hemopoietic origin, all mast cells are an important addition to the nervous system. They are a unique combination of both receptor and effector cells located in all organs and tissues. The mast cells supply the central nervous system with information about any local changes in tissue homeostasis and enhance local nervous influences. At the same time, mast cells are extremely important for neuro-immune communication as well as their mutual control on local defense reactions and mucosa conditions.

**Keywords:** mast cells, thymus, neuroimmune interactions, mast cell-nerve contacts, stress, mediators.

### Introduction

The role of mast cells (MCs) in neuroimmune interactions has been the subject of intense research in recent years. By PubMed, about 1,700 publications on this topic are published in the world per year. Such interest in MCs is associated with their detection in almost all organs and tissues, including the brain (Grigorev, Korzhhevskii 2021), their involvement in allergic reactions (Gushchin 2020), their ability to synthesize a broad spectrum of cytokines,

chemokines, and growth factors, with potential autocrine, paracrine, local, and systemic effects (Da Silva et al. 2014; Mukai et al. 2018). These molecules play a critical role in the regulation of both immune reactions and a variety of brain and physiological functions (Forsythe 2019). The involvement of MCs in the regulation of the maturation and differentiation of immunocompetent cells and the immune response became an undoubted fact after the discovery of the intrathymic MC population (Bodey et al. 1987).

Interest in MCs physiology arose after the discovery of intercellular contacts between MCs and nerve terminals and experimental evidence of functional interactions between them (Pearce et al. 1989). Based on these results, it was suggested that MC are simultaneously cells of the nervous and immune systems, which provide bilateral translation and transformation of signals from peptides, cytokines, hormones, and other macromolecules as well as mutual regulation of functions (Forsythe 2019). This hypothesis is valid for all the described MC populations, their participation in neuroimmune interactions in connective tissue and mucosa. But the thymic MC population remains poorly studied.

Therefore, a brief analysis of the intrathymic mast cell population and mechanisms of its participation in neuroimmune interactions under stress will be carried out in this minireview.

### Morphology and physiology of thymic mast cells

MCs appear in the thymus already during embryogenesis. According to our data, they are detected in the mouse thymus from the 19<sup>th</sup> day of gestation. MCs are localized in the medulla and deep cortex during embryogenesis, and they are found mainly in the connective tissue of septa, trabeculae, and perivascular area in adult animals (Gusel'nikova et al. 2012). Thymic mast cells have a large, light, unsegmented nucleus (4–7  $\mu\text{m}$ ). The linear dimensions of rounded or oval thymic MCs are 8–12  $\mu\text{m}$  in embryogenesis and they increase till 15–25  $\mu\text{m}$  in adult mice. The cytoplasm of mature mast cell contains approximately 1,000 granules (Komi et al. 2020).

The composition of the granules of all MCs, including thymic ones, is rather similar. To characterize the functions of MCs, it turned out to be very convenient to divide the components of their granules into preformed ones, which provide MC immediate reactions and synthesize *de novo* in response to activation, which, in turn, are associated with long-term MC responses (Forsythe 2019). Preformed components of thymic MC granules are proteases (cathepsins C, G, B, L, D, E, caspases-1, -3, serine proteases tryptase and chymase, metalloproteinases), biogenic amines (histamine, serotonin, dopamine, polyamines), proteoglycans (chondroitin-4- and -6-sulfates, but not heparin) as well as numerous cytokines and growth factors (TNF $\alpha$ , IL-4, GM-CSF, FGF $\beta$ , VEGF, NGF). Upon activation, MCs synthesize a wide range of regulatory cytokines (IL-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -12, -13, -14, -16, -18, -25, -37, TNF $\alpha$ ), chemokines (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , RANTES, TARC (CCL-17), eotaxin),

growth factors (TGF $\beta$ , SCE, GM-CSF, MCSF, FGF $\beta$ , PDGF, VEGF, NGF), as well as neuropeptides (CRF, VIP, SP) and eicosanoids (LT-B<sub>4</sub>, -C<sub>4</sub>, PAF, PGD<sub>2</sub>) (Da Silva et al. 2014; Forsythe 2019; Komi et al. 2020; Mukai et al. 2018).

In humans, MCs are traditionally classified based on the composition of produced serine proteases, tryptase and chymase. There are two main phenotypes of human MCs: MCs containing only tryptase (predominantly reside in the mucosa of the small intestine and alveolar septa) and MCs containing tryptase, chymase, and carboxypeptidases (generally found in the skin, submucosal layers of the small intestine, and tonsils). MCs containing only chymase are rare and found in synovial tissue. MCs of rodents are also classified in two main subsets: connective tissue MCs (CTMCs) located in the skin, peritoneal cavity, and intestinal submucosa and the mucosal MCs (MMC) residing in mucosal layers (Komi et al. 2020; Krystel-Whittemore et al. 2016).

The nature of the thymic MCs is still unclear. There are variants of their origin from a bone marrow progenitor (common with blood basophils) (Da Silva et al. 2014; Forsythe 2019) or immature thymocytes (Scripture-Adams et al. 2014; Winandy, Brown 2007). Our results do not allow us to conclude the nature of MCs. But we found out that immature thymic MCs pass all stages of differentiation within one thymic lobule (Gusel'nikova, Polevshchikov 2013). The first MCs appear in the deep cortex and the medulla of the mouse thymus on the 19<sup>th</sup> day of gestation (Gusel'nikova et al. 2012). During granule maturation, they move to the subcapsular region as well as to the capsule and connective tissue trabeculae (Gusel'nikova, Polevshchikov 2013), where they come into contact with nerve terminals (Gusel'nikova et al. 2015). The intrathymic stages of MCs maturation indirectly testify in favor of the lymphoid origin of thymic MCs.

The existence of contacts between thymic MCs and nerve terminals gives an opportunity to estimate their role in neuroimmune interactions and a possible mediating function (Schiller et al. 2020). The key molecules in neuro-MC contacts are N-cadherin and CADM1 on both cells, as well as nestin-3 on the nerve terminals (Forsythe 2019). Intrathymic MCs have been linked to neuro(endocrine)-immune circuits involving MCs-peptidergic nerve contacts and changes in the number of MCs inside the organ have been reported in a series of experimental conditions related to the manipulation of the neuroendocrine axis (Ribatti, Crivellato 2016). According to the latest data, MCs interact with the nervous system through degranulation, *de novo* synthesis, extracellular vesicles, tunneling nanotubes, and extracellular traps (Mittal et al. 2019).

MCs express receptors for various neurotransmitters and neuropeptides and are modulated by them, allowing neural control of mast cell function. Conversely, MCs also directly trigger neuron activation through mediators, including cytokines, histamine, neurotransmitters, and neurotrophic factors, causing acute activation and long-lasting changes in excitability and neuronal phenotypes (Forsythe 2019; Xu et al. 2020).

Soluble mediators realize nerve-MC interaction but it is possible to move the whole granule to the neuron cytoplasm (Wilhelm et al. 2005). The Figure 1 shows key mechanisms and a shortlist of the signaling molecules that are exchanged between MCs and neurons. Importantly, MC can act as both a receptor cell and an effector cell. MC can generate an afferent signal to the CNS, as well as translate the efferent signal from the CNS into a set of secreted cytokines and growth factors. This contact is often referred to as a “neuro-MC functional unit” (Kleij, Bienenstock 2005). The role of MC as a receptor cell is effectively illustrated by the presence of serotonin and dopamine in its granules, which may be key mediators for afferent signals to the brain about any inflammatory disorders (Wernersson, Pejler 2014; Herr et al. 2017).

Perivascular localization of MCs in the thymus may be directly related to the thymic endocrine

function (Hadden 1992). Until the beginning of the 1990s, the thymus was considered as one of the sources of somatostatin, CGRP, CRE, VIP, SP, oxytocin, and vasopressin (Savino et al. 1999). However, it is MCs that are the only thymic cells capable of secretion. The set of thymus hormones is very close to the set of MC secretory products (Fig. 1). There is a reason to believe that all thymic hormones are the results of neuro-MC interactions synthesized by either MCs or nerve terminals.

### Role of thymic MCs in stress

Stress-induced thymic atrophy is the classic and most obvious manifestation of thymic responses to the effects of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and MCs are actively involved in this process (James et al. 2018). The number of degranulating thymic MCs increases in 4–8 hrs after an increase in corticosteroid levels in the blood (Guselnikova, Polevshchikov 2013). The triggering of degranulation may be associated with signals from adrenergic and noradrenergic nerve endings (Bellinger et al. 1992). The perivascular localization of thymic MCs and the set of MC mediators suggest their participation in the processes of cell extrathymic migration in response to a stress stimulus (Godinho-Silva et al. 2019). Direct morphological data confirm the exit

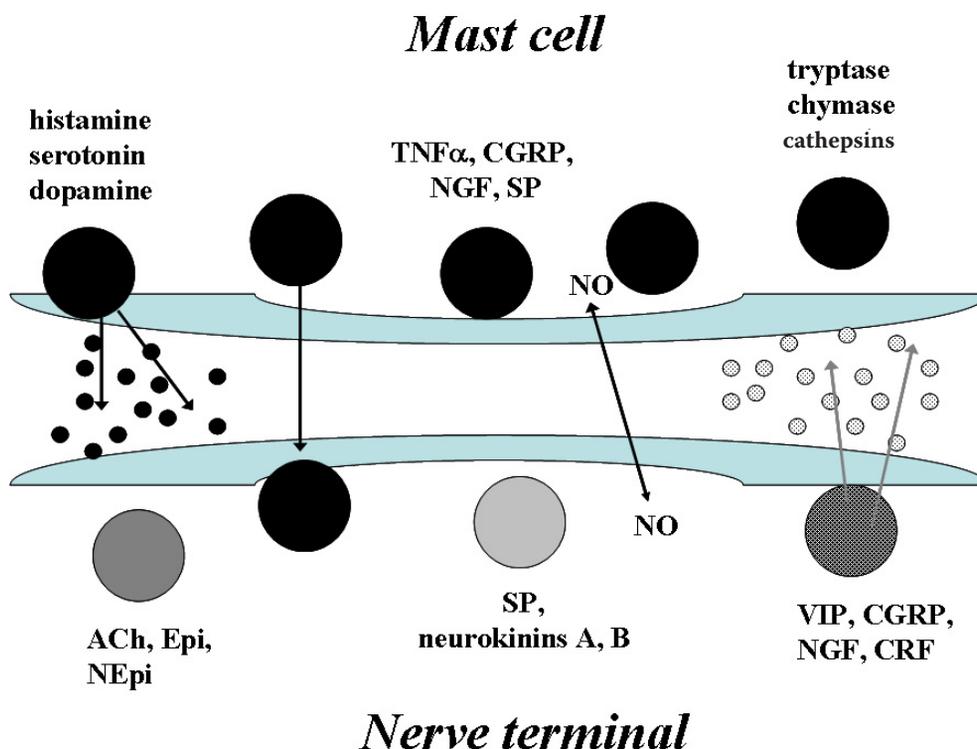


Fig. 1. The main mediators and ways of transferring molecules in neuro-mast cell contacts

of a significant part of living cells from the thymus throughout the lymphatic vessels in response to glucocorticoid hormone releasing (Kato, Schoeffl 1989). This result was indirectly confirmed by the results of a cytometric assessment of thymocyte viability during stress-induced atrophy. Inside the thymic cortex, only 60–70% of immature DP thymocytes die by apoptosis under stress, while the rest of the cortical cells leave the organ (Starskaya et al. 2015). The role of the alive DP-thymocyte releasing during the stress reaction from the thymus to the bloodstream remains unclear.

The subsequent involvement of thymic MCs in the repopulation of cortical thymocytes after the stress reaction has also been studied in detail. It was found that the number of thymic MCs significantly increases within 4–7 days after stress-induced thymic involution. It is assumed that peptidergic nerve terminals play an important role in this process stimulating the differentiation and degranulation of new MCs (Bellinger et al. 1992; Forsythe 2019; Varricchi et al. 2019). MC growth factors and cytokines (especially SCF, VEGF, TGF- $\beta$ , NGF, PDGF, GM-CSF, FGF- $\beta$ , IL-2, -3, -4, -10) provide accelerated repopulation of cortical thymocytes after stress (Da Silva et al. 2014).

The influence of MC neuropeptides on the thymocytes maturation and differentiation occurs after a stress reaction as well as during the normal T-cell development and the immune response. VIP has an anti-inflammatory effect and inhibits the functions of Th1 and Th17 (Ran et al. 2015). CGRP has a similar anti-inflammatory effect, which provides the predominant formation of Th2 in the thymus and their production of IL-4 (Assas et al. 2014). It is CGRP, acting together with somatostatin and neuropeptide Y, that very effectively ensures the attachment of proliferating thymocytes to fibronectin of the thymic stroma and their proliferation (Springer et al. 2003). On the contrary, tachykinins have opposite proinflammatory effects on maturing thymocytes. SP and neurokinin A have a particularly significant effect at all the stages of intrathymic T-cell development and their activation in peripheral lymphoid organs. At the same time, both nerve terminals and MCs can be the source of all these neuropeptides, however, the local concentration of peptides created by MCs will be much higher (Forsythe 2019). It was found that both CD4 and CD8 T-cells express functional NK1R that, together with SP and hemokinin-1, co-localize within the

immune synapse during cognate activation of T-cells. Simultaneous TCR and NK1R stimulation is necessary for the survival of activated T-cells, helper 1 (Th1) and Th17 bias (Morelli et al. 2020).

### From integrative physiology to personalized medicine

MCs are a good example of the relevance of an integrative approach in physiology. The history of MC study over 140 years has led to the description of many phenomena, but the real role of MCs is being revealed only now. Probably, MCs are a unique addition to the nervous system capacities. Their combination of receptor and effector capacities and their localization in all organs and tissues simultaneously supply the CNS with information about any local changes in tissue homeostasis and enhance the local regulatory effects of the nervous system. MCs are instrumental in the communication of the nervous and immune systems as well as in their mutual control of the barrier epithelium.

At present, the prospects for the application of knowledge about MC physiology in the clinical practice of many diseases are already being considered. Data on neuro-MC interactions are already used in the study and treatment of solid and hematologic cancers (Sammarco et al. 2019; Varricchi et al. 2017). New approaches to the therapy of heart diseases and atherosclerosis are also based on the information about neuro-MC interactions. The new data on MC functions are extremely important for solving the problems of Crohn's disease, intestinal and upper respiratory tract polyposis, atypical forms of bronchial asthma and rhinitis of unknown etiology (Da Silva et al. 2014; Varricchi et al. 2019). Within a few years the image of neuro-mast cell contacts may be found on the cover of new guidelines on integrative physiology.

### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Author contributions

V. V. Guselnikova: writing, editing and approval of the final version of the article;

A. V. Polevshchikov: the concept and design of the article, writing, editing and approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

### Abbreviations

*ACh* — acetylcholine, *CADMI* — cell adhesion molecule-1, *CGRP* — calcitonin gene-related peptide, *CNS* — central nervous system, *CRF* — corticotropin-releasing factor, *DP* — double positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)

immature thymocytes, *Epi* — epinephrine (adrenaline), *FGFβ* — fibroblast growth factor-β, *GM-CSF* — granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *IL* — interleukin, *LT* — leukotriene, *MC* — mast cell, *MCP-1* — monocyte chemoattractant protein-1, *MCSF* — macrophage colony-stimulating factor, *MIP-1* — macrophage inflammatory protein-1, *NEpi* — norepinephrine (noradrenaline), *NGF* — nerve growth factor, *PAF* — platelet-activating factor, *PDGF* — platelet-derived growth factor, *PG* — prostaglandin, *RANTES* — chemokine CCL5 (Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), *SCF* — stem cell factor, *SP* — substance P, *TARC* — chemokine CCL-17 (Thymus and Activation Regulation Chemokine), *TGFβ* — transforming growth factor-β, *Th* — T-helper, *TNFα* — tumor necrosis factor-α, *VEGF* — vascular endothelial growth factor, *VIP* — vasoactive intestinal peptide

## References

- Assas, B. M., Pennock, J. I., Miyan, J. A. (2014) Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 8, article 23. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2014.00023> (In English)
- Bellinger, D. L., Lorton, D., Felten, S. Y., Felten, D. L. (1992) Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 14, no. 3, pp. 329–344. [https://www.doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90162-e](https://www.doi.org/10.1016/0192-0561(92)90162-e) (In English)
- Bodey, B., Calvo, W., Prummer, O. et al. (1987) Development and histogenesis of the thymus in dog. A light and electron microscopical study. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 11, no. 1, pp. 227–238. [https://www.doi.org/10.1016/0145-305x\(87\)90023-1](https://www.doi.org/10.1016/0145-305x(87)90023-1) (In English)
- Da Silva, E. Z. M., Jamur, M. C., Oliver, C. (2014) Mast cell function: A new vision of an old cell. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 62, no. 10, pp. 698–738. <https://www.doi.org/10.1369/0022155414545334> (In English)
- Forsythe, P. (2019) Mast cells in neuroimmune interactions. *Trends in Neurosciences*, vol. 42, no. 1, pp. 43–55. <https://www.doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006> (In English)
- Godinho-Silva, C., Cardoso, F., Veiga-Fernandes, H. (2019) Neuro-immune cell units: A new paradigm in physiology. *Annual Review of Immunology*, vol. 37, pp. 19–46. <https://www.doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041812> (In English)
- Grigorev, I. P., Korzhevskii, D. E. (2021) Tuchnye kletki v golovnom mozge pozvonochnykh — lokalizatsiya i funktsii [Mast cells in the vertebrate brain: Localization and functions]. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii — Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 57, no. 1, pp. 17–32. <https://www.doi.org/10.31857/S0044452921010046> (In Russian)
- Gusel'nikova, V. V., Sukhorukova, E. G., Fedorova, E. A. et al. (2015) A method for the simultaneous detection of mast cells and nerve terminals in the thymus in laboratory mammals. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 45, no. 4, pp. 371–374. <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0084-x> (In English)
- Gusel'nikova, V. V., Polevshchikov, A. V. (2013) Izmeneniya populyatsii tuchnykh kletok timusa posle aktsidental'noj transformatsii [Changes of thymic mast cell population after accidental transformation]. *Tsitokiny i vospalenie — Cytokines and Inflammation*, vol. 12, no. 1–2, pp. 125–130. (In Russian)
- Gusel'nikova, V. V., Polevshchikov, A. V. (2013) Tuchnye kletki timusa myshi v norme i pri aktsidental'noj transformatsii [Mouse thymic mast cells in normal state and after stress-induced atrophy]. *Rossiiskij allergologicheskij zhurnal — Russian Journal of Allergy*, vol. 10, no. 4, pp. 24–32. <https://doi.org/10.36691/RJA501> (In Russian)
- Gusel'nikova, V. V., Sinit'syna, V. F., Korolkova, E. D. et al. (2012) Lokalizatsiya tuchnykh kletok v timuse myshi na raznykh etapakh ontogeneza [Thymic mast cell localization at different stages of the ontogenesis in the mouse]. *Morphologiia — Morphology*, vol. 141, no. 2, pp. 40–45. (In Russian)
- Gushchin, I. S. (2020) Samoogranichenie i razreshenie allergicheskogo protsessa [Autorestriction and resolution of allergic process]. *Immunologiya*, vol. 41, no. 6, pp. 557–580. <https://www.doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-6-557-580> (In Russian)
- Hadden, J. W. (1992) Thymic endocrinology. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 14, no. 3, pp. 345–352. [https://www.doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90163-f](https://www.doi.org/10.1016/0192-0561(92)90163-f) (In English)
- Herr, N., Bode, C., Duerschmied, D. (2017) The effects of serotonin in immune cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 4, article 48. <https://www.doi.org/10.3389/fcvm.2017.00048> (In English)
- James, K. D., Jenkinson, W. E., Anderson, G. (2018) T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 104, no. 2, pp. 275–284. <https://www.doi.org/10.1002/jlb.1mr1217-496r> (In English)
- Kato, S., Schoefl, C. I. (1989) Microvasculature of normal and involuted mouse thymus. *Cells Tissues Organs*, vol. 135, no. 1, pp. 1–11. <https://www.doi.org/10.1159/000146715> (In English)
- Kleij, H., Bienenstock, J. (2005) Significance of conversation between mast cells and nerves. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, vol. 1, no. 2, pp. 65–80. <https://www.doi.org/10.1186/1710-1492-1-2-65> (In English)

- Komi, D. E. A., Wöhrle, S., Bielory, L. (2020) Mast cell biology at molecular level: A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, vol. 58, no. 3, pp. 342–365. <https://www.doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2> (In English)
- Krystel-Whittemore, M., Dileepan, K. N., Wood, J. G. (2016) Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, vol. 6, article 620. <https://www.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620> (In English)
- Mittal, A., Sagi, V., Gupta, M., Gupta, K. (2019) Mast cell neural interactions in health and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 13, article 110. <https://www.doi.org/10.3389/fncel.2019.00110> (In English)
- Morelli, A. E., Sumpter, T. L., Rojas-Canales, D. M. et al. (2020) Neurokinin-1 receptor signaling is required for efficient Ca<sup>2+</sup> flux in T-cell-receptor-activated T-cells. *Cell Reports*, vol. 30, no. 10, pp. 3448–3465. <https://www.doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.054> (In English)
- Mukai, K., Tsai, M., Saito, H., Galli, S. J. (2018) Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews*, vol. 282, no. 1, pp. 121–150. <https://www.doi.org/10.1111/imr.12634> (In English)
- Pearce, F. L., Kassessinoff, T. A., Liu, W. L. (1989) Characteristics of histamine secretion induced by neuropeptides: Implications for the relevance of peptide-mast cell interactions in allergy and inflammation. *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 88, no. 1–2, pp. 129–131. <https://www.doi.org/10.1159/000234764> (In English)
- Ran, W.-Z., Dong, L., Tang, C.-Y. et al. (2015) Vasoactive intestinal peptide suppresses macrophage-mediated inflammation by downregulating interleukin-17A expression via PKA- and PKC-dependent pathways. *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 96, no. 4, pp. 269–275. <https://www.doi.org/10.1111/iep.12130> (In English)
- Ribatti, D., Crivellato, E. (2016) The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples. *Experimental Cell Research*, vol. 341, no. 1, pp. 105–109. <https://www.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.022> (In English)
- Sammarco, G., Varricchi, G., Ferraro, V. et al. (2019) Mast cells, angiogenesis and lymphangiogenesis in human gastric cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 9, article 2106. <https://www.doi.org/10.3390/ijms20092106> (In English)
- Savino, W., Arzt, E., Dardenne, M. (1999) Immunoneuroendocrine connectivity: The paradigm of the thymus-hypothalamus/pituitary axis. *Neuroimmunomodulation*, vol. 6, no. 1–2, pp. 126–136. <https://www.doi.org/10.1159/000026372> (In English)
- Schiller, M., Ben-Shaanan, T. L., Rolls, A. (2020) Neuronal regulation of immunity: Why, how and where? *Nature Reviews Immunology*, vol. 21, no. 1, pp. 20–36. <https://www.doi.org/10.1038/s41577-020-0387-1> (In English)
- Scripture-Adams, D. D., Damle, S. S., Li, L. et al. (2014) GATA-3 Dose-dependent checkpoints in early T-cell commitment. *The Journal of Immunology*, vol. 193, no. 7, pp. 3470–3491. <https://www.doi.org/10.4049/jimmunol.1301663> (In English)
- Springer, J., Geppetti, P., Fischer, A., Gronebergad, D. A. (2003) Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 16, no. 3, pp. 121–130. [https://www.doi.org/10.1016/s1094-5539\(03\)00049-x](https://www.doi.org/10.1016/s1094-5539(03)00049-x) (In English)
- Starskaya, I. S., Kudryavtsev, I. V., Guselnikova, V. V. et al. (2015) Apoptosis level in developing T-cells in the thymus. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 462, no. 1, pp. 163–165. <https://www.doi.org/10.1134/s1607672915030060> (In English)
- Varricchi, G., de Paulis, A., Marone, G. et al. (2019) Future needs in mast cell biology. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 18, article 4397. <https://www.doi.org/10.3390/ijms20184397> (In English)
- Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S. et al. (2017) Are mast cells MASTers in Cancer? *Frontiers in Immunology*, vol. 8, article 424. <https://www.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00424> (In English)
- Wernersson, S., Pejler, G. (2014) Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 7, pp. 478–494. <https://www.doi.org/10.1038/nri3690> (In English)
- Wilhelm, M., Silver, R., Silverman, A. J. (2005) Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *European Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 9, pp. 2238–2248. <https://www.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04429.x> (In English)
- Winandy, S., Brown, M. (2007) No DL1 notch ligand? GATA be a mast cell. *Nature Immunology*, vol. 8, no. 8, pp. 796–797. <https://www.doi.org/10.1038/ni0807-796> (In English)
- Xu, H., Shi, X., Li, X. et al. (2020) Neurotransmitter and neuropeptide regulation of mast cell function: A systematic review. *Journal of Neuroinflammation*, vol. 17, article 356. <https://www.doi.org/10.1186/s12974-020-02029-3> (In English)



УДК 612.338

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-21-32>

## О роли кишечных бактерий в физиологической регуляции аппетита и энергетического обмена

С. О. Фетисов<sup>✉1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Руанский университет, 76130, Франция, Руан, г. Мон-Сен-Эньян, ул. Тома Бекета, д. 1

<sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12

<sup>3</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

### Сведения об авторе

Сергей Олегович Фетисов,  
SPIN-код: 7974-1782,  
ResearcherID: H-6023-2016,  
ORCID: 0000-0002-2491-4945,  
e-mail: [Serguei.Fetisov@univ-rouen.fr](mailto:Serguei.Fetisov@univ-rouen.fr)

### Для цитирования:

Фетисов, С. О.  
(2021) О роли кишечных бактерий в физиологической регуляции аппетита и энергетического обмена. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 21–32.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-21-32>

**Получена** 9 февраля 2021; прошла рецензирование 28 февраля 2021; принята 1 марта 2021.

**Финансирование:** Исследование поддержано НЦМУ «Павловский центр Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости» (грант № 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

**Права:** © Автор (2021).  
Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** В основе современного понимания регуляции аппетита лежит так называемая «гомеостатическая модель», которая предполагает, что переход от чувства голода к сытости и наоборот зависит от интенсивности энергетического обмена в организме. При этом изменение содержания энергетических субстратов в органах и тканях кодируется и передается в мозг нервной и эндокринной системами. Однако низкая метаболическая активность основных энергоемких тканей, например жировой, не позволяет объяснить краткосрочную регуляцию аппетита. В настоящей статье представлены данные, указывающие на участие микробиоты в регуляции аппетита. Прежде всего, суточная метаболическая активность кишечных бактерий (2 ккал/г) примерно в 100 раз выше, чем у организма взрослого человека, что может являться основой быстрого воздействия продуктов синтеза бактерий на краткосрочную регуляцию аппетита. Кроме того, совпадение динамики роста бактерий, регулируемой внутренними факторами микробной популяции, с изменением аппетита хозяина является индикатором функционального взаимодействия обоих процессов. Действительно, было показано, что при регулярном питании продолжительность экспоненциальной фазы роста кишечных бактерий равна 20 мин, что в точности соответствует времени, необходимому для формирования физиологического чувства насыщения. Определение бактериального белка казеинолитической протеазы (ClpV) в роли миметика ключевого анорексигенного гормона меланотропина позволило понять молекулярный механизм взаимодействия бактерий с системой передачи сигналов насыщения в кишечнике. Повышенное содержание белка ClpV в стационарной фазе роста бактерий указывает на его физиологическую роль в индукции чувства сытости у хозяина. Практическим применением этих исследований явилась разработка ClpV-содержащих пробиотиков для повышения чувства сытости и снижения веса тела при ожирении. Таким образом, по мнению автора, активная физиологическая роль кишечных бактерий в механизме чувства насыщения и сытости должна стать неотъемлемой частью «гомеостатической модели» регуляции аппетита.

**Ключевые слова:** аппетит, пищевое поведение, сытость, энергетический обмен, питание, микробиота кишечника, нейропептиды, мозг, пробиотики.

# Role of gut bacteria in the physiological regulation of appetite and energy metabolism

S. O. Fetissov <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Rouen University, 1 Rue Thomas Becket, Mont-Saint-Aignan 76130, France

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, 12 Akad. Pavlova Str., Saint Petersburg 197376, Russia

<sup>3</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

## Author

Sergueï O. Fetissov,  
SPIN: 7974-1782,  
ResearcherID: H-6023-2016,  
ORCID: 0000-0002-2491-4945,  
e-mail: [Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr](mailto:Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr)

## For citation:

Fetissov, S. O.  
(2021) Role of gut bacteria in the physiological regulation of appetite and energy metabolism. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 21–32.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-21-32>

**Received** 9 February 2021;  
reviewed 28 February 2021;  
accepted 1 Mart 2021.

**Funding:** This study was supported by the Pavlov Center for Integrative Physiology for Personal Medicine, High-Tech Healthcare, and Stress Resistance Technology (grant no. 075-15-2020-921 as of 13 November 2020).

**Copyright:** © The Author (2021).  
Published by Herzen State Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Abstract.** The current “homeostatic theory” of appetite regulation assumes that alternation of hunger and satiety depends on energy balance in the host tissues encoded and transmitted to the brain by neuronal and hormonal signals. However, relatively low metabolic activity of fat tissue cannot explain short-term regulation of appetite. In this paper, I am presenting the evidence supporting bacterial contribution to the appetite regulation by showing that energy metabolism of gut bacteria can be linked to the host appetite cycles. Indeed, the daily metabolic activity of gut bacteria (~2 kcal/g) is about 100 times higher than that of the human body. Importantly, the reproduction cycle of gut bacteria, which is independently regulated from the host, is temporally identical to the short-term changes of appetite; 20 min of the bacterial exponential growth duration corresponds to 20 min necessary for physiological satiation. In further support of the “microbial theory”, molecular pathways linking gut bacteria with the host regulation of appetite have been identified. For instance, bacterial caseinolytic protease B (ClpB), whose production increases during the bacterial stationary growth phase, i. e., when the host is satiated, acts as a conformational mimetic of anorexigenic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and activates the intestinal satiety pathway. The practical utility to stimulate this pathway and to control body weight gain in obesity was recently validated using ClpB-expressing probiotics. Thus, an important functional contribution of gut bacteria to the host energy metabolism should be considered as a new integral part of the “homeostatic theory” of appetite regulation.

**Keywords:** appetite, feeding behavior, satiety, energy metabolism, nutrition, gut microbiota, neuropeptides, brain, probiotics.

*«Недаром над всеми явлениями человеческой жизни господствует забота о насущном хлебе...»*

*И. П. Павлов*

## Введение

Регуляция аппетита и пищевого поведения является одной из ключевых тем интегративной физиологии. Важнейшую роль в этой регуляции играет взаимодействие кишечника с мозгом, выявленное уже более 100 лет назад И. П. Павловым и его коллегами. В своей речи по случаю присуждения Нобелевской премии в 1904 г. И. П. Павлов говорил: «...Точное знание судьбы пищи в организме должно составить предмет идеальной физиологии, физиологии будущего...» (Павлов 1951, 347). Современная наука действительно значительно продвинулась в понимании регуляции пищеварения, аппетита и пищевого поведения путем открытия молекулярно-

генетических основ этих процессов. Изначальная павловская концепция функциональной связи «кишечник — мозг» далее развивалась и укреплялась, например, открытием ряда пептидных гормонов (холецистокинин, нейропептид тирозин и др.), продуцируемых одновременно и в кишечнике, и в мозге, которые участвуют в интеграции процессов пищеварения, аппетита и когнитивной функции (Mayer 2011; Mutt 1988). Однако, несмотря на значительный прогресс в понимании молекулярных основ регуляции аппетита, эта проблема по-прежнему остается неразрешенной. Так, мировая «эпидемия» ожирения в большой степени связана с банальным перееданием и отсутствием эффективных и безопасных анорексигенных медикаментозных средств для профилактики и лечения гиперфагии. С другой стороны, механизмы происхождения нейропсихиатрических заболеваний, сопровождающихся

выраженными нарушениями пищевого поведения, таких как нервная анорексия и булимия, не окончательно раскрыты. Это выражается в том, что специфического лечения этих заболеваний не существует, и примерно 50% пациентов страдают от их хронических форм. Кроме того, смертность от нервной анорексии составляет около 10%, что является самым высоким показателем среди всех психиатрических заболеваний (Harris, Barraclough 1998). Анорексия как синдром при некоторых формах рака также представляет серьезную клиническую проблему, ухудшая прогноз выздоровления. Такая тревожная ситуация отражает недостаточное понимание физиологических механизмов регуляции аппетита и пищевого поведения и вызывает необходимость их дальнейшего исследования. Настоящая статья проливает свет на новое направление в исследованиях регуляции аппетита. В статье обсуждаются теоретические и экспериментальные данные, указывающие на возможную ключевую роль кишечных бактерий.

### Развитие теорий регуляции аппетита

Аппетит часто ассоциируется с чувством голода, отличаясь от более широкого применения этого термина в научной литературе, в которой он описывается как физиологическая и эмоциональная составляющие различных видов мотивированного поведения, пищевого в том числе. Аппетит включает в себя висцеральные и эмоциональные ощущения, характерные для каждой из его трех основных фаз: чувство голода, чувство насыщения и чувство сытости (Blundell et al. 2010). В настоящей статье используется именно такое понятие аппетита. Переход от чувства голода через процесс насыщения к сытости, продолжающейся до появления нового чувства голода, составляет один цикл аппетита. Чередование таких циклов является движущей силой (драйвом) или мотивацией для осуществления пищевого поведения, выраженного в поиске, поглощении и переваривании пищи. Анализ выбора пищи и процесса ее потребления в норме и патологии являются основными подходами к исследованию аппетита. Было установлено, что длительность физиологической фазы насыщения у человека составляет 20 мин после начала приема пищи, затем переходя в фазу сытости средней продолжительности 5–6 ч (Labouré et al. 2002). Такой интервал между приемами пищи соответствует промежуткам между завтраком, обедом и ужи-

ном, т. е. обычному ритму питания, сформированному под воздействием естественного колебания аппетита в течение суток.

Поразительная стабильность чередования циклов аппетита подразумевает их точную регуляцию. Природа аппетита всегда вызывала интерес у физиологов, однако до сих пор не все механизмы этого процесса ясны. Например, нет четких ответов на вопросы, почему насыщение наступает именно через 20 мин, или почему нельзя наестся впрок, так как голод все равно появится через 5–6 часов. В настоящей статье автор предлагает новые подходы для решения этих вопросов. В историческом плане формулировка теорий, объясняющих регуляцию аппетита, следовала появлению новых данных о влиянии тех или иных факторов на изменения в пищевом поведении, выражавшиеся в повышении или снижении приема пищи (Hopkins, Blundell 2017). Основные теории аппетита можно условно разделить на механические, биохимические и метаболические. Очевидно, что новые теории учитывали предыдущие и становились более комплексными. Обзор ранних теорий регуляции аппетита прекрасно представлен в монографии А. М. Уголева (Уголев 1991).

Так, Вальтер Каннон, современник И. П. Павлова и автор теории гомеостаза, считал, что растяжение желудка после приема пищи служит главным сигналом к насыщению. Изменения уровня питательных веществ в крови легли в основу различных теорий аппетита, получивших названия в соответствии с каждым макронутриентом: углеводы — «глюкостатическая» — Майер, 1953 (Mayer 1953); жиры — «липостатическая» — Кеннеди, 1953 (Kennedy 1953); белки и аминокислоты — «аминостатическая» — Мелинкофф, 1956 (Mellinkoff et al. 1956). Ограниченность каждой из теорий макронутриентов очевидна, и академиком А. М. Уголевым была предложена «метаболическая» теория аппетита, которая подразумевает измерение организмом энергии, содержащейся во всех типах нутриентов (Уголев 1991). Похожая идея нашла свое отражение в «исхиометрической» теории Николаидиса (1974), предполагающей, что нервные клетки в гипоталамусе могли бы служить сенсорами энергетических субстратов (Nicolaidis 2011). В дальнейшем определение 5'АМФ-активируемой протеинкиназы в роли универсального детектора энергетического баланса клетки явилось биохимическим подтверждением метаболических теорий (Hardie, Carling 1997).

## Гомеостатическая модель регуляции аппетита

Для интеграции различных теорий регуляции аппетита на организменном уровне Шварцем и коллегами в 2000 г. была предложена гомеостатическая модель (Schwartz et al. 2000). Эта модель предполагает, что переход от чувства голода к сытости и наоборот зависит от интенсивности энергетического обмена в организме. Например, снижение уровня потенциальной энергии в тканях, содержащих энергетические субстраты (в основном в жировой), должно вызывать чувство голода, а их повышение — чувство сытости. При этом изменение содержания энергетических субстратов в органах и тканях кодируются и передаются в мозг нервной и эндокринной системами. Основной молекулярный путь сигнализации, лежащий в основе этой модели, представлен белковым гормоном лептином (16 КДа), продуцируемым в жировой ткани (Friedman, Mantzoros 2015). Активация рецепторов к лептину в мозге ведет к снижению приема пищи, тогда как отсутствие функционального лептинового пути, например у мутантных мышей *ob/ob* или *db/db*, ведет к гиперфагии и ожирению. Продукция лептина и его концентрация в плазме крови прямо пропорциональны количеству жировой ткани, что предполагает его функциональную роль как аппетит-регулирующего гормона, посылающего в мозг сигналы о запасах энергии в жировой ткани.

Несмотря на важную катаболическую функцию лептина, у животных с его отсутствием или, наоборот, у животных с избытком лептина при ожирении краткосрочная регуляция аппетита сохраняется, означая, что ни лептин, ни жировая ткань *per se* не являются генераторами циклов голода/насыщения/сытости (Strohmayr, Smith 1987). Кроме того, низкая метаболическая активность жировой ткани, а также чувство голода при ее избытке а *rigid* не позволяют объяснить краткосрочную регуляцию аппетита обменом энергии в жировой ткани. Медленная суточная динамика изменения уровней экспрессии и концентрации лептина также не соответствует пищевым циклам. Чтобы компенсировать этот недостаток, гомеостатическая модель обычно включает в себя роль кишечных гормонов, секреция которых действительно соответствует изменениям аппетита. При этом игнорируется отсутствие прямой связи между жировой тканью и секрецией кишечных гормонов, т. е. теряется теоретическая основа регуляции аппетита на основе интенсивности

энергетического обмена, в данной модели объясняемая запасами энергии в жировой ткани.

Несмотря на все недостатки и противоречия «гомеостатической модели», на сегодняшний день она продолжает оставаться доминирующей теорией регуляции аппетита, включенной в университетские программы. Живучесть данной модели можно объяснить как отсутствием альтернативной теории регуляции аппетита, так и наличием безусловно правильной и всеми принимаемой общей направляющей идеи об основополагающей роли энергетического гомеостаза в регуляции поглощения энергии согласно второму закону термодинамики.

## Ось «кишечная микробиота — мозг»

В кишечнике всех животных содержатся многочисленные бактерии, а также археи, вирусы и грибы, составляющие вместе микробиоту кишечника. По уточненным данным, суммарный вес кишечных бактерий у человека весом 70 кг составляет около 200 г, при этом общее количество бактерий почти равно количеству клеток человека, составляя  $3,8 \times 10^{13}$  и  $3,0 \times 10^{13}$  соответственно (Sender et al. 2016). Важно отметить, что для поддержания своих основных биологических процессов, включая питание и размножение, микробиота зависит от физиологии хозяина, который предоставляет и среду обитания, и питательные вещества (Turnbaugh et al. 2007). Функциональные взаимодействия между кишечными бактериями и их хозяином являются сложными и в основном определены как симбиотические. Действительно, бактериальный вклад в физиологию хозяина варьирует от переваривания пищевых волокон и выработки короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и витаминов до нормального функционирования иммунной системы (Hooper et al. 2012). С другой стороны, можно предположить, что филогенетически более древние микроорганизмы влияли в процессе эволюции на формирование организма хозяина, способного добывать из доступной окружающей среды пищевые субстраты и экстрагировать из них питательные элементы, используемые бактериями. Такое влияние выражается в существовании так называемой оси «кишечная микробиота — мозг», которую можно рассматривать как неотъемлемую часть функциональной связи «кишечник — мозг» (Cryan, Dinan 2012). Исследование оси «кишечная микробиота — мозг» в настоящее время является одним из приоритетных направлений в патогенезе нейропсихиатрических заболеваний (Hooks et al. 2018).

## Циклы размножения кишечных бактерий и аппетит

Цель данной статьи — показать, что кишечные бактерии представляют важное звено в цепочке физиологических механизмов регуляции аппетита и что их включение в гомеостатическую модель должно заменить жировую ткань в качестве энергозависимого генератора ритмов голода/насыщения/сытости. Впервые эта идея и новая версия гомеостатической модели были предложены автором в 2017 г. и стали результатом как собственных исследований, так и анализа литературных данных (Fetissov 2017). За 3 года после публикации этой статьи накопились новые данные о роли кишечных бактерий в регуляции аппетита (van de Wouw et al. 2017), включая разработку их клинического применения, о чем будет сказано ниже.

Суть «микробной» теории в регуляции аппетита заключается в том, что прием пищи рефлекторно активирует секрецию нутриентов в полость кишечника, включая толстый кишечник, запуская таким образом автономный цикл размножения кишечных бактерий, которые в процессе своего метаболизма вырабатывают вещества, активирующие молекулярные пути насыщения и сытости. Снижение же концентрации таких веществ во время естественной гибели бактерий может вызывать чувство голода,

мотивируя к новому приему пищи и, соответственно, запуску нового цикла размножения бактерий (Fetissov 2017). Благодаря такому взаимодействию бактерий с организмом хозяина, они способны поддерживать высокую плотность микробной популяции, варьирующейся около  $10^{12}$  бактериальных клеток/мл толстого кишечника.

Для подтверждения данной теории необходимо показать, что динамика размножения кишечных бактерий соответствует фазам аппетита, а также выявить молекулярные пути, связывающие фазы роста бактерий с фазами аппетита, например стационарную фазу с чувством сытости. Действительно, исследование, проведенное в 2016 г. под руководством автора данной статьи, показало, что при регулярном питании бактерий и при достижении их высокой плотности в популяции *in vitro* и *in vivo* бактерии демонстрируют специфическую динамику роста (Breton et al. 2016b). Эта динамика выражается в 20 мин экспоненциального роста с последующей стационарной фазой, длящейся не менее 2 ч. Таким образом, впервые было обнаружено, что динамика роста кишечных бактерий в условиях регулярных приемов пищи и плотности их популяции, соответствующей толстому кишечнику, совпадает с динамикой изменения аппетита (рис. 1).



Рис. 1. Соответствие циклических изменений аппетита динамике роста бактерий в толстом кишечнике Согласно «микробной» теории аппетита, прием пищи хозяином совпадает с рефлекторным выделением жидкости и нутриентов в кишечник, которые запускают деление кишечных бактерий. Длительность экспоненциальной (Эксп) фазы роста — 20 мин — соответствует времени, необходимому для появления чувства насыщения, а длительность стационарной (Стат) фазы соответствует чувству сытости. Стадия гибели бактерий соответствует прогрессивно увеличивающемуся чувству голода, который вызывает новый прием пищи (адаптировано из: Fetissov 2017)

Fig. 1. Cyclic changes of appetite correspond to the dynamics of bacterial growth in the large intestine According to the “microbial” theory of appetite, food ingestion coincides with the reflex secretion of water and nutrients into the gut triggering the growth of intestinal bacteria. The duration of the exponential (Эксп) growth phase (20 min.) corresponds to the time necessary for satiation; while the duration of the stationary (Стат) phase, to the feeling of satiety. The decline phase (гибель бактерий) corresponds to the progressively increasing feeling of hunger which triggers a new meal. Y-axis, “Feeling of fullness and density of bacterial population in the large intestine” (adapted from: Fetissov 2017)

На чем основана такая динамика размножения бактерий? Важно отметить, что несмотря на то, что хозяин и обеспечивает кишечные бактерии нутриентами, бактерии сами регулируют свои фазы роста. Длительность экспоненциальной фазы зависит от исходного количества бактерий и готовности их генетического аппарата к делению при получении питательной среды. В процессе роста, при достижении оптимальной плотности, бактерии начинают выделять химические вещества, называемые «чувство кворума» (*quorum sensing*), которые тормозят дальнейшее деление всей микробной популяции, чувствительной к этим веществам. Этот важный процесс объясняет, почему кишечник не «раздувает» от бесконтрольного размножения бактерий. Период роста, равный 20 мин, соответствует минимальному времени, необходимому для 1 деления бактериальной ДНК, т. е. можно сказать, что при приеме пищи количество бактерий удваивается. Длительность стационарной фазы, при которой кишечные бактерии находятся в состоянии энергетического равновесия, точно не установлена. Такое равновесие, по сути, соответствует состоянию энергетического равновесия, т. е. сытости у хозяина, когда нет ни поиска нутриентов, ни их поглощения. Под воздействием факторов окружающей среды стационарная фаза плавно переходит в фазу отмирания бактерий. В тонком кишечнике к таким бактерицидным факторам относятся прежде всего желчные кислоты и различные пищеварительные ферменты. Отсутствие этих факторов в толстом кишечнике объясняет наивысшую в организме, да и вообще в природе, концентрацию бактерий. Несмотря на это, снижение числа бактерий в этом самом населенном микроорганизмами отделе кишечника также регулярно происходит путем лизиса бактериофагами. Бактериофаги являются вирусами, которые присутствуют в нормальной микробиоте кишечника в количестве, на порядок превышающем число бактерий. Они селективно разрушают бактериальные клетки, способствуя таким образом физиологическому выделению содержимого бактерий в кишечник. Кроме того, потеря бактерий происходит за счет дефекации (~15 г бактерий/день).

#### Метаболическая активность кишечных бактерий и организма хозяина

Регулярное размножение и отмирание бактерий в кишечнике означает, что микробиота кишечника является, по сути, биореактором, регулярно продуцирующим биомассу. В составе такой биомассы имеются как чисто питательные,

так и различные биоактивные вещества, как упоминалось выше. Так как среднее содержание белка в бактериальных клетках составляет 15% от их общей массы (или половины от сухой массы), то удвоение 200 г кишечных бактерий с последующим лизисом способно обеспечить организм человека 30 г белка (O'Connor, Adams 2010). Важная белок-синтезирующая роль кишечных бактерий хорошо известна у травоядных сельскохозяйственных животных. Клеточное деление — процесс энергоемкий: по приблизительным подсчетам, для воспроизводства 1 г бактерий требуется 1 ккал. Соответственно, для появления 200 г новых бактерий потребуется 200 ккал, а если цикл роста бактерий повторяется 2 раза в день, то 400 ккал в сутки. Таким образом, при среднем суточном потреблении взрослым человеком 2 000 ккал на долю бактерий приходится 20% всей поглощенной энергии. Учитывая большую разницу в суммарном весе бактерий (200 г) и взрослого человека (80 кг), суточная интенсивность метаболизма у бактерий (2 ккал/г) превышает в 100 раз таковую у человека (0,02 ккал/г), усредненную по массе тела. Такая высокая метаболическая активность бактерий, к тому же работающая как часы — деление в течение 20 мин до выхода в стационарную фазу, — может являться и энергетической основой, и пейсмейкером, задающими пищевой ритм и регулируемыми циклы аппетита.

#### Молекулярные основы влияния кишечных бактерий на аппетит

Анорексигенный эффект липополисахаридов (ЛПС), компонентов клеточной стенки грамм-отрицательных бактерий, известен давно и является частью болезненного поведенческого ответа (*sickness behavior*) на инфекцию (Chaskiel et al. 2016). Роль ЛПС в физиологической регуляции аппетита неясна, хотя он присутствует в крови у здоровых людей и его уровень повышается после приема жирной пищи (Amar et al. 2008). Наиболее изученные КЦЖК, продукты ферментации пищевых волокон бактериями кишечника, ацетат, пропионат и бутират также обладают анорексигенным эффектом, хотя было описано и противоположное влияние (Burne et al. 2015).

С позиции «микробной» модели регуляции аппетита необходимо подтвердить, что продукты синтеза бактерий способны вызывать чувство сытости во время стационарной фазы и что таких продуктов нет или недостаточно во время экспоненциальной фазы роста, которая соответствует приему пищи. Для проверки этой

гипотезы были протестированы эффекты внутрибрюшинного введения экстрактов белка кишечной палочки (*E. coli*, *Escherichia coli*), взятых в обеих фазах роста, на пищевое поведение у крыс. Исследования показали, что только белки стационарной фазы *E. coli* достоверно снижали прием пищи у животных и активировали анорексигенные пути в мозге. Кроме того, при инфузии в кишечник крыс такой экстракт стимулировал секрецию анорексигенного пептида тирозин-тирозин (*PUU*, *peptide YY*) в кровь (Breton et al. 2016b). Поскольку бактериальные белки выделяются из кишечных бактерий и в процессе секреции, и при естественномлизисе, этот эксперимент концептуально подтвердил, что стационарная фаза бактерий может быть механистически ассоциирована с чувством сытости.

Кроме того, был выявлен один из основных компонентов бактериальной белковой смеси *E. coli*, ответственный за анорексигенный эффект. Им оказался белок казеинолитической протеазы (*ClpB*, *caseinolytic protease B*) с молекулярной массой 96 КДа. Действительно, *ClpB* является белком так называемого «лунного света» (*moonlighting*), т. е. имеющий более чем одну функцию. С одной стороны, он выполняет функцию шаперона, т. е. молекулярной структуры, участвующей в диссоциации белков и восстановлении их третичной структуры, например при термическом шоке (Mogk, Schlieker et al. 2003). С другой стороны, *ClpB* был определен как конформационный миметик анорексигенного пептидного гормона меланотропина ( $\alpha$ -*MSH*,  $\alpha$ -*melanocyte-stimulating hormone*) (Tennoune et al. 2014). Это открытие было сделано при поиске микробного антигена, вызывающего образование перекрестно-реактивных антител к  $\alpha$ -*MSH*.

Наряду с лептином пептид  $\alpha$ -*MSH* является важнейшим медиатором, активирующим чувство насыщения и сытости, а также ускоряющим катаболические процессы, в том числе в жировой ткани (Anderson et al. 2016). Для осуществления этой функции  $\alpha$ -*MSH* связывается с меланокортиновым рецептором 4 типа на нервных клетках в центральной и периферической нервных системах. Рецептор также экспрессируется и в других тканях, например в энтероэндокринных клетках кишечника, где его активация вызывает секрецию гормона насыщения *PUU* (Panaro et al. 2014). Интересно, что, несмотря на экспрессию меланокортиновых рецепторов в кишечнике, локальное наличие его эндогенного лиганда  $\alpha$ -*MSH* минимально, т. к. основные его источники находятся в клетках мозга и промежуточной доле гипофиза.

Таким образом, можно предположить, что меланокортиновые рецепторы в кишечнике физиологически активируются не самим пептидом  $\alpha$ -*MSH*, а  $\alpha$ -*MSH*-подобными белками и пептидами, производными белков кишечных бактерий. Действительно, в *in vitro* исследованиях было показано, что *ClpB* способен активировать секрецию *PUU* (Dominique et al. 2019). Бактерии увеличивают продукцию *ClpB* в стационарной фазе роста, что связано с необходимостью диссоциации белков в клетке (Mogk, Deuerling et al. 2003). *ClpB* также секретруется бактериями, по-видимому принимая участие в регуляции стабильности бактериальной популяции. Таким образом, бактериальный *ClpB*, выделяющийся в кишечнике через 20 мин после начала приема пищи, может стимулировать энтероэндокринные клетки и высвобождать гормоны насыщения, например *PUU*, путем активации меланокортиновых рецепторов.

Действительно, в составе аминокислотной последовательности *ClpB E. coli* имеется фрагмент, комплементарный пептиду  $\alpha$ -*MSH*, обладающий аффинностью к меланокортиновым рецепторам (Ericson et al. 2015). Изначальный биоинформатический анализ показал, что такой фрагмент присутствует в *ClpB* всех видов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, но его нет в большинстве других бактерий, включая классические пробиотики, относящиеся к видам *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus* (Fetisov et al. 2019). Однако недавнее исследование показало, что снижение функции *ClpB* за счет уменьшения некоторых других кишечных бактерий, например *Clostridia*, ассоциируется с ожирением (Arnorriaga-Rodríguez et al. 2020). Действительно, новый биоинформатический анализ выявил наличие  $\alpha$ -*MSH*-комплементарного фрагмента в молекуле *ClpB* у некоторых кишечных бактерий, относящихся к классу *Clostridia*, например у *Faecalibacterium prausnitzii*.

Микробиота кишечника находится в непосредственном контакте не только с энтероцитами и энтероэндокринными клетками, но и с окончаниями блуждающего нерва в слизистой оболочке кишечника. Действительно, афферентные волокна *n. vagus* присутствуют в ворсинках кишечника и обладают набором рецепторов к большинству нутриентов, а также биоактивных веществ, включая кишечные гормоны (Powley et al. 2011; Williams et al. 2016). Бактериальные метаболиты, например КЦЖК, могут активировать *n. vagus* (Chen et al. 2019). Афференты блуждающего нерва имеют меланокортиновые рецепторы, что не исключает возможность их

прямой активации бактериальным белком *ClpB* (Campos et al. 2014).

Помимо кишечника, *ClpB E. coli* обнаруживается в плазме крови здоровых людей, что предполагает системное физиологическое действие этого бактериального белка (Breton et al. 2016a). В эксперименте на мышах было показано, что *ClpB* стимулирует электрическую активность  $\alpha$ -*MSH*-синтезирующих нейронов аркуатного ядра гипоталамуса, т. е. непосредственно активирует центральные пути насыщения и сытости (Breton et al. 2016b). Наряду с ядрами ствола мозга, принимающими афферентные волокна блуждающего нерва, активация нейронов аркуатного ядра кишечными гормонами и лептином считается ключевым процессом в регуляции аппетита и пищевого поведения. Таким образом, центральный сенсорный механизм, обеспечивающий интеграцию метаболических процессов в органах и тканях, также способен получать информацию от кишечных бактерий.

Помимо влияния на чувство голода и насыщения, имеются данные о роли кишечных бактерий в регуляции пищевого предпочтения у хозяина, которая проявляется в стимулировании его к выбору пищи, содержащей субстраты бактериального метаболизма. Механизм такой регуляции формируется под воздействием окружающей среды, содержащей те или иные нутриенты (Alcock et al. 2014). Например, было показано, что тирамин, синтезируемый кишечными бактериями *Providencia*, действовал как нейротрансмиттер и вызывал предпочтение у червей *C. elegans* потреблять в пищу бактерии именно этого вида (O'Donnell et al. 2020).

Некоторые аспекты «микробной» теории аппетита требуют дальнейшего уточнения. Например, необходимо определить, какие конкретные бактерии у человека продуцируют *ClpB* и, соответственно, участвуют в регуляции аппетита. Кроме того, неизвестно, имеются ли другие бактериальные белки, способные активировать молекулярные пути насыщения, включая как систему меланокортиновых рецепторов, так и рецепторы других пептидных гормонов, например *РУУ* и холецистокинина. Также предстоит выяснить, существует ли рефлекторный механизм активации бактериального роста в кишечнике.

### Жизнь без бактерий и аппетит

Участие кишечных бактерий в регуляции пищевого поведения иногда ставится под сомнение, так как такая регуляция присутствует

у аксеничных животных, т. е. выращенных в стерильных изоляторах, без каких-либо бактерий в их организме. Действительно, такие животные (исследования проводились на мышах и крысах), живущие без бактерий (*germ free*), развиваются внешне нормально, но с некоторыми изменениями в метаболизме и поведении. Так, у аксеничных мышей содержание жировой ткани и уровни лептина и глюкозы в крови снижены, энергетический обмен также снижен примерно на 27%, но при этом наблюдается повышенный прием пищи (Bäckhed et al. 2004; Swartz et al. 2012). Снижение энергетического обмена было также обнаружено в более ранних исследованиях на аксеничных крысах (Wostmann 1981). Эти экспериментальные данные в целом подтверждают представленные выше теоретические расчеты об участии кишечных бактерий в суммарном метаболизме хозяина. Наличие регуляции пищевого поведения у животных без микробиоты указывает на достаточность механизма генетического контроля такой регуляции в организме хозяина. При этом отсутствие микробиоты выражается в недостаточности механизмов чувства насыщения и нарушении энергетического обмена. Указанные выше различия, а также дифференциальная экспрессия регуляторных пептидов и белков в гипоталамусе (Liu et al. 2021), указывают на физиологическую роль бактерий, всегда присутствующих в кишечнике в естественных условиях обитания животных, в регуляции пищевого поведения. Взаимоотношения микробиоты и хозяина в регуляции гомеостатической функции можно образно сравнить с пилотом и автопилотом соответственно. Автопилот настроен на выполнение изначально заданной пилотом задачи, а транспортное средство, хоть и передвигается, но делает это ради пилотов и пассажиров. Когнитивные способности человека влияют на регуляцию аппетита, но не способны ее контролировать. Однако при некоторых заболеваниях, например при нервной анорексии, может появиться ложное чувство контроля над аппетитом.

Для понимания влияния состава микробиоты на организм хозяина в последнее время проведено большое количество исследований на аксеничных и гнотобиотических (т. е. с контролируемой микробиотой) мышах. Так, трансплантация специфических видов бактерий, а также комплексных фекальных микробиот от различных доноров, включая экспериментальных животных и человека, позволили показать влияние такого переноса на регуляцию энергетического обмена и иногда пищевого поведения у реципиента. Классическими считаются экс-

перименты по вызыванию ожирения у мышей, получивших фекальную микробиоту от доноров с ожирением (Turnbaugh et al. 2006). С другой стороны, перенос микробиоты от пациентов с нервной анорексией вызывал снижение приема пищи и набор веса тела у реципиентов (Hata et al. 2019). Надо отметить, что эксперименты по фекальной трансплантации не всегда воспроизводимы, что скорее всего связано с различным иммунным ответом на микробную трансплантацию.

### Практическое применение

Важно отметить, что для воздействия на регуляцию пищевого поведения кишечная микробиота, в отличие от мозга, более доступна для терапевтического вмешательства, например через пробиотики. Действительно, ряд пробиотиков, уже ставших классическими, были разработаны в прошлом столетии, в чем есть вклад и российских ученых (Suvorov 2013). Молекулярные механизмы, лежащие в основе влияния кишечных бактерий на регуляцию функции мозга, включая пищевое поведение, начали исследоваться только недавно, и они требуют дальнейшего изучения для их возможного применения в медицинской практике. Тем не менее, исходя из физиологической роли бактериального белка *ClpB* в стимулировании чувства сытости и насыщения, был разработан *ClpB*-продуцирующий пробиотик для улучшения контроля чувства насыщения у пациентов с избыточным весом.

Критическая роль *ClpB* в коррекции гиперфагии и снижения набора веса тела была показана в серии экспериментов на мышах с ожирением с применением бактерий с мутацией гена *ClpB* в качестве контроля. В последующем в качестве потенциального пробиотика были выбраны и опробованы бактерии *Hafnia alvei* (*H. alvei*). Этот вид бактерий ранее входил в семейство *Enterobacteriaceae*, но в настоящее время они классифицируются как отдельное семейство *Hafniaceae*. В любом случае, главным критерием выбора послужило наличие у этих бактерий белка *ClpB* с  $\alpha$ -MSH-подобным эпитопом. Кроме того, безопасность применения *H. alvei* человеком подтверждена многолетней практикой использования этих бактерий для производства мягких сыров, например камамбера. Хроническое внутрижелудочное введение *H. alvei* мышам с ожирением приводило к снижению приема пищи и набора веса за счет уменьшения содержания жировой ткани (Legrand et al. 2020). Недавние клинические исследования

показали, что прием *H. alvei* также эффективен по этим показателям у людей с повышенной массой тела.

### Заключение

На основе вышеуказанных данных не вызывает сомнения, что метаболизм кишечных бактерий должен рассматриваться как неотъемлемая часть энергетического обмена всего макроорганизма. Особенности бактериального метаболизма, в частности его интенсивность и динамика, регулируемая внутренними факторами микробной популяции, в условиях постоянной доступности нутриентов предполагают роль кишечных бактерий в регуляции аппетита и пищевого поведения хозяина. При этом организм хозяина не только снабжает кишечные бактерии нутриентами и водой, но и в результате получает биомассу, используемую в различных физиологических процессах. Такие трофические взаимоотношения между кишечными бактериями и хозяином можно рассматривать в рамках «трофологии», предложенной А. М. Уголевым в качестве науки, объединяющей все живые организмы (Уголев 1991).

В заключение надо добавить, что предложенная модель регуляции аппетита с участием кишечных бактерий является гомеостатической и не выделяет независимую роль гедонического компонента, т. е. чувства удовольствия, в регуляции пищевого поведения как части глобальной системы вознаграждения за вовлечение и осуществление мотивированного поведения (Shechter, Schwartz 2018). Дофамин, секретируемый в прилежащем ядре (NAc, nucleus accumbens), является ключевым нейротрансмиттером в генерации чувства удовольствия. Нельзя исключать прямую или опосредованную роль кишечных бактерий в гедонической регуляции. Например, накопилось множество косвенных данных о связи микробиоты кишечника с грелином (Schalla, Stengel 2016). Грелин, орексигенный гормон, секретируемый энтероэндокринными клетками желудка перед приемом пищи, стимулирует дофаминергические нервные клетки вентральной покрышки (VTA, ventral tegmental area), проецирующиеся в NAc (Al Massadi et al. 2019). Нарушения метаболизма дофамина были обнаружены в мозге у аксеничных мышей (Diaz Heijt et al. 2011). Таким образом, для подтверждения возможной роли кишечных бактерий в гедонической регуляции необходимы дальнейшие исследования. Важно отметить, что у человека гедоническая составляющая аппетита подвержена влиянию социальных и культур-

ных факторов, часто приводящих к перееданию и повышенному весу тела. Возникновение порочного круга, где социокультурные факторы вызывают сдвиг в микробиоте кишечника, которая, в свою очередь, способствует формированию фенотипа метаболического синдрома и ожирения, представляется актуальной медицинской проблемой, требующей комплексных профилактических и терапевтических подходов. Понимание роли кишечной микробиоты в регуляции аппетита и пищевого поведения, без сомнения, позволит разработать такие подходы.

## Благодарности

Автор выражает благодарность Е. С. Родионовой (Физиологический отдел им. И. П. Павлова Института экспериментальной медицины) за помощь в редактировании статьи.

## Конфликт интересов

Автор является сооснователем биотехнологической компании TargEDys.

## References

- O'Connor, C. M., Adams, J. U. (2010) *Essentials of cell biology*. Cambridge: NPG Education. [Online]. Available at: [https://web.iitd.ac.in/~amittal/SBL101\\_Essentials\\_Cell\\_Biology.pdf](https://web.iitd.ac.in/~amittal/SBL101_Essentials_Cell_Biology.pdf) (accessed 07.02.2021). (In English)
- Al Massadi, O., Nogueiras, R., Dieguez, C., Girault, J. A. (2019) Ghrelin and food reward. *Neuropharmacology*, vol. 148, pp. 131–138. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.001> (In English)
- Alcock, J., Maley, C. C., Aktipis, C. A. (2014) Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. *BioEssays*, vol. 36, no. 10, pp. 940–949. <https://www.doi.org/10.1002/bies.201400071> (In English)
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B. et al. (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, no. 5, pp. 1219–1223. <https://www.doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1219> (In English)
- Anderson, E. J. P., Çakir, I., Carrington, S. J. et al. (2016) 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 56, no. 4, pp. T157–T174. <https://www.doi.org/10.1530/JME-16-0014> (In English)
- Arnoriaga-Rodríguez, M., Mayneris-Perxachs, J., Burokas, A. et al. (2020) Gut bacterial ClpB-like gene function is associated with decreased body weight and a characteristic microbiota profile. *Microbiome*, vol. 8, article 59. <https://www.doi.org/10.1186/s40168-020-00837-6> (In English)
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T. et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 44, pp. 15718–15723. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.0407076101> (In English)
- Blundell, J., de Graaf, C., Hulshof, T. et al. (2010) Appetite control: Methodological aspects of the evaluation of foods. *Obesity Reviews*, vol. 11, no. 3, pp. 251–270. <https://www.doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00714.x> (In English)
- Breton, J., Legrand, R., Akkermann, K. et al. (2016a) Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*, vol. 49, no. 8, pp. 805–808. <https://www.doi.org/10.1002/eat.22531> (In English)
- Breton, J., Tenuoune, N., Lucas, N. et al. (2016b) Gut commensal *E. coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metabolism*, vol. 23, no. 2, pp. 324–334. <https://www.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.017> (In English)
- Byrne, C. S., Chambers, E. S., Morrison, D. J., Frost, G. (2015) The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, vol. 39, no. 9, pp. 1331–1338. <https://www.doi.org/10.1038/ijo.2015.84> (In English)
- Campos, C. A., Shiina, H., Ritter, R. C. (2014) Central vagal afferent endings mediate reduction of food intake by melanocortin-3/4 receptor agonist. *Journal of Neuroscience*, vol. 34, no. 38, pp. 12636–12645. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1121-14.2014> (In English)
- Chaskiel, L., Paul, F., Gerstberger, R. et al. (2016) Brainstem metabotropic glutamate receptors reduce food intake and activate dorsal pontine and medullar structures after peripheral bacterial lipopolysaccharide administration. *Neuropharmacology*, vol. 107, pp. 146–159. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.030> (In English)
- Chen, H., Nwe, P.-K., Yang, Y. et al. (2019) A forward chemical genetic screen reveals gut microbiota metabolites that modulate host physiology. *Cell*, vol. 177, no. 5, pp. 1217–1231. <https://www.doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.036> (In English)
- Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2012) Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 13, pp. 701–712. <https://www.doi.org/10.1038/nrn3346> (In English)
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F. et al. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 7, pp. 3047–3052. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1010529108> (In English)

- Dominique, M., Breton, J., Guérin, C. et al. (2019) Effects of macronutrients on the in vitro production of ClpB, a bacterial mimetic protein of  $\alpha$ -MSH and its possible role in the satiety signaling. *Nutrients*, vol. 11, no. 9, article 2115. <https://www.doi.org/10.3390/nu11092115> (In English)
- Ericson, M. D., Schnell, S. M., Freeman, K. T., Haskell-Luevano, C. (2015) A fragment of the *Escherichia coli* ClpB heat-shock protein is a micromolar melanocortin 1 receptor agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 25, no. 22, pp. 5306–5308. <https://www.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.09.046> (In English)
- Fetissov, S. O. (2017) Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 13, no. 1, pp. 11–25. <https://www.doi.org/10.1038/nrendo.2016.150> (In English)
- Fetissov, S. O., Legrand, R., Lucas, N. (2019) Bacterial protein mimetic of peptide hormone as a new class of protein-based drugs. *Current Medicinal Chemistry*, vol. 26, no. 3, pp. 546–553. <https://www.doi.org/10.2174/0929867324666171005110620> (In English)
- Friedman, J. M., Mantzoros, C. S. (2015) 20 years of leptin: From the discovery of the leptin gene to leptin in our therapeutic armamentarium. *Metabolism*, vol. 64, no. 1, pp. 1–4. <https://www.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.023> (In English)
- Hardie, D. G., Carling, D. (1997) The AMP-activated protein kinase. Fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, vol. 246, no. 2, pp. 259–273. <https://www.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x> (In English)
- Harris, E. C., Barraclough, B. (1998) Excess mortality of mental disorder. *The British Journal of Psychiatry*, vol. 173, no. 1, pp. 11–53. <https://www.doi.org/10.1192/bjp.173.1.11> (In English)
- Hata, T., Miyata, N., Takakura, S. et al. (2019) The gut microbiome derived from anorexia nervosa patients impairs weight gain and behavioral performance in female mice. *Endocrinology*, vol. 160, no. 10, pp. 2441–2452. <https://www.doi.org/10.1210/en.2019-00408> (In English)
- Hooks, K. B., Konsman, J. P., O'Malley, M. A. (2018) Microbiota-gut-brain research: A critical analysis. *Behavioral and Brain Sciences*, vol. 42, article e60. <https://www.doi.org/10.1017/S0140525X18002133> (In English)
- Hooper, L. V., Littman, D. R., Macpherson, A. J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, vol. 336, no. 6086, pp. 1268–1273. <https://www.doi.org/10.1126/science.1223490> (In English)
- Hopkins, M., Blundell, J. E. (2017) Energy metabolism and appetite control: Separate roles for fat-free mass and fat mass in the control of food intake in humans. In: *Appetite and food intake: Central control*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press / Taylor & Francis Publ., Chapter 12. PMID: 28880518. <https://www.doi.org/10.1201/9781315120171-12> (In English)
- Kennedy, G. C. (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, vol. 140, no. 901, pp. 578–592. <https://www.doi.org/10.1098/rspb.1953.0009> (In English)
- Labouré, H., Van Wymelbeke, V., Fantino, M., Nicolaidis, S. (2002) Behavioral, plasma, and calorimetric changes related to food texture modification in men. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 282, no. 5, pp. R1501–R1511. <https://www.doi.org/10.1152/ajpregu.00287.2001> (In English)
- Legrand, R., Lucas, N., Dominique, M. et al. (2020) Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice — a new potential probiotic for appetite and body weight management. *International Journal of Obesity*, vol. 44, no. 5, pp. 1041–1051. <https://www.doi.org/10.1038/s41366-019-0515-9> (In English)
- Liu, R., Wei, P., Keller, C. et al. (2021) Integrated label-free and 10-plex dileu isobaric tag quantitative methods for profiling changes in the mouse hypothalamic neuropeptidome and proteome: Assessment of the impact of the gut microbiome. *Analytical Chemistry*, vol. 92, no. 20, pp. 14021–14030. <https://www.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02939> (In English)
- Mayer, E. A. (2011) Gut feelings: The emerging biology of gut-brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 12, no. 8, pp. 453–466. <https://www.doi.org/10.1038/nrn3071> (In English)
- Mayer, J. (1953) Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine*, vol. 249, no. 1, pp. 13–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM195307022490104> (In English)
- Mellinkoff, S. M., Frankland, M., Boyle, D., Greipel, M. (1956) Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. *Journal of Applied Physiology*, vol. 8, no. 5, pp. 535–538. <https://www.doi.org/10.1152/jappl.1956.8.5.535> (In English)
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwulbecke, S. et al. (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology*, vol. 50, no. 2, pp. 585–595. <https://www.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03710.x> (In English)
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C. et al. (2003) Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 20, pp. 17615–17624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209686200> (In English)
- Mutt, V. (ed.). (1988) *Gastrointestinal hormones. Vol. 11*. San Diego: Academic Press, 545 p. (In English)
- Nicolaidis, S. (2011) Metabolic and humoral mechanisms of feeding and genesis of the ATP/ADP/AMP concept. *Physiology & Behavior*, vol. 104, no. 1, pp. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.058> (In English)

- O'Donnell, M. P., Fox, B. W., Chao, P.-H. et al. (2020) A neurotransmitter produced by gut bacteria modulates host sensory behaviour. *Nature*, vol. 583, no. 7816, pp. 415–420. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2395-5> (In English)
- Panaro, B. L., Tough, I. R., Engelstoft, M. S. et al. (2014) The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metabolism*, vol. 20, no. 6, pp. 1018–1029. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.004> (In English)
- Pavlov, I. P. (1951) *Polnoe sobranie sochinenij [Full composition of writings]: In 6 vols. Vol. 2: In 2 books.* 2<sup>nd</sup> ed. Moscow; Leningrad: USSR Academy of Sciences Publ., 592 p. (In Russian)
- Powley, T. L., Spaulding, R. A., Haglof, S. A. (2011) Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 519, no. 4, pp. 644–660. <https://doi.org/10.1002/cne.22541> (In English)
- Schalla, M. A., Stengel, A. (2016) Effects of microbiome changes on endocrine ghrelin signaling — a systematic review. *Peptides*, vol. 133, article 170388. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170388> (In English)
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D. Jr. et al. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534> (In English)
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, vol. 14, no. 8, article e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533> (In English)
- Shechter, A., Schwartz, G. J. (2018) Gut-brain nutrient sensing in food reward. *Appetite*, vol. 122, pp. 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.009> (In English)
- Strohmayr, A. J., Smith, G. P. (1987) The meal pattern of genetically obese (*ob/ob*) mice. *Appetite*, vol. 8, no. 2, pp. 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0195-6663\(87\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(87)80004-1) (In English)
- Suvorov, A. (2013) Gut microbiota, probiotics, and human health. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, vol. 32, no. 3, pp. 81–91. <https://doi.org/10.12938/bmfh.32.81> (In English)
- Swartz, T. D., Duca, F. A., de Wouters, T. et al. (2012) Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and sodium glucose luminal transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota. *British Journal of Nutrition*, vol. 107, no. 5, pp. 621–630. <https://doi.org/10.1017/S0007114511003412> (In English)
- Tennoune, N., Chan, P., Breton, J. et al. (2014) Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide  $\alpha$ -MSH, at the origin of eating disorders. *Translational Psychiatry*, vol. 4, no. 10, article e458. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.98> (In English)
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M. et al. (2007) The human microbiome project. *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244> (In English)
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A. et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, vol. 444, no. 7122, pp. 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414> (In English)
- Ugolev, A. M. (1991) *Teoriya adekvatnogo pitaniya i trofologiya [Adequate nutrition theory and trophology]*. Leningrad: Nauka Publ., 270 p. (In Russian)
- Van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2017) Microbiota-gut-brain axis: Modulator of host metabolism and appetite. *The Journal of Nutrition*, vol. 147, no. 5, pp. 727–745. <https://doi.org/10.3945/jn.116.240481> (In English)
- Williams, E. K., Chang, R. B., Storchlic, D. E. et al. (2016) Sensory neurons that detect stretch and nutrients in the digestive system. *Cell*, vol. 166, no. 1, pp. 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.011> (In English)
- Wostmann, B. S. (1981) The germfree animal in nutritional studies. *Annual Review of Nutrition*, vol. 1, pp. 257–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.001353> (In English)



УДК 314.8+612.8+571.27

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-33-40>

## Психосоциальный стресс перенаселенности (скученности): негативные последствия для организма человека и грызунов

Е. В. Лосева<sup>✉1</sup>

<sup>1</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Россия, г. Москва, ул. Бултерова, д. 5а

### Сведения об авторе

Елена Владимировна Лосева,  
SPIN-код: 7159-1186,  
Scopus Author ID: 24399472300,  
ORCID: 0000-0003-0941-670X,  
e-mail: losvnd@mail.ru

### Для цитирования:

Лосева, Е. В.  
(2021) Психосоциальный стресс перенаселенности (скученности): негативные последствия для организма человека и грызунов. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 33–40.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-33-40>

**Получена** 3 февраля 2021; прошла рецензирование 15 февраля 2021; принята 18 февраля 2021.

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 годы.

**Права:** © Автор (2021). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Обзор посвящен анализу литературных и собственных данных о негативных последствиях психосоциального стресса перенаселенности в обществе для организма человека, а также о влиянии скученности (экспериментальной модели перенаселенности) в условиях вивария на организм грызунов (крыс и мышей). Наибольшее внимание при анализе экспериментальных работ, в том числе и собственных, на грызунах уделено влиянию скученности на общее состояние организма, развитие стресс-реакции, содержание моноаминов и их метаболитов в мозге, состояние иммунной системы — цитокиновый профиль и интерфероновый статус. Сделано заключение, что долговременная скученность у грызунов (главным образом крыс) в условиях вивария является мощным стрессором, при котором ухудшается общее состояние организма, развивается тревожно-депрессивное поведение, нарушается деятельность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, происходит дисбаланс моноаминов и их метаболитов в ряде структур мозга, снижается иммунитет. В собственных экспериментах применялась интенсивная стрессовая модель скученности в ограниченном пространстве, при которой крысы-самцы после месяца жизни в стандартных условиях вивария (4–6 особей в клетке) помещались в скученные условия (15–17 особей в клетке) на длительное время (две недели). Предполагается, что такая модель может быть использована для доклинической оценки анксиолитических, антидепрессивных, иммуномодулирующих и других свойств различных биологически активных веществ и препаратов, которые могут быть полезны для коррекции негативных последствий долговременных психосоциальных стрессов.

**Ключевые слова:** психосоциальный стресс, перенаселенность, общество, скученность, грызуны, нервная система, поведение, моноамины мозга, иммунитет.

# Psychosocial stress of overpopulation (crowding): Negative consequences for the human body and rodents

E. V. Loseva<sup>✉1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
5a Butlerova Str., Moscow 117485, Russia

## Author

Elena V. Loseva,  
SPIN: 7159-1186,  
Scopus Author ID: 24399472300,  
ORCID: 0000-0003-0941-670X,  
e-mail: [losvnd@mail.ru](mailto:losvnd@mail.ru)

## For citation:

Loseva, E. V.  
(2021) Psychosocial stress  
of overpopulation (crowding):  
Negative consequences for the  
human body and rodents.  
*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 33–40.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-33-40>

**Received** 3 February 2021;  
reviewed 15 February 2021;  
accepted 18 February 2021.

**Funding:** The study is part  
of the assignment commissioned  
by the Ministry of Science and  
Higher Education of the Russian  
Federation for 2021–2023.

**Copyright:** © The Author (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC  
License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Abstract.** The paper provides an overview of literature and our own data on the negative consequences of psychosocial stress induced by overpopulation for humans. It also explores the effect of crowding on rodents (rats and mice) in a vivarium as an experimental model of overpopulation. Experimental studies on rodents (the existing and our own research) focus on the influence of crowding on the general state of the body, the development of stress reactions, the content of monoamines and their metabolites in the brain, the state of the immune system, e. g., cytokine profile and interferon status. It was concluded that long-term crowding in rodents (mainly rats) in a vivarium is a huge stress factor. It has a negative impact on the general state of the body, leads to anxiety / depressive disorders, interferes with the hypothalamic-pituitary-adrenal system, creates an imbalance of monoamines and their metabolites in a number of brain structures, and compromises the immunity. In our own experiments, we used the model of crowding to test the effect of stress induced by a confined space: after a month in standard vivarium conditions (four to six individuals in a cage), a group of male rats was placed in crowded conditions (from fifteen to seventeen individuals in a cage) for 2 weeks. It is assumed that the model may be used for preclinical assessment of anxiolytic, antidepressant, immunomodulatory and other properties of various biologically active substances and drugs used in fighting the negative consequences of long-term psychosocial stress.

**Keywords:** psychosocial stress, overpopulation, society, crowding, rodents, nervous system, behavior, brain monoamines, immunity.

## Введение

В настоящем обзоре проведен анализ научной литературы о негативных последствиях психосоциального стресса перенаселенности в обществе для организма человека, а также литературных и собственных данных о влиянии скученности (экспериментальной модели перенаселенности) в условиях вивария на организм грызунов (крыс и мышей). При оценке воздействия скученности на грызунов акцент сделан на общее состояние организма, поведение в разных тестах, развитие стресс-реакции, содержание моноаминов и их метаболитов в мозге, иммунный статус.

## Перенаселенность в человеческом обществе

Одним из широко распространенных социальных стрессоров является перенаселенность, или скученность — субъективное ощущение нехватки пространства (Myers 2007). Подобно-

му стрессу подвергаются люди, приезжающие из сельской местности в крупные города, проживающие в городе большими семьями в стесненных условиях, воспитанники детских домов, лица, находящиеся длительное время в небольших перенаселенных замкнутых пространствах (моряки, космонавты, шахтеры, заключенные тюрем и т. д.), лица, часто пользующиеся общественным транспортом в часы пик и т. д. Социальный стресс перенаселенности в человеческом обществе приводит к различным негативным последствиям для организма. Известно, что перенаселенность, при которой, как правило, возникает антисанитария, является одним из основных факторов риска для развития респираторных болезней (Hoge et al. 1994; Sethi 1992), а также заболеваний желудочно-кишечного тракта (Fabiana et al. 2007). Предполагают, что при перенаселенности и недостаточной гигиене в человеческом обществе происходит нарушение работы иммунной

системы, вследствие чего могут возникать аутоиммунные и аллергические болезни, а также хроническое воспаление (Martín et al. 2009). Перенаселенность является одним из факторов, провоцирующих онкологические заболевания (Chawińska et al. 2014). Кроме того, она является психосоциальным стрессором, при длительном воздействии которого может увеличиваться риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (Williams et al. 2009). Перенаселенность в детстве является фактором риска для развития депрессии во взрослом возрасте (Sadowski et al. 1999). Жители густонаселенных городов часто испытывают страх, что связывают с активацией в их мозге миндаины (амигдалы) (Lederbogen et al. 2011). Урбанизация может приводить к психиатрическим расстройствам, в том числе к шизофрении (Costa e Silva, Steffen 2019). При скученности в больничных условиях может даже увеличиваться смертность (Sprivulis et al. 2006).

Исследование проявлений и механизмов пагубного влияния стресса скученности на организм является одной из важнейших медико-биологических и медико-социальных задач. Несмотря на понимание того, что эти закономерности для человеческого общества имеют свою специфику, для их исследования часто прибегают к моделированию скученности у грызунов, чаще всего крыс (Love, Zelikowsky 2020).

### Модели перенаселенности (скученности) крыс в условиях вивария

Скученность у крыс в виварии моделируют разными способами: не расселяют крысят с рождения или ссаживают в одну клетку по 10–20 половозрелых особей одного или разных полов. Такому стрессу животные подвергаются в течение разного времени. Известно, что крысы в природе живут группами со сложными иерархическими взаимоотношениями (Armitage 2004). Такие же отношения возникают и в виварии у крыс, содержащихся в стандартных условиях (по 4–6 особей в клетке). При скученности эти отношения должны нарушаться. Любопытно, что скученность приводила к стрессу у крыс-самцов, тогда как у самок она, наоборот, успокаивала (Brown, Grunberg 1995).

Учитывая данные литературы, в наших многолетних исследованиях, связанных с исследованием воздействия скученности на нервную и иммунную системы крыс, была использована следующая модель. Половозрелых крыс-самцов, которые месяц после привоза из питомника

жили в виварии в нормальных условиях (по 5–6 особей в клетке размером 55 × 30 × 20 см), ссаживали из трех клеток в одну такую же клетку. Это одна из наиболее стрессовых, на наш взгляд, моделей перенаселенности в замкнутом помещении, когда у крыс после долгой жизни в хороших условиях не только резко уменьшается жизненное пространство, но и нарушаются иерархические отношения. В результате могут возникать различного рода негативные изменения в деятельности нервной, иммунной и эндокринной систем, проявляемые прежде всего в поведении животных и затрагивающие биохимические показатели активности этих систем. Есть данные о том, что стресс в тесте вынужденного плавания у крыс более выражен в течение первых двух недель, а затем может наступить некоторая адаптация (Nagaraja, Jeganathan 1999). Мы предположили, что скученность более двух недель тоже может привести к адаптации организма. Поэтому в нашей работе эксперименты со скученными животными проводились не более 14–16 дней. Есть данные, что показатели тревожности в открытом поле и в приподнятом крестообразном лабиринте не изменялись при скученности 12 крыс в клетке, но увеличивались, когда в клетке содержали 16 или 24 животных (Botelho et al. 2007). Поэтому в нашей работе для анализа тревожно-депрессивного поведения при моделировании скученности было решено ссаживать в одну клетку по 15–17 животных. В течение всех экспериментов был исключен фактор антисанитарии, поскольку клетки чистили ежедневно. Животные имели свободный доступ к пище и воде и не испытывали в них недостатка.

### Поведение крыс при скученности

В области исследования поведения крыс в условиях скученности есть работы, посвященные его социальной составляющей. Например, Джон Калхун обнаружил, что высокая плотность популяции серых крыс приводила к дезинтеграции семейной жизни, высокой смертности новорожденных, малым размерам помета, к недостаточному строительству гнезд, к тому, что взрослые крысы начинали бросать молодняк, к каннибализму и садизму. Калхун охарактеризовал ситуацию как поведенческий спад (Calhoun 1962). Об агрессии грызунов при скученности свидетельствуют и другие работы (Christian 1963; Ramsden 2009).

Есть данные о том, что у крыс на фоне скученности память и способность к обучению ухудшаются (Goeckner et al. 1973).

Ряд работ посвящен исследованию показателей тревожно-депрессивного поведения у крыс при скученности, но результаты этих исследований часто противоречивы. Так, есть данные об увеличении дефекаций и ухудшении исследовательской активности у самцов крыс при скученности (девять крыс в клетке) по сравнению с контролем (три крысы в клетке), что говорит об увеличении эмоциональности (Armario et al. 1984). В то же время показано, что чем больше скученность в популяции крыс Sprague-Dawley, тем у них менее выражена эмоциональность (Morrison, Thatcher 1969). При скученности, как показывает ряд исследований, тревожность у крыс увеличивается (Botelho et al. 2007; Daniels et al. 2000; Moiseeva et al. 2009). Есть данные, что у крыс, содержащихся в условиях скученности, в тесте вынужденного плавания происходили судорожные подергивания головы, что авторы связывают с проявлением депрессивного состояния (Naitoh et al. 1992).

В наших экспериментах при долговременной (10–13 дней), но не кратковременной (один — четыре дня) скученности (17 крыс в клетке) наблюдался повышенный уровень тревожности по ряду показателей в тестах «открытое поле», «свет — темнота», «приподнятый крестообразный лабиринт» (Кнызева et al. 2012). Эти тесты приняты в мировой практике для оценки тревожности. Кроме того, по нашим данным, в тесте вынужденного плавания (тест на депрессию) при скученности у крыс (10 дней) увеличивалось время иммобилизации и уменьшалось время первого эпизода активного плавания, что указывало на развитие депрессивноподобного состояния (Loseva et al. 2015). Таким образом, наши эксперименты подтверждают те литературные данные, которые демонстрируют усиление тревожно-депрессивного поведения при долгосрочной скученности у крыс.

### Физиологическое состояние организма грызунов при скученности

Скученность вызывает нарушение и физиологического состояния организма грызунов. Так, при скученности у мышей нарушались барьерные функции кожи и водообмен (Aioi et al. 2001). Скученность (один и семь дней), как и другие стрессы, вызывала повышение уровня трансаминаз в сыворотке крови крыс Вистар (Nagaraja, Jeganathan 1999), что может свидетельствовать о патологических изменениях печени, мышц, мозга. При скученности у крыс увеличивалось потребление алкоголя (Anacker,

Ryabinin 2010; Nagaraja, Jeganathan 2003). Есть данные о том, что при хронической скученности (девять недель) у мышей при неизменной массе тела увеличивалось ожирение. В соответствии с повышенным содержанием жира увеличивался уровень лептина в плазме крови (Lin et al. 2015). Согласно нашим данным, скученность у крыс-самцов (16 животных в клетке) в течение 15 дней вызывала снижение динамики привеса массы тела (Loseva et al. 2013).

### Проявления стресс-реакции у грызунов при скученности

Существуют немногочисленные данные о воздействии скученности на нейро-иммунно-эндокринный комплекс, который принимает активное участие в механизмах стресса и интегративная деятельность которого доказана в многочисленных исследованиях. Так, при хроническом (19 дней) содержании самцов мышей в субординатных колониях были выявлены гипертрофия надпочечников, снижение общего веса, атрофия тимуса и воспаление толстой кишки. При формировании субординатных колоний четыре подчиненных особи, которые содержались в индивидуальных клетках (16 × 22 × 14 см), помещались в одну клетку (38 × 22 × 35 см) с большим доминантным самцом. В этой клетке не только подчиненные мыши подвергались давлению со стороны доминантного самца (самцы менялись во избежание привыкания), но и на каждую мышшь приходилось в два раза меньше площади, чем в индивидуальных клетках (Reber et al. 2007). У крыс при острой (три часа) скученности (12 крыс в клетке), как и при других стрессах, усиливалась активность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (Djordjević et al. 2003). В другой работе скученность у крыс в течение трех дней (24 особи в клетке) значительно уменьшала уровень центрального вазопрессина, но не изменяла систему кортикотропин-рилизинг гормона, участвующего в стимуляции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (Bugajski et al. 1995). У молодых (38–65 дней от рождения) крыс-самцов Вистар при скученности увеличивалось содержание кортикостерона как в плазме крови, так и в волосах (Uarquin 2016). При скученности (пять и десять недель) повышался уровень противомозговых (к нейронам и глии) антител в сыворотке крови (Andrejević et al. 1997). Все эти данные говорят о развитии стресса при скученности у грызунов.

## Содержание моноаминов и их метаболитов в мозге крыс при скученности

Имеется небольшое количество литературных данных о влиянии скученности на содержание моноаминов и их метаболитов в разных структурах мозга. Так, было показано, что при скученности снижается уровень 5НТ-1А-рецепторов в гиппокампе (Daniels et al. 2000). При острой скученности (второй день) в мозге крыс наблюдали повышение содержания метаболита серотонина 5-гидрокси-3-индол-уксусной кислоты (5-ОИУК), а при более длительной (десятый день) — 5-ОИУК, серотонина и норадреналина (Boranic et al. 1982).

В нашей работе (Loseva et al. 2013) исследовали содержание моноаминов и их метаболитов у скученных в течение 15 дней (15 крыс в клетке) и контрольных животных (пять крыс в клетке) в структурах мозга, ответственных за тревожное поведение, — гипоталамусе, амигдале, гиппокампе, септуме. Было показано, что содержание норадреналина и дофамина в септуме снижалось, а в гипоталамусе повышалось, содержание метаболита дофамина диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) снижалось в обеих структурах, а показатель его обмена — соотношение ДОФУК/дофамин — только в гипоталамусе. Скученность не изменяла показатели норадренергической и дофаминергической систем в амигдале и гиппокампе, а серотонинергической системы — во всех четырех структурах.

В другой нашей работе (Loseva et al. 2015) исследовали влияние скученности на уровни моноаминов и их метаболитов в структурах мозга, ответственных за депрессивное поведение, — префронтальной коре, обонятельной луковице, прилежащем ядре, стриатуме и гипоталамусе. Скученность вызывала уменьшение содержания дофамина в стриатуме, его метаболитов (гомованилиновой кислоты — ГВК и ДОФУК) и обмен дофамина в гипоталамусе, но увеличивала содержание норадреналина, ГВК и ДОФУК в обонятельной луковице и ГВК в префронтальной коре. В прилежащем ядре изменений выявлено не было. Содержание серотонина не изменялось во всех исследованных структурах.

По результатам обеих работ мы предположили, что выявленные изменения в содержании моноаминов и их метаболитов в определенных структурах мозга могут являться нейрхимическими коррелятами тревожно-депрессивного поведения, вызываемого скученностью у крыс.

## Иммунологические показатели в крови у грызунов при скученности

Имеются единичные факты, свидетельствующие о развитии иммунного ответа при скученности. Так, в стимуляцию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси при скученности (7 дней) у крыс (24 особи в клетке) вовлекались интерлейкин 1 (IL-1 beta) и простагландины (Gadek-Michalska et al. 2008). Показано, что при скученности у старых мышей линии СВА/СА в Т-лимфоцитах селезенки уменьшался, а у молодых — не изменялся метаболизм кальция. Это свидетельствует об ослаблении иммунного ответа у старых животных, содержащихся в условиях скученности (Csermely et al. 1995). У мышей после хронического содержания в субординатных колониях усиливалась секреция про- и противовоспалительных цитокинов клетками мезентериальных лимфатических узлов (Reber et al. 2007).

В нашей работе (Loseva et al. 2013) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции было исследовано влияние хронической скученности у крыс (16 животных в клетке) на уровни экспрессии генов 11 цитокинов по синтезу их мРНК (цитокиновый профиль) в крови. Кроме того, исследовали интерфероновый статус, включающий в себя интерферон (ИФН), спонтанно продуцируемый клетками крови и циркулирующий в плазме крови, а также способность к продукции ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$ . Оказалось, что в условиях скученности у крыс угнеталась экспрессия гена противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (IL-4), активировалась транскрипция провоспалительного цитокина IL-17 и была ослаблена способность к продукции интерферонов  $\gamma$  и  $\alpha$ . Эти данные указывают на ослабление как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета при скученности у крыс; а также в скученных условиях более вероятно развитие аллергических и аутоиммунных реакций. При этом нарушаются тонкие механизмы регуляции системы интерферонов, что говорит об ослаблении противовирусного иммунитета. Полученные данные могут быть иммунологическими коррелятами тревожно-депрессивного поведения при скученности у крыс.

## Заключение

Таким образом, анализ литературы позволяет заключить, что психосоциальный стресс перенаселенности в обществе приводит к целому ряду негативных последствий для организма

человека и его поведения. Согласно литературным и собственным данным, долговременная скученность у грызунов (главным образом крыс) в условиях вивария (модель перенаселенности в замкнутом пространстве в человеческом обществе) является мощным стрессором, при котором нарушается общее состояние организма, развивается тревожно-депрессивное поведение, нарушается деятельность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, происходит дисбаланс моноаминов и их метаболитов в ряде структур мозга, снижается иммунитет.

Мы полагаем, что модель долговременной (две недели) перенаселенности, используемая в собственных экспериментах, при которой половозрелых крыс-самцов после месяца жизни

в стандартных условиях (4–6 крыс в клетке) помещают в условия скученности (не менее 15 крыс в клетке), удобна для доклинической оценки анксиолитических, антидепрессивных, иммуномодулирующих и других свойств различных биологически активных веществ и препаратов, которые могут быть полезны для коррекции негативных последствий хронических психосоциальных стрессов. Следует отметить, что при скученности животные, получающие различные препараты или плацебо, могут содержаться в одной клетке, подвергаясь одинаковому стрессовому воздействию. Это позволяет более корректно сравнивать различные показатели активности нервной и иммунной систем у контрольных и подопытных групп крыс.

## References

- Aioi, A., Okuda, M., Matsui, M. et al. (2001) Effect of high population density environment on skin barrier function in mice. *Journal of Dermatological Science*, vol. 25, no. 3, pp. 189–197. [https://www.doi.org/10.1016/s0923-1811\(00\)00133-x](https://www.doi.org/10.1016/s0923-1811(00)00133-x) (In English)
- Anacker, A. M., Ryabinin, A. E. (2010) Biological contribution to social influences on alcohol drinking: Evidence from animal models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 7, no. 2, pp. 473–493. <https://www.doi.org/10.3390/ijerph7020473> (In English)
- Andrejević, S., Bukilica, M., Dimitrijević, M. et al. (1997) Stress-induced rise in serum anti-brain autoantibody levels in the rat. *International Journal of Neuroscience*, vol. 89, no. 3–4, pp. 153–164. <https://www.doi.org/10.3109/00207459708988471> (In English)
- Armario, A., Castellanos, J. M., Balasch, J. (1984) Effect of crowding on emotional reactivity in male rats. *Neuroendocrinology*, vol. 39, no. 4, pp. 330–333. <https://www.doi.org/10.1159/000124000> (In English)
- Armitage, D. (2004) *Rattus norvegicus*. *Animal Diversity Web*. [Online]. Available at: [https://animaldiversity.org/accounts/Rattus\\_norvegicus/](https://animaldiversity.org/accounts/Rattus_norvegicus/) (accessed 31.01.2021). (In English)
- Boranic, M., Pericic, D., Radacic, M. et al. (1982) Immunological and neuroendocrine responses of rats to prolonged or repeated stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 36, no. 1, pp. 23–28. PMID: 6127122. (In English)
- Botelho, S., Estanislau, C., Morato, S. (2007) Effects of under- and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, vol. 74, no. 3, pp. 357–362. <https://www.doi.org/10.1016/j.beproc.2006.12.006> (In English)
- Brown, K. J., Grunberg, N. E. (1995) Effects of housing on male and female rats: Crowding stresses male but calm females. *Physiology and Behavior*, vol. 58, no. 6, pp. 1085–1089. [https://www.doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02043-8](https://www.doi.org/10.1016/0031-9384(95)02043-8) (In English)
- Bugajski, J., Borycz, J., Glod, R., Bugajski, A. J. (1995) Crowding stress impairs the pituitary-adrenocortical responsiveness to the vasopressin but not corticotropin-releasing hormone stimulation. *Brain Research*, vol. 681, no. 1–2, pp. 223–228. [https://www.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00297-4](https://www.doi.org/10.1016/0006-8993(95)00297-4) (In English)
- Calhoun, J. B. (1962) Population density and social pathology. *Scientific American*, vol. 206, no. 2, pp. 139–150. (In English)
- Chawińska, E., Tukiendorf, A., Mischczyk, L. (2014) Interrelation between population density and cancer incidence in the province of Opole, Poland. *Contemporary Oncology (Poznań, Poland)*, vol. 18, no. 5, pp. 367–370. <https://www.doi.org/10.5114/wo.2014.44122> (In English)
- Christian, J. J. (1963) The pathology of overpopulation. *Military Medicine*, vol. 128, no. 7, pp. 571–603. <https://doi.org/10.1093/milmed/128.7.571> (In English)
- Costa e Silva, J. A., Steffen, R. E. (2019) Urban environment and psychiatric disorders: A review of the neuroscience and biology. *Metabolism*, vol. 100, article 153940. <https://www.doi.org/10.1016/j.metabol.2019.07.004> (In English)
- Csermely, P., Péntzes, I., Tóth, S. (1995) Chronic overcrowding decreases cytoplasmic free calcium levels in T lymphocytes of aged CBA/CA mice. *Experientia*, vol. 51, no. 9–10, pp. 976–979. <https://www.doi.org/10.1007/BF01921751> (In English)
- Daniels, W. M. U., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E. et al. (2000) Overcrowding induces anxiety and causes loss of serotonin 5HT-1a receptors in rats. *Metabolic Brain Disease*, vol. 15, no. 4, pp. 287–295. <https://www.doi.org/10.1023/a:1011123208674> (In English)

- Djordjević, J., Cvijić, G., Davidović, V. (2003) Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiological Research*, vol. 52, no. 1, pp. 67–72. PMID: [12625809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12625809/). (In English)
- Fabiana, A., Donia, D., Gabrieli, R. et al. (2007) Influence of enteric viruses on gastroenteritis in Albania: Epidemiological and molecular analysis. *Journal of Medical Virology*, vol. 79, no. 12, pp. 1844–1849. <https://www.doi.org/10.1002/jmv.21001> (In English)
- Gadek-Michalska, A., Bugajski, A. J., Bugajski, J. (2008) Prostaglandins and interleukin-1beta in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic phenylephrine under basal and stress conditions. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, vol. 59, no. 3, pp. 563–575. PMID: [18953098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18953098/). (In English)
- Goeckner, D. J., Greenough, W. T., Mead, W. R. (1973) Deficits in learning tasks following chronic overcrowding in rats. *Journal of Personality and Social Psychology*, vol. 28, no. 2, pp. 256–261. <https://www.doi.org/10.1037/h0035783> (In English)
- Hoge, C. W., Reichler, M. R., Dominguez, E. A. et al. (1994) An epidemic of pneumococcal disease in an overcrowded, inadequately ventilated jail. *New England Journal of Medicine*, vol. 331, no. 10, pp. 643–648. <https://www.doi.org/10.1056/NEJM199409083311004> (In English)
- Knyazeva, S. I., Loginova, N. A., Loseva, E. V. (2012) Anxiety level and body weight changes in rats living in overpopulated cages. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 154, no. 1, pp. 3–6. <https://www.doi.org/10.1007/s10517-012-1860-z> (In English)
- Lederbogen, F., Kirsch, P., Haddad, L. et al. (2011) City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. *Nature*, vol. 474, no. 7352, pp. 498–501. <https://www.doi.org/10.1038/nature10190> (In English)
- Lin, E.-J. D., Sun, M., Choi, E. Y. et al. (2015) Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 51, pp. 318–330. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.007> (In English)
- Loseva, E. V., Loginova, N. A., Mezentsseva, M. V. et al. (2013) Immunological parameters of the blood and monoamine content in the brain of rats during long-term overcrowding. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 155, no. 4, pp. 470–473. <https://www.doi.org/10.1007/s10517-013-2181-6> (In English)
- Loseva, E. V., Sarkisova, K. Yu., Loginova, N. A., Kudrin, V. S. (2015) Depressive behavior and monoamine contents in brain structures of rats during chronic overcrowding. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 159, no. 3, pp. 327–330. <https://www.doi.org/10.1007/s10517-015-2953-2> (In English)
- Love, J., Zelikowsky, M. (2020) Stress varies along the social density continuum. *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 14, article 582985. <https://www.doi.org/10.3389/fnsys.2020.582985> (In English)
- Martín, P. I., Sánchez, P. A., Rewald, E. (2009) Microparticles and the hygiene hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1173, no. 1, pp. 409–421. <https://www.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04920.x> (In English)
- Moiseeva, Ju. V., Khonicheva, N. M., Ajrapetyants, M. G. et al. (2009) Povyshenie urovnya trevozhnosti u krys, vyzvannoe sotsial'nym stressom perenaseleniya, ne soprovozhdaetsya izmeneniyami nitrergicheskoy sistemy v mozge [Increase of anxiety level in rats caused by social stress of overpopulation not followed by changes of nitrergic system in the brain]. *Nejrokhimiya — Neurochemical Journal*, vol. 26, no. 1, pp. 64–71. (In Russian)
- Morrison, B. J., Thatcher, K. (1969) Overpopulation effects on social reduction of emotionality in the albino rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, vol. 69, no. 4, pp. 658–662. <https://www.doi.org/10.1037/h0028202> (In English)
- Myers, D. G. (2007) *Sotsial'naya psikhologiya: intensivnyj kurs [Exploring social psychology]*. Saint Petersburg: Prajm-Yevroznak Publ., 512 p. (In Russian)
- Nagaraja, H. S., Jeganathan, P. S. (1999) Influence of different types of stress on selected cardiovascular parameters in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 43, no. 3, pp. 296–304. PMID: [10776477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10776477/). (In English)
- Nagaraja, H. S., Jeganathan, P. S. (2003) Effect of acute and chronic conditions of over-crowding on free choice ethanol intake in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 47, no. 3, pp. 325–331. PMID: [14723319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14723319/). (In English)
- Naitoh, H., Nomura, S., Kunimi, Y., Yamaoka, K. (1992) “Swimming-induced head twitching” in rats in the forced swimming test induced by overcrowding stress: A new marker in the animal model of depression? *The Keio Journal of Medicine*, vol. 41, no. 4, pp. 221–224. <https://www.doi.org/10.2302/kjm.41.221> (In English)
- Ramsden, E. (2009) The urban animal: Population density and social pathology in rodents and humans. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 87, no. 2, p. 82. <https://www.doi.org/10.2471/blt.09.062836> (In English)
- Reber, S. O., Birkeneder, L., Veenema, A. H. et al. (2007) Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: Implications and mechanisms. *Endocrinology*, vol. 148, no. 2, pp. 670–682. <https://www.doi.org/10.1210/en.2006-0983> (In English)
- Sadowski, H., Ugarte, B., Kolvin, I. et al. (1999) Early life family disadvantages and major depression in adulthood. *The British Journal of Psychiatry*, vol. 174, no. 2, pp. 112–120. <https://www.doi.org/10.1192/bjp.174.2.112> (In English)

- Sethi, G. R. (1992) Environment and acute respiratory infections. *ICCW News Bulletin*, vol. 40, no. 3–4, pp. 27–29. PMID: [12318354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12318354/). (In English)
- Sprivulis, P. C., Da Silva, J.-A., Jacobs, I. G. et al. (2006) The association between hospital overcrowding and mortality among patients admitted via Western Australian emergency departments. *The Medical Journal of Australia*, vol. 184, no. 12, pp. 208–212. <https://www.doi.org/10.5694/j.1326-5377.2006.tb00416.x> (In English)
- Uarquin, D. G., Meyer, J. S., Cardenas, F. P., Rojas, M. J. (2016) Effect of overcrowding on hair corticosterone concentrations in juvenile male Wistar rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 55, no. 6, pp. 749–755. PMID: [27931312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27931312/). (In English)
- Williams, E. D., Steptoe, A., Chambers, J. C., Kooner, J. S. (2009) Psychosocial risk factors for coronary heart disease in UK South Asian men and women. *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 63, no. 12, pp. 986–991. <https://www.doi.org/10.1136/jech.2008.084186> (In English)



Check for updates

Экспериментальные статьи

UDC 612.82+577.2

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-41-48>

## Effects of neonatal dexamethasone and CpдA on the expression of genes for apoptosis regulator proteins in the neonatal hippocampus

D. A. Lanshakov<sup>✉1</sup>, E. V. Sukhareva<sup>1</sup>, V. V. Bulygina<sup>1</sup>, T. A. Lagunov<sup>2,3</sup>, T. S. Kalinina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, 10 Lavrenteva Ave., Novosibirsk 630090, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, 1 Pirogova Str., Novosibirsk 630090, Russia

<sup>3</sup> Cytometry and Biokinetics Laboratory, The Institute of Chemical Kinetics and Combustion, 3 Institutskaya Str., Novosibirsk 630090, Russia

### Authors

Dmitriy A. Lanshakov,  
SPIN: 7041-4461,  
Scopus AuthorID: 34872521600,  
ORCID: 0000-0002-8482-1302,  
e-mail: [lanshakov@bionet.nsc.ru](mailto:lanshakov@bionet.nsc.ru),  
[dmitriylanshakov@gmail.com](mailto:dmitriylanshakov@gmail.com)

Ekaterina V. Sukhareva,  
SPIN: 7485-0055,  
Scopus AuthorID: 57132850100,  
ORCID: 0000-0001-9263-9167,  
e-mail: [evsukhareva@mail.ru](mailto:evsukhareva@mail.ru)

Veta V. Bulygina,  
SPIN: 1933-0712,  
Scopus AuthorID: 6602730877,  
e-mail: [veta03@mail.ru](mailto:veta03@mail.ru)

Timofey A. Lagunov,  
e-mail: [t.lagunov@g.nsu.ru](mailto:t.lagunov@g.nsu.ru)

Tatyana S. Kalinina,  
SPIN: 2088-5753,  
Scopus AuthorID: 7007111908,  
ORCID: 0000-0002-2575-4621,  
e-mail: [kalin@bionet.nsc.ru](mailto:kalin@bionet.nsc.ru)

### For citation:

Lanshakov, D. A., Sukhareva, E. V.,  
Bulygina, V. V., Lagunov, T. A.,  
Kalinina, T. S.

(2021) Effects of neonatal dexamethasone and CpдA on the expression of genes for apoptosis regulator proteins in the neonatal hippocampus. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 41–48. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-41-48>

**Received** 28 January 2021;  
reviewed 5 February 2021;  
accepted 15 February 2021.

**Funding:** The work was funded through Basic Russian Scientific programme No. AAAAA-19-119100290012-8.

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License 4.0.

**Abstract.** Glucocorticoids (GC) are crucial regulators of homeostasis and function. Despite its negative side effects, glucocorticoid therapy in neonates is widely used antenatally for accelerating fetal lung maturation in cases of preterm birth. GC action is mediated via glucocorticoid receptors — ligand-activated transcription factors. Cell death and viability in the neonatal brain are regulated by many factors, but the glucocorticoid receptor signalling is high above them. The present work studies the changes in the expression of genes for apoptosis regulators with Bcl-2 homology (BH) domains (*Bcl-xL*, *Bax*, *Bim*, *Bok*, *Bid*) in the neonatal rat hippocampus after dexamethasone (DEX) and CpдA administration. CpдA is a dissociative ligand — glucocorticoid receptor modulator — that shifts glucocorticoid receptor (GR) activity toward transrepression. Ligands administration to P2 pups caused different patterns of timeline changes in the expression of the studied genes. We observed the first increase in the mRNA level of the genes which have glucocorticoid response element (GRE) (*Bcl-xL*, *Bim*) in their promoter 30 min after DEX administration. Activated GR action on cells in the neonatal hippocampus is complex and long-lasting; it could also contain receptor homo- and heterodimerisation. Using rat pheochromocytoma PC12 cells as a test system, we assessed GR-GR and GR-MR (mineralocorticoid receptor) dimerisation with proximity ligation assay (PLA) assay separately in the nucleus and cytoplasm after DEX and CpдA administration. An increase in GR-GR dimers in the cell nucleus was observed only after DEX administration. In the cell cytoplasm, we observed a gradual (DEX more than CpдA) increase in the number of both GR-GR and GR-MR dimers.

**Keywords:** glucocorticoid receptor, brain cell type markers, development, hippocampus, neocortex, apoptosis regulator protein, proximity ligation assay (PLA).

## Introduction

High levels of glucocorticoids (GCs) resulting from hormonal therapy or early life stress severely affect the development of the brain (Lanshakov et al. 2016; Oitzl et al. 2010). It causes cell death of certain brain areas by indirect excitotoxicity (Lanshakov et al. 2016). During the neonatal period, elevated GC levels also cause behavioural abnormalities as well as impairment of learning and memory in the future (Holson et al. 1995; Nagano et al. 2008). The long-lasting neuro-behavioural consequences of early life exposures to stress or its hormones evidently occur due to the hormonal effects on the sensitive cells that express glucocorticoid receptors (GRs) (Shaburova, Lanshakov 2020; Shishkina et al. 2015a; 2015b). Among the key processes that GCs could affect in the neonatal brain are cell viability and apoptosis. GC acts via its receptors — intracellular ligand-activated transcription factors. Activated glucocorticoids receptors (GRs) could affect expression of the main apoptosis regulator proteins (Shishkina et al. 2015b). The BCL2 family of proteins is the hallmark of apoptosis regulation (van Delft, Huang 2006). This family has pro-apoptotic and anti-apoptotic members. Some of them possess glucocorticoid response element (GRE) in their promoter, some have nGRE or both, some do not seem to be regulated by GCs. Activated GR could affect transcription in several ways: by transactivation on positive +GRE, by transrepression on negative nGRE and by interaction (tethering) with other transcription factors, which has complex consequences for transcription (Surjit et al. 2011). Preferable pathways to affect transcription are determined mostly by the ligand. Several compounds that shift GR activity toward transrepression were recently discovered (Dezitter et al. 2014). Detailed molecular dynamics of classical and transrepression GR ligands on expression of Bcl apoptosis regulators in the neonatal brain is unclear and requires additional studies. To assess the influence on brain cell viability, we investigated the expression timeline of apoptosis regulatory genes with Bcl-2 homology (BH) domains — *Bcl-xL*, *Bax*, *Bim*, *Bok*, *Bid* — in the rat neonatal hippocampus after administration of dexamethasone (DEX) and CpdA — a GR modulator ligand that selectively activates GR-mediated transrepression. The negative glucocorticoid response element (nGRE) mediates DNA-dependent transrepression by GR and differs dramatically from classical activating response elements (GRE). Therefore, CpdA action on rat neonatal hippocampus could be completely different from DEX. In the process of GR transactivation, it dimerizes with itself. In

transrepression, dimerization with mineralocorticoid receptor (MR) could happen. These two types of interaction could have an impact on GR genomic action. To assess GR-GR and GR-MR interaction after DEX and CpdA, the proximity ligation method (PLA) was used on PC12 cells.

## Materials and methods

### *Animals and experimental design*

All procedures were conducted in accordance with Directive 2010/63/EU of the EU and the Russian Ministry of Health regulations on Good Laboratory Practice (supplement to order No. 199n of 1 April 2016) and approved by the Animal Care Committee, Institute of Cytology and Genetics. All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used. Pregnant Wistar rats were housed individually (22–24 °C, 12 hours light/dark cycle) with free access to food and water. The day of birth was considered as P0. DEX phosphate 0.2 mg/kg (KRKA, Slovenia), CpdA (*sc-221677*, Santa-Cruz) 0.2 mg/kg were injected subcutaneously in 25 µl saline (SAL); for the control group, the same volume of SAL was injected. For the gene expression experiments, there were 6–8 animals in the group. Pups were injected sequentially with a 7 min interval needed for further brain snap freezing. After injection, pups were returned to the mother. When the needed time had passed, hippocampi were dissected and snap frozen in liquid nitrogen.

### *Real-time RT-qPCR analysis*

Total cellular RNA was isolated using a single-step acidic phenol extraction as previously described (Lanshakov et al. 2016). Reverse transcription was performed with MMLV Reverse Transcriptase (Sibenzyme) 1µg total RNA and oligo(dT) primer (Evrogen). All real-time PCR reactions were performed using the ABI ViiA7 system (ThermoFisher scientific) and a standard two-stage cycle. Amplifications were done using the real time PCR Master Mix SYBR qPCRmix +LowROX (Evrogen) and primers from Table 1.

### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry was done as previously described (Drozd, Lanshakov 2020; Lanshakov et al. 2017; 2016; Menshanov et al. 2015) with antibodies from Table 2.

### *PLA staining*

PC12 cells were cultivated using standard protocols. 12 hours before the experiments the cells were seeded on poly-l-lysine covered coverslips

Table 1. Sequences and catalogue numbers of primers and taqman assays used in this study

Gene	Sequence or catalog number
<i>Bid-F</i>	agtcatccacaacattgccagg
<i>Bid-R</i>	gcaccctcagtcctctcatttcta
<i>Bim-F</i>	agagatacggatcgcacagg
<i>Bim-R</i>	gtcttccgctctcgtaat
<i>Bok-F</i>	gaattgtacgcaagaccctgg
<i>Bok-R</i>	gctgaccacacacttgagga
<i>Bcl-xl</i>	Rn00437783_m1 (Thermofisher scientific)
<i>Bax</i>	Rn02532082_g1 (Thermofisher scientific)

Table 2. Antibody numbers, host species, dilutions used in the study for BCL-XL immunohistochemistry

Cat No.	Target	Host species	Dilution
sc-8392 (Santa-cruz)	BCL-XL	mouse	1:200
A10037 (Thermofisher scientific)	Mouse IgG	donkey anti mouse conjugated Alexa 568	1:400

in a 24-well plate at the density of  $0.1 \times 10^6$ . The following morning 100  $\mu$ M DEX or CpdA in the culture medium was applied for 30 min. After that the cells were fixed with 4% buffered paraformaldehyde for 5 min. Then the coverslips were washed 2 times for 10 min in 1xPBS, following cell permeabilisation in 1xPBS containing 0.2% Triton X-100 (PBST). Nonspecific binding blocking was done with Duolink blocking solution for 1 h at 37 °C. Then the coverslips were incubated in respective primary antibody pairs (Table 3) overnight at 4 °C. Afterwards the coverslips were washed with PBST twice for 10 min. Duolink (DUO92102-1KT) probes and signal amplification were conducted according to the manufacturer's protocol. After the final washes for cytoplasm and nuclear counterstain, the cells were incubated with Alexa 488 conjugated phalloidin 20  $\mu$ M in 1xPBS and 300 nM DAPI in 1x PBS, respectively. Afterwards cells were washed twice for 10 min in 1xPBS and mounted on glass slides with Mowiol.

### Microscopy

All images were acquired using Zeiss LSM 780 confocal microscope using 488 nm, 561 nm and

405 nm lasers. Panoramic images of the whole brain were taken using the tile scan mode with the 20x objective. For the BCL-XL immunohistochemistry analysis, hippocampal non-confocal panoramic images were taken with the tile scan mode, the Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objective and a 200  $\mu$ m pinhole. Then, fluorescence intensity of the red channel in the CA3 area was measured using the ZEN software in 10 images per animal. For the PLA image acquisition, the Plan-Apochromat 100x objective NA = 1.4 was used, and Z-stacks were taken with the pinhole set at 1AU. The PLA images were analysed using the Cell Profiler program. A software pipeline that counts Cy3 labelled PLA interaction signal separately in nucleus and cytoplasm was created. Total 20 cells per group were analysed in the PLA analysis.

### Statistics

Gene expression data were analysed using the one-way ANOVA with Fisher's LSD post-hoc aposterior analysis. The PLA data were analysed using the one-way ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test. Differences between means were estimated using the above analyses

Table 3. Antibody numbers, host species, dilutions used in the PLA assay staining

Cat No.	Target	Host species	Dilution
MABS1250 (Millipore)	MR	mouse	1:200
12041S (Cell Sign.)	GR	rabbit	1:200
sc-56851(Santa-cruz)	GR	mouse	1:200

Effects of the factors as well as differences between groups were considered significant at probability less than 0.05.

## Results

### Expression timeline of apoptosis regulator proteins with BH domains in the neonatal hippocampus after DEX and Cpda

To assess the GR impact on hippocampal cell viability, we studied the expression timeline of apoptosis regulators with BH domains after two different GR ligands administration to P2 rat pups: classical dexamethasone and Cpda. A glucocorticoid receptor modulator, Cpda is a “dissociating” GR ligand. It prevents GR dimerization and shifts GR activity towards transrepression. Expression of different apoptosis regulatory genes was investigated. Some of them are pro-apoptotic, others are anti-apoptotic. *Bim* and *Bcl-xL* have classical GRE in their promoters, while *Bcl-xL* also has several negative nGRE besides classical GRE (Fig. 1A). We did not observe any significant changes in the mRNA level for any studied genes after the SAL injection (all  $p > 0.05$ ). These groups were merged for further statistical analysis. Interestingly, an elevation of the mRNA level of genes with

GRE (*Bim*, *Bcl-xL*) was observed 30 minutes after the subcutaneous DEX injection [*Bim* —  $F(6, 45) = 3.9962$ ,  $p = 0.00273$ ; *Bcl-xL* —  $F(6, 46) = 7.4192$ ,  $p = 0.00001$ ] (Fig. 1B). The mRNA level of *Bid* proapoptosis regulator elevated 1 h after DEX administration;  $F(6, 43) = 3.2729$ ,  $p = 0.00969$  (Fig. 1B). The mRNA elevation of *Bok* proapoptosis regulator was observed 2 h after DEX administration;  $F(6, 42) = 6.2119$ ,  $p = 0.00010$  (Fig. 1B). This 2 h interval is greater than 30 min response time interval for the genes with GRE. We did not observe any changes in the *Bax* mRNA level after DEX administration. Not so much expression change was observed after Cpda administration. A small decline in the *Bid* mRNA level was observed 6 h after administration;  $F(11, 83) = 1.2525$ ,  $p = 0.05$ . The *Bax* mRNA level did not change after DEX, but its small increase was observed 30 min after Cpda administration;  $F(11, 84) = 3.0167$ ,  $p = 0.00196$ . Changes in the mRNA level were accompanied by changes in the protein levels. The BCL-XL protein level increased 1 h after DEX administration;  $F(1, 8) = 23.393$ ,  $p = 0.00129$  (Fig. 1C, D). Remarkably, intensive BCL-XL staining was observed in the hippocampal CA3 region where the Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression site is (Fig. 1C).

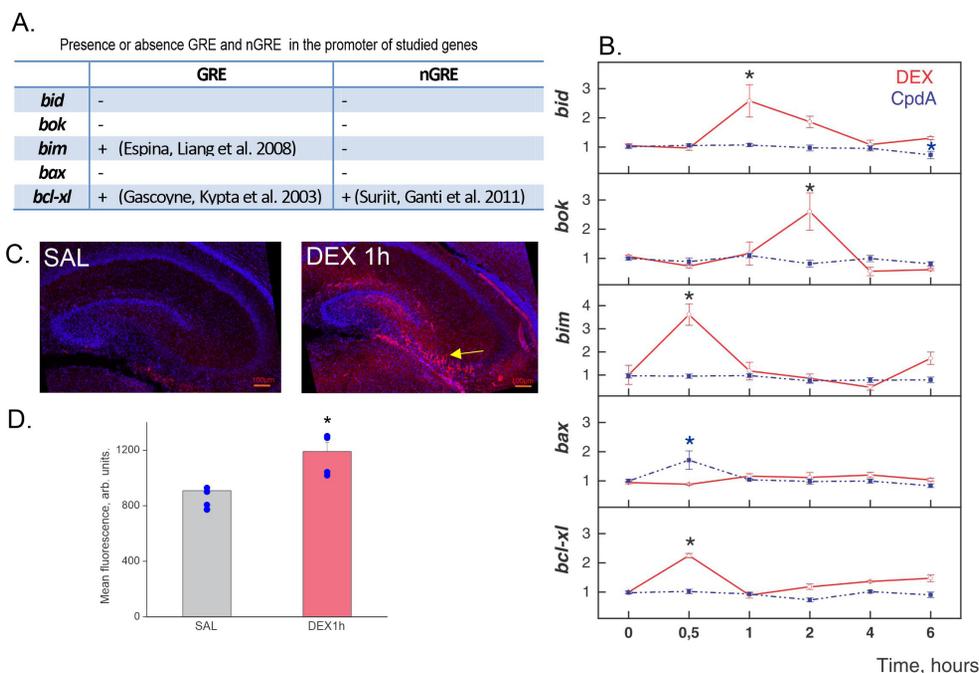


Fig. 1. Changes in the expression timeline of apoptosis regulators genes after DEX and Cpda administration. (A) Presence or absence of GRE and nGRE in the promoters of the genes for apoptosis regulatory proteins. (B) Changes in the expression timeline of the apoptosis regulatory proteins after DEX 0.2 mg/kg (red lines) and Cpda 0.2 mg/kg (blue lines) administration. Black asterisk for the group after DEX administration compared to the control group with SAL injection using the one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ); blue asterisk for the group after Cpda injection compared to the control group with SAL injection using the one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ). (C) Representative microscopic images of Bcl-xL immunostaining on P2 rat hippocampi 1 h after DEX administration. Yellow arrow shows CA3 neurons with intensive Bcl-xL staining. Scale bar 100  $\mu$ m. (D) Quantification of Bcl-xL immunohistochemical signal in hippocampal CA3 area ( $n = 4-5$ ), one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 23.393$ ,  $p = 0.00129$ , compared to the SAL control group

### Evaluation of GR-GR and GR-MR dimerization after DEX and Cpda

To assess the impact of the GR homo- and heterodimerization on transcription changes after DEX and Cpda, proximity ligation assay (PLA) was chosen. PLA is a method that allows in situ detection of protein interaction. It is based on the detection of proximity between two proteins with secondary antibodies conjugated with oligonucleotide (PLA probe). Two different PLA probes in close proximity could form a template for rolling circle polymerase, and so the signal is amplified (Fig. 2A). Fig. 2B shows representative confocal images where red dots are PLA signals labelled with Cy3. 30 minutes after GR ligands administration to the PC12 cells there was a significant elevation of GR-GR dimers in the cell nucleus only after DEX ad-

ministration compared to the control group ( $F(5, 1707) = 12,712, p < 0.05$ ; Fig. 2C). As is expected, no elevation of GR-GR dimers was observed after Cpda administration. Interestingly, after the Cpda administration the number of MR-GR heterodimers decreased (Fig. 2C), but after DEX we did not observe any changes in MR-GR dimers in the cell nucleus (Fig. 2C). In the cell cytoplasm there was a completely different situation. DEX administration produces the highest increase in both types of dimers: GR-GR and MR-GR ( $F(5, 1062) = 13.496, p < 0.05$ ; Fig. 2D). Cpda applied to the culture media causes low elevation in the cell cytoplasm of both dimer types as well (Fig. 2D). It should be noted that with our Cell profiler pipeline, average PLA detected signals in the nucleus were higher than in the cytoplasm.

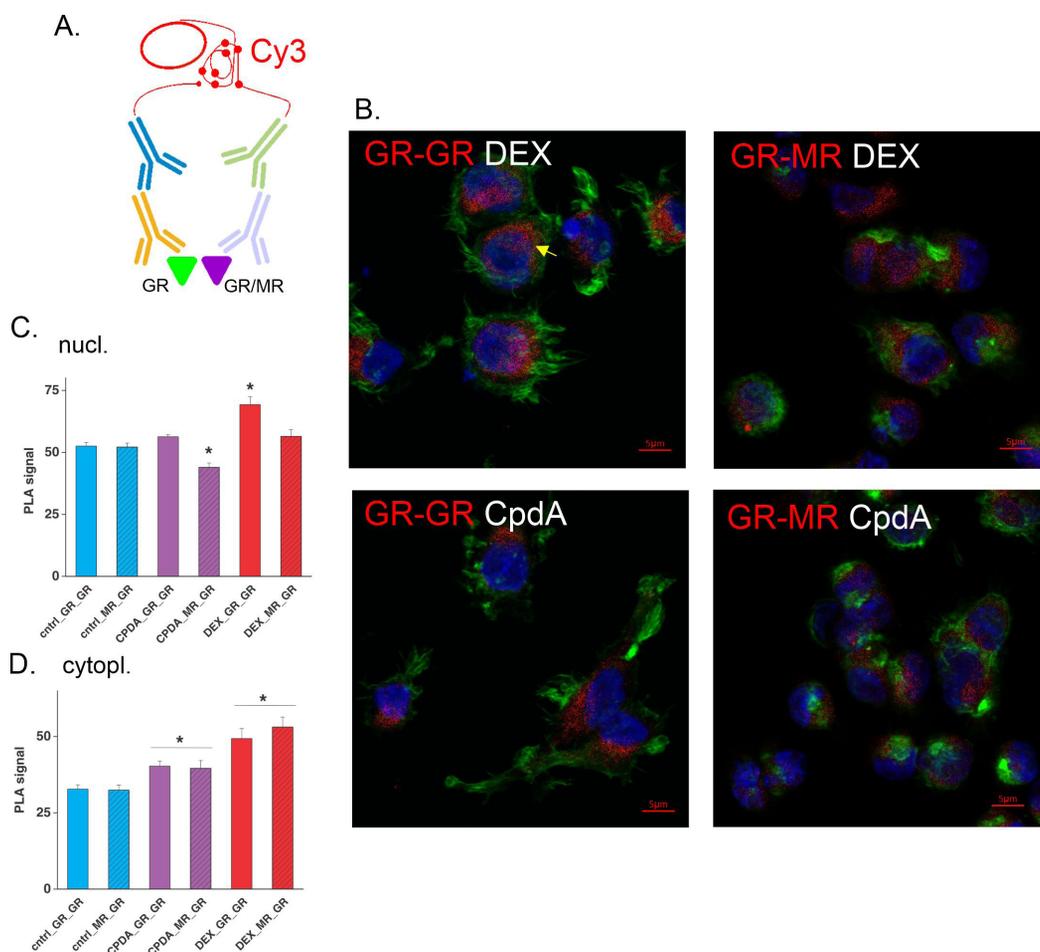


Fig. 2. Homo- (GR-GR) and hetero-dimerization (GR-MR) in the PC12 cells after DEX and Cpda administration. (A) Schematics of the method. Primary antibodies (AB) raised in different species binds to the target proteins, then secondary antibodies with conjugated nucleotides bind to respective primary AB. Afterwards, a template for rolling circle amplification polymerase is formed, and it makes concatamers. The fluorescently labelled probe binds to the concatamerised template. (B) Representative confocal images of PC12 cell after the PLA assay. Red — the PLA signal, Cy3 labelled; green — Alexa 488 phalloidin staining for counterstain cytoplasm; blue — nuclear counterstain DAPI staining. Scale bar 5  $\mu\text{m}$ . (C) Evaluation of the GR-GR and GR-MR dimerization with the PLA assay on the PC12 as a test system. The PLA signal in the nucleus; one-way ANOVA, asterics —  $p < 0.05$ , compared to the untreated control group. (D) The PLA signal in the cytoplasm; one-way ANOVA, asterics —  $p < 0.05$ , compared to the untreated control group

## Discussion

In the present work we studied expression of the main apoptotic regulatory proteins with BH domain in the neonatal hippocampus after administration of dexamethasone or a novel dissociative GR ligand — CpdA. Interestingly, the action of DEX on expression of genes possessing GRE in their promoters (*Bcl*, *Bim*) in vivo was observed 30 min after the DEX subcutaneous injection to P2 rat pups. It is similar to the GR action on genes expression in cell culture experiments (Reddy et al. 2009). This observation is consistent with the timeline tracking results for stress-induced GR activation in GRE luciferase reporter transgenic mice (Lee et al. 2016). Usually, for most of the genes an interval of 18–40 min is required for the gene expression response in cell culture (Reddy et al. 2009). Repression of the genes caused by activated GR in cell culture experiments begins later: in 44–53 min (Reddy et al. 2009). After a subcutaneous injection of the dissociative glucocorticoid modulator ligand (CpdA), we observed a small decline only in the *Bid* mRNA level 6 hours after the injection. That is much longer than the time needed for cells in culture. An increase in the *Bid* mRNA level was also observed 1 hour after DEX administration. These data could lead us to the conclusion that the *Bid* promoter could possibly possess GRE and nGRE as well; however, there have been no reports proving that yet. For the gene repression, much longer time might be needed for the mRNA level to decline, usually around 1–6 hours, but it depends on the particular mRNA stability or binding with RNA binding proteins like YTHDF2 that affect RNA stability (Du et al. 2016). Recent sci-fate and single cells transcriptomic studies revealed that glucocorticoids cause shifts of cells to a new transcriptional state that could take up to 10 hours (Cao et al. 2020). Overall, the investigated changes in the expression timeline in neonatal hippocampus after DEX had the opposite effect on the expression of BH3 apoptosis regulators. After DEX, an increase in the mRNA level of pro-apoptotic members — *Bid*, *Bim*, *Bok* — and anti-apoptotic *Bcl-xL* was observed. BCL-XL protein level increased in the neonatal hippocampus 1 h after DEX administration as well. Remarkably, BCL-XL elevated in the hippocampal CA3 region (Fig. 2C). BDNF is also more prominent in this hippocampal region. *Bcl-xL* and *Bdnf* are both regulated intensively by neuronal activity, stress and by GR's as well (Lanshakov et al. 2017; Shishkina et al. 2015b). Taking into account the same expression site in the hippocampus, a complex intersected mutual self-regulation net of *Bcl-xL* and *Bdnf* could be proposed.

As reported before, glucocorticoids could possibly cause cell death by indirect mechanisms like excitotoxicity in the neonatal brain (Lanshakov et al. 2016). Activated GR causes a glutamate release or transcription changes within the first hour and this, in turn, causes secondary changes in genes transcription. *Bok* is implicated in autophagy (Kalkat et al. 2013). The *Bok* mRNA level elevated 2 h after DEX administration, which is postponed from the direct events observed within the first hour. Considering time and absence of GRE in the promoter, it is likely that changes in the *Bok* mRNA level could be due to a secondary event that happened after the primary one activated by GR action.

GR homo- and hetero-dimerization can influence its genomic action. We analysed GR-GR homo- and GR-MR hetero-dimerization using proximity ligation assay after applying different ligands — DEX and CpdA. As is expected, in the cell nucleus, where the GR genomic action is happening, we observed a significant increase in GR-GR dimers only after DEX. The number of GR-MR heterodimers did not change after DEX and even went down after CpdA. In the cell cytoplasm, a gradual elevation of both dimer types was observed. The highest increase in the number of GR-MR dimers in the cytoplasm was observed after DEX. Fewer GR-MR dimers were detected after CpdA. Possibly, GR-MR dimers in the nucleus are minor to GR-GR ones and should be detected with more precise methods involving next generation sequencing. In the cytoplasm GR-MR heterodimers could be formed in the same number as GR-GR dimers, before transfer to the nucleus. It could be due to a possibly more dynamic dimers formation in the cytoplasm than in the nucleus (Tiwari et al. 2017).

Besides glucocorticoids, multiple other factors, such as neurotrophin BDNF and its precursor (Menshanov et al. 2015) as well as hypoxia (Bulygina et al. 2014) affect babies during labour and delivery (Alotaibi et al. 2015) and influence brain development. Nevertheless, the effect of glucocorticoids may be one of the most practically important ones, because these hormones and their synthetic analogues are widely used to prevent chronic lung disease in premature infants (Barrington 2001). Some effects of natural glucocorticoids may be positive for the developing nervous system and reduce apoptotic cell death (Kalinina et al. 2019). However, more often synthetic hormones induce cell loss, reduce neurogenesis and glial proliferation, attenuate dendrite formation, inhibit brain growth and cause abnormalities of brain structure and function (de Kloet et al. 2014; Reynolds 2013). These effects could be attributed to the direct action of the hormone on the GR-expressing cells as well as to

the indirect effects of glucocorticoid that are mediated, for example, through glutamate excitotoxicity (Lanshakov et al. 2016). Nowadays, two potential approaches can be used to prevent some deleterious effects of glucocorticoids on the developing brain. The first approach is to block glutamate excitotoxicity with antagonists of glutamate receptors (Li et al. 2014). The second approach is to activate intracellular processes that interfere with the glucocorticoid action, such as that induced by mild hypoxia (Bulygina et al. 2014). However, both approaches are only suggestions and require further investigation.

### Conclusion

In this work we showed that DEX administration to P2 rat pups leads to an increase in the mRNA level of various apoptosis regulatory genes with BH domain, both pro-apoptotic (*Bid*, *Bim*, *Bok*) and

anti-apoptotic (*Bcl-xL*). We observed a rise in the mRNA level of genes with GRE 30 min after injection. After Cpda, a small increase in the *Bax* mRNA level was observed 30 min after injection and a small decrease in the *Bid* mRNA level was observed 6 hours after administration. Such discrepancies in action could be explained by different GR-GR and GR-MR dimer formation. On the PC12 cell line we showed that the number of GR-GR dimers in the cell nucleus increased only after DEX administration. In the cell cytoplasm, a gradual increase (DEX more than Cpda) in the number of both dimer types (GR-GR and GR-MR) was observed. Possibly, dimers formation after ligand administration goes faster in the cytoplasm than in the cell nucleus.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

### Author contributions

LDA — manuscript writing; LDA, KTS, SuEV — experimental design; LDA, KTS, SuEV, BVV — animal injections and specimen collection; LDA, KTS, SuEV — qRT-PCR; LDA, VVB — immunohistochemistry, confocal microscopy; LDA — cell culture and PLA staining, LTA — PLA samples microscopy and cell profiler analysis.

### References

- Alotaibi, M., Arrowsmith, S., Wray, S. (2015) Hypoxia-induced force increase (HIFI) is a novel mechanism underlying the strengthening of labor contractions, produced by hypoxic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 31, pp. 9763–9768. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1503497112> (In English)
- Barrington, K. J. (2001) The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: A systematic review of RCTs. *BioMed Central Pediatrics*, vol. 1, article 1. <https://www.doi.org/10.1186/1471-2431-1-1> (In English)
- Bulygina, V. V., Men'shanov, P. N., Lanshakov, D. A., Dygalo, N. N. (2014) The effects of dexamethasone and hypoxia on the content of active caspase-3 in the cerebellum and the behavior of neonatal rats. *Biology Bulletin*, vol. 41, no. 6, pp. 540–544. <https://www.doi.org/10.1134/s1062359014060028> (In English)
- Cao, J., Zhou, W., Steemers, F. et al. (2020) Sci-fate characterizes the dynamics of gene expression in single cells. *Nature Biotechnology*, vol. 38, no. 8, pp. 980–988. <https://www.doi.org/10.1038/s41587-020-0480-9> (In English)
- de Kloet, E. R., Claessens, S. E. F., Kentrop, J. (2014) Context modulates outcome of perinatal glucocorticoid action in the brain. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 5, article 100. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00100> (In English)
- Dezitter, X., Fagart, J., Taront, S. et al. (2014) A structural explanation of the effects of dissociated glucocorticoids on glucocorticoid receptor transactivation. *Molecular Pharmacology*, vol. 85, no. 2, pp. 226–236. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085860> (In English)
- Drozd, U. S., Lanshakov, D. A. (2020) Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump. *Integrative Physiology*, vol. 1, no. 2, pp. 144–146. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-2-144-146> (In English)
- Du, H., Zhao, Y., He, J. et al. (2016) YTHDF2 destabilizes m<sup>6</sup>A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nature Communication*, vol. 7, article 12626. <https://www.doi.org/10.1038/ncomms12626> (In English)
- Holson, R. R., Gough, B., Sullivan, P. et al. (1995) Prenatal dexamethasone or stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats. *Neurotoxicol Teratology*, vol. 17, no. 4, pp. 393–401. [https://www.doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)00074-n](https://www.doi.org/10.1016/0892-0362(94)00074-n) (In English)
- Kalinina, T., Sukhareva, E., Bulygina, V. et al. (2019) P.216 Long-term up-regulation of tyrosine hydroxylase gene expression after neonatal dexamethasone. *European Neuropsychopharmacology*, vol. 29, suppl. 6, pp. S166–S167. <https://www.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.259> (In English)

- Kalkat, M., Garcia, J., Ebrahimi, J. et al. (2013) Placental autophagy regulation by the BOK-MCL1 rheostat. *Autophagy*, vol. 9, no. 12, pp. 2140–2153. <https://www.doi.org/10.4161/autophagy.26452> (In English)
- Lanshakov, D. A., Drozd, U. S., Dygalo, N. N. (2017) Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in Neurons. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 82, no. 3, pp. 340–344. <https://www.doi.org/10.1134/S0006297917030129> (In English)
- Lanshakov, D. A., Sukhareva, E. V., Kalinina, T. S., Dygalo, N. N. (2016) Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. *Neurobiology of Disease*, vol. 91, pp. 1–9. <https://www.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.009> (In English)
- Lee, M.-S., Kim, Y.-H., Park, W.-S. et al. (2016) Temporal variability of glucocorticoid receptor activity is functionally important for the therapeutic action of fluoxetine in the hippocampus. *Molecular Psychiatry*, vol. 21, no. 2, pp. 252–260. <https://www.doi.org/10.1038/mp.2014.137> (In English)
- Li, S.-X., Fujita, Y., Zhang, J.-C. et al. (2014) Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiology of Disease*, vol. 62, pp. 124–134. <https://www.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.004> (In English)
- Menshanov, P. N., Lanshakov, D. A., Dygalo, N. N. (2015) proBDNF is a major product of *bdnf* gene expressed in the perinatal rat cortex. *Physiological Research*, vol. 64, no. 6, pp. 925–934. <https://www.doi.org/10.33549/physiolres.932996> (In English)
- Nagano, M., Ozawa, H., Suzuki, H. (2008) Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. *Neuroscience Research*, vol. 60, no. 4, pp. 364–371. <https://www.doi.org/10.1016/j.neures.2007.12.005> (In English)
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., de Kloet, E. R. (2010) Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 34, no. 6, pp. 853–866. <https://www.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.07.006> (In English)
- Reddy, T. E., Pauli, F., Sprouse, R. O. et al. (2009) Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Research*, vol. 19, no. 12, pp. 2163–2171. <https://www.doi.org/10.1101/gr.097022.109> (In English)
- Reynolds, R. M. (2013) Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: Two decades of testing the hypothesis – 2012 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 1, pp. 1–11. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.012> (In English)
- Shaburova, E. V., Lanshakov, D. A. (2020) Effects of ketamine and stress on the neurotrophin receptors expression. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 1, pp. 75–77. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-75-77> (In English)
- Shishkina, G. T., Bulygina, V. V., Dygalo, N. N. (2015a) Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress. *Psychopharmacology*, vol. 232, no. 5, pp. 851–860. <https://www.doi.org/10.1007/s00213-014-3718-8> (in English)
- Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., Bulygina, V. V. et al. (2015b) Anti-apoptotic protein Bcl-xL expression in the midbrain raphe region is sensitive to stress and glucocorticoids. *PLoS One*, vol. 10, no. 12, article 0143978. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0143978> (In English)
- Surjit, M., Ganti, K. P., Mukherji, A. et al. (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, vol. 145, no. 2, pp. 224–241. <https://www.doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027> (In English)
- Tiwari, M., Oasa, S., Yamamoto, J. et al. (2017) A quantitative study of internal and external interactions of homodimeric glucocorticoid receptor using fluorescence cross-correlation spectroscopy in a live cell. *Scientific Reports*, vol. 7, article 4336. <https://www.doi.org/10.1038/s41598-017-04499-7> (In English)
- van Delft, M. F., Huang, D. C. S. (2006) How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research*, vol. 16, no. 2, pp. 203–213. <https://www.doi.org/10.1038/sj.cr.7310028> (In English)



УДК 577.25

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-49-60>

## Влияние нарушения синтеза кинуренинов на память у дрозофилы

Е. А. Никитина<sup>✉1,2</sup>, А. В. Журавлев<sup>1</sup>, Е. В. Савватеева-Попова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, 191186, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, д. 48

### Сведения об авторах

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

Александр Владимирович Журавлев,  
SPIN-код: 3366-7956,  
Scopus AuthorID: 56603096400,  
ORCID: 0000-0003-2673-4283,  
e-mail: beneor@mail.ru

Елена Владимировна Савватеева-Попова,  
SPIN-код: 2559-4778,  
Scopus AuthorID: 6603078303,  
e-mail: esavvateeva@mail.ru

### Для цитирования:

Никитина, Е. А., Журавлев, А. В., Савватеева-Попова, Е. В. (2021) Влияние нарушения синтеза кинуренинов на память у дрозофилы. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 49–60. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-49-60>

**Получена** 29 января 2021; прошла рецензирование 15 февраля 2021; принята 15 февраля 2021.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Государственной программы РФ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема 63.1) и гранта РФФИ (№ 20-015-00300 А).

**Права:** © Авторы (2021). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Проблема продолжительности жизни, особенностей медицинской помощи населению пожилого и старческого возраста становится все актуальнее в большинстве стран мира, в том числе и в России. С увеличением продолжительности жизни нейродегенеративные заболевания (НДЗ) выходят в развитых странах на ведущее место. Одна из причин возникновения нейродегенеративных изменений в мозге — нарушение кинуренинового пути обмена триптофана (КПОТ). Мутанты КПОТ дрозофилы представляют собой адекватные модели для экспериментального изучения роли нейрокинуренинов в изменениях мозговых функций, которые приводят к нарушениям обучения и памяти. Известно несколько мутантных линий *D. melanogaster*, характеризующихся дефектами кинуренинового пути метаболизма триптофана, в том числе *vermilion* ( $v^1$ , блок на уровне фермента триптофаноксигеназы, приводящий к отсутствию кинуренинов и накоплению триптофана). Показано, что мутант  $v^1$  сохраняет нормальную способность к обучению при формировании как среднесрочной, так и долгосрочной памяти. Дефектов формирования среднесрочной памяти не обнаружено. Напротив, выявлены нарушения сохранения долгосрочной памяти у данного мутанта. Отсутствие 8-суточной долгосрочной памяти у мутанта  $v^1$  с подавлением КПОТ может быть следствием дисбаланса кинуренинов.

**Ключевые слова:** дрозофила, обучение, память, кинурениновый путь обмена триптофана, нейрокинуренины.

# Effect of impaired kynurenine synthesis on memory in *Drosophila*

E. A. Nikitina<sup>✉1,2</sup>, A. V. Zhuravlev<sup>1</sup>, E. V. Savvateeva-Popova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., Saint Petersburg 191186, Russia

## Authors

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

Aleksandr V. Zhuravlev,  
SPIN: 3366-7956,  
Scopus AuthorID: 56603096400,  
ORCID: 0000-0003-2673-4283,  
e-mail: beneor@mail.ru

Elena V. Savvateeva-Popova,  
SPIN: 2559-4778,  
Scopus AuthorID: 6603078303,  
e-mail: esavvateeva@mail.ru

## For citation:

Nikitina, E. A., Zhuravlev, A. V.,  
Savvateeva-Popova, E. V.  
(2021) Effect of impaired  
kynurenine synthesis on memory  
in *Drosophila*. *Integrative  
Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 49–60.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-49-60>

**Received** 29 January 2021;  
reviewed 15 February 2021;  
accepted 15 February 2021.

**Funding:** This study was supported  
by the Government-Run Program  
of the Russian Federation 47 GP  
“Scientific and Technological  
Development of the Russian  
Federation” (2019–2030) (63.1)  
and the Russian Foundation  
for Basic Research  
(grant no. 20-015-00300 A).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC  
License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Abstract.** Such issues as life expectancy and medical care for the elderly are gaining momentum all over the world, including Russia. With an increase in life expectancy, neurodegenerative diseases (NDD) are on the rise in developed countries. One of the reasons for neurodegenerative changes in the brain is a disturbance of the kynurenine tryptophan metabolism pathway (KTMP). *Drosophila* KTMP mutants are suitable models for the experimental study of neurokynurenines that change brain functions resulting in learning and memory impairments. There are several mutant stocks of *D. melanogaster* with defects in the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, including *vermilion* ( $v^1$ , a block at the level of the tryptophan oxygenase enzyme that stops the production of kynurenines and leads to the accumulation of tryptophan). The mutant  $v^1$  has been shown to maintain normal learning ability, both in medium- and long-term memory formation. No defects in medium-term memory formation were detected. In contrast, the mutant showed the disturbances of long-term memory. The absence of eight-day long-term memory in the KTMP-suppressed mutant  $v^1$  may be a consequence of kynurenine imbalance.

**Keywords:** *Drosophila*, learning, memory, kynurenine pathway of tryptophan metabolism, neurokynurenines.

## Введение

Одной из фундаментальных задач современной нейронауки является познание того, как мозг участвует в приобретении, хранении и воспроизведении различных форм памяти (Savvateeva-Popova et al. 2015). Это крайне важно в свете роста числа нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), сопровождающихся прогрессирующей потерей памяти.

Сегодня благодаря открытию ряда универсальных механизмов нейродегенерации как при

естественном старении, так и в условиях болезни на наших глазах происходит фактическая смена весьма расплывчатой общей теории патогенеза НДЗ современными концепциями. Так, в 90-е годы XX века была предложена глутаматергическая теория нейродегенеративного процесса. Согласно этой теории, универсальным механизмом развития всех НДЗ является эксайтотоксичность, под которой понимают повреждение и гибель нейронов в результате избыточной активации постсинаптических NMDAR (N-methyl D-aspartate receptor) (Beal 1992).

Важнейшую роль в этих процессах играют нейрокинуренины, являющиеся агонистами и антагонистами NMDAR.

Незаменимая аминокислота триптофан поступает в организм с пищей и подвергается следующим превращениям: ресинтез белков, выделение с мочой, расщепление бактериями кишечника, промежуточный обмен. Кинурениновый путь обмена триптофана (КПОТ) — магистральный путь катаболизма этой аминокислоты в организме человека (~95%) (Badawy 2017). До последнего времени метаболиты КПОТ называли «кинуренины» (по названию первого из долгоживущих метаболитов этого пути). Теперь считается, что их более точно следует называть нейрокинуренинами (НЕКИ) — по аналогии с нейропептидами, нейрогормонами и т. п. (Лапин 2004).

Естественные флуктуации уровня мозговых НЕКИ модулируют процессы синаптической нейротрансмиссии. Так, кинуреновая кислота (*kynurenic acid*, KYNA) в повышенных концентрациях является антагонистом широкого спектра возбуждающих ионотропных рецепторов глутамата (iGluR), а также  $\alpha 7$  подтипа никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR). Хинолиновая кислота (*quinolinic acid*, QUIN), напротив, является агонистом NR2A-субъединицы ионотропного глутаматного NMDAR, в повышенных концентрациях вызывая развитие нейродегенеративных процессов в ткани мозга. 3-гидроксикинуренин (*3-hydroxykynurenine*, 3-НОК), QUIN и 3-гидроксиантрахинолиновая кислота генерируют пероксид водорода, индуцирующий гиперпродукцию токсичных свободных радикалов в клетке (Schwarcz, Pellicari 2002). Среди нейротоксических метаболитов кинуренинового пути особого внимания заслуживает 3-НОК, который подвержен автоокислению, легко генерирует свободные радикалы, способен претерпевать спонтанное дезаминирование и декарбоксилирование (Nikitina et al. 2018).

Интегральный эффект продуктов КПОТ определяется соотношением концентраций возбуждающих метаболитов (QUIN, кинуренин (*kynurenine*, KYN), 3-НОК) и их антагонистов (KYNA, 3-оксипируват, никотинамид) (Лапин 2004). Нарушения метаболизма кинурениновых продуктов являются первичным звеном в развитии ряда нейропатологических процессов. Изменения уровня метаболитов КПОТ у человека наблюдаются при ряде неврологических и психических заболеваний (Schwarcz et al. 2012). Известны два основных молекулярных механизма нейроактивности кинуренинов — модуляция активности клеточных рецепторов

и модуляция окислительно-восстановительных процессов в нервной клетке (Журавлев и др. 2020).

Важные сведения о нейрофизиологической активности кинуренинов получены на беспозвоночных животных, таких как дрозофила и пчела. Генетическое блокирование тех или иных стадий КПОТ у мутантов *D. melanogaster* и *A. mellifera* приводит к отсутствию или накоплению определенных метаболитов этого пути, предшествующих мутационному блоку, что сопровождается заметными изменениями поведенческой активности насекомых и нарушением ряда физиологических процессов в ЦНС. Мутанты КПОТ дрозофилы и пчелы являются естественными моделями для исследования воздействия этих метаболитов на поведенческие процессы у животных с высокоорганизованной ЦНС, а также для изучения молекулярных механизмов их активности.

К числу мутантов по КПОТ у дрозофилы относится *vermilion* ( $v^1$ ) с блокированной первой ключевой стадией распада триптофана (фермент триптофанпирролаза или индоламин-2,3-диоксигеназа, EC 1.13.11.52) и поэтому характеризующийся отсутствием всех метаболитов кинуренинового пути (рис. 1). Ген *vermilion* локализован в X-хромосоме (X: 9F11), его последовательность включает 6 экзонов: 83, 161, 134, 607, 94 и 227 п.н. (Searless et al. 1990). У мутанта *cinnabar* (*cn*, 2R: 43E16) неактивен фермент кинуренин-3-гидроксилаза (EC 1.14.13.9) — соответственно, блокирована стадия превращения KYN в 3-НОК. У мутанта *cardinal* (*cd*, 3R: 94A1-94E2) инактивирован фермент распада 3-НОК феноксазиносинтетаза (ФС) (EC 1.10.3.4), результатом чего является накопление в тканях мозга 3-НОК. Следует напомнить, что путь биосинтеза никотинамида из 3-НОК, включая промежуточный метаболит QUIN, у насекомых отсутствует (Лопатина и др. 2004).

У мутантов КПОТ дрозофилы и пчелы наблюдается ряд физиологических и поведенческих изменений. Дефицит кинуренинов ингибирует долговременную память у пчелы (Lopatina et al. 2011). Память у позвоночных и беспозвоночных животных представляет собой сложный многостадийный процесс: каждая из его фаз во времени регулируется специфическими генами и белками, а ее материальной основой служат структурно-функциональные изменения в определенных участках мозга (Журавлев и др. 2015). Если сохранение памяти на ранних стадиях связано с активацией внутриклеточных сигнальных каскадов, в частности систем метаболизма цАМФ (Davis, Kiger 1981), то консолидация



Цель нашего исследования — оценка влияния дисрегуляции КПОТ на процессы среднесрочной и долгосрочной памяти у мутанта *vermilion* ( $v^1$ ) *D. melanogaster*, модельного объекта, широко используемого для изучения молекулярных основ нейропатологий. Удобство дрозофилы как модели определяется рядом ее характеристик: короткий жизненный цикл и легкость постановки молекулярно-генетических экспериментов, консервативность генов, регулирующих элементарные поведенческие процессы, а также наличие у дрозофилы сложно устроенного мозга, способного к выработке условных рефлексов, обучению и формированию различных видов памяти.

## Материалы и методы

### Линии дрозофилы

Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем».

В работе использовали следующие линии *D. melanogaster*:

1. *Canton-S* (*CS*) — линия дикого типа; темно-красный цвет глаз.

2. *vermilion* ( $v^1$ ) — мутация в гене триптофан-2,3-диоксигеназы (X:9F11); отсутствие кинуренинов, ярко-красный цвет глаз.

Мутант  $v^1$  был приведен к генетическому фону линии дикого типа *CS* путем 30 циклов «кантонизации». Мух выращивали в стаканчиках объемом 160 мл на стандартной изюмно-дрожжевой среде при  $+25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ , 60% влажности и свето-темновом цикле 12:12 ч.

### Оценка способности к обучению и формированию памяти

Для поведенческих опытов вылупившихся насекомых без наркотизации сортировали по полу. Отбирали самцов исследуемых линий и содержали их индивидуально на изюмно-дрожжевой среде. В качестве объектов ухода для самцов всех анализируемых линий использовали оплодотворенных за сутки до опыта самок линии *CS* в возрасте пяти суток. Исследования проводили на взрослых мухах в возрасте 5 дней при температуре  $+25 \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$  в первой половине дня. Обучение и тестирование проводили в экспериментальных камерах из оргстекла (диаметр — 15 мм, высота — 5 мм).

Методика УРПУ была использована в модификации Камышева (Kamyshev et al. 1999) — как в процессе тренировки, так и при тестиро-

вании использовали оплодотворенных самок. Для выработки УРПУ (тренировки) пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *CS*. Память тестировали через разные интервалы времени. В качестве контроля использовали самцов, не имеющих опыта полового поведения. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 с, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация и преследование, вибрация, лизание, попытка копуляции), а также время исполнения элементов, не связанных с ухаживанием (активность (побежка), принижение, покой). Регистрацию начинали через 45 с после помещения мухи в камеру. В каждой группе (контрольной, сразу после тренировки и через определенные интервалы времени после тренировки) тестировали не менее 20 пар мух. Для расшифровки и анализа данных использовали специально разработанные компьютерные программы (автор программ — Н. Г. Камышев).

Для каждого самца вычисляли индекс ухаживания (ИУ), т. е. время ухаживания самца за самкой, выраженное в процентах от общего времени наблюдения. Для количественной оценки результатов обучения вычисляли индекс обучения (ИО) по следующей формуле:

$$\begin{aligned} \text{ИО} &= [(ИУ_{\text{H}} - ИУ_{\text{T}}) / ИУ_{\text{H}}] \times 100\% = \\ &= (1 - ИУ_{\text{T}} / ИУ_{\text{H}}) \times 100\%, \end{aligned}$$

где  $ИУ_{\text{H}}$  и  $ИУ_{\text{T}}$  — средние индексы ухаживания для независимых выборок самцов, не имеющих опыта полового поведения, и самцов, прошедших тренировку (Kamyshev et al. 1999; Sokal, Rohlf 1995).

Методика условно-рефлекторного подавления ухаживания была использована для оценки способности к обучению и формированию среднесрочной (ССП) и долгосрочной (ДСП) памяти самцов дрозофилы.

Для оценки способности к обучению и формированию **среднесрочной памяти** пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали в экспериментальную камеру вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *CS* и оставляли на 30 мин. Обучение и память тестировали сразу (0 мин) и через 3 часа (180 мин) после тренировки, используя новых оплодотворенных самок *CS* в возрасте 5 суток.

**Долгосрочную память** у самцов вырабатывали в соответствии с протоколом УРПУ, модифицированной для ДСП (Redt-Clouet et al.

2012). Пятисуточного самца тестируемой линии, не имеющего опыта полового поведения, помещали вместе с оплодотворенной пятисуточной самкой *CS* в стакан с питательной средой (объем свободного пространства — около 3 см<sup>3</sup>) и оставляли на 5 ч. Обучение и память тестировали через разные интервалы времени: сразу после тренировки, через 2 суток и через 8 суток после тренировки, используя новых оплодотворенных самок *CS* в возрасте 5 суток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием рандомизационного анализа (автор программ — Н. Г. Камышев). Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Оценка способности к обучению и формированию среднесрочной памяти

У линии дикого типа *CS* индекс обучения длительное время сохранялся на уровне, достиг-

нутом сразу после окончания тренировки, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения и формирования ССП (рис. 2А).

У мутанта *v<sup>1</sup>* наблюдали УРПУ, и ИО длительное время сохранялся на уровне, достигнутом сразу после окончания тренировки, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения и формирования ССП.

Таким образом, ни у линии дикого типа *CS*, ни у мутанта *v<sup>1</sup>* не выявлено дефектов обучения и ССП.

### Оценка способности к обучению и формированию долгосрочной памяти

У линии дикого типа *CS* индекс обучения на протяжении 8 суток сохранялся на уровне, достигнутом сразу после окончания тренировки, что является свидетельством нормального протекания процессов обучения и формирования ДСП (рис. 2В).

У линии *v<sup>1</sup>* также не отмечено нарушений способности к обучению. ИО через 2 суток со-

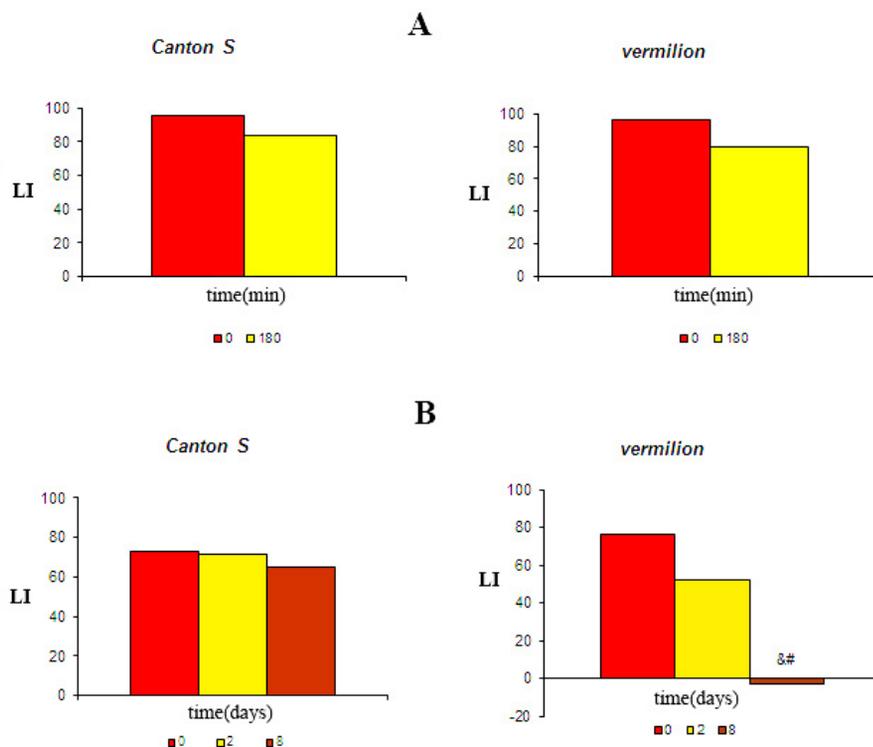


Рис. 2. Динамика сохранения условно-рефлекторного подавления ухаживания при тестировании среднесрочной (А) и долгосрочной (В) памяти у самцов линии дикого типа *Canton S* и мутанта *vermilion* *Drosophila melanogaster*. По оси абсцисс: время после завершения тренировки; по оси ординат: ИО — индекс обучения, у. е. # — ИО в отсроченном тесте достоверно ниже, чем в тесте сразу после тренировки; & — ИО достоверно ниже, чем у линии дикого типа *CS* в аналогичных условиях (двусторонний тест рандомизации,  $p < 0,05$ )

Fig. 2. The dynamics in the suppression of the conditioned courtship reflex when testing medium-term (A) and long-term (B) memory in *D. melanogaster* males of wild type stock *Canton S* and mutant *vermilion*.

The horizontal axis: time after the completion of training; the vertical axis: LI (IO) — learning index. # — LI in delayed test is reliably lower than immediately after training; & — LI is reliably lower than in wild type line of *CS* under analogous conditions (bilateral randomization test,  $p < 0.05$ )

хранялся на высоком уровне. Однако через 8 суток ИО значительно снижался, достоверно отличаясь от линии дикого типа *CS* и принимая отрицательные значения. Для данной линии выявлено нарушение сохранения ДСП.

### Обсуждение результатов

Полученные нами данные весьма нетривиальны, т. к. во многих физиологических и поведенческих тестах кинурениновые мутанты ведут себя по-разному. Так, у *cd* начиная с 12 суток наблюдается прогрессирующее снижение ССП, тогда как у *sn* подобные нарушения отсутствуют (Savvateeva et al. 2000). Для *cd* показаны возраст-зависимые нарушения брачной песни самца и повышение уровня апоптотической нейродегенерации, при этом у *sn* наблюдается противоположная тенденция (Savvateeva-Popova et al. 2003). У *cd* в возрасте 13–29 суток скорость и длительность спонтанных побегов выше, а частота ниже, чем у *CS*, для *sn* же картина обратная (Zhuravlev et al. 2020). Вместе с тем вышеуказанные тесты не выявляют различий между *CS*, *sn* и *cd* в возрасте 5 суток. Проявление межлинейных различий, таким образом, носит отложенный характер. Это подтверждают и наши данные: *CS* и *v<sup>1</sup>* демонстрируют одинаковую способность к формированию ССП, а также 2-суточной ДСП. Снижение же 8-суточной ДСП у *v<sup>1</sup>* может быть следствием возраст-зависимых изменений, вызванных отсутствием кинуренинов в ЦНС дрозофилы. Нарушения ДСП при недостатке кинуренинов наблюдается также и у пчел (Lopatina et al. 2011).

Формирование, сохранение и воспроизведение ДСП у дрозофилы в парадигме УРПУ имеет достаточно сложную нейрофизиологическую основу. Существенную роль в данном процессе играют грибовидные тела (ГТ) — парная структура мозга, ответственная за различные формы ассоциативного обучения, преимущественно ольфакторного (Heisenberg 2003). В состав ГТ входит калликс и окружающие его клетки Кеньона. Их нервные отростки формируют стебелек (педункулус), разветвляясь затем на вертикальные ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ) и горизонтальные ( $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\gamma$ ) лопасти, которые, в свою очередь, подразделяются на ряд морфофункциональных зон (Aso, Hattori et al. 2014). Зоны лопастей ГТ избирательно вовлечены в процессы сохранения и/или воспроизведения различных форм памяти. Важную роль в УРПУ также играет вентральный добавочный калликс, получающий иннервацию от зрительных долей и посылающих отростки в область  $\gamma 5$  (Aso, Hattori et al. 2014; Montague, Baker 2016). Это согласуется с данными Ш. Макбрайда

с коллегами (McBride et al. 1999), согласно которым для УРПУ существенное значение имеют визуальные стимулы.

Здесь нужно отметить, что у всех кинурениновых мутантов нарушена пигментация глаз. Индексы ухаживания у *CS*, *sn*, *cd* не различаются и также существенно не изменяются с возрастом — следовательно, реакция на ольфакторные и визуальные стимулы у кинурениновых мутантов в целом сохраняется на уровне нормы (Savvateeva et al. 2000). Нельзя исключать, однако, что дефект пигментации приводит к искажению зрительного восприятия самцом самки, влияя на сохранение или воспроизведение 8-суточной ДСП.

Основой зависимого от ГТ ассоциативного обучения у дрозофилы служит модификация активности синаптических выходов ГТ, регулирующих те или иные программы поведения. Ключевую роль в данном процессе играет дофаминергическая система, влияющая на активность синаптических контактов между собственными нейронами ГТ (клетками Кеньона) и нейронами, располагающимися на выходе ГТ (mushroom body output neurons, MBON). Дофаминовая система в мозге дрозофилы ответственна за различные виды внутреннего подкрепления, как аттрактивного, так и аверсивного. В мозге дрозофилы имеется несколько кластеров дофаминергических нейронов (Мао, Davis 2009), которые активируются безусловными стимулами различной природы. Аксоны этих нейронов взаимодействуют с синапсами ГТ — MBON в составе специфических компартментов. Аксоны MBON проецируются в высшие интегративные центры мозга, такие как верхний протоцеребрум и боковой рог. В этих же районах сосредоточено порядка 90% дендритов дофаминовых нейронов. Таким образом, данные структуры формируют своеобразный круг, являющийся основой ассоциативного обучения и памяти (Aso, Hattori et al. 2014).

Активность MBON отражает не исходную модальность поступающего стимула (ольфакторный, визуальный и др.), а его биологическое значение (аттрактивный/аверсивный). По-видимому, в норме поддерживается баланс между «аттрактивными» и «аверсивными» MBON. Обучение же выводит систему из равновесия, склоняя ее в ту или иную сторону, что и определяет поведение мухи — предпочтение некоторого стимула или его избегание (Aso, Sitaraman et al. 2014). Характер реакций также зависит от предсуществующих ассоциаций УС — БС (Aso, Rubin 2016).

Таким образом, УРПУ чувствительно к контексту и может вызываться сочетанием стимулов разной природы. Любой дисбаланс в такой сложной системе может нарушать ее функционирование, особенно в тех случаях, когда речь идет о долговременных эффектах.

Белок-зависимая консолидация 24 ч ДСП в парадигме УРПУ требует активации дофаминергических нейронов aSP13, иннервирующих  $\gamma 5$  нейроны ГТ, между 8 и 11 ч после начала тренировки. В процесс обучения белок Orb2A локализуется в синапсах у нейронов ГТ, которые затем могут быть вовлечены в консолидацию. Продолжительная активность aSP13 индуцирует формирование димеров Orb2A — Orb2B в синапсах, являющихся субстратом ДСП (Keleman et al. 2007). Активация aSP13 необходима и достаточна для подавления ухаживания, повышая чувствительность мух к антиафродизику — цВА (Keleman et al. 2012). aSP13 пролонгирует активность синапсов  $\gamma 5$  — М6 MBON (Zhao et al. 2018). В консолидации также участвует другая важная структура мозга — центральный комплекс, а именно — нейроны вевровидного тела vFB, активирующие aSP13 и вызывающие у мухи сон (Dag et al. 2019).

Таким образом, система нейронов aSP13 —  $\gamma 5$  — М6 является ключевой для формирования ДСП в данной экспериментальной парадигме. В одной из работ, однако, было показано, что нарушение функционирования  $\gamma$ -нейронов ГТ не влияет на воспроизведение 3-часовой — 8-суточной памяти. Возможно,  $\gamma$ -нейроны необходимы для формирования ДСП, а другие нейроны ГТ, такие как  $\alpha\beta$ , регулируют ее воспроизведение (Redt-Clouet et al. 2012).

Нейроны М6 MBON, играющие ключевую роль в процессе консолидации, являются глутаматергическими нейронами (Zhao et al. 2018). В консолидации ольфакторной памяти у дрозо-

филы также принимают участие гены субъединиц NR1 и NR2 NMDAR, локализованных в эллипсоидном теле центрального комплекса (Wu et al. 2007). Последнее может объяснять отсутствие 8-суточной памяти у мутанта  $v^1$  с подавлением КПОТ, при котором может повышаться индекс KYNA/3-НОК (Breda et al. 2016). Накопление KYNA, антагониста глутаматных рецепторов, в значительных количествах может нарушать нормальное протекание процессов в ЦНС, в частности при шизофрении (Wonodi, Schwarcz 2010), а также может оказывать токсическое действие на нервную систему, снижая продолжительность жизни у *сн* (Камышев 1980). Вместе с тем ряд физиологических и поведенческих характеристик у *v* изменяется противоположным образом сравнительно с диким типом (Лопатина и др. 2004; Смирнов, Пономаренко 1981). Не исключено, что негативное воздействие на сохранение ДСП у  $v^1$  может оказывать 6-кратный избыток триптофана и его перенаправление с КПОТ на серотониновый и триптаминовый пути. При этом обе линии сохраняют нормальную способность к обучению при формировании как ССП, так и ДСП.

### Заключение

В последнее время в нейробиологии наметился возврат интереса к кинуренинам, обусловленный их вовлеченностью в целый ряд заболеваний (болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, боковой амиотрофической склероз), а также процессы старения (Журавлев и др. 2020). Для поиска способов лечения заболеваний, зависящих от нарушения баланса кинуренинов, необходимо понимание молекулярных механизмов активности метаболитов КПОТ, что предопределяет важность привлечения животных моделей, в том числе мутантов дрозофилы.

### Литература

- Журавлев, А. В., Никитина, Е. А., Савватеева-Попова, Е. В. (2015) Обучение и память у дрозофилы: физиолого-генетические основы. *Успехи физиологических наук*, т. 46, № 1, с. 76–92.
- Журавлев, А. В., Никитина, Е. А., Савватеева-Попова, Е. В. (2020) Роль кинуренинов в регуляции поведения и процессов памяти у дрозофилы. *Интегративная физиология*, т. 1, № 1, с. 40–50. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50>
- Камышев, Н. Г. (1980) Продолжительность жизни и ее связь с двигательной активностью у мутантов дрозофилы метаболического пути триптофан-ксантомматин. *Доклады Академии наук СССР*, т. 253, № 6, с. 1476–1480.
- Лапин, И. П. (2004) *Стресс. Тревоги. Депрессия. Алкоголизм. Эпилепсия (Нейрокинурениновые механизмы и новые подходы к лечению)*. СПб.: ДЕАН, 224 с.
- Лопатина, Н. Г., Чеснокова, Е. Г., Смирнов, В. Б. и др. (2004) Кинурениновый путь обмена триптофана и его значение в нейрофизиологии насекомых. *Энтомологическое обозрение*, т. 83, № 1, с. 3–22.

- Смирнов, В. Б., Пономаренко, В. В. (1981) Влияние мутаций, блокирующих кинурениновый путь обмена триптофана, на нейрональную активность у *Drosophila melanogaster*. Доклады Академии наук СССР, т. 258, № 2, с. 489–491.
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y. et al. (2014) The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, vol. 3, article e04577. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.04577>
- Aso, Y., Rubin, G. M. (2016) Dopaminergic neurons write and update memories with cell-type-specific rules. *eLife*, vol. 5, article e16135. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.16135>
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T. et al. (2014) Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife*, vol. 3, article e04580. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.04580>
- Badawy, A. A-B. (2017) Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 10. [Online]. <https://www.doi.org/10.1177/1178646917691938>
- Bailey, C. H., Bartsch, D., Kandel, E. R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 93, no. 24, pp. 13445–13452. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.93.24.13445>
- Beal, M. F. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB Journal*, vol. 6, no. 15, pp. 3338–3344. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.15.1464368>
- Breda, C., Sathyaikumar, K. V., Sograte Idrissi, S. et al. (2016) Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 19, pp. 5435–5440. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1604453113>
- Dag, U., Lei, Z., Le, J. Q. et al. (2019) Neuronal reactivation during post-learning sleep consolidates long-term memory in *Drosophila*. *eLife*, vol. 8, article e42786. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.42786>
- Davis, R. L., Kiger, J. A. Jr. (1981) *Dunce* mutants of *Drosophila melanogaster*: Mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *Journal of Cell Biology*, vol. 90, no. 1, pp. 101–107. <https://www.doi.org/10.1083/jcb.90.1.101>
- Ejima, A., Smith, B. P. C., Lucas, C. et al. (2005) Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Current Biology*, vol. 15, no. 3, pp. 194–206. <https://www.doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.035>
- Griffith, L. C., Ejima, A. (2009) Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: Diverse plasticity of a reproductive behavior. *Learning & Memory*, vol. 16, no. 12, pp. 743–750. <https://www.doi.org/10.1101/lm.956309>
- Heisenberg, M. (2003) Mushroom body memoir: From maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, no. 4, pp. 266–275. <https://www.doi.org/10.1038/nrn1074>
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., Bragina, J. V. (1999) *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learning & Memory*, vol. 6, no. 1, pp. 1–20. PMID: 10355520.
- Keleman, K., Krüttner, S., Alenius, M., Dickson, B. J. (2007) Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 1587–1593. <https://www.doi.org/10.1038/nn1996>
- Keleman, K., Vrontou, E., Krüttner, S. et al. (2012) Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning. *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 145–149. <https://www.doi.org/10.1038/nature11345>
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Chesnokova, E. G., Savvateeva-Popova, E. V. (2011) Behavioral and molecular consequences of deficiency of endogenous kynurenines in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 41, no. 6, pp. 626–631. <https://www.doi.org/10.1007/s11055-011-9465-y>
- Mao, Z., Davis, R. L. (2009) Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 3, article 5. <https://www.doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009>
- McBride, S. M. J., Giuliani, G., Choi, C. et al. (1999) Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, vol. 24, no. 4, pp. 967–977. [https://www.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81043-0](https://www.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81043-0)
- Montague, S. A., Baker, B. S. (2016) Memory elicited by courtship conditioning requires mushroom body neuronal subsets similar to those utilized in appetitive memory. *PLoS One*, vol. 11, no. 10, article e0164516. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0164516>
- Nikitina, E. A., Chernikova, D. A., Vasilieva, O. V. et al. (2018) Effect of antioxidants on medium-term memory formation in mutant *cardinal* of *Drosophila melanogaster*. *Biotechnology*, vol. 34, no. 3, pp. 67–77. <https://www.doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-3-67-77>
- Redt-Clouet, C., Trannoy, S., Boulanger, A. et al. (2012) Mushroom body neuronal remodelling is necessary for short-term but not for long-term courtship memory in *Drosophila*. *European Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 11, pp. 1684–1691. <https://www.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08103.x>
- Savvateeva, E., Popov, A., Kamyshev, N. et al. (2000) Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the *Drosophila* mutant *cardinal* accumulating 3-hydroxykynurenine. *Journal of Neural Transmission*, vol. 107, no. 5, pp. 581–601. <https://www.doi.org/10.1007/s007020070080>
- Savvateeva-Popova, E. V., Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V. (2015) Neurogenetics and neuroepigenetics. *Russian Journal of Genetics*, vol. 51, no. 5, pp. 518–528. <https://doi.org/10.1134/S1022795415050075>

- Savvateeva-Popova, E. V., Popov, A. V., Heinemann, T., Riederer, P. (2003) *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway as a model for ageing studies. In: G. Allegri, C. V. L. Costa, E. Ragazzi et al. (eds.). *Developments in tryptophan and serotonin metabolism*. Boston: Springer Publ., pp. 713–722. (Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 527). [https://www.doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0\\_84](https://www.doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_84)
- Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., Wu, H.-Q. (2012) Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. *Nature Review Neuroscience*, vol. 13, no. 7, pp. 465–477. <https://www.doi.org/10.1038/nrn3257>
- Schwarcz, R., Pelliccari, R. (2002) Manipulation of brain kynurenins: Glial targets, neuronal effects and clinical opportunities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 303, no. 1, pp. 1–10. <https://www.doi.org/10.1124/jpet.102.034439>
- Searless, L. L., Ruth, R. S., Pret, A. M. et al. (1990) Structure and transcription of the *Drosophila melanogaster* *vermilion* gene and several mutant alleles. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10, no. 4, pp. 1423–1431. <https://www.doi.org/10.1128/mcb.10.4.1423>
- Siegel, R. W., Hall, J. C. (1979) Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 7, pp. 3430–3434. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.76.7.3430>
- Sokal, R. R., Rohlf, J. F. (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Co. Publ., 887 p.
- Wonodi, I., Schwarcz, R. (2010) Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, vol. 36, no. 2, pp. 211–218. <https://www.doi.org/10.1093/schbul/sbq002>
- Wu, C.-L., Xia, S., Fu, T.-F. et al. (2007) Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 1578–1586. <https://www.doi.org/10.1038/nn2005>
- Zawistowski, S. (1988) A replication demonstrating reduced courtship of *Drosophila melanogaster* by associative learning. *Journal of Comparative Psychology*, vol. 102, no. 2, pp. 174–176. <https://www.doi.org/10.1037/0735-7036.102.2.174>
- Zhao, X., Lenek, D., Dag, U. et al. (2018) Persistent activity in a recurrent circuit underlies courtship memory in *Drosophila*. *eLife*, vol. 7, article e31425. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.31425>
- Zhuravlev, A. V., Vetrovoy, O. V., Ivanova, P. N., Savvateeva-Popova, E. V. (2020) 3-hydroxykynurenine in regulation of *Drosophila* behavior: The novel mechanisms for cardinal phenotype manifestations. *Frontiers in Physiology*, vol. 11, article 971. <https://www.doi.org/10.3389/fphys.2020.00971>

## References

- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y. et al. (2014) The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, vol. 3, article e04577. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.04577> (In English)
- Aso, Y., Rubin, G. M. (2016) Dopaminergic neurons write and update memories with cell-type-specific rules. *eLife*, vol. 5, article e16135. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.16135> (In English)
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T. et al. (2014) Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife*, vol. 3, article e04580. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.04580> (In English)
- Badawy, A. A-B. (2017) Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 10. [Online]. <https://www.doi.org/10.1177/1178646917691938> (In English)
- Bailey, C. H., Bartsch, D., Kandel, E. R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 93, no. 24, pp. 13445–13452. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.93.24.13445> (In English)
- Beal, M. F. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB Journal*, vol. 6, no. 15, pp. 3338–3344. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.15.1464368> (In English)
- Breda, C., Sathyasaikumar, K. V., Sograte Idrissi, S. et al. (2016) Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 19, pp. 5435–5440. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.1604453113> (In English)
- Dag, U., Lei, Z., Le, J. Q. et al. (2019) Neuronal reactivation during post-learning sleep consolidates long-term memory in *Drosophila*. *eLife*, vol. 8, article e42786. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.42786> (In English)
- Davis, R. L., Kiger, J. A. Jr. (1981) *Dunce* mutants of *Drosophila melanogaster*: Mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *Journal of Cell Biology*, vol. 90, no. 1, pp. 101–107. <https://www.doi.org/10.1083/jcb.90.1.101> (In English)
- Ejima, A., Smith, B. P. C., Lucas, C. et al. (2005) Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Current Biology*, vol. 15, no. 3, pp. 194–206. <https://www.doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.035> (In English)

- Griffith, L. C., Ejima, A. (2009) Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: Diverse plasticity of a reproductive behavior. *Learning & Memory*, vol. 16, no. 12, pp. 743–750. <https://www.doi.org/10.1101/lm.956309> (In English)
- Heisenberg, M. (2003) Mushroom body memoir: From maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 4, no. 4, pp. 266–275. <https://www.doi.org/10.1038/nrn1074> (In English)
- Kamyshev, N. G. (1980) Prodolzhitel'nost' zhizni i ee svyaz' s dvigatel'noy aktivnost'yu u mutantov drozofily metabolicheskogo puti triptofan-ksantommatin [Lifespan and its association with locomotor activity in tryptophan-xanthommatin metabolic pathway *Drosophila* mutants]. *Doklady akademii nauk SSSR*, vol. 253, no. 6, pp. 1476–1480. (In Russian)
- Kamyshev, N. G., Iliadi, K. G., Bragina, J. V. (1999) *Drosophila* conditioned courtship: Two ways of testing memory. *Learning & Memory*, vol. 6, no. 1, pp. 1–20. PMID: [10355520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10355520/). (In English)
- Keleman, K., Krüttner, S., Alenius, M., Dickson, B. J. (2007) Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 1587–1593. <https://www.doi.org/10.1038/nn1996> (In English)
- Keleman, K., Vrontou, E., Krüttner, S. et al. (2012) Dopamine neurons modulate pheromone responses in *Drosophila* courtship learning. *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 145–149. <https://www.doi.org/10.1038/nature11345> (In English)
- Lapin, I. P. (2004) *Stress. Trevogi. Depressiya. Alkogolizm. Epilepsiya (Nejrokinureninovyie mekhanizmy i novye podkhody k lecheniyu) [Stress. Anxiety. Depression. Alcoholism. Epilepsy (Neurokynurenine mechanisms and new treatment approaches)]*. Saint Petersburg: Dean Publ., 224 p. (In Russian)
- Lopatina, N. G., Chesnokova, E. G., Smirnov, V. B. et al. (2004) Kinureninovyj put' obmena triptofana i ego znachenie v nefrofiziologii nasekomykh [Kynurenine pathway of tryptophan metabolism and its significance in neurophysiology of insects]. *Entomologicheskoe obozrenie — Entomological Review*, vol. 83, no. 1, pp. 3–22. (In Russian)
- Lopatina, N. G., Zachepilo, T. G., Chesnokova, E. G., Savvateeva-Popova, E. V. (2011) Behavioral and molecular consequences of deficiency of endogenous kynurenines in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 41, no. 6, pp. 626–631. <https://www.doi.org/10.1007/s11055-011-9465-y> (In English)
- Mao, Z., Davis, R. L. (2009) Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: Anatomical and physiological heterogeneity. *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 3, article 5. <https://www.doi.org/10.3389/neuro.04.005.2009> (In English)
- McBride, S. M. J., Giuliani, G., Choi, C. et al. (1999) Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*, vol. 24, no. 4, pp. 967–977. [https://www.doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81043-0](https://www.doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81043-0) (In English)
- Montague, S. A., Baker, B. S. (2016) Memory elicited by courtship conditioning requires mushroom body neuronal subsets similar to those utilized in appetitive memory. *PLoS One*, vol. 11, no. 10, article e0164516. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0164516> (In English)
- Nikitina, E. A., Chernikova, D. A., Vasilieva, O. V. et al. (2018) Effect of antioxidants on medium-term memory formation in mutant *cardinal* of *Drosophila melanogaster*. *Biotechnology*, vol. 34, no. 3, pp. 67–77. <https://www.doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-3-67-77> (In English)
- Redt-Clouet, C., Trannoy, S., Boulanger, A. et al. (2012) Mushroom body neuronal remodeling is necessary for short-term but not for long-term courtship memory in *Drosophila*. *European Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 11, pp. 1684–1691. <https://www.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08103.x> (In English)
- Savvateeva, E., Popov, A., Kamyshev, N. et al. (2000) Age-dependent memory loss, synaptic pathology and altered brain plasticity in the *Drosophila* mutant *cardinal* accumulating 3-hydroxykynurenine. *Journal of Neural Transmission*, vol. 107, no. 5, pp. 581–601. <https://www.doi.org/10.1007/s007020070080> (In English)
- Savvateeva-Popova, E. V., Nikitina, E. A., Medvedeva, A. V. (2015) Neurogenetics and neuroepigenetics. *Russian Journal of Genetics*, vol. 51, no. 5, pp. 518–528. <https://doi.org/10.1134/S1022795415050075> (In English)
- Savvateeva-Popova, E. V., Popov, A. V., Heinemann, T., Riederer, P. (2003) *Drosophila* mutants of the kynurenine pathway as a model for ageing studies. In: G. Allegri, C. V. L. Costa, E. Ragazzi et al. (eds.). *Developments in tryptophan and serotonin metabolism*. Boston: Springer Publ., pp. 713–722. (Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 527). [https://www.doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0\\_84](https://www.doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_84) (In English)
- Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., Wu, H.-Q. (2012) Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. *Nature Review Neuroscience*, vol. 13, no. 7, pp. 465–477. <https://www.doi.org/10.1038/nrn3257> (In English)
- Schwarcz, R., Pelliccari, R. (2002) Manipulation of brain kynurenines: Glial targets, neuronal effects and clinical opportunities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 303, no. 1, pp. 1–10. <https://www.doi.org/10.1124/jpet.102.034439> (In English)
- Searless, L. L., Ruth, R. S., Pret, A. M. et al. (1990) Structure and transcription of the *Drosophila melanogaster* *vermillion* gene and several mutant alleles. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10, no. 4, pp. 1423–1431. <https://www.doi.org/10.1128/mcb.10.4.1423> (In English)
- Siegel, R. W., Hall, J. C. (1979) Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 7, pp. 3430–3434. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.76.7.3430> (In English)

- Smirnov, V. B., Ponomarenko, V. V. (1981) Vliyanie mutatsij, blokiryuyushchikh kinureninovyj put' obmena triptofana, na nejronal'nuyu aktivnost' u *Drosophila melanogaster* [Effect of mutations blocking the kynurenine tryptophan metabolism pathway on neuronal activity in *Drosophila melanogaster*]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, vol. 258, no. 2, pp. 489–491. (In Russian)
- Sokal, R. R., Rohlf, J. F. (1995) *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: W. H. Freeman and Co. Publ., 887 p. (In English)
- Wonodi, I., Schwarcz, R. (2010) Cortical kynurenine pathway metabolism: A novel target for cognitive enhancement in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, vol. 36, no. 2, pp. 211–218. <https://www.doi.org/10.1093/schbul/sbq002> (In English)
- Wu, C.-L., Xia, S., Fu, T.-F. et al. (2007) Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 1578–1586. <https://www.doi.org/10.1038/nn2005> (In English)
- Zawistowski, S. (1988) A replication demonstrating reduced courtship of *Drosophila melanogaster* by associative learning. *Journal of Comparative Psychology*, vol. 102, no. 2, pp. 174–176. <https://www.doi.org/10.1037/0735-7036.102.2.174> (In English)
- Zhao, X., Lenek, D., Dag, U. et al. (2018) Persistent activity in a recurrent circuit underlies courtship memory in *Drosophila*. *eLife*, vol. 7, article e31425. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.31425> (In English)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2015) Obuchenie i pamyat' u drozofily: fiziologo-geneticheskie osnovy [Learning and memory in *Drosophila*: Physiologic and genetic bases]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, vol. 46, no. 1, pp. 76–92. (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Nikitina, E. A., Savvateeva-Popova, E. V. (2020) Rol' kinureninov v regulyatsii povedeniya i protsessov pamyati u drozofily [Role of kynurenines in regulation of behavior and memory processes in *Drosophila*]. *Integrativnaya fiziologiya — Integrative Physiology*, vol. 1, no. 1, pp. 40–50. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-40-50> (In Russian)
- Zhuravlev, A. V., Vetrovoy, O. V., Ivanova, P. N., Savvateeva-Popova, E. V. (2020) 3-hydroxykynurenine in regulation of *Drosophila* behavior: The novel mechanisms for cardinal phenotype manifestations. *Frontiers in Physiology*, vol. 11, article 971. <https://www.doi.org/10.3389/fphys.2020.00971> (In English)



УДК 612.062:577.25

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

## Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс — рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2

Н. Э. Ордян<sup>✉1</sup>, О. В. Малышева<sup>1,2</sup>, В. К. Акулова<sup>1</sup>, Г. И. Холова<sup>1</sup>, С. Г. Пивина<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

### Сведения об авторах

Наталья Эдуардовна Ордян,  
SPIN-код: 9324-5244,  
Scopus AuthorID: 6603325559,  
ORCID: 0000-0002-2492-262X,  
e-mail: [ordyann@infran.ru](mailto:ordyann@infran.ru)

Ольга Викторовна Малышева,  
SPIN-код: 1740-2691,  
Scopus Author ID: 6603763549,  
ORCID: 0000-0002-8626-5071,  
e-mail: [omal99@mail.ru](mailto:omal99@mail.ru)

Виктория Константиновна  
Акулова,  
Scopus AuthorID: 15749860500,  
e-mail: [neo@infran.ru](mailto:neo@infran.ru)

Гулрухсор Исхакджоновна  
Холова,  
e-mail: [garmieva@bk.ru](mailto:garmieva@bk.ru)

Светлана Геннадьевна Пивина,  
SPIN-код: 3324-7408,  
Scopus AuthorID: 6602095959,  
e-mail: [sgpivina@infran.ru](mailto:sgpivina@infran.ru)

### Для цитирования:

Ордян, Н. Э., Малышева, О. В., Акулова, В. К., Холова, Г. И., Пивина, С. Г. (2021) Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс — рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 61–70. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

**Получена** 29 января 2021; прошла рецензирование 22 февраля 2021; принята 24 февраля 2021.

**Финансирование:** Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-015-00186.

**Аннотация.** Такие психопатологии, как депрессия и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), которыми страдают отцы в репродуктивном возрасте, могут оказывать влияние на физиологические функции потомков, в том числе на когнитивные функции и память. Целью исследования являлось сопоставление эффектов стрессирования самцов крыс в двух парадигмах, моделирующих ПТСР («стресс — рестресс») или депрессию («выученная беспомощность»), на память их взрослых потомков-самцов, которую изучали в тестах «пассивное избегание» и «распознавание нового объекта». В связи с вовлеченностью инсулиноподобного фактора роста 2 (Igf2) и его рецептора 2-го типа (Igf2r) в контроль памяти в гиппокампе потомков изучена экспрессия генов *Igf2* и *Igf2r* методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Показано нарушение памяти потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием, сопровождающееся снижением в гиппокампе экспрессии *Igf2*, но не *Igf2r*. У потомков самцов в депрессивноподобном состоянии нарушений памяти и экспрессии генов в гиппокампе не выявлено. Сделано заключение, что одним из факторов, обеспечивающих влияние состояния отца на память потомков, может служить интенсивность стрессорного воздействия, которому подвергается самец-отец, а также о значимости роли снижения в гиппокампе экспрессии *Igf2* в нарушении формирования памяти и длительности ее сохранения.

**Ключевые слова:** посттравматическое стрессовое расстройство, депрессия, модель, потомки, память, инсулиноподобный фактор роста 2, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, гиппокамп, крыса.

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

## Cognitive impairment in the offspring of male rats exposed to stress in “stress — restrest” or “learned helplessness” paradigms: The role of insulin-like growth factor 2

N. E. Ordyan<sup>✉1</sup>, O. V. Malysheva<sup>1,2</sup>, V. K. Akulova<sup>1</sup>, G. I. Kholova<sup>1</sup>, S. G. Pivina<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, 3 Mendeleev Line,  
Saint Petersburg 199034, Russia

### Authors

Natalia E. Ordyan,  
SPIN: 9324-5244,  
Scopus AuthorID: 6603325559,  
ORCID: 0000-0002-2492-262X,  
e-mail: [ordyan@infran.ru](mailto:ordyan@infran.ru)

Olga V. Malysheva,  
SPIN: 1740-2691,  
Scopus AuthorID: 6603763549,  
ORCID: 0000-0002-8626-5071,  
e-mail: [omal99@mail.ru](mailto:omal99@mail.ru)

Viktoria K. Akulova,  
Scopus AuthorID: 15749860500,  
e-mail: [neo@infran.ru](mailto:neo@infran.ru)

Gulrukhsor I. Kholova,  
e-mail: [garmieva@bk.ru](mailto:garmieva@bk.ru)

Svetlana G. Pivina,  
SPIN: 3324-7408,  
Scopus AuthorID: 6602095959,  
e-mail: [sgpivina@infran.ru](mailto:sgpivina@infran.ru)

### For citation:

Ordyan, N. E., Malysheva, O. V.,  
Akulova, V. K., Kholova, G. I.,  
Pivina, S. G.  
(2021) Cognitive impairment  
in the offspring of male rats exposed  
to stress in “stress — restrest”  
or “learned helplessness” paradigms:  
The role of insulin-like growth  
factor 2. *Integrative Physiology*,  
vol. 2, no. 1, pp. 61–70.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

**Received** 29 January 2021;  
reviewed 22 February 2021;  
accepted 24 February 2021.

**Funding:** This study was supported  
by the Russian Foundation for Basic  
Research, project no. 18-015-00186.

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Psychopathologies such as depression and post-traumatic stress disorder (PTSD), which fathers suffer during reproductive years, can affect the physiological functions of the offspring, including cognitive function and memory. The aim of the study was to compare how the stress in male rats affected the memory of their adult male offspring. The experiment modeled two stress paradigms: PTSD (“stress — restrest”) and depression (“learned helplessness”). The methodology included a passive avoidance test and recognition of a new object test. In connection with the involvement of insulin-like growth factor 2 (Igf2) and its receptor type 2 (Igf2r) in memory control, the expression of *Igf2* and *Igf2r* genes in the hippocampus of the offspring was studied by reverse transcription real-time PCR. The study revealed memory impairment in male offspring with a PTSD-like status. It was accompanied by a decrease in the expression of *Igf2*, but not *Igf2r* in the hippocampus. The offspring of depressive males did not show impaired memory and gene expression in the hippocampus. We concluded that the influence of the paternal stress on the memory of their offspring may be dependent on the intensity of stress to which the male was exposed. We also concluded that a decrease in *Igf2* expression in the hippocampus contributed to impaired memory and the duration of memory retention.

**Keywords:** post-traumatic stress disorder, depression, modeling, offspring, memory, insulin-like growth factor 2, receptor of insulin-like growth factor 2, hippocampus, rat.

## Введение

В литературе появились клинические и экспериментальные данные о влиянии нарушения уровня глюкокортикоидных гормонов у отцов на различные физиологические функции потомков. В исследованиях А. Лехнера и соавторов было показано, что потомки отцов, которые страдали посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), демонстрируют нарушение активности гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС), свидетельствующее о снижении чувствительности этой гормональной оси к сигналам отрицательной обратной связи (Lehrner et al. 2014). В экспериментах, где у лабораторных грызунов моделировали депрессию с использованием хронического умеренного стресса, выявлено, напротив, снижение стрессорной активности ГАС (Rodgers et al. 2013). Эти данные указывают, что разные психопатологии отца как в клинике, так и при моделировании в эксперименте могут оказывать различное по своей направленности действие на потомков. Такие различия могут быть обусловлены тем, что при указанных психопатологиях наблюдается диаметрально противоположная активность ГАС. При депрессии активность этой гормональной системы увеличена, что проявляется в повышении базального уровня глюкокортикоидов в крови и снижении ее чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи (Pariante, Lightman 2008). При ПТСР, напротив, чаще всего наблюдается снижение базального уровня кортикостерона с усилением регуляция ГАС по механизму отрицательной обратной связи (Andreasen 2011).

В исследованиях, выполненных ранее, было показано, что моделирование ПТСР в парадигме «стресс — рестресс» у самцов крыс в период сперматогенеза не только оказывает деструктивное влияние на их репродуктивные функции (Pivina et al. 2019), но и проявляется в нарушении памяти у их потомков-самцов в тесте «реакция пассивного избегания» (Ordyan et al. 2020). Выявленные нарушения памяти сопровождались снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2, *Igf2*) в гиппокампе. Остается неизвестным, оказывает ли депрессивноподобное влияние на состояние самцов-отцов на когнитивные функции потомков и экспрессию гена *Igf2* в мозге.

В связи с этим целью исследования являлось сопоставление стрессирования самцов-отцов в двух парадигмах, моделирующих ПТСР или депрессию. Следует отметить, что в большинстве работ, где изучали последствия стрессирования

самцов-отцов у их потомков, использовали различные виды хронического стрессирования (Dietz et al. 2011; Rodgers et al. 2013). Для моделирования депрессии мы использовали парадигму «выученная беспомощность». Выбор этой модели депрессии обосновывался тем, что в данной парадигме животным предъявляется однократное неизбежаемое стрессорное воздействие в течение 1 ч. Однократное стрессорное воздействие используется и при моделировании ПТСР в парадигме «стресс — рестресс», и хотя здесь животных дополнительно стрессируют через 7 суток после первоначального воздействия с целью создания стойкого ПТСР-подобного состояния, эта дополнительная стрессорная процедура является кратким 30-минутным ограничением подвижности. У потомков самцов-отцов в ПТСР-подобном или депрессивноподобном состоянии была исследована память, а в гиппокампе изучена экспрессия гена *Igf2* и его рецептора второго типа (*Igf2r*) в связи с имеющимися в литературе данными о вовлеченности этого ростового фактора в контроль гиппокамп-зависимой памяти (Chen et al. 2011; Yu et al. 2020).

## Объекты и методы исследования

Для проведения экспериментов было использовано 15 крыс линии Wistar (самцы, вес 250–300 г) из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» и их потомки самцы, полученные от интактных самок (вес 200–230 г) той же линии. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище и световом режиме 12:12 ч. Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в директиве Европейского сообщества 2010 г. (2010/63/ЕЕС). Самцы были случайным образом разделены на три группы (моделирование ПТСР — 5 крыс, моделирование депрессии — 5 крыс и контрольная — 5 крыс). После процедуры стрессирования через 46–48 суток каждый самец был посажен к рецептивной самке, находящейся в стадии эструса. На следующий день осуществляли контроль наступления беременности по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке. Беременных самок сразу отсаживали от самца и содержали по 5 особей в клетке до 17 дня беременности, а с 18 дня — в индивидуальных клетках. Пометы содержали с матерью до 30-дневного возраста, а далее по 6–7 особей в соответствии с полом. От каждого самца было получено по два помета.

В качестве модели ПТСР использовали парадигму «стресс — рестресс», в которой самцов подвергали комбинированному воздействию, состоящему из последовательно применяемых стрессоров (двухчасовая иммобилизация в узких пластиковых пенах, двадцатиминутное плавание в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой с температурой  $24 \pm 2$  °С, а после небольшой паузы — эфирный стресс в течение 1 мин). Через шесть суток после комбинированного стресса производили тридцатиминутную иммобилизацию — «рестресс», который служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния. Контроль развития ПТСР-подобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10 суток после «рестресса», который определяли в пробах крови, взятых из хвостовой вены. Для спаривания с самками использовали только тех самцов, базальный уровень кортикостерона в крови которых был снижен по сравнению с соответствующим показателем контрольных самцов.

Для моделирования депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность». Самцов подвергали электрокожному раздражению в клетке с токопроводящим полом размером  $30 \times 18 \times 20$  см. Удары электрического тока (1мА, 50 Гц) длительностью 15 с подавали 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 54 с. Такой режим электрокожной стимуляции создает неизбежность и неконтролируемость воздействия, в результате чего у животного формируется состояние «выученная беспомощность», характеризующееся рядом поведенческих и гормональных нарушений, воспроизводящих симптоматику депрессии у людей (Czén et al. 2016). Контроль развития депрессивноподобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10-е сутки после электрокожной стимуляции, который определяли в пробах крови, взятых из хвостовой вены. Для спаривания с самками использовали только тех самцов, базальный уровень кортикостерона в крови которых был повышен по сравнению с соответствующим показателем контрольных самцов.

Помимо кортикостерона, в крови самцов, у которых моделировали психопатологии, определяли уровень тестостерона. Кровь животных центрифугировали при 2 500 об/мин и температуре 4 °С. Полученную плазму хранили при  $-20$  °С до момента определения в ней уровня кортикостерона и тестостерона. Содержание гормонов в плазме самцов анализировали методом ИФА, используя стандартные наборы

производства «ХЕМА» (Россия) и анализатор Multiskan FS (ThermoFisher Scientific, Финляндия).

Память потомков изучали в тестах «реакция пассивного избегания» (РПИ) и «распознавание нового объекта» (РНО). Особенность теста РПИ заключается в том, что используемый в данном тесте удар электрического тока после захода в темную камеру животным запоминается на достаточно длительный срок, а угашение этой реакции (забывание) можно определить, проводя дополнительные тестирования животных через некоторые промежутки времени после первой сессии обучения. Второй тест связан со способностью животного различать старый объект и новый, а при предъявлении нового объекта — проявлять повышенную исследовательскую активность по отношению к нему. Тестирование памяти осуществляли только у половозрелых потомков самцов весом 230–250 г, родившихся от отцов с ПТСР-подобным или депрессивноподобным состоянием, а также от контрольных отцов ( $n = 10$  в каждой группе животных). С целью нивелирования влияния материнского ухода на исследуемые параметры группы потомков формировали таким образом, чтобы в каждой группе присутствовало только по два самца из помета. Тесты выполняли с 13:00 до 17:00.

Вначале выполняли тест РНО как менее стрессогенный. РНО вырабатывали в установке «открытое поле». В качестве объектов использовали три предмета округлой формы, выполненных из пластика. В первую фазу, «ознакомления», крысам позволяли исследовать два незнакомых объекта в течение 5 минут. Регистрировали время исследования каждого из них. Затем крысу помещали в домашнюю клетку. Во вторую фазу, «тестовую», которую проводили через 24 ч после первой фазы, один из объектов меняли на новый объект. После этого в течение 5 минут регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Для оценки памяти распознавания объектов использовали коэффициент дискриминации ( $K_d$ ), который рассчитывали по формуле:

$$K_d = \frac{\text{Время (Объект Новый)} - \text{Время (Объект Знакомый)}}{\text{Время (Объект Новый)} + \text{Время (Объект Знакомый)}} \times 100$$

Чем меньше  $K_d$ , тем хуже животное различает новый и старый объекты (Cinalli et al. 2020).

На следующие сутки вырабатывали РПИ в камере, состоящей из двух отсеков — светлого и темного, разделенных перегородкой с отверстием и дверцей. Пол темного отсека был

представлен металлическими прутьями, подключенными к источнику тока. В первый день проводили обучение РПИ (первая сессия): крысу помещали в светлый отсек, через 10 сек дверцу в темный отсек открывали. После перехода крысы в темный отсек дверцу закрывали, а животное получало электрокожное раздражение 0,9 мА длительностью 2 сек. Через сутки после обучения проводили первое тестирование (тест 1), где животное снова помещали в светлый отсек (вторая сессия) и повторяли процедуру первой сессии, при этом удар электрическим током не производили. Для исследования угашения РПИ крыс тестировали с разницей в одну неделю (тест 2, 3, 4), повторяя процедуру второй сессии. В каждом тесте фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составило 180 сек.

Экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе изучали у отдельных групп потомков, рожденных от отцов с моделированием психопатологий ( $n = 6$  для каждой группы) или контрольных самцов ( $n = 6$ ). Крыс декапитировали, из мозга выделяли гиппокамп, который помещали в раствор для стабилизации РНК («Евроген», Россия) на 24 ч, а затем хранили до выделения РНК при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора Pure Link RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора High Capacity Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, в присутствии 10 ммоль dNTP, 200 Ед/мл обратной транскриптазы MMLV, расщепленной затравки (3 мг/мл) и с добавлением от 100 до 500 нг тотальной РНК. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

Для исследования экспрессии гена *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (Rn01454518\_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Для анализа экспрессии гена *Igf2r* была использована технология с интеркалирующим красителем (Eva Green) и олигонуклеотидные праймеры, синтезированные «АлкорБио», Россия: прямой TTGCCCTCCAGAAACGGAAG, обратный TACACCACAGTTTCGCTCGT. Данные праймеры ранее были использованы другими авторами (Yu et al. 2020). Предварительно проводили проверку специфичности праймеров с помощью сервиса BLAST и геномных баз данных (Ensemble). Для оценки специфичности

продукта после проведения ПЦР снимали показания кривой плавления. В качестве внутреннего контроля использовали ген *Hprt1* (Rn01527840\_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Исследования выполняли на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ проводили с использованием параметрических критериев и программы «STATISTICA 8.0». Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро — Уилка. В связи с тем, что показатели тестов РПИ не соответствовали нормальному распределению, их приводили к нормальному распределению, логарифмируя по основанию 2. Далее для статистического анализа результатов РПИ использовали двухфакторный ANOVA (день тестирования  $\times$  группа животных) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) результатов отдельных тестов. Для оценки межгрупповых различий в тесте РНО, результатов показателей экспрессии генов *Igf2*, *Igf2r* и уровня гормонов в плазме крови применяли *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

## Результаты

### *Влияние модельных психопатологий на уровень стероидных гормонов в крови самцов-отцов*

С целью контроля развития ПТСП-подобного или депрессивноподобного состояния у самцов отцов на 10 день после «рестресса» или электрокожной стимуляции в крови определяли базальный уровень кортикостерона и тестостерона. Выявлено снижение уровня кортикостерона и тестостерона у самцов с ПТСП-подобным состоянием и повышение уровня кортикостерона у самцов с депрессивноподобным состоянием, сопровождающееся снижением уровня тестостерона (рис. 1).

### *Влияние ПТСП-подобного состояния самца-отца на способность к обучению и память потомков*

Результаты экспериментов, где исследовали выработку и угашение РПИ, а также показатель различения нового и старого объекта (Кд) в тесте РНО у потомков подопытных и контрольных самцов-отцов, представлены

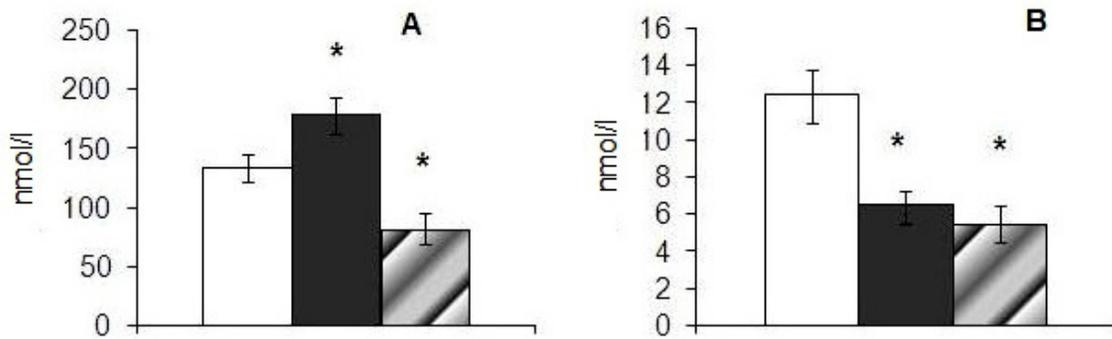


Рис. 1. Влияние экспериментальных психопатологий на уровни кортикостерона (А) и тестостерона (В) в крови самцов крыс. Светлые столбики — контрольные самцы, темные столбики — самцы с моделированием депрессии, столбики со штриховкой — самцы с моделированием ПТСР. \* — достоверные отличия от контрольных самцов ( $p < 0,05$ )

Fig. 1. The influence of experimental psychopathologies on corticosterone (A) and testosterone (B) levels in the blood of male rats. Light bars — control males, dark bars — simulated depression males, dashed columns — simulated PTSD males. \* — significant differences from control males ( $p < 0.05$ )

на рисунке 2. Двухфакторный дисперсионный анализ результатов теста РПИ методом ANOVA показал взаимодействие факторов день тестирования — группа животных ( $F_{(3,79)} = 9,3$ ,  $p = 0,00004$ ). *Post-hoc* анализ показателей экспериментальных групп для каждого дня тестирования выявил, что латентный период захода в темный отсек камеры при первом тестировании был снижен у самцов — потомков стрессированных отцов, по сравнению с контрольными крысами. Достоверные различия латентного периода захода в темную камеру между контрольными и подопытными крысами были обнаружены через 3 недели (тест 4) после первой сессии обучения (рис. 2А).

В тесте РНО также были обнаружены различия между самцами — потомками подопытных или контрольных самцов-отцов (рис. 2В). Кд у самцов, родившихся от отцов в ПТСР-подобном состоянии, был статистически значимо снижен по сравнению с этим показателем у потомков контрольных самцов-отцов.

Полученные данные свидетельствуют о значительном нарушении памяти и длительности ее сохранения у самцов, родившихся от отцов с ПТСР-подобным состоянием.

#### *Влияние депрессивноподобного состояния отца-самца на способность к обучению и память потомков*

Результаты данной серии экспериментов представлены на рисунке 3. Анализ способности

к выработке РПИ и ее угашения у самцов, родившихся от отцов в депрессивноподобном состоянии или контрольных отцов, с использованием двухфакторного ANOVA показал отсутствие достоверного влияния фактора группа животных на выработку РПИ и ее сохранность ( $F_{(3,79)} = 0,34$ ,  $p = 0,58$ ). В тесте РНО также не было выявлено существенного влияния депрессивноподобного состояния самца-отца на Кд их потомков-самцов.

Можно заключить, что стрессирование самцов-отцов в парадигме «выученная беспомощность» не оказывает значимого влияния на память их потомков мужского пола.

#### *Влияние ПТСР- или депрессивноподобного состояния отца-самца на экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе потомков*

Анализ экспрессии генов в гиппокампе потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием выявил снижение экспрессии гена *Igf2* по сравнению с аналогичным показателем у потомков контрольных отцов, тогда как экспрессия гена *Igf2r* существенных изменений не претерпевала (рис. 4). В гиппокампе потомков отцов с депрессивноподобным состоянием изменений экспрессии обоих генов не обнаружено. Данные свидетельствуют о том, что ПТСР-подобное состояние отца в период сперматогенеза оказывает более выраженное влияние на экспрессию *Igf2* в мозге потомков.

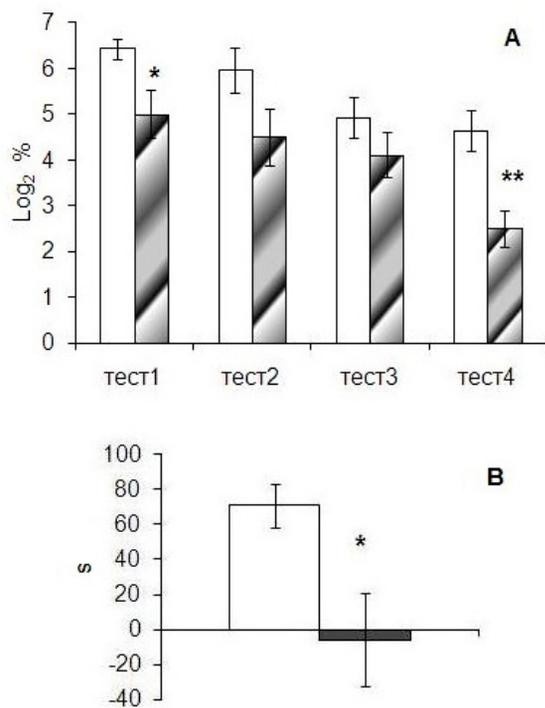


Рис. 2. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В).

Панель А: по оси ординат —  $\text{Log}_2$  латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с).

Панель В: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с).

Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. \* — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ( $p < 0,05$ ). \*\* — ( $p < 0,01$ )

Fig. 2. The influence of paternal PTSD-like status on the offspring memory in the passive avoidance (A) and novel object recognition tests (B).

Panel A: ordinate —  $\text{Log}_2$  of latency period of entering the dark compartment of the chamber in % of the total testing time (180 s).

Panel B: ordinate — discrimination coefficient (s).

Light bars — the offspring of control fathers.

Dark bars — the offspring of stressed fathers.

\* — significant differences between the offspring of control and stressed fathers ( $p < 0.05$ ). \*\* — ( $p < 0.01$ )

### Обсуждение полученных результатов

В последние годы ИФР2 привлекает пристальное внимание исследователей всего мира в связи с появившимися данными о вовлечении этого ростового фактора в обеспечение когнитивных процессов в норме и при различных патологиях, таких как шизофрения, болезнь Альцгеймера, алкоголизм и некоторых других

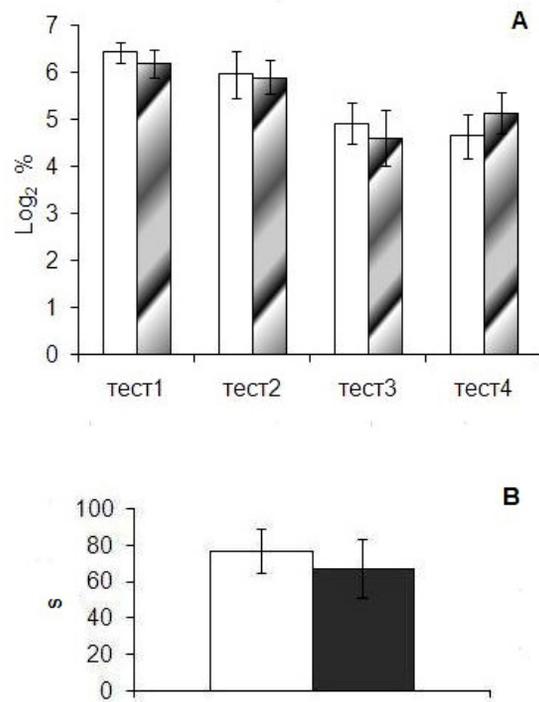


Рис. 3. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на память потомков в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В).

Панель А: по оси ординат —  $\text{Log}_2$  латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с).

Панель В: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с). Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов

Fig. 3. The influence of paternal depressive-like status on the offspring memory in the passive avoidance (A) and novel object recognition tests (B).

Panel A: ordinate —  $\text{Log}_2$  of latency period of entering the dark compartment of the chamber in % of the total testing time (180 s).

Panel B: ordinate — discrimination coefficient (s).

Light bars — the offspring of control fathers.

Dark bars — the offspring of stressed fathers

(Pardo et al. 2019). В исследованиях, выполненных на лабораторных грызунах, было показано, что повышение содержания ИФР2 в гиппокампе при обучении в тесте РПИ является необходимым условием для консолидации памяти и длительности ее сохранения (Chen et al. 2011; Lee et al. 2015). Вовлеченность ИФР2 в процессы, связанные с памятью, подтверждается и нашими данными, которые демонстрируют

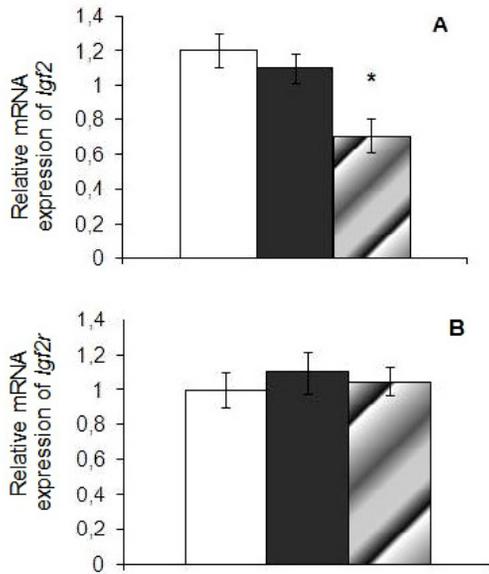


Рис. 4. Уровень экспрессии генов *Igf2* (A) и *Igf2r* (B) в гиппокампе потомков, родившихся от самцов с моделированием ПТСР или депрессии.

Светлые столбики — потомки контрольных самцов.

Темные столбики — потомки отцов с депрессивноподобным состоянием.

Столбики со штриховкой — потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием. \* — достоверные отличия от потомков контрольных отцов ( $p < 0,05$ )

Fig. 4. Expression level of *Igf2* (A) and *Igf2r* (B) genes in the hippocampus of the offspring born from males with modelled PTSD or depression.

Light bars — the offspring of control males.

Dark bars — the offspring of males in depressive-like status.

Dashed columns — the offspring of males in PTSD-like status. \* — significant differences from the offspring of control males ( $p < 0.05$ )

ухудшение памяти потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе. Следует отметить, что ухудшение памяти нами выявлено не только в тесте РПИ, который сопровождается отрицательным подкреплением, но и в тесте РНО. В работах, где изучали участие ИФР2 в гиппокамп-зависимой памяти, использовали преимущественно тесты с отрицательным подкреплением. Мы впервые показали, что этот ростовой фактор может принимать участие и в других видах памяти, например памяти об объекте, зависящей от гиппокампа и некоторых областей коры (Cinalli et al. 2020). Примечательно, что у потомков отцов с депрессивноподобным состоянием память не нарушается, так же, как и экспрессия *Igf2* в гиппокампе.

Механизмы, благодаря которым ИФР2 регулирует память, до сих пор активно обсуждаются. Как известно, ИФР2 может связываться с рецептором ИФР1 и с рецептором самого инсулина (Kolychnev 2000). Однако данные, полученные Д. Чен с соавторами, показали, что введение в гиппокамп только ИФР2, но не ИФР1 способствует консолидации памяти и длительности ее сохранения в тесте РПИ (Chen et al. 2011).

Помимо указанных выше рецепторов, ИФР2 специфически связывается с катион-независимым маннозо-6-фосфатным рецептором, который также именуют ИФР2 рецептором 2-го типа (М6Ф/ИФР2Р). Этот рецептор не связан с какими-либо вторичными посредниками (или они пока не идентифицированы), и долгое время считалось, что основная его функция заключается в секвестрировании как циркулирующего, так и локально синтезируемого ИФР2 (Brown et al. 2009).

Недавно было установлено, что М6Ф/ИФР2Р вовлечен в действие ИФР2 на память, связанную с гиппокампом. Такой эффект был выявлен как в тесте РПИ, так и в тесте на пространственную память (Yu et al. 2020). Тем не менее мы не обнаружили изменений экспрессии гена *Igf2r* в гиппокампе самцов, которые демонстрировали нарушения памяти. Вероятно, в данном случае большее значение имеет изначально сниженная экспрессия гена *Igf2* и, соответственно, самого белка ИФР2 в гиппокампе, количество которого недостаточно для реализации эффектов этого ростового фактора на память даже при неизменном количестве М6Ф/ИФР2Р.

Следует подчеркнуть, что нарушение памяти мы обнаружили только у потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, но не депрессивноподобным состоянием. Эти модели характеризуются различным функциональным состоянием ГАС, что было выявлено при исследовании базального уровня кортикостерона в ходе формирования модельных психопатологий. Преимущественное влияние ПТСР-подобного состояния отцов на потомков мы связываем с интенсивностью стрессорного воздействия, которому подвергали самцов-отцов. В случае моделирования ПТСР использовали комбинированный стресс, который в общей сложности длится больше двух часов, а затем применяли повторное стрессорное воздействие меньшей интенсивности. ПТСР-подобное состояние в этой модели сохраняется длительно, до 30 суток (Pivina et al. 2016).

Для индукции депрессивноподобного состояния использовали однократное неизбежное и неконтролируемое стрессорное воздействие в течение 1 ч. За это время животное получало 60 ударов током длительностью 15 сек. По данным литературы депрессивноподобное состояние у крыс в этой парадигме сохраняется не более двух недель (Czén et al. 2016). Несмотря на то, что у самцов-отцов в обеих экспериментальных моделях мы выявили снижение уровня тестостерона, вероятно, интенсивность стрессорного воздействия для формирования депрессивноподобного состояния недостаточна для нарушения процессов, связанных со сперматогенезом, и, в частности, для нарушения эпигенетических процессов при созревании сперматозоидов, которым отводится ведущая роль в трансгенерационном влиянии отцов на потомков (Yeshurun, Hannan 2019).

## Заключение

Наши исследования показали: моделирование ПТСР у самцов-отцов оказывает выраженное влияние на память их потомков, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе. Вместе с тем экспрессия гена *Igf2r*, кодирующего М6Ф/ИФР2R, у таких потомков не изменялась, что свидетельствует о значимости снижения именно ИФР2 в нарушении памяти этих животных. Моделирование депрессии у самцов-отцов не влияло ни на память, ни на экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе потомков. Мы полагаем, что одним из факторов, усиливающих влияние состояния отца на их потомков, может служить интенсивность стрессорного воздействия, которому подвергается самец-отец.

## References

- Andreasen, N. C. (2011) What is post-traumatic stress disorder? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, vol. 13, no. 3, pp. 240–243. PMID: 22033951. <https://www.doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.2/nandreasen> (In English)
- Brown, J., Jones, E. Y., Forbes, B. E. (2009) Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitamins and Hormones*, vol. 80, pp. 699–719. [https://www.doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00625-0](https://www.doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00625-0) (In English)
- Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A. et al. (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 491–497. <https://www.doi.org/10.1038/nature09667> (In English)
- Cinalli, D. A. Jr., Cohen, S. J., Guthrie, K., Stackman, R. W. Jr. (2020) Object recognition memory: Distinct yet complementary roles of the mouse CA1 and perirhinal cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 13, article 527543. <https://www.doi.org/10.3389/fnmol.2020.527543> (In English)
- Czén, B., Fuchs, E., Wiborg, O., Simon, M. (2016) Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 64, pp. 293–310. <https://www.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004> (In English)
- Dietz, D. M., LaPlant, Q., Watts, E. L. et al. (2011) Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biological Psychiatry*, vol. 70, no. 5, pp. 408–414. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005> (In English)
- Kolychev, A. P. (2000) Insulin-like growth factor II (IGF-II). Its role among regulatory peptides of the insulin superfamily. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 36, no. 2, pp. 91–110. (In English)
- Lehrner, A., Bierera, L. M., Passarella, V. et al. (2014) Maternal PTSD associates with greater glucocorticoid sensitivity in offspring of Holocaust survivors. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 40, pp. 213–220. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.11.019> (In English)
- Ordyan, N. E., Malysheva, O. V., Akulova, V. K. et al. (2020) The capability to learn and expression of the insulin-like growth factor II gene in the brain of male rats whose fathers were subjected to stress factors in the “stress–restress” paradigm. *Neurochemical Journal*, vol. 14, no. 2, pp. 191–196. <https://www.doi.org/10.1134/S1819712420020075> (In English)
- Pardo, M., Cheng, Y., Sitbon, Y. H. (2019) Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neuroscience Research*, vol. 149, pp. 1–13. <https://www.doi.org/10.1016/j.neures.2018.10.012> (In English)
- Pariante, C. M., Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, vol. 39, no. 9, pp. 464–468. <https://www.doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006> (In English)
- Pivina, S. G., Holova, G. I., Rakitskaya, V. V. et al. (2019) Changes in reproductive functions of male rats in a posttraumatic stress disorder model. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 55, no. 5, pp. 426–428. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093019050120> (In English)
- Pivina, S. G., Rakitskaya, V. V., Akulova, V. K., Ordyan, N. E. (2016) Activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 160, no. 5, pp. 601–604. <https://www.doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3> (In English)

- Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Bronson, S. L. et al. (2013) Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprogramming offspring HPA axis stress regulation. *Journal of Neurosciences*, vol. 33, no. 21, pp. 9003–9012. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013> (In English)
- Yeshurun, S., Hannan, A. J. (2019) Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, vol. 24, no. 4, pp. 536–548. <https://www.doi.org/10.1038/s41380-018-0039-z> (In English)
- Yu, X.-W., Pandey, K., Katzman, A. C., Alberini, C. M. (2020) A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *eLife*, vol. 9, article e54781. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.54781> (In English)



УДК 612.336+612.82+616-009.021.1

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-71-78>

## Нейрональные перестройки на супраспинальном уровне, способствующие кишечной гипералгезии при колите

О. А. Любашина<sup>✉1</sup>, А. А. Михалкин<sup>1</sup>, И. Б. Сиваченко<sup>1</sup>

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

### Сведения об авторах

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

Александр Александрович  
Михалкин,  
SPIN-код: 9942-9379,  
Scopus AuthorID: 55210047400,  
ORCID: 0000-0003-2342-6357,  
e-mail: mikhalkin@infran.ru

Иван Борисович Сиваченко,  
SPIN-код: 4049-8950,  
Scopus AuthorID: 55882139900,  
ORCID: 0000-0001-8548-8823,  
e-mail: AVANS\_d@mail.ru

### Для цитирования:

Любашина, О. А.,  
Михалкин, А. А., Сиваченко, И. Б.  
(2021) Нейрональные перестройки на супраспинальном уровне, способствующие кишечной гипералгезии при колите. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 71–78.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-71-78>

Получена 27 января 2021; прошла рецензирование 21 февраля 2021; принята 21 февраля 2021.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-015-00055) и Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 64).

**Права:** © Авторы (2021). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) характеризуются хронической абдоминальной болью, которая продолжает беспокоить пациентов даже в период ремиссии. Полагают, что основной причиной такой боли является кишечная гипералгезия, развивающаяся вследствие вызванных периферическим воспалением нарушений в центральных, в частности супраспинальных, механизмах контроля болевой информации от толстой кишки. Однако какие именно структуры головного мозга и каким образом вовлечены в этот процесс, остается неясным. Поэтому целью нашего исследования было определение ассоциированных с колитом изменений в нейрональных свойствах супраспинальных структур, которые могут способствовать развитию кишечной гипералгезии. Работа выполнена на анестезированных уретаном самцах крыс линии Вистар. С помощью иммуногистохимического метода определения экспрессии c-fos белков и микроэлектродной нейрофизиологической техники оценивали нейрональную активность структур головного мозга у здоровых животных и крыс с колитом, вызванным трансректальным введением пикрилсульфониевой кислоты. Кишечное воспаление сопровождалось усилением базальной и вызванной ноцицептивным колоректальным растяжением (КРР) c-fos-синтезирующей активности в каудальной вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга (ВЛРО), ядре одиночного тракта (ЯОТ), парабрахияльном комплексе моста и голубом пятне. В этих условиях c-fos-позитивные клетки дорсального ядра шва были индифферентными к КРР, а ноцицептивная c-fos-синтезирующая активность центрального серого вещества среднего мозга (ЦСВ) была существенно снижена по сравнению с таковой в норме. Микроэлектродное исследование ствола мозга у крыс с колитом выявило усиление вызванного КРР нейронального возбуждения в ВЛРО и ЯОТ при уменьшении доли отвечающих на кишечную стимуляцию нервных клеток в ЦСВ. Ассоциированные с кишечным воспалением сенситизация висцеросенсорных стволовых структур и параллельное снижение уровня возбудимости ключевых образований эндогенной антиноцицептивной системы мозга могут облегчать восходящее проведение висцеральных болевых сигналов, т. е. способствовать кишечной гипералгезии.

**Ключевые слова:** кишечное воспаление, структуры ствола мозга, экспрессия c-fos белков, нейрональная активность, колоректальное растяжение, кишечная гипералгезия, абдоминальная боль.

# Supraspinal neuronal alterations promoting intestinal hyperalgesia in colitis

O. A. Lyubashina<sup>✉1</sup>, A. A. Mikhalkin<sup>1</sup>, I. B. Sivachenko<sup>1</sup>

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

## Authors

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

Aleksandr A. Mikhalkin,  
SPIN: 9942-9379,  
Scopus AuthorID: 55210047400,  
ORCID: 0000-0003-2342-6357,  
e-mail: mikhalkin@infran.ru

Ivan B. Sivachenko,  
SPIN: 4049-8950,  
Scopus AuthorID: 55882139900,  
ORCID: 0000-0001-8548-8823,  
e-mail: AVANS\_d@mail.ru

## For citation:

Lyubashina, O. A., Mikhalkin, A. A., Sivachenko, I. B. (2021) Supraspinal neuronal alterations promoting intestinal hyperalgesia in colitis. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 71–78. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-71-78>

**Received** 27 January 2021;  
reviewed 21 February 2021;  
accepted 21 February 2021.

**Funding:** This study was supported the Russian Foundation for Basic Research (no. 18-015-00055) and the Program for Basic Scientific Research of State Academies for 2013-2020 (GP-14, section 64).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Abstract.** Inflammatory bowel diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis) are characterized by chronic abdominal pain that persists even in the disease remission. The main cause of such pain is believed to be intestinal hyperalgesia, which develops as a result of the peripheral inflammation-induced impairments in the central, in particular, supraspinal mechanisms controlling visceral nociception. However, which brain structures and neuronal events are involved in the process remains unclear. Our study was aimed to determine the colitis-associated changes in neuronal properties of supraspinal structures, which can underlie development of intestinal hyperalgesia. The work was performed on urethane anesthetized male Wistar rats. Neuronal activity in various brain areas was assessed in healthy animals and rats with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis by using the immunohistochemical method of determining c-fos protein expression and the microelectrode technique. Intestinal inflammation was accompanied by increased basal and nociceptive colorectal distension (CRD)-caused c-fos production in the caudal ventrolateral medulla (CVLM), nucleus tractus solitarius (NTS), parabrachial complex, and locus coeruleus. Under colitis, neuronal c-fos expression in the dorsal raphe nucleus was indifferent to CRD, whereas nociceptive c-fos activation in the midbrain central gray (MCG) was significantly reduced compared to that in norm. The microelectrode study in inflamed rats revealed an increase in the CRD-induced CVLM and NTS neuronal excitation and a decrease in the proportion of CRD-responsive MCG cells. The observed colitis-associated sensitization of the viscerosensory brainstem areas with a simultaneous decrease in excitability of the key structures belonging to the brain antinociceptive system can facilitate ascending visceral pain transmission, promoting intestinal hyperalgesia.

**Keywords:** intestinal inflammation, brainstem structures, c-fos expression, neuronal activity, colorectal distension, intestinal hyperalgesia, abdominal pain.

## Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона и язвенный колит, характеризуются хронической абдоминальной болью, которая продолжает беспокоить пациентов даже в период ремиссии, при отсутствии выраженного органического воспаления (Bielefeldt et al. 2009; Ceuleers et al. 2016). Согласно современным представлениям основной причиной такой боли является кишечная гипералгезия, т. е. повышенная воспри-

имчивость к внутрикишечным болевым стимулам (Ceuleers et al. 2016; Farmer, Aziz 2013). Полагают, что ведущую роль в развитии последней играют вызванные периферической патологией изменения в центральных механизмах контроля висцеральной болевой информации, которые могут сохраняться длительное время после нормализации состояния кишки (Moshiree et al. 2006; Siegel, MacDermott 2009). К настоящему времени детально изучены ассоциированные с кишечным воспалением нейрональные перестройки на спинальном уровне

(Farrell et al. 2014; Lu et al. 2017; Lu, Westlund 2001). Между тем усиление или возникновение абдоминальной боли у индивидуумов с ВЗК в условиях психологического стресса, тревоги или депрессии указывает на немаловажную роль в патогенезе кишечной гипералгезии супраспинальных механизмов (Bhamre et al. 2018; Greenwood-Van Meerveld, Johnson 2018). Однако последние до сих пор остаются малоизученными, что существенно сдерживает разработку эффективных методов лечения хронических абдоминальных болевых синдромов при ВЗК. Поэтому целью нашего исследования, выполненного на крысах с использованием иммуногистохимического и нейрофизиологического методов, являлось определение ассоциированных с колитом изменений в нейрональных свойствах супраспинальных структур, которые могут способствовать развитию кишечной гипералгезии.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на анестезированных уретаном (Sigma-Aldrich, США; 1,5 мг/кг, внутривенно) взрослых самцах крыс линии Вистар (Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности Института физиологии им. И. П. Павлова РАН). Для инициации абдоминальной ноцицепции использовали механическое растяжение коло ректальной области толстой кишки. Колоректальное растяжение (КРР) осуществляли в течение 60 секунд посредством раздувания воздухом (до давления 80 мм рт. ст.) интаректально введенного резинового баллона автоматическим шприцевым насосом ДШ-09 (Висма-Планар, Беларусь). Экспериментальный колит вызывали по методу Дж. Морриса с соавторами (Morris et al. 1989) посредством трансректального введения в толстую кишку спиртового раствора пикрилсульфониевой кислоты (TNBS, Sigma-Aldrich, США; 20 мг в 0,25 мл 50% этанола).

Имуногистохимическая часть исследования выполнена на четырех группах крыс по трое животных в каждой: 1) норма контроль (здоровые, без болевой стимуляции), 2) норма КРР, 3) колит контроль (с колитом, без болевой стимуляции), 4) колит КРР. Животным контрольных групп осуществляли трансректальное введение резинового баллона, оставляли его в толстой кишке на 60 минут, но КРР не производили. В группах со стимуляцией 60-секундное КРР осуществляли 12 раз с 4-минутным интервалом (общее время процедуры — 60 минут). Сразу после завершения контрольных и стимуляци-

онных процедур крыс транскардиально перфузировали последовательно 0,9% физиологическим раствором и 4% раствором параформальдегида в 0,01 М фосфатном буфере (ФБ, БиолоТ, Россия; рН 7.4). Головной мозг после извлечения выдерживали в 20% и 30% растворах сахарозы в 0,01 М ФБ (4 °С) и на замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали фронтальные срезы через области исследуемых структур толщиной 40 мкм. Для визуализации нейронов с с-fos-синтезирующими ядрами срезы подвергали иммуногистохимической обработке по авидин-биотин-пероксидазному методу с использованием первичных поликлональных антител к с-fos (ABE457, Sigma-Aldrich, США; разведение 1:10000) и вторичных биотинилированных антител (goat anti-rabbit IgG, PK-4001 kit, Vector Laboratories, США; разведение 1:600). После инкубирования в авидин-биотин-пероксидазном комплексе (PK-4001 kit, Vector Laboratories, США) срезы выдерживали в хромогенсодержащем растворе диаминобензидина, никеля и перекиси водорода. Цифровые изображения готовых препаратов получали в светлом поле светового микроскопа Olympus CX41 (Olympus Corporation, Япония), оснащенного видеокамерой Nikon (Nikon Corporation, Япония). Далее с помощью программного пакета «Cell Annotation Software» (Nurzynska et al. 2017) в пределах исследуемых структур определяли количество и реферированную к фону оптическую плотность с-fos-позитивных клеточных ядер. Далее оценивали средние значения этих показателей на срез в разных образованиях мозга у разных групп животных.

Нейрофизиологическая часть работы выполнена на двух группах крыс — здоровых и с колитом (по 30 животных в каждой группе). Голову анестезированного животного закрепляли в стереотаксическом приборе и хирургическим путем обеспечивали доступ к дорсальной поверхности продолговатого или среднего мозга. Для внеклеточной регистрации активности нейронов в исследуемых структурах использовали вольфрамовые микроэлектроды с кончиком 1 мкм и сопротивлением 1 Мом (Science Products GmbH, Германия), которые перемещали в пределах стереотаксических координат данной области (Paxinos, Watson 1998) с помощью микроманипулятора (МП-2, Россия). После усиления (DAM 80; World Precision Instruments, США) сигнал подавали на вход звуковой карты компьютера, визуализировали и сохраняли с помощью программы Audition 3 (Adobe Corp, США). Регистрацию нейрональной активности производили на 3-минутном интервале (1 мин до,

1 мин во время и 1 мин после КРР). Последующую селекцию нейрональных разрядов по форме выполняли с помощью программы Spike 2 (CED, Великобритания). Для разных импульсных потоков определяли среднюю частоту разрядов на минутных отрезках, указанных выше.

Статистическую обработку, сравнение и графическое оформление данных, полученных в обеих экспериментальных сериях на разных группах животных, производили с помощью программного пакета Origin 8 (OriginLab Corp, США) с применением парных и непарных непараметрических тестов.

### Результаты и обсуждение

Как показали иммуногистохимические исследования, у здоровых крыс болевое растяжение толстой кишки вызывает существенное по сравнению с контрольной группой увеличе-

ние количества c-fos-позитивных нейронов, т. е. нейрональную активацию, в каудальной вентро-латеральной ретикулярной области продолговатого мозга (ВАРО, рис. 1А), ядре одиночного тракта (ЯОТ, рис. 1В), парабрахиальном комплексе моста (рис. 1С), голубом пятне (рис. 1D), дорсальном ядре шва (рис. 1Е) и центральном сером веществе среднего мозга (ЦСВ, рис. 1F). Статистически значимых различий по вызванной КРР c-fos-синтезирующей активности в указанных структурах между левой и правой сторонами мозга обнаружено не было (для всех структур  $p > 0,05$ , парный тест Вилкоксона). В парабрахиальном комплексе наиболее реактивной к стимуляции была его медиальная часть, в ЦСВ — латеральная и вентролатеральная колонки. Существенное по сравнению с контролем увеличение оптической плотности иммунопозитивных клеточных ядер после

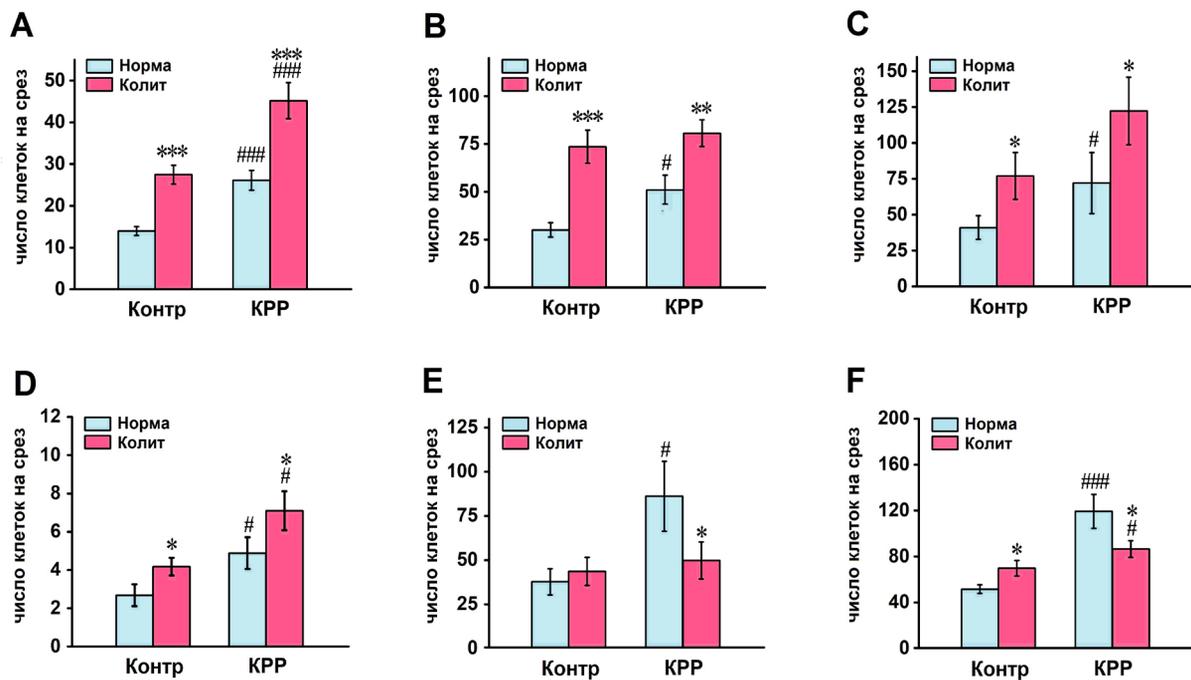


Рис. 1. Количество c-fos-позитивных нейронов в вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга (А), ядре одиночного тракта (В), парабрахиальном комплексе моста (С), голубом пятне (D), в дорсальном ядре шва (Е) и центральном сером веществе среднего мозга (F) без стимуляции (Контр) и после колоректального растяжения (КРР) у здоровых крыс (Норма) и у животных с колитом (Колит). Показаны средние значения и их стандартные ошибки. Значимые различия (тест Манна — Уитни): #  $p < 0,05$  и ###  $p < 0,001$  — по сравнению с контролем; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  и \*\*\*  $p < 0,001$  — по сравнению с нормой

Fig. 1. Numbers of c-fos-positive neurons within the caudal ventrolateral medulla (A), nucleus tractus solitarius (B), parabrachial complex (C), locus coeruleus (D), dorsal raphe nucleus (E), and midbrain central gray (F) without stimulation (Control) and after colorectal distension (CRD) in healthy (Norm) and colitic rats (Colitis). The mean values and their standard errors are shown. Significant differences (Mann — Whitney test): #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.001$ , in comparison to the control; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , in comparison to the norm

КРР наблюдалось только в латеральной части ЯОТ ( $p = 0,04$ ,  $U = 103$ , тест Манна — Уитни).

У животных с экспериментальным колитом, подтвержденным визуальным и микроскопическим анализом толстой кишки, было отмечено существенное по сравнению с нормой усиление как фоновой (в отсутствие болевой стимуляции), так и вызванной КРР *c-fos*-синтезирующей активности в обеспечивающих висцеросенсорную трансмиссию каудальной ВЛРО (рис. 1А), ЯОТ (рис. 1В) и парабрахиальном комплексе моста (рис. 1С), а также в норадренергическом голубом пятне (рис. 1D). При этом было отмечено также увеличение оптической плотности иммунопозитивных клеточных ядер в ВЛРО ( $p = 0,005$ ,  $U = 808$ , тест Манна — Уитни) и ЯОТ ( $p < 0,0001$ ,  $U = 502$ ). Эти изменения свидетельствуют о вызванных патологией повышении общего уровня нейрональной возбудимости указанных структур и усилении их реактивности к абдоминальным болевым сигналам, т. е. о развитии в них сенситизации. Между тем дорсальное ядро шва в условиях кишечного воспаления не проявляло каких-либо выраженных изменений в количестве *c-fos*-позитивных клеток в покое и не реагировало на болевое КРР (рис. 1Е). В свою очередь, в ЦСВ среднего мозга, демонстрирующем ассоциированное с колитом усиление базальной нейрональной экспрессии *c-fos*, увеличение последней после КРР было менее выражено, чем в норме (рис. 1F), что может указывать на снижение ноцицептивной чувствительности этой структуры.

В нейрофизиологических экспериментах в каудальной ВЛРО и медиальной части ЯОТ продолговатого мозга у здоровых крыс и животных с колитом были обнаружены три популяции нейронов, которые во время ноцицептивного КРР демонстрировали усиление, торможение импульсной активности или отсутствие выраженной реакции соответственно. Сходные три группы нейронов были зарегистрированы в вентролатеральной колонке ЦСВ среднего мозга. Среди КРР-реактивных нейронов в ВЛРО преобладали клетки с возбуждающими ответами на КРР (рис. 2А), тогда как в ЯОТ нейроны чаще демонстрировали тормозные реакции на раздражение (рис. 2В). Эти статистически значимые различия ( $p = 0,002$ , точный тест Фишера) могут свидетельствовать об исходно разном вкладе этих структур в контроль висцеральной ноцицепции. В свою очередь, в ЦСВ здоровых животных преобладали клетки с возбуждающими ответами на КРР, хотя тормозящиеся нейроны тоже составляли значительную по численности популяцию (рис. 2С).

У крыс с колитом в изученных бульбарных структурах преобладали возбуждающиеся в ответ на КРР нейроны при существенно сниженной по сравнению с нормой доле тормозящихся клеток в ВЛРО (рис. 2А) и меньшем числе индифферентных к висцеральной ноцицепции нейронов в ЯОТ (рис. 2В). При этом в обеих областях было отмечено значительное усиление возбуждающих нейрональных реакций на кишечную стимуляцию, что не было характерным для тормозных ответов (рис. 2D, E). Эти нейрональные перестройки свидетельствуют о вовлечении ВЛРО и ЯОТ в усиленную возбуждающую висцеральную ноцицептивную трансмиссию при колите. Напротив, в ЦСВ среднего мозга при кишечной патологии было зарегистрировано сниженное по сравнению с нормой количество возбуждающихся и тормозящихся клеток при значительно превосходящей доле индифферентных к КРР нейронов (рис. 2С). Параллельно ЦСВ животных с колитом демонстрировало усиление возбуждающих и ослабление тормозных изменений в импульсной активности при болевом раздражении кишки (рис. 2F). Эти данные дополняют результаты иммуногистохимических экспериментов и являются доказательством нарушений нейрональных процессов в ЦСВ при кишечной патологии.

В целом полученные нами иммуногистохимические данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований, продемонстрировавших увеличение количества *c-fos*-иммунопозитивных нейронов в изученных структурах ствола мозга после болевого растяжения толстой кишки (Lyubashina et al. 2012; Mönnikes et al. 2003; Panteleev et al. 2013; Wang et al. 2009). Также они соответствуют данным других авторов, которые установили ассоциированное с колитом усиление фоновой (базальной) экспрессии *c-fos* белков в ЦСВ среднего мозга, парабрахиальном комплексе моста, голубом пятне, ЯОТ и каудальной ВЛРО продолговатого мозга (Goehler et al. 2005; Lu, Westlund 2001; Porcher et al. 2004; Zhang et al. 2014). Вместе с тем в нашей работе впервые обнаружены вызванные кишечной патологией изменения в уровне *c-fos*-позитивной реактивности этих структур к висцеральным болевым сигналам.

В свою очередь, полученные нами нейрофизиологические данные о существовании в висцеросенсорных областях продолговатого мозга групп нейронов, различающихся по характеру ответа на болевое колоректальное растяжение, согласуются с результатами других исследований, продемонстрировавших такие же популяции нервных клеток в каудальной ВЛРО (Lyubashina

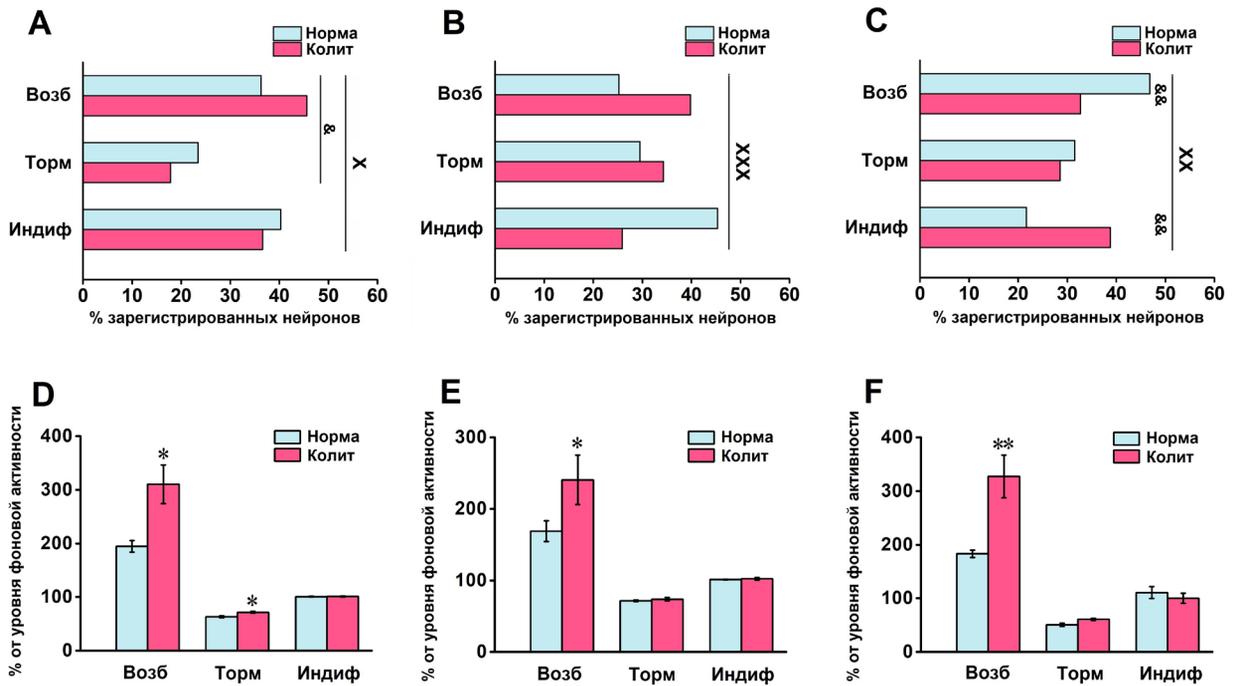


Рис. 2. Процентное соотношение возбуждающихся (Возб), тормозящихся (Торм) в ответ на колоректальное растяжение и индифферентных к нему (Индиф) нейронов (верхние графики) и амплитуда их ноцицептивных реакций (нижние графики) в вентролатеральной ретикулярной области продолговатого мозга (A, D), ядре одиночного тракта (B, E) и центральном сером веществе среднего мозга (C, F) у здоровых животных (Норма) и крыс с колитом (Колит). На фрагментах А–С значимые различия между нормой и колитом: <sup>x</sup>  $p < 0,05$ , <sup>xx</sup>  $p < 0,01$  и <sup>xxx</sup>  $p < 0,001$  — для всех типов нейронов (тест Хи-квадрат); <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  и <sup>&&</sup>  $p < 0,01$  — для двух типов (точный тест Фишера). На фрагментах D–F значимые различия со значением в норме (тест Манна — Уитни): <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  и <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$ ; показаны средние значения и их стандартные ошибки

Fig. 2. Percentages of neurons exhibiting excitatory (Возб), inhibitory (Торм), or no response (Индиф) to colorectal distension (upper graphs) and magnitudes of their nociceptive responses (bottom graphs) in the caudal ventrolateral medulla (A, D), nucleus tractus solitarius (B, E), and midbrain central gray (C, F) in healthy (Норма) and colitic rats (Колит). In A–C, significant differences between the norm and colitis: <sup>x</sup>  $p < 0.05$ , <sup>xx</sup>  $p < 0.01$  и <sup>xxx</sup>  $p < 0.001$ , for all neuronal types (Chi-square test); <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  и <sup>&&</sup>  $p < 0.01$ , for two types (Fisher's exact test). In D–F, significant differences between the norm and colitis (Mann — Whitney test): <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  и <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ ; the mean values and their standard errors are shown

et al. 2016; Ness et al. 1998; Pinto-Ribeiro et al. 2011) и ЯОТ (Liu et al. 2014; Panteleev et al. 2021). Однако мы впервые обнаружили сходные по реакциям на висцеральную боль группы нейронов в ЦСВ среднего мозга и показали, что при кишечном воспалении соотношение и функциональные характеристики таких нейронных групп не только в бульбарных структурах, но и на среднемозговом уровне претерпевают существенные изменения. Имеющиеся к настоящему времени сведения позволяют полагать, что выявленные нами перестройки в ноцицептивных свойствах ЯОТ и ЦСВ могут быть связаны с индуцированными висцеральной патологией нарушениями локальной глутаматергической нейротрансмиссии в этих структурах (Bai et al. 2019; Ko et al. 2020).

Таким образом, проведенные исследования впервые продемонстрировали ассоциированное с колитом усиление ноцицептивной активации висцеросенсорных стволовых структур и нейронов норадренергического голубого пятна с параллельным ослаблением реактивности к абдоминальной боли таких ключевых образований эндогенной антиноцицептивной системы, как серотонинергическое дорсальное ядро шва и центральное серое вещество среднего мозга. В своей совокупности выявленные на супраспинальном уровне изменения могут способствовать облегчению проведения висцеральных болевых сигналов к вышележащим структурам мозга, т. е. лежать в основе патогенеза кишечной гиперчувствительности и хронической абдоминальной боли.

## References

- Bai, Y., Chen, Y.-B., Qiu, X.-T. et al. (2019) Nucleus tractus solitarius mediates hyperalgesia induced by chronic pancreatitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 25, no. 40, pp. 6077–6093. <https://www.doi.org/10.3748/wjg.v25.i40.6077> (In English)
- Bielefeldt, K., Davis, B., Binion, D. G. (2009) Pain and inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, no. 5, pp. 778–788. <https://www.doi.org/10.1002/ibd.20848> (In English)
- Bhamre, R., Sawrav, S., Adarkar, S. et al. (2018) Psychiatric comorbidities in patients with inflammatory bowel disease. *Indian Journal of Gastroenterology*, vol. 37, no. 4, pp. 307–312. <https://www.doi.org/10.1007/s12664-018-0870-9> (In English)
- Ceuleers, H., van Spaendonk, H., Hanning, N. et al. (2016) Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome: The role of proteases. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, no. 47, pp. 10275–10286. <https://www.doi.org/10.3748/wjg.v22.i47.10275> (In English)
- Farmer, A. D., Aziz, Q. (2013) Gut pain & visceral hypersensitivity. *British Journal of Pain*, vol. 7, no. 1, pp. 39–47. <https://www.doi.org/10.1177/2049463713479229> (In English)
- Farrell, K., Sci, B. B., Keely, S. et al. (2014) A systematic review of the evidence for central nervous system plasticity in animal models of inflammatory-mediated gastrointestinal pain. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 20, no. 1, pp. 176–195. <https://www.doi.org/10.1097/01.MIB.0000437499.52922.b1> (In English)
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Opitz, N. et al. (2005) Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: Early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 19, no. 4, pp. 334–344. <https://www.doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002> (In English)
- Greenwood-Van Meerveld, B. G., Johnson, A. C. (2018) Mechanisms of stress-induced visceral pain. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, vol. 24, no. 1, pp. 7–18. <https://www.doi.org/10.5056/jnm17137> (In English)
- Ko, C.-Y., Yang, Y.-B., Chou, D., Xu, J.-H. (2020) The ventrolateral periaqueductal gray contributes to depressive-like behaviors in recovery of inflammatory bowel disease rat model. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 14, article 254. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2020.00254> (In English)
- Liu, K., Gao, X.-Y., Li, L. et al. (2014) Neurons in the nucleus tractus solitarius mediate the acupuncture analgesia in visceral pain rats. *Autonomic Neuroscience*, vol. 186, pp. 91–94. <https://www.doi.org/10.1016/j.autneu.2014.08.004> (In English)
- Lu, Y., Jiang, B.-C., Cao, D.-L. et al. (2017) Chemokine CCL8 and its receptor CCR5 in the spinal cord are involved in visceral pain induced by experimental colitis in mice. *Brain Research Bulletin*, vol. 135, pp. 170–178. <https://www.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.10.009> (In English)
- Lu, Y., Westlund, K. N. (2001) Effects of baclofen on colon inflammation-induced Fos, CGRP and SP expression in spinal cord and brainstem. *Brain Research*, vol. 889, no. 1–2, pp. 118–130. [https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03124-3](https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03124-3) (In English)
- Lyubashina, O., Atanasova, D., Pantelev, S. et al. (2012) Differential c-fos expression in nuclei of the caudal medulla oblongata following noxious colorectal distension in anaesthetized rats. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences — Proceeding of the Bulgarian Academy of Sciences*, vol. 65, no. 5, pp. 709–716. (In English)
- Lyubashina, O. A., Sivachenko, I. B., Pantelev, S. S., Nozdrachev, A. D. (2016) Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor blockade on visceral nociceptive neurons in the ventrolateral reticular field of the rat medulla oblongata. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 52, pp. 313–325. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093016040062> (In English)
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S. et al. (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 795–803. PMID: [2914642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2914642/). (In English)
- Moshiree, B., Zhou, Q., Price, D. D., Verne, G. N. (2006) Central sensitisation in visceral pain disorders. *Gut*, vol. 55, no. 7, pp. 905–958. <https://www.doi.org/10.1136/gut.2005.078287> (In English)
- Mönnikes, H., Rüter, J., König, M. et al. (2003) Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: Role of afferent C-fibers and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Brain Research*, vol. 966, no. 2, pp. 253–264. [https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04197-5](https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04197-5) (In English)
- Ness, T. J., Follett, K. A., Piper, J., Dirks, B. A. (1998) Characterization of neurons in the area of the medullary lateral reticular nucleus responsive to noxious visceral and cutaneous stimuli. *Brain Research*, vol. 802, no. 1–2, pp. 163–174. [https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00608-8](https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00608-8) (In English)
- Nurzynska, K., Mikhalkin, A., Piorkowski, A. (2017) CAS: Cell annotation software — research on neuronal tissue has never been so transparent. *Neuroinformatics*, vol. 15, no. 4, pp. 365–382. <https://www.doi.org/10.1007/s12021-017-9340-2> (In English)
- Pantelev, S. S., Martseva, A. A., Lyubashina, O. A. (2013) Responses of solitary tract nucleus neurons to nociceptive stimuli of the large intestine in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 43, no. 6, pp. 775–781. <https://www.doi.org/10.1007/s11055-013-9808-y> (In English)

- Panteleev, S. S., Sivachenko, I. B., Lyubashina, O. A. (2021) The buspirone-dependent abdominal pain transmission within the nucleus tractus solitarius in the rat. *Neuroscience*, vol. 452, pp. 326–334. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.032> (In English)
- Paxinos, G., Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 237 p. (In English)
- Pinto-Ribeiro, F., Ansah, O. B., Almeida, A., Pertovaara, A. (2011) Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in monoarthritic and healthy control rats: Modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Research Bulletin*, vol. 86, no. 1–2, pp. 82–90. <https://www.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.014> (In English)
- Porcher, C., Sinniger, V., Juhem, A. et al. (2004) Neuronal activity and CRF receptor gene transcription in the brains of rats with colitis. *The American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, no. 4, pp. G803–G814. <https://www.doi.org/10.1152/ajpgi.00135.2004> (In English)
- Siegel, C. A., MacDermott, R. P. (2009) Is chronic pain an extraintestinal manifestation of IBD? *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, no. 5, pp. 769–771. <https://www.doi.org/10.1002/ibd.20844> (In English)
- Wang, L., Martínez, V., Larauche, M., Taché, Y. (2009) Proximal colon distension induces Fos expression in oxytocin-, vasopressin-, CRF- and catecholamines-containing neurons in rat brain. *Brain Research*, vol. 1247, pp. 79–91. <https://www.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.094> (In English)
- Zhang, M.-M., Liu, S.-B., Chen, T. et al. (2014) Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. *Molecular Brain*, vol. 7, article 47. <https://www.doi.org/10.1186/1756-6606-7-47> (In English)



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 612.3.08

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-79-87>

## Исследование всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс на интегративных экспериментальных моделях

А. А. Груздков<sup>✉1</sup>, А. В. Громова<sup>1</sup>

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

### Сведения об авторах

Андрей Андреевич Груздков,  
SPIN-код: 6153-7919,  
ORCID: 0000-0003-2028-7873,  
e-mail: [gruzdkovaa@infran.ru](mailto:gruzdkovaa@infran.ru)

Людмила Викторовна Громова,  
SPIN-код: 9680-5011,  
Scopus AuthorID: 7006258323,  
ORCID: 0000-0002-4390-200X,  
e-mail: [gromovalv@infran.ru](mailto:gromovalv@infran.ru)

### Для цитирования:

Груздков, А. А., Громова, А. В.  
(2021) Исследование всасывания  
глюкозы в тонкой кишке крыс  
на интегративных  
экспериментальных моделях.  
*Интегративная физиология*, т. 2,  
№ 1, с. 79–87.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-79-87>

**Получена** 31 января 2021; прошла  
рецензирование 11 февраля 2021;  
принята 11 февраля 2021.

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Поиск адекватных экспериментальных моделей для исследования всасывания глюкозы в тонкой кишке остается актуальной задачей физиологов. Наиболее крупные успехи в наших знаниях о механизмах ее всасывания были достигнуты с использованием различных аналитических (упрощенных) экспериментальных моделей (от отрезков и полосок тонкой кишки до изолированных кишечных клеток и мембранных везикул). Вместе с тем основные закономерности регуляции протекающих в организме процессов, как и их реальные масштабы, можно выявить лишь при использовании различных интегративных экспериментальных моделей. В статье кратко рассмотрены два варианта таких интегративных моделей: а) перфузия изолированного участка кишки растворами глюкозы в условиях хронического опыта и б) оценка всасывательной способности тонкой кишки по скорости свободного потребления животными концентрированного раствора глюкозы. Приведены примеры использования этих моделей для исследования реальных скоростей всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в условиях, максимально близких к физиологическим, естественным. Отмечены основные методические особенности каждого из вариантов, их достоинства и ограничения. Эти экспериментальные подходы в сочетании взаимно дополняют друг друга и значительно расширяют существующие представления о реальных масштабах и механизмах регуляции всасывания глюкозы в тонкой кишке в нормальных, физиологических условиях.

**Ключевые слова:** всасывание глюкозы, тонкая кишка, экспериментальные модели, гидролиз-зависимый транспорт, хронический стресс, диабет 2-го типа.

# Study of glucose absorption in the small intestine of rats on the integrative experimental models

A. A. Gruzdkov<sup>✉1</sup>, L. V. Gromova<sup>1</sup>

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

## Authors

Andrei A. Gruzdkov,  
SPIN: 6153-7919,  
ORCID: 0000-0003-2028-7873,  
e-mail: gruzdkovaa@infran.ru

Lyudmila V. Gromova,  
SPIN: 9680-5011,  
Scopus AuthorID: 7006258323,  
ORCID: 0000-0002-4390-200X,  
e-mail: gromovalv@infran.ru

## For citation:

Gruzdkov, A. A., Gromova, L. V. (2021) Study of glucose absorption in the small intestine of rats on the integrative experimental models. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1, pp. 79–87. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-79-87>

**Received** 31 January 2021;  
reviewed 11 February 2021;  
accepted 11 February 2021.

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** The search for adequate experimental models to study glucose absorption in the small intestine stands high on the research agenda for physiologists. The most substantial advancements in the study of glucose absorption mechanisms were reached by using various analytical (simplified) experimental models: from pieces and strips of the small intestine to isolated intestinal cells and membrane vesicles. At the same time, the main regularities of the processes occurring in the body, as well as their real scale, can be revealed only through various integrative experimental models. The article is a brief overview of the two versions of such integrative models: 1) perfusion of the isolated loop of the small intestine with glucose solutions in chronic experiment and, 2) evaluation of the absorptive capacity of the small intestine by the rate of free consumption of concentrated glucose solution by animals. The paper provides examples of applying the two experimental models to study the real rates of glucose absorption in the small intestine of rats under conditions close to natural physiological ones. The paper outlines the main methodological features of each approach, their advantages and limitations. The two experimental approaches complement each other and significantly expand the modern understanding of the real scale and mechanisms of glucose absorption regulation in the small intestine under normal physiological conditions.

**Keywords:** glucose absorption, small intestine, experimental models, hydrolysis-dependent transport, chronic stress, type 2 diabetes.

## Введение

Выдающийся отечественный физиолог А. М. Уголев отмечал, что основные закономерности функционирования и регуляции различных систем в целостном организме и реальные масштабы протекающих в нем процессов можно выявить лишь при использовании интегративных экспериментальных моделей, в условиях, максимально приближенных к физиологическим (Уголев и др. 1984).

Примером такой интегративной модели служит разработанная Уголевым и Зариповым уникальная методика перфузии изолированного участка тонкой кишки крыс в хроническом опыте (Уголев, Зарипов 1979).

Кроме того, в последнее время сделан еще один шаг в развитии интегративных физиологических моделей — разработана новая методика оценки всасывания глюкозы в тонкой кишке в условиях, максимально близких к естественным (Груздков и др. 2015; Громова и др. 2019; 2020).

В статье дается краткое описание этих моделей и представлены примеры их использования для исследования всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в физиологических условиях.

## Исследование всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в хронических опытах

Методика и условия проведения хронических опытов подробно описаны в целом ряде публикаций (Уголев, Зарипов 1979; Уголев и др. 1981; 1984; 1986a; Ugolev et al. 1986b; Gromova, Gruzdkov 1999).

### *Исследование сопряжения процессов мембранного гидролиза дисахаридов и всасывания образующейся глюкозы*

В нормальных условиях всасывание глюкозы из ди- и олигосахаридов происходит с высокой эффективностью и тесно сопряжено с их мембранным гидролизом благодаря прямой передаче образующейся глюкозы с фермента на специфический транспортер в апикальной

мембране энтероцитов (Уголев и др. 1984). По мнению других исследователей (Pappenheimer 1990; 1993), эффективность гидролиз-зависимого всасывания глюкозы объясняется ее преимущественно парацеллюлярным транспортом в тонкой кишке.

В хронических опытах сопоставлено всасывание глюкозы, образующейся при расщеплении дисахаридов с высокой (мальтоза) и низкой (трегалоза) скоростью гидролиза (Gromova, Gruzdkov 1999).

При низких концентрациях мальтозы скорость всасывания образующейся глюкозы (рис. 1, кривая 2), была такой же, как и скорость всасывания свободной глюкозы (рис. 1, кривая 3), но при высоких концентрациях — заметно меньше. Скорость всасывания глюкозы, образующейся из трегалозы, не отличалась от скорости ее гидролиза во всем диапазоне ее концентраций (рис. 1, кривая 2а).

Это показывает, что степень сопряжения гидролиза и транспорта зависит не от интенсивности трансэпителиальных потоков воды (Pappenheimer 1993), а от соотношения скоростей гидролиза дисахаридов и всасывания образующейся глюкозы. В хроническом опыте это сопряжение обеспечивается благодаря высокой эффективности глюкозных транспортеров, которые, по-видимому, разобщены в пространстве с дисахаридазами (Gromova, Gruzdkov 1999).

*Оценка роли облегченной диффузии во всасывании глюкозы в тонкой кишке крыс в физиологических условиях*

По современным представлениям (Ferraris 2001; Wright et al. 2007), всасывание глюкозы в тонкой кишке млекопитающих происходит путем ее активного транспорта через апикальную мембрану энтероцитов с участием ко-транспортера Na<sup>+</sup> и глюкозы (SGLT1) и последующего ее переноса через базолатеральную

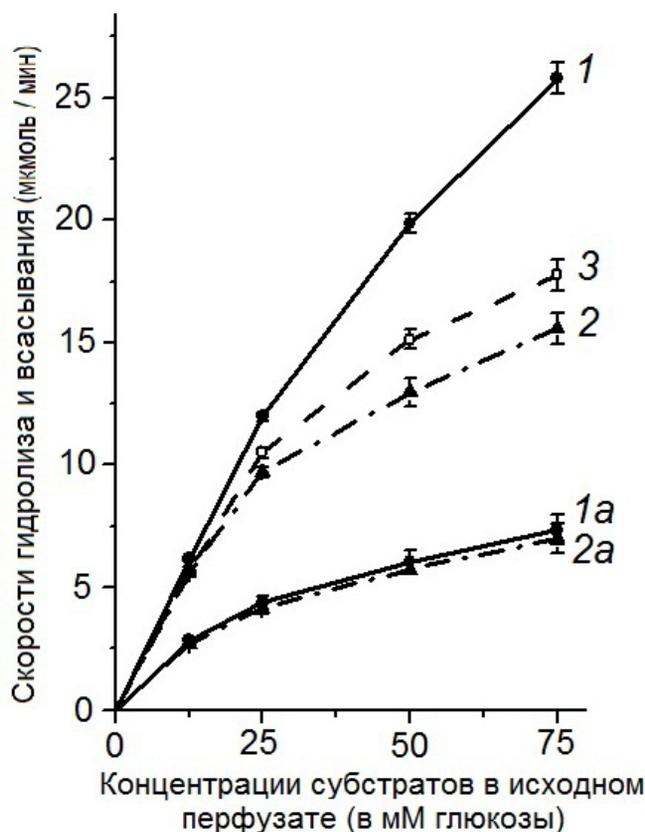


Рис. 1. Гидролиз мальтозы (1) и трегалозы (1а) и всасывание глюкозы, свободной (3) и образующейся при гидролизе мальтозы (2) и трегалозы (2а) в изолированном участке тонкой кишки крыс при его перфузии в хроническом опыте

Fig. 1. Hydrolysis of maltose (1) and trehalose (1a) and the absorption of free glucose (3) and glucose derived from maltose (2) and trehalose (2a) in the isolated part of the small intestine in rat during perfusion in the chronic experiment

мембрану путем облегченной диффузии с участием транспортера глюкозы GLUT2.

Однако есть факты, противоречащие этим представлениям (Ferraris 2001; Kellett 2001; Parpenheimer 2001). Была высказана гипотеза (Au et al. 2002; Kellett 2001), согласно которой при высоких концентрациях глюкозы в кишке GLUT2 может встраиваться в апикальную мембрану энтероцитов и принимать участие в ее переносе через эту мембрану. При этом облегченная диффузия оказывается основным механизмом всасывания глюкозы. Гипотеза основана на данных опытов, проводившихся на анестезированных животных. Возникал вопрос о том, какова относительная роль активного транспорта и облегченной диффузии во всасывании глюкозы в отсутствие наркоза.

В наших хронических опытах факт включения GLUT2 в апикальную мембрану энтероцита при повышенной концентрации глюкозы в полости кишки подтвердился (Громова и др. 2006). Однако анализ экспериментальных данных и математического моделирования показал, что в диапазоне реальных концентраций глюкозы в полости кишки (< 50 мМ) (Ferraris 2001) доминирует ее активный транспорт (рис. 2, кривая 2), а облегченная диффузия (рис. 2, кривая 3), начинает играть заметную роль лишь при более высоких концентрациях (> 75 мМ) глюкозы в полости кишки (Громова и др. 2006).

Отметим, что основное достоинство этой интегративной модели состоит в проведении опытов в физиологических условиях, в отсутствие наркоза и операционной травмы. Она позволяет проводить многократные опыты на одном и том же животном в течение длительного времени (до нескольких месяцев), а надежность получаемых данных достигается при небольшом количестве экспериментальных животных.

К ограничениям этой методики можно отнести сложность операции по изоляции участка кишки, а также прогрессирующую атрофию этого участка из-за отсутствия в нем экзогенной функциональной нагрузки.

*Методика оценки всасывательной способности тонкой кишки крыс по скорости свободного потребления раствора глюкозы*

Идея этого подхода возникла при рассмотрении временной динамики свободного питья концентрированного раствора глюкозы предварительно голодавшими крысами в опытах, проводившихся под руководством Уголева (Скворцова и др. 1975). Обращал на себя внимание тот факт, что объем выпиваемого крысами раствора глюкозы почти линейно возрастал во времени, начиная с 30-й минуты, на протяжении последующих трех часов.

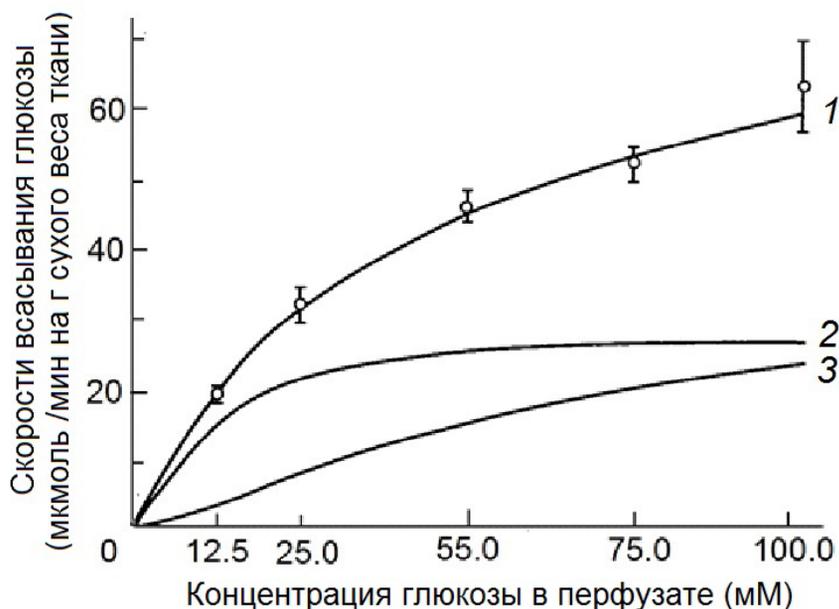


Рис. 2. Роль активного транспорта (2) и облегченной диффузии (3) в суммарном всасывании глюкозы (1) в тонкой кишке

Fig. 2. The role of active transport (2) and facilitated diffusion (3) in the total absorption of glucose (1) in the small intestine

Физиологически этот факт отражает действие “ileal brake” — механизма регуляции эвакуаторной функции желудка в соответствии со скоростями расщепления и всасывания пищевых веществ в тонкой кишке (Maljaars et al. 2008). Скорость потребления крысами раствора глюкозы, по сути, отражает способность тонкой кишки к всасыванию этого моносахарида. Этот факт был использован для объективной оценки всасывательной способности тонкой кишки у животных, находящихся в естественных условиях (Груздков и др. 2015; Громова и др. 2019; 2020).

Опыты проводили на животных, заранее подготовленных к питью растворов глюкозы с ее высокой концентрацией. После предварительного голодания в течение 18–20 ч крыс рассаживали в отдельные клетки с поилками, содержащими раствор глюкозы (200 г/л) и воду, и затем в течение 3–4 часов регистрировали объем выпитого раствора. После опыта животных возвращали в общие клетки со стандартным кормом. По данным регистрации методом линейной регрессии определяли среднюю скорость потребления глюкозы в интервале 60–300 мин.

*Оценка скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс при хроническом иммобилизационном стрессе*

Хронический стресс способствует развитию таких патологий, как диабет 2-го типа, метаболический синдром, воспалительные заболевания кишечника (Konturek et al. 2011; Patterson, Abizaid 2013). Представлял интерес вопрос о реакции

на него со стороны системы всасывания глюкозы в тонкой кишке.

Определялась концентрация кортикостерона в крови как показателя стрессорного воздействия и оценивалось всасывание глюкозы в тонкой кишке при стрессе, вызванном ежедневной трехчасовой иммобилизацией животных при комнатной (20–22 °С) или пониженной (5–6 °С) температурах на протяжении 3–16 дней. (Громова и др. 2020). Контрольными были крысы, которых не подвергали стрессу и на три часа лишали корма и воды.

Хроническая иммобилизация крыс при комнатной температуре вызывала повышение скорости свободного потребления раствора глюкозы (200 г/л) (и, соответственно, скорости ее всасывания) через три дня (рис. 3А), тогда как в сочетании с холодом она приводила к значительному повышению скорости потребления и всасывания глюкозы в тонкой кишке на всех сроках стрессорного воздействия (рис. 3В).

Эти изменения коррелировали с уровнем кортикостерона в плазме крови, что свидетельствует о роли эндогенного кортикостерона в изменении всасывания глюкозы в тонкой кишке в нашей модели хронического стресса.

*Оценка всасывания глюкозы в тонкой кишке при диабете 2-го типа по скорости потребления крысами ее концентрированного раствора*

Диабет 2-го типа является широко распространенным заболеванием, при котором раз-

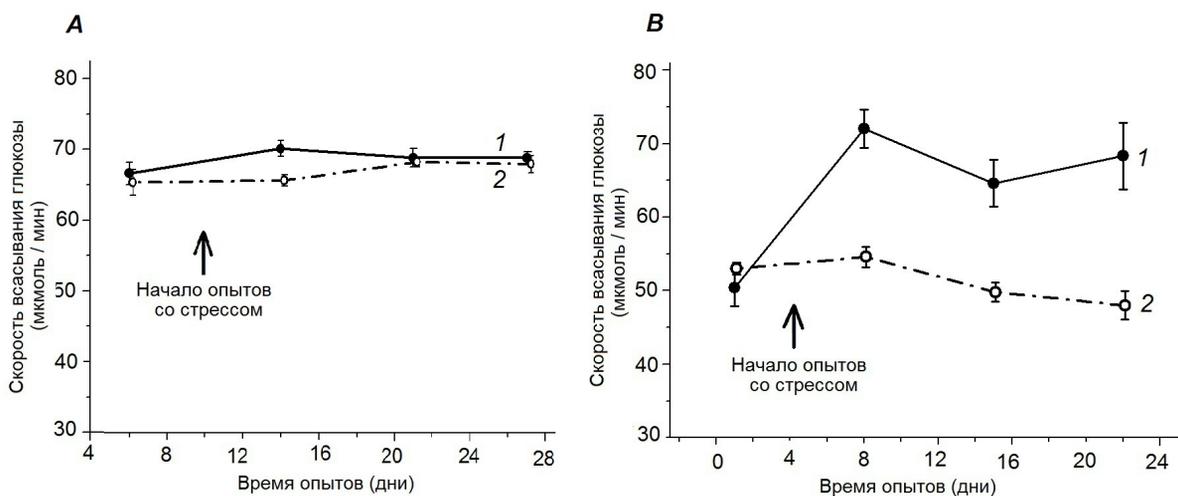


Рис. 3. Скорость свободного потребления крысами концентрированного раствора глюкозы (200 г/л) в ходе хронического иммобилизационного стресса (1) и в контроле (без стресса) (2) при комнатной (А) и пониженной (В) температурах

Fig. 3. The rate of voluntary consumption of concentrated glucose solution (200 g/L) by rats during chronic immobilization stress (1) and in the control (without stress) (2) at room (A) and lowed (B) temperatures

вивается гипергликемия — повышенное содержание глюкозы в крови (Wong et al. 2009).

Одним из факторов, вносящих вклад в развитие гипергликемии при диабете 2-го типа, является повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке. Современные представления об изменении всасывания глюкозы при диабете противоречивы и базируются в основном на данных, полученных в опытах *in vitro* и острых опытах *in vivo*, не вполне адекватно отражающих реальные закономерности протекающих процессов.

Мы оценивали всасывание глюкозы при диабете по скорости свободного потребления крысами ее концентрированного раствора.

Диабет 2-го типа вызывали путем инъекции стрептозотоцина крысам, содержащимся до этого в течение двух месяцев на жировой диете.

По результатам орального глюкозотолерантного теста (ОГТТ) крыс распределили на опытную (с диабетом) и контрольную группы. В последней вместо стрептозотоцина вводился его растворитель (цитратный буфер, pH 4,5).

В группе крыс с диабетом 2-го типа скорость потребления глюкозы из ее концентрированного раствора (200 г/л) увеличилась почти на треть по сравнению с наблюдавшейся в контроле, а также со скоростью в той же группе за три недели до индукции диабета ( $p < 0,05$ ) (рис. 4, 2a) (Громова и др. 2019). Это свидетельствует о повышении способности тонкой кишки к всасыванию глюкозы при диабете и хорошо

согласуется с данными других авторов, также отметивших более высокую скорость всасывания глюкозы у крыс с диабетом в острых опытах *in vivo* и *in vitro* (Wong et al. 2009).

### Заключение

Опыт применения двух рассмотренных методических подходов показал, что методика хронических опытов на крысах, разработанная Уголевым и Зариповым более 40 лет назад, вполне адекватна для исследования механизмов всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в условиях, близких к физиологическим, и остается востребованной до настоящего времени.

Методика оценки всасывательной способности тонкой кишки по скорости свободного потребления животным ее концентрированного раствора в некотором отношении уникальна, так как она впервые дает возможность объективно и количественно оценить реальную скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке в условиях, максимально близких к естественным, причем многократно у одного и того же животного на протяжении длительного времени (до нескольких месяцев).

Сочетание этих подходов, взаимно дополняющих друг друга, позволяет получить результаты, расширяющие представления о реальных масштабах и механизмах регуляции всасывания глюкозы в тонкой кишке в нормальных, физиологических условиях.

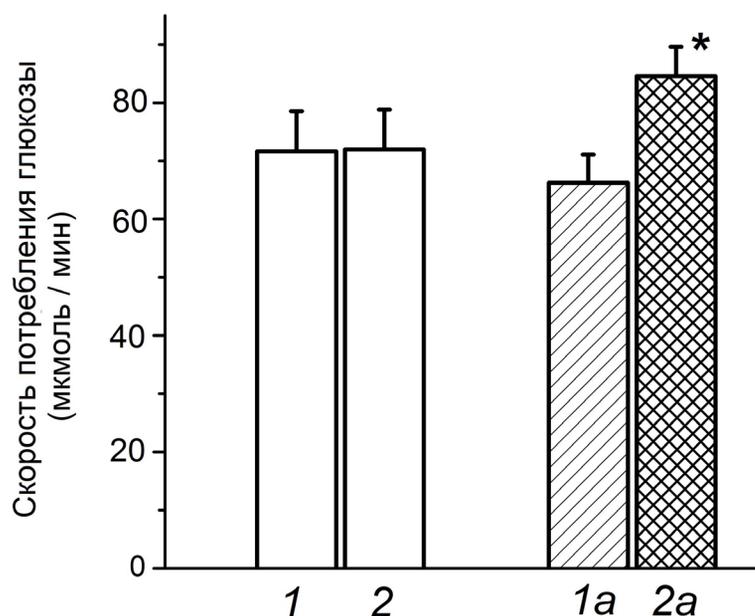


Рис. 4. Скорость свободного потребления крысами раствора глюкозы (200 г/л) до (1, 2) и через три недели после инъекции стрептозотоцина (2a) и его растворителя (контроль) (1a). \*  $p < 0,05$  к контролю

Fig. 4. The rate of voluntary consumption of glucose solution (200 g / l) by rats before (1, 2) and three weeks after the injection of streptozotocin (2a) and solvent (control) (1a). \*  $p < 0.05$  to control

## Литература

- Громова, Л. В., Грефнер, Н. М., Груздков, А. А., Комиссарчик, Я. Ю. (2006) Оценка роли облегченной диффузии в транспорте глюкозы через апикальную мембрану энтероцита. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 92, № 3, с. 362–373.
- Громова, Л. В., Полозов, А. С., Корнюшин, О. В. и др. (2019) Всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при экспериментальном диабете типа 2. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, т. 55, № 2, с. 145–147. <https://www.doi.org/10.1134/S0044452919020062>
- Громова, Л. В., Савочкина, Е. В., Алексеева, А. С. и др. (2020) Мембранный гидролиз углеводов и всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при хроническом иммобилизационном стрессе. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 106, № 11, с. 1421–1435. <https://www.doi.org/10.31857/S0869813920100040>
- Груздков, А. А., Громова, Л. В., Дмитриева, Ю. В., Алексеева, А. С. (2015) Скорость свободного потребления крысами раствора глюкозы как критерий оценки ее всасывания в тонкой кишке (Экспериментальное исследование и математическое моделирование). *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, т. 101, № 6, с. 708–720.
- Скворцова, Н. Б., Волконская, В. А., Туляганова, Е. Х. и др. (1975) О существовании специального аппетитарегулирующего кишечного гормона — арэнтерина. *Доклады Академии наук СССР*, т. 220, № 2, с. 493–495.
- Уголев, А. М., Зарипов, Б. З. (1979) Методические приемы для изучения мембранного пищеварения и всасывания в тонкой кишке в условиях хронического эксперимента на крысах и некоторых других животных. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 65, № 12, с. 1849–1853.
- Уголев, А. М., Зарипов, Б. З., Волошенович, М. И. и др. (1981) Новая техника и результаты исследований ферментативных и транспортных функций тонкой кишки в хронических экспериментах на крысах в норме и при патологии. *Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова*, т. 67, № 11, с. 1683–1693.
- Уголев, А. М., Зарипов, Б. З., Иезуитова, Н. Н. и др. (1984) Особенности мембранного гидролиза и транспорта в тонкой кишке в условиях, близких к физиологическим (ревизия существующих данных и представлений). *Биологические мембраны*, т. 1, № 10, с. 997–1018.
- Уголев, А. М., Зарипов, Б. З., Иезуитова, Н. Н. и др. (1986а) Сравнительная характеристика мембранного гидролиза и транспорта в острых и хронических экспериментах (ревизия данных и представлений). В кн.: А. М. Уголев (ред.). *Мембранный гидролиз и транспорт. Новые данные и гипотезы*. Л.: Наука, с. 139–166.
- Au, A., Gupta, A., Schembri, P., Cheeseman, C. I. (2002) Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochemical Journal*, vol. 367, no. 1, pp. 247–254. <https://www.doi.org/10.1042/BJ20020393>
- Ferraris, R. P. (2001) Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochemical Journal*, vol. 360, no. 2, pp. 265–276. <https://doi.org/10.1042/bj3600265>
- Gromova, L. V., Gruzdkov, A. A. (1999) Hydrolysis-dependent absorption of disaccharides in the rat small intestine (chronic experiments and mathematical modeling). *General Physiology and Biophysics*, vol. 18, no. 2, pp. 209–224. PMID: [10517294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10517294/).
- Kellett, G. L. (2001) The facilitated component of intestinal glucose absorption. *The Journal of Physiology*, vol. 531, no. 3, pp. 585–595. <https://www.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x>
- Konturek, P. C., Brzozowski, T., Konturek, S. J. (2011) Stress and the gut: Pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology & Pharmacology*, vol. 62, no. 6, pp. 591–599. PMID: [22314561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22314561/).
- Maljaars, P. W. J., Peters, H. P. F., Mela, D. J., Masclee, A. A. M. (2008) Ileal brake: A sensible food target for appetite control. A review. *Physiology & Behavior*, vol. 95, no. 3, pp. 271–281. <https://www.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.018>
- Pappenheimer, J. R. (1990) Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: Relation to body size. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 259, no. 2, pp. G290–G299. <https://www.doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.2.G290>
- Pappenheimer, J. R. (1993) On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 265, no. 3, pp. G409–G417. <https://www.doi.org/10.1152/ajpgi.1993.265.3.G409>
- Pappenheimer, J. R. (2001) Role of pre-epithelial “unstirred” layers in absorption of nutrients from the human jejunum. *The Journal of Membrane Biology*, vol. 179, no. 3, pp. 185–204. <https://www.doi.org/10.1007/s002320010047>
- Patterson, Z. R., Abizaid, A. (2013) Stress induced obesity: Lessons from rodent models of stress. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 7, article 130. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2013.00130>
- Ugolev, A. M., Zарипов, B. Z., Iезуитова, N. N. et al. (1986b) A revision of current data and views on membrane hydrolysis and transport in the mammalian small intestine based on a comparison of techniques of chronic and

- acute experiments: Experimental reinvestigation and critical reviews. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*, vol. 85, no. 4, pp. 593–612. [https://www.doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90269-0](https://www.doi.org/10.1016/0300-9629(86)90269-0)
- Wong, T. P., Debnam, E. S., Leung, P. S. (2009) Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: Implications for control of glucose transport across the brush border membrane. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 297, no. 3, pp. C601–C610. <https://www.doi.org/10.1152/ajpcell.00135.2009>
- Wright, E. M., Hirayama, B. A., Loo, D. F. (2007) Active sugar transport in health and disease. Review. *Journal of Internal Medicine*, vol. 261, no. 1, pp. 32–43. <https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01746.x>

## References

- Au, A., Gupta, A., Schembri, P., Cheeseman, C. I. (2002) Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochemical Journal*, vol. 367, no. 1, pp. 247–254. <https://www.doi.org/10.1042/BJ20020393> (In English)
- Ferraris, R. P. (2001) Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochemical Journal*, vol. 360, no. 2, pp. 265–276. <https://doi.org/10.1042/bj3600265> (In English)
- Gromova, L. V., Grefner, N. M., Gruzdkov, A. A., Komissarchik, Ya. Yu. (2006) Otsenka roli oblegchennoj diffuzii v transporte glyukozy cherez apikal'nuyu membranu enterotsita [The role of facilitated diffusion in glucose transport across the apical membrane of the enterocytes]. *Rossiyskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 92, no. 3, pp. 362–373. (In Russian)
- Gromova, L. V., Gruzdkov, A. A. (1999) Hydrolysis-dependent absorption of disaccharides in the rat small intestine (chronic experiments and mathematical modeling). *General Physiology and Biophysics*, vol. 18, no. 2, pp. 209–224. PMID: [10517294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10517294/). (In English)
- Gromova, L. V., Polozov, A. S., Korniyushin, O. V. et al. (2019) Vsasyvaniye glyukozy v tonkoj kishke krysa pri eksperimental'nom diabete tipa 2 [Glucose absorption in the rat small intestine under experimental type 2 diabetes mellitus]. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii — Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 55, no. 2, pp. 145–147. <https://www.doi.org/10.1134/S0044452919020062> (In Russian)
- Gromova, L. V., Savochkina, E. V., Alekseyeva, A. S. et al. (2020) Membrannyj gidroliz uglevodov i vsasyvanie glyukozy v tonkoj kishke krysa pri khronicheskom immobilizatsionnom stresse [Membrane hydrolysis of carbohydrates and glucose absorption in the rat small intestine under chronic immobilization stress]. *Rossiyskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 106, no. 11, pp. 1421–1435. <https://www.doi.org/10.31857/S0869813920100040> (In Russian)
- Gruzdkov, A. A., Gromova, L. V., Dmitriyeva, Yu. V., Alekseeva, A. S. (2015) Skorost' svobodnogo potrebleniya krysam rastvora glyukozy kak kriterij otsenki ee vsasyvaniya v tonkoj kishke (Eksperimental'noye issledovaniye i matematicheskoe modelirovanie) [Free consumption of glucose solution by rats as a criterion for evaluation its absorption in the small intestine (experimental study and mathematical modeling)]. *Rossiyskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 101, no. 6, pp. 708–720. (In Russian)
- Kellett, G. L. (2001) The facilitated component of intestinal glucose absorption. *The Journal of Physiology*, vol. 531, no. 3, pp. 585–595. <https://www.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0585h.x> (In English)
- Konturek, P. C., Brzozowski, T., Konturek, S. J. (2011) Stress and the gut: Pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology & Pharmacology*, vol. 62, no. 6, pp. 591–599. PMID: [22314561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22314561/). (In English)
- Maljaars, P. W. J., Peters, H. P. F., Mela, D. J., Masclee, A. A. M. (2008) Ileal brake: A sensible food target for appetite control. A review. *Physiology & Behavior*, vol. 95, no. 3, pp. 271–281. <https://www.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.018> (In English)
- Pappenheimer, J. R. (1990) Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: Relation to body size. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 259, no. 2, pp. G290–G299. <https://www.doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.2.G290> (In English)
- Pappenheimer, J. R. (1993) On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 265, no. 3, pp. G409–G417. <https://www.doi.org/10.1152/ajpgi.1993.265.3.G409>
- Pappenheimer, J. R. (2001) Role of pre-epithelial “unstirred” layers in absorption of nutrients from the human jejunum. *The Journal of Membrane Biology*, vol. 179, no. 3, pp. 185–204. <https://www.doi.org/10.1007/s002320010047> (In English)
- Patterson, Z. R., Abizaid, A. (2013) Stress induced obesity: Lessons from rodent models of stress. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 7, article 130. <https://www.doi.org/10.3389/fnins.2013.00130> (In English)
- Skvortsova, N. B., Volkonskaya, V. A., Tulyaganova, E. Kh. et al. (1975) O sushchestvovanii spetsial'nogo appetitreguliruyushchego kishchnogo gormona — arenterina [On the existence of a special appetite-regulating intestinal hormone — arenterin]. *Doklady Akademii nauk SSSR*, vol. 220, no. 2, pp. 493–495. (In Russian)
- Ugolev, A. M., Zaripov, B. Z. (1979) Metodicheskiye priemy dlya izucheniya membrannogo pishchevareniya i vsasyvaniya v tonkoj kishke v usloviyakh khronicheskogo eksperimenta na kryсах i nekotorykh drugikh zhivotnykh [Methods for studying membrane digestion and absorption in the small intestine in a chronic

- experiment on rats and some other animals]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 65, no. 12, pp. 1849–1853. (In Russian)
- Ugolev, A. M., Zaripov, B. Z., Voloshenovitch, M. I. et al. (1981) Novaya tekhnika i rezul'taty issledovaniy fermentativnykh i transportnykh funktsij tonkoj kishki v khronicheskikh eksperimentakh na krysakh v norme i pri patologii [New technique and results of investigation of the enzyme and transport functions of small intestine in chronic experiments in rats in norma and pathology]. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR im. I. M. Sechenova*, vol. 67, no. 11, pp. 1683–1693. (In Russian)
- Ugolev, A. M., Zaripov, B. Z., Iezuitova, N. N. et al. (1984) Osobennosti membrannogo gidroliza i transporta v tonkoj kishke v usloviyakh, blizkikh k fiziologicheskim (reviziya sushchestvuyushchikh dannykh i predstavlenij) [The features of membrane hydrolysis and transport in the small intestine under close to physiological conditions (a revision of existing data and ideas)]. *Biologicheskie membrany — Biological Membranes*, vol. 1, no. 10, pp. 997–1018. (In Russian)
- Ugolev, A. M., Zaripov, B. Z., Iyezuitova, N. N. et al. (1986a) Sravnitel'naya kharakteristika membrannogo gidroliza i transporta v ostrykh i khronicheskikh eksperimentakh (reviziya dannykh i predstavlenij) [Comparative characteristics of membrane hydrolysis and transport in acute and chronic experiments (a revision of data and ideas)]. In: A. M. Ugolev (ed.). *Membrannyj gidroliz i transport. Novye dannye i gipotezy [Membrane hydrolysis and transport. New data and hypotheses]*. Leningrad: Nauka Publ., pp. 139–166. (In Russian)
- Ugolev, A. M., Zaripov, B. Z., Iezuitova, N. N. et al. (1986b) A revision of current data and views on membrane hydrolysis and transport in the mammalian small intestine based on a comparison of techniques of chronic and acute experiments: Experimental reinvestigation and critical reviews. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*, vol. 85, no. 4, pp. 593–612. [https://www.doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90269-0](https://www.doi.org/10.1016/0300-9629(86)90269-0) (In English)
- Wong, T. P., Debnam, E. S., Leung, P. S. (2009) Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: Implications for control of glucose transport across the brush border membrane. *American Journal Physiology. Cell Physiology*, vol. 297, no. 3, pp. C601–C610. <https://www.doi.org/10.1152/ajpcell.00135.2009> (In English)
- Wright, E. M., Hirayama, B. A., Loo, D. F. (2007) Active sugar transport in health and disease. Review. *Journal of Internal Medicine*, vol. 261, no. 1, pp. 32–43. <https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01746.x> (In English)



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 612.13:611.018.74:616.61

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-88-95>

## Роль $K^+$ -каналов и сероводорода в регуляции тонуса церебральных артерий нефрэктомированных крыс

Г. И. Лобов<sup>✉1</sup>, Г. Т. Иванова<sup>1</sup>

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

### Сведения об авторах

Геннадий Иванович Лобов,  
SPIN-код: 6436-1404,  
Scopus AuthorID: 7003862926,  
ORCID: 0000-0003-3088-4647,  
e-mail: [lobovgi@infran.ru](mailto:lobovgi@infran.ru)

Галина Тажимовна Иванова,  
SPIN-код: 5398-7584,  
Scopus AuthorID: 57210290363,  
ORCID: 0000-0003-0188-5173,  
e-mail: [ivanovagt@infran.ru](mailto:ivanovagt@infran.ru)

### Для цитирования:

Лобов, Г. И., Иванова, Г. Т.  
(2021) Роль  $K^+$ -каналов  
и сероводорода в регуляции  
тонуса церебральных артерий  
нефрэктомированных крыс.  
*Интегративная физиология*, т. 2,  
№ 1, с. 88–95.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-88-95>

**Получена** 29 января; прошла  
рецензирование 7 февраля 2021;  
принята 11 февраля 2021.

**Финансирование:** Работа  
выполнена при финансовой  
поддержке гранта РФФИ  
№ 19-015-00047 и частично  
Государственной программы  
Российской Федерации 47\_110\_  
ДРиОК, тема № 0134-2019-  
003(65.2).

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Хроническая почечная недостаточность широко распространена и приводит к нарушению функционального состояния церебральных артерий, что сопровождается когнитивными нарушениями и повышением риска развития ишемического инсульта. В исследовании изучалась роль эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) опосредованного механизма и  $H_2S$  в эндотелий-зависимой дилатации церебральных артерий у нефрэктомированных (НЭ) крыс. На самцах крыс Wistar, подвергнутых резекции 5/6 массы ткани почек и контрольных ложнооперированных, изучены реакции церебральных артерий диаметром 60–80 мкм и < 20 мкм крыс на ацетилхолин (ACh) и при действии ACh на фоне ингибитора NO-синтазы, цистатионин- $\gamma$ -лиазы и блокирования  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов. Показано, что ослабление ACh-индуцируемой дилатации церебральных артерий НЭ крыс при применении L-NAME было менее выражено по сравнению с реакциями крыс контрольной группы. В мелких артериях крыс контрольной группы блокирование  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов сопровождалось уменьшением ACh-индуцируемой дилатации на  $11,2 \pm 0,7\%$ , у НЭ крыс — на  $18,8 \pm 1,3\%$ . Ингибирование цистатионин- $\gamma$ -лиазы в мелких артериях контрольных крыс ослабляло ACh-индуцируемую дилатацию на  $14 \pm 0,9\%$ , у НЭ крыс — на  $22,8 \pm 1,6\%$ . Таким образом, нарушение ACh-индуцируемой дилатации артерий НЭ крыс обусловлено дефицитом (снижением биодоступности) NO. В мелких артериях часть эндотелийзависимой дилатации реализуется посредством механизма EDH-типа, у НЭ крыс роль этого механизма возрастает.  $H_2S$  принимает участие в эндотелий-зависимой дилатации мелких церебральных артерий контрольных и НЭ крыс (у последних роль  $H_2S$  как вазодилататора более значима).

**Ключевые слова:** хроническая болезнь почек, нефрэктомия, церебральные артерии, дилатация, ацетилхолин, NO, эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF),  $H_2S$ ,  $K^+$ -каналы.

# Role of K<sup>+</sup>-channels and hydrogen sulfide in the regulation of cerebral arteries in nephrectomized rats

G. I. Lobov<sup>✉1</sup>, G. T. Ivanova<sup>1</sup><sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia**Authors**

Gennady I. Lobov,  
SPIN: 6436-1404,  
Scopus AuthorID: 7003862926,  
ORCID: 0000-0003-3088-4647,  
e-mail: [lobovgi@infran.ru](mailto:lobovgi@infran.ru)

Galina T. Ivanova,  
SPIN: 5398-7584,  
Scopus AuthorID: 57210290363,  
ORCID: 0000-0003-0188-5173,  
e-mail: [ivanovagt@infran.ru](mailto:ivanovagt@infran.ru)

**For citation:**

Lobov, G. I., Ivanova, G. T. (2021)  
Role of K<sup>+</sup>-channels and hydrogen  
sulfide in the regulation of cerebral  
arteries in nephrectomized rats.  
*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 88–95.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-88-95>

**Received** 29 January 2021;  
reviewed 7 February 2021;  
accepted 11 February 2021.

**Finding:** The work was supported  
by the Russian Foundation for Basic  
Research, grant no. 19-015-00047,  
and, in part, by the Government-  
Run Programme of the Russian  
Federation 47\_110\_DRiOK, topic  
no. 0134-2019-003 (65.2).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Chronic renal failure is widespread. It disrupts the functional state of cerebral arteries, leads to cognitive impairment and an increased risk of ischemic stroke. The study investigated the role of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) mediated mechanism and H<sub>2</sub>S in endothelium-dependent dilatation of cerebral arteries in nephrectomized (NE) rats. The study explored the reactions of cerebral arteries with a diameter of 60–80 μm and < 20 μm NE and sham-operated male Wistar rats to acetylcholine (ACh) as well as to ACh acting under an NO synthase inhibitor, cystathionine γ-lyase and blocking of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels. The attenuation of ACh-induced dilatation of cerebral arteries in NE rats with L-NAME was lower than in the control group. In the small arteries of the control group of rats, blocking of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels was accompanied by a decrease in ACh-induced dilatation by 11.2 ± 0.7%, in NE rats — by 18.8 ± 1.3%. Inhibition of cystathionine-γ-lyase in small arteries of control rats weakened ACh-induced dilatation by 14 ± 0.9%, in NE rats — by 22.8 ± 1.6%. It was concluded that the impairment of ACh-induced dilatation of arteries in NE rats is caused by a deficiency (bioavailability decrease) of NO. In small arteries, part of endothelium-dependent dilatation is realized through the EDH-type mechanism; in NE rats, the role of this mechanism increases. H<sub>2</sub>S is involved in endothelium-dependent dilatation of small cerebral arteries in control and NE rats (in the latter, H<sub>2</sub>S is a more significant vasodilator).

**Keywords:** chronic kidney disease, nephrectomy, cerebral arteries, vasodilation, acetylcholine, NO, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), H<sub>2</sub>S, K<sup>+</sup>-channels.

## Введение

Хроническая болезнь почек (ХБП) широко распространена (у 10–13% населения регистрируется ХБП I–V стадий), необратима, непрерывно прогрессирует и связана с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний (Ammirati 2020; Coresh et al. 2007). Вероятность смерти от сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с ХБП в несколько раз, а риск развития ишемического инсульта в 8–10 раз выше по сравнению с основной популяцией (Power 2013; Saritas, Floege 2020). У пациентов с ХБП гораздо чаще выявляется болезнь мелких сосудов головного мозга (Eldehni et al. 2019), проявляющаяся в виде когнитивной дисфункции вплоть до развития сосудистой деменции и церебральной атрофии

(Drew et al. 2013; Kamata et al. 2000). Появляется все больше доказательств того, что ХБП связана с нарушением функции эндотелия (эндотелиальная дисфункция, ЭД), которая ослабляет способность сосудов адекватно реагировать на физиологические раздражители и, по мнению ряда исследователей, является общим механизмом, резко увеличивающим риск цереброваскулярных осложнений (Higashi et al. 2012; Martens et al. 2016). ЭД вызывается негативным воздействием на эндотелий постоянно циркулирующих в крови уремических токсинов. Одним из проявлений ЭД является снижение производства и биодоступности эндотелиального оксида азота (NO) (Baylis 2008), вызванного ингибированием синтазы NO асимметричным диметиларгинином — одним из наиболее опасных

уремических токсинов. В некоторых исследованиях показано, что при ХБП, помимо угнетения производства NO, происходит снижение продукции других вазодилататоров. В мелких сосудах важнейшим вазодилататором, производимым эндотелием, является эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) (Féleto, Vanhoutte 2009). С. Ветторетти и соавторы (Vettoretti et al. 2006) исследовали релаксацию артерий крыс после субтотальной нефрэктомии, реализуемую посредством EDH-механизма. Они обнаружили, что EDHF-опосредованная релаксация в мелких брыжеечных артериях у этих животных была ослаблена. Что касается компенсаторных цереброваскулярных эндотелий-зависимых регуляторных механизмов при ХБП, то необходимо отметить, что они остаются относительно неизученными (Sprick et al. 2020). Роль EDHF в церебральных артериях при уремии изучалась в единичных работах (Lobov, Sokolova 2020), и в них далеко не полностью раскрыт механизм повреждающего действия уремии на эндотелиальные и гладкомышечные клетки.

В настоящем исследовании мы проверили гипотезу о том, что ХБП приводит к нарушению EDHF-опосредованной дилатации церебральных артерий у нефрэктомированных крыс, исследовали участие  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов в эндотелий-зависимой дилатации этих артерий, а также оценили роль  $H_2S$  в регуляции тонуса церебральных артерий при уремии.

### Материал и методы

В исследование были включены самцы крыс Wistar в возрасте 3 мес. Две группы крыс были сформированы методом случайной выборки. Животным первой группы ( $n = 14$ ) была проведена нефрэктомия (двухэтапная резекция 5/6 массы почечной ткани) (Ivanova et al. 2019). Вторую (контрольную) группу ( $n = 12$ ) составили ложнопериоперированные крысы, которые подверглись аналогичному оперативному вмешательству без удаления почечной ткани. Последующие 4 месяца крысы получали стандартный пищевой рацион и питьевую воду ad libitum. Все хирургические и последующие экспериментальные манипуляции проводили под наркозом (золетил, Virbac, 20 мг/кг, внутривенно). Исследование проведено в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по этике Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Через 4 месяца после проведения операций животным взвешивали и измеряли систолическое артериальное давление (АД) с помощью авто-

матизированной системы «Систола» (РФ). Затем крыс наркотизировали и проводили исследование состояния и реакций артерий сенсомоторной коры головного мозга на воздействие агонистов и антагонистов. В теменной области черепа крыс удаляли кожу, костную ткань и твердую мозговую оболочку. На протяжении всего исследования поверхность мозга орошали сатурированным ( $95\% O_2 + 5\% CO_2$ ) физиологическим солевым раствором (PSS) (в mM: NaCl — 120,4; KCl — 5,9;  $NaHCO_3$  — 15,5;  $MgCl_2$  — 1,2;  $CaCl_2$  — 2,5;  $NaH_2PO_4$  — 1,2; EDTA — 0,026; глюкоза — 11,5). pH раствора стабилизировали на уровне  $7,38 \pm 0,02$ , температуру —  $+38 \pm 0,2$  °C. Температуру тела животного поддерживали на уровне  $38 \pm 0,2$  °C. Фото- и видеорегистрацию пиальных артерий проводили с помощью установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2 ZOOM (Микромед, Россия), цветную видеокамеру DCM-510 (Scorpetek, Китай) и персональный компьютер.

В процессе исследования фотографировали и анализировали изменения диаметра артерий двух групп: крупных (диаметром 60–80 мкм) и мелких (диаметром < 20 мкм). На поверхность мозга осуществляли аппликацию растворов агонистов и антагонистов, активирующих или ингибирующих межклеточные и внутриклеточные сигнальные пути: ацетилхолин (Acetylcholine chloride, ACh, 1 мкМ), L-NAME (N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester, 10 мкМ), пропаргилглицин (D-Propargylglycine, PPG, 5 мкМ), индометацин (Indomethacin, 50 мкМ), TRAM-34 (10 мкМ). Все реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich. Непосредственно перед экспериментами применяемые вещества растворяли в PSS. Индометацин и TRAM-34 предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Перед воздействием необходимое количество концентрата добавляли в физиологический раствор. Концентрация DMSO в конечном растворе не превышала 0,02%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывал влияния на диаметр и реакции церебральных артерий.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows, v.10. Результаты анализа представлены средними значениями данных (M) и величинами стандартной ошибки. Нормальность распределения полученных данных определяли по W-критерию Шапиро — Уилка. Оценка статистической значимости различий средних осуществлялась на основе t-критерия Стьюдента.

Статистически значимыми считали результаты при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В регуляции мозгового кровотока принимают участие различные механизмы. В работах разных лабораторий в последние годы большое внимание уделяется локальным механизмам модуляции церебрального кровотока, в т. ч. эндотелийзависимым (Mulders et al. 2009; Peterson et al. 2011). Имеются данные, свидетельствующие, что NO, продуцируемый эндотелиальными клетками, является одним из основных факторов местной регуляции тонуса церебральных артерий и мозгового кровотока (Peterson et al. 2011). В последние десятилетия появились также данные, доказывающие, что в церебральных артериях довольно эффективно функционирует механизм вазодилатации, опосредованный EDHF (Leo et al. 2011).

У нефрэктомированных крыс через 3–4 мес. после операции развивается уремия — состояние, максимально приближенное к терминальной стадии хронической болезни почек (ХБП) у человека, и артериальная гипертензия. После нефрэктомии у крыс происходит нарушение функционального состояния церебральных артерий, которое определяется действием комплекса негативных факторов (в первую очередь гипертензией и влиянием уремических токсинов).

В нашем исследовании через 4 месяца после проведения операций животных взвешивали и измеряли артериальное давление (АД). Разница в массе тела крыс разных групп была несущественной (нефрэктомированные крысы —  $367,4 \pm 13,1$  г, ложнооперированные —  $389,2 \pm 15,3$  г). В то же время систолическое АД у нефрэктомированных крыс было значительно выше по сравнению с ложнооперированными животными ( $167,2 \pm 3,3$  мм рт. ст. и  $128,4 \pm 2,8$  мм рт. ст. соответственно,  $p < 0,01$ ), т. е. у них была стойкая АГ. В данной работе мы не исследовали биохимические показатели крови крыс, но ранее нами было показано, что после нефрэктомии в сыворотке крови значительно повышается содержание мочевины и креатинина, а также гомоцистеина и ассиметричного диметиларгинина (Ivanova et al. 2019).

Ранее в нашей лаборатории было изучено функциональное значение NO в регуляции церебрального кровотока у нефрэктомированных крыс (Ivanova et al. 2019). В данном исследовании основное внимание было уделено роли EDHF в регуляции просвета церебральных артерий у крыс с уремией. Но поскольку в процессе

регуляции сосудистых гладкомышечных клеток NO и EDHF оказывают сложное влияние друг на друга (Féléto, Vanhoutte 2009), мы оценивали и функциональное значение NO.

Классический подход к изучению роли EDHF в дилатации сосудов заключается в проведении экспериментов с использованием ACh на фоне применения комбинации: ингибитор NO-синтазы + ингибитор циклооксигеназы с целью блокирования синтеза NO и простагландинов (Leo et al. 2011). В наших опытах на первом этапе через 20 мин после вскрытия черепа у крыс и измерения исходного диаметра церебральных артерий на поверхность мозга апплицировали PSS, содержащий ACh, и через 3 мин измеряли диаметр артерий. Затем на протяжении 20 мин поверхность мозга омывали PSS, после этого добавляли L-NAME; через 15 мин в раствор, содержащий L-NAME, вводили ACh и через 3 мин измеряли диаметр артерий. Затем на протяжении 20 мин поверхность мозга омывали PSS. Затем в PSS вводили L-NAME и индометацин, через 15 мин добавляли ACh и через 3 мин измеряли диаметр артерий. На заключительном этапе в раствор одновременно вводили L-NAME, индометацин и TRAM-34 и через 15 мин в очередной раз оценивали ACh-индуцированную дилатацию артерий.

Данные, полученные в ходе этой серии экспериментов, представлены на рисунке 1.

Поскольку анализ данных, представленных на рисунке 1, достаточно сложен и на подобной диаграмме трудно показать достоверность различий параметров, ниже, на рисунке 2, мы показываем эти же данные в другом виде и другом масштабе, удобном для сравнения и анализа. Первое, что необходимо отметить, — это уменьшение амплитуды ACh-индуцируемой дилатации церебральных артерий у нефрэктомированных крыс. Достоверное уменьшение дилатации наблюдалось как в крупных, так и в мелких артериях. Ослабление эндотелий-зависимой дилатации при ХБП характерно для артерий различных сосудистых бассейнов (Thambyrajah et al. 2000), и в этом отношении церебральные сосуды не явились исключением.

Ингибирование продукции NO (добавление в раствор L-NAME) приводило к значительному ослаблению ACh-индуцированной дилатации крупных и мелких церебральных артерий как контрольной группы, так и нефрэктомированных. Максимальное уменьшение дилатации при действии L-NAME наблюдалось в крупных артериях, что дает основание заключить, что по механизму действия ACh-индуцированная

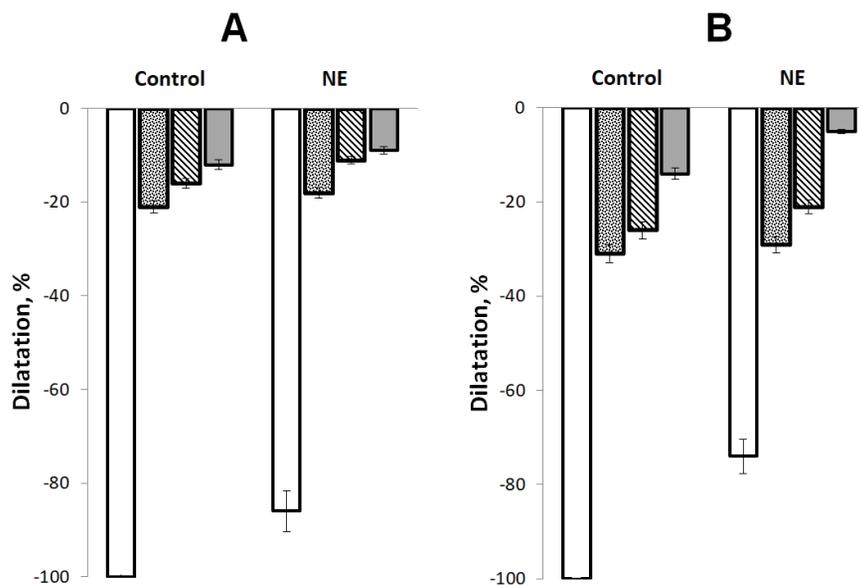


Рис. 1. Величина ACh-индуцируемой дилатации церебральных артерий крыс диаметром 60–80 мкм (A) и < 20 мкм (B) на фоне ингибирования: NO-синтазы (■), циклооксигеназы (▨) и блокирования эндотелиальных  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов промежуточной проводимости (▩). Данные представлены в % от величины общей ACh-индуцируемой дилатации церебральных артерий крыс контрольной группы. Control — контрольные крысы, NE — крысы после нефрэктомии

Fig. 1. The value of ACh-induced dilatation of cerebral arteries in rats with a diameter of 60–80 μm (A) and < 20 μm (B) under inhibition of: NO synthases (■), cyclooxygenase (▨) and blocking of endothelial  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channels of intermediate conductance (▩). The data are presented as a percentage of the value of the total ACh-induced dilatation of the cerebral arteries of the rats of the control group. Control — control rats, NE — nephrectomized rats

дилатация в этих артериях является преимущественно NO-опосредованной. Нефрэктомия приводила к ослаблению этого компонента ACh-индуцированной дилатации как в крупных, так и в мелких артериях.

Ингибирование синтеза простагландинов оказывало слабое влияние на амплитуду ACh-индуцированной дилатации крупных и мелких церебральных артерий животных контрольной группы. Нефрэктомия привела к возрастанию PG (градиент давления) – опосредованного компонента компонента ACh-индуцируемой дилатации как крупных, так и мелких церебральных артерий крыс. Мы полагаем, что возрастание роли простагландинов в дилатации артерий при ХПН может объясняться экспрессией COX-2. При ХПН циркулирующие в плазме крови уремические токсины вызывают повреждение тканей и системное воспаление, обычно сопровождающееся экспрессией COX-2 (Cobo et al. 2018).

Третий, наименее изученный, механизм эндотелий-зависимой вазодилатации — это гиперполяризация, обусловленная различными химическими веществами, продуцируемыми эндотелием

и ранее объединяемыми в единое понятие — EDHF (Luksha et al. 2009). Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие, что роль EDHF могут выполнять  $H_2O_2$ , CO,  $H_2S$  и другие вещества (Félétou, Vanhoutte 2009), при этом механизм их действия идентичен: открытие  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов на мембране эндотелиоцитов → гиперполяризация мембраны эндотелиальных клеток → передача гиперполяризации через миоэндотелиальные щелевые контакты на гладкомышечные клетки (ГМК), в результате чего потенциал-управляемые  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа деактивируются, концентрация  $[Ca^{2+}]_i$  в цитоплазме ГМК восстанавливается, что способствует их расслаблению и вазорелаксации (Behringer 2017). На мембране эндотелиальных клеток имеются два типа  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов: малой проводимости и промежуточной проводимости, при этом роль последних более значима (Grgic et al. 2009)

В данной работе мы не изучали химическую природу вещества, продуцируемого эндотелием и приводящего к гиперполяризации и вазодилатации. С учетом того факта, что все кандидаты в EDHF оказывают влияние на сосудистые ГМК посредством гиперполяризации, обусловленной

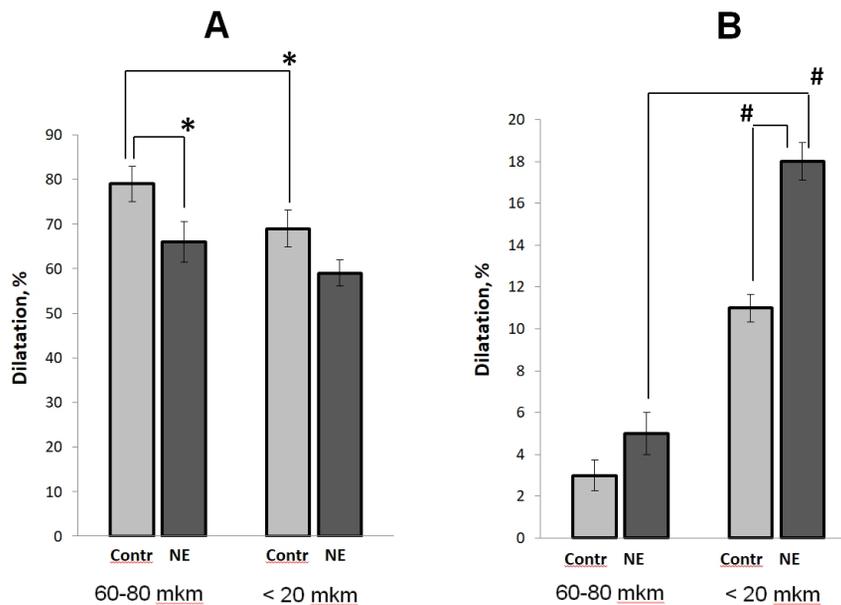


Рис. 2. Рассчитанные величины NO-опосредованной (А) и EDHF-опосредованной (В) АСh-индуцируемой дилатации церебральных артерий диаметром 60–80 мкм и < 20 мкм крыс контрольной группы и нефрэктомированных животных. Данные представлены в % от величины общей АСh-индуцируемой дилатации церебральных артерий крыс контрольной группы. Contr — контрольная группа, NE — группа крыс с нефрэктомией. Различия между группами животных значимы: \* —  $p < 0,05$ , # —  $p < 0,01$

Fig. 2. Calculated values of NO-mediated (A) and EDHF-mediated (B) ACh-induced dilatation of cerebral arteries with a diameter of 60–80  $\mu\text{m}$  and < 20  $\mu\text{m}$  in rats of the control group and nephrectomized animals. The data are presented as a percentage of the value of the total ACh-induced dilatation of the cerebral arteries of the rats of the control group. Contr — control rats, NE — nephrectomized rats. Differences between groups of animals are significant: \* —  $p < 0.05$ , # —  $p < 0.01$

открыванием  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов, мы применяли блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^{+}$ -каналов промежуточной проводимости — TRAM-34. TRAM-34 добавляли в раствор после ингибирования NO- и PG-опосредованных механизмов вазодилатации. Действие TRAM-34 приводило к выраженному уменьшению амплитуды АСh-индуцируемой дилатации мелких церебральных артерий, в крупных артериях дилатация также ослаблялась, но в значительно меньшей степени (рис. 1 и 2). Из полученных данных можно заключить следующее: 1) в физиологических условиях в мелких церебральных артериях крыс эндотелийзависимая дилатация реализуется не только за счет продукции NO, важную роль играет EDH-механизм, 2) у нефрэктомированных крыс роль EDH-механизма значительно возрастает, что на фоне снижения продукции NO можно расценивать как проявление адаптации к патологическому состоянию, компенсирующей дефицит NO (Félétou, Vanhoutte 2009).

Хотя в задачу данного исследования не входила идентификация химической природы вещества, продуцируемого эндотелием и приводящего к дилатации артерий посредством EDH-механизма, с учетом все более возрастающего интереса к  $\text{H}_2\text{S}$  как к третьему газотрансмиттеру (Chen et al. 2007) мы провели исследование роли  $\text{H}_2\text{S}$  в эндотелий-зависимой дилатации церебральных артерий крыс. С этой целью мы использовали ингибитор синтеза эндогенного  $\text{H}_2\text{S}$  — PPG. С учетом сложного взаимодействия в тканях NO и  $\text{H}_2\text{S}$  (Dongó et al. 2018) PPG вводили в раствор после ингибирования продукции NO. Данные, полученные в этой серии опытов, представлены в таблице 1. Ингибирование синтеза  $\text{H}_2\text{S}$  приводило к значительному ослаблению вазодилатации в мелких церебральных артериях крыс контрольной группы (уменьшение составляло в среднем  $25,2 \pm 1,8\%$  от величины не NO-опосредованной дилатации). У нефрэктомированных крыс применение PPG сопровождалось более выраженным снижением амплитуды дилатации ( $43,3 \pm 2,9\%$  от величины не NO-опосредованной дилатации).

Табл. 1. Величина ACh-индуцируемой дилатации церебральных артерий крыс на фоне ингибирования продукции NO и  $H_2S$

Table 1. ACh-induced dilatation of rat cerebral arteries under inhibition of NO and  $H_2S$  production

Диаметр артерий	Группа крыс	ACh	ACh + L-NAME	ACh + L-NAME +PPG
60–80 мкм	Контроль	100%	21,2 ± 1,7%	16,3 ± 1,1%*
	НЭ	86,2 ± 5,1%	17,4 ± 1,4%	10,3 ± 0,7%*
< 20 мкм	Контроль	100%	31,1 ± 2,0%	17,6 ± 1,2%#
	НЭ	74 ± 4,2%	29,6 ± 1,8%	8,4 ± 0,4%#

Примечание: различия достоверны по отношению к величине дилатации церебральных артерий на фоне L-NAME, \* —  $p < 0,05$ ; # —  $p < 0,01$ .

Note that the difference is significant relative to the dilatation value of cerebral arteries under L-NAME, \* —  $p < 0.05$ ; # —  $p < 0.01$ .

В крупных церебральных артериях применение PPG сопровождалось незначительными изменениями величины ACh-индуцируемой дилатации. Данные этой серии экспериментов позволяют заключить: 1) в мелких церебральных артериях крыс достаточно эффективно функционирует механизм дилатации, реализуемый с участием  $H_2S$ ; 2) роль EDHF в мелких церебральных артериях крыс может выполнять  $H_2S$ ; 3) при уремии роль этого механизма вазодилатации возрастает.

Таким образом, в процессе проведенного исследования установлено: 1) артериальная гипертензия и уремия, спровоцирован-

ные нефрэктомией, привели к нарушению эндотелийзависимой дилатации церебральных артерий крыс; 2) у нефрэктомированных крыс нарушено производство (биодоступность) NO в крупных и мелких церебральных артериях; 3) в мелких церебральных артериях крыс часть эндотелий-зависимой дилатации реализуется посредством механизма дилатации EDH-типа; 4) эффективность дилатации EDH-типа в мелких артериях нефрэктомированных крыс возрастает, т. е. этот механизм выполняет компенсаторную функцию при дефиците NO; 5) эндоген-

ный  $H_2S$  в мелких церебральных артериях способствует их дилатации и может выступать в роли эндотелиального EDHF.

## References

- Ammirati, A. L. (2020) Chronic kidney disease. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 66, suppl. 1, pp. s03–s09. <https://www.doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.3> (In English)
- Baylis, C. (2008) Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, vol. 294, no. 1, pp. F1–F9. <https://www.doi.org/10.1152/ajprenal.00424.2007> (In English)
- Behringer, E. J. (2017) Calcium and electrical signaling in arterial endothelial tubes: New insights into cellular physiology and cardiovascular function. *Microcirculation*, vol. 24, no. 3, article e12328. <https://www.doi.org/10.1111/micc.12328> (In English)
- Chen, C.-q., Xin, H., Zhu, Y.-z. (2007) Hydrogen sulfide: Third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 28, no. 11, pp. 1709–1716. <https://www.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00629.x> (In English)
- Cobo, G., Lindholm, B., Stenvinkel, P. (2018) Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 33, suppl. 3, pp. iii35–iii40. <https://www.doi.org/10.1093/ndt/gfy175> (In English)
- Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L. A. et al. (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Journal of the American Medical Association*, vol. 298, no. 17, pp. 2038–2047. <https://www.doi.org/10.1001/jama.298.17.2038> (In English)
- Dongó, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A. S., Kiss, L. (2018) The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*, vol. 81, pp. 75–87. <https://www.doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.010> (In English)

- Drew, D. A., Bhadelia, R., Tighiouart, H. et al. (2013) Anatomic brain disease in hemodialysis patients: A cross-sectional study. *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 61, no. 2, pp. 271–278. <https://www.doi.org/10.1053/ajkd.2012.08.035> (In English)
- Eldehni, M. T., Odudu, A., Mcintyre, C. W. (2019) Brain white matter microstructure in end-stage kidney disease, cognitive impairment, and circulatory stress. *Hemodialysis International*, vol. 23, no. 3, pp. 356–365. <https://www.doi.org/10.1111/hdi.12754> (In English)
- Féletou, M., Vanhoutte, P. M. (2009) EDHF: An update. *Clinical Science (London)*, vol. 117, no. 4, pp. 139–155. <https://www.doi.org/10.1042/CS20090096> (In English)
- Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J., Köhler, R. (2009) Endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses — relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, vol. 157, no. 4, pp. 509–526. <https://www.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x> (In English)
- Higashi, Y., Kihara, Y., Noma, K. (2012) Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertension Research*, vol. 35, no. 11, pp. 1039–1047. <https://www.doi.org/10.1038/hr.2012.138> (In English)
- Ivanova, G. T., Lobov, G. I., Beresneva, O. N., Parastayeva, M. M. (2019) Izmenenie reaktivnosti sudov kryz s eksperimental'nym umen'sheniyem massy funktsioniruyushchikh nefronov [Changes in the reactivity of vessels of rats with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons]. *Nefrologiya — Nephrology (Saint Petersburg)*, vol. 23, no. 4, pp. 88–95. <https://www.doi.org/10.24884/1561-6274-2019-23-4-88-95> (In Russian)
- Kamata, T., Hishida, A., Takita, T. et al. (2000) Morphologic abnormalities in the brain of chronically hemodialyzed patients without cerebrovascular disease. *American Journal of Nephrology*, vol. 20, no. 1, pp. 27–31. <https://www.doi.org/10.1159/000013551> (In English)
- Leo, C. H., Hart, J. L., Woodman, O. L. (2011) Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *British Journal of Pharmacology*, vol. 162, no. 2, pp. 365–377. <https://www.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01023.x> (In English)
- Lobov, G. I., Sokolova, I. B. (2020) Rol' NO i H<sub>2</sub>S v regulyatsii tonusa tserebral'nykh sudov pri khronicheskoy boleznii pochek [Role of NO and H<sub>2</sub>S in the regulation of the tone of cerebral vessels in chronic kidney disease]. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 106, no. 8, pp. 1002–1015. <https://www.doi.org/10.31857/S0869813920080063> (In Russian)
- Luksha, L., Agewall, S., Kublickiene, K. (2009) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, vol. 202, no. 2, pp. 330–344. <https://www.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.008> (In English)
- Martens, C. R., Kirkman, D. L., Edwards, D. G. (2016) The vascular endothelium in chronic kidney disease: A novel target for aerobic exercise. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, vol. 44, no. 1, pp. 12–19. <https://www.doi.org/10.1249/JES.0000000000000065> (In English)
- Mulders, A. C. M., Mathy, M.-J., Meyer zu Heringdorf, D. et al. (2009) Activation of sphingosine kinase by muscarinic receptors enhances NO-mediated and attenuates EDHF-mediated vasorelaxation. *Basic Research in Cardiology*, vol. 104, no. 1, pp. 50–59. <https://www.doi.org/10.1007/s00395-008-0744-x> (In English)
- Peterson, E. C., Wang, Z., Britz, G. (2011) Regulation of cerebral blood flow. *International Journal of Vascular Medicine*, vol. 2011, article 823525. <https://www.doi.org/10.1155/2011/823525> (In English)
- Power, A. (2013) Stroke in dialysis and chronic kidney disease. *Blood Purification*, vol. 36, no. 3–4, pp. 179–183. <https://www.doi.org/10.1159/000356086> (In English)
- Saritas, T., Floege, J. (2020) Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Herz*, vol. 45, no. 2, pp. 122–128. <https://www.doi.org/10.1007/s00059-019-04884-0> (In English)
- Sprick, J. D., Nocera, J. R., Hajjar, I. et al. (2020) Cerebral blood flow regulation in end-stage kidney disease. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, vol. 319, no. 5, pp. F782–F791. <https://www.doi.org/10.1152/ajprenal.00438.2020> (In English)
- Thambyrajah, J., Landray, M. J., McGlynn, F. J. et al. (2000) Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart*, vol. 83, no. 2, pp. 205–209. <https://www.doi.org/10.1136/heart.83.2.205> (In English)
- Vettoretti, S., Ochodnický, P., Buikema, H. et al. (2006) Altered myogenic constriction and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in small mesenteric arteries of hypertensive subtotaly nephrectomized rats. *Journal of Hypertension*, vol. 24, no. 11, pp. 2215–2223. <https://www.doi.org/10.1097/01.hjh.0000249699.04113.36> (In English)



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 612.085.2+612.822.3+57.086.83+57.086.164 <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

## Возможная физиологическая функция эндогенного убаина

В. А. Пеннийнен<sup>✉1</sup>, В. Б. Плахова<sup>1</sup>, С. А. Подзорова<sup>1</sup>, С. Г. Терехин<sup>1</sup>, Б. В. Крылов<sup>1</sup>

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

### Сведения об авторах

Валентина Альбертовна  
Пеннийнен,  
SPIN-код: 6610-3718,  
Scopus AuthorID: 6603501257,  
ORCID: 0000-0003-3936-8681,  
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Вера Борисовна Плахова,  
SPIN-код: 4184-7669,  
Scopus AuthorID: 6603237137,  
ORCID: 0000-0002-1983-852X,  
e-mail: verapl@mail.ru

Светлана Александровна  
Подзорова,  
SPIN-код: 3974-3430,  
Scopus AuthorID: 6602224180,  
ORCID: 0000-0003-0003-9338,  
e-mail: sveap@yandex.ru

Станислав Георгиевич Терехин,  
SPIN-код: 6993-1862,  
Scopus AuthorID: 57191375298,  
ORCID: 0000-0002-8180-9391,  
e-mail: stasok32@yandex.ru

Борис Владимирович Крылов,  
SPIN-код: 3946-6408,  
Scopus AuthorID: 7004655760,  
ORCID: 0000-0001-5258-1597,  
e-mail: krylov@infran.ru

### Для цитирования:

Пеннийнен, В. А., Плахова, В. Б.,  
Подзорова, С. А., Терехин, С. Г.,  
Крылов, Б. В.

(2021) Возможная  
физиологическая функция  
эндогенного убаина.

*Интегративная физиология*, т. 2,  
№ 1, с. 96–101.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

**Получена** 21 января 2021; прошла  
рецензирование 31 января 2021;  
принята 1 февраля 2021.

**Финансирование:** Данное  
исследование выполнено в рамках  
реализации Программы НЦМУ  
и при финансовой поддержке  
Минобрнауки РФ (соглашение  
№ 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Наши результаты свидетельствуют о том, что эндогенный убаин запускает два разных сигнальных процесса. Первый, быстрый процесс, приводит к модуляции активационного воротного устройства каналов  $Na_v1.8$ , что снижает их функциональную активность. Вторым, медленным процессом, ведет к снижению плотности каналов  $Na_v1.8$  в мембране первичного сенсорного нейрона. Мы предполагаем, что в этом случае эндогенный убаин запускает внутриклеточный каскад, ведущий к снижению экспрессии гена *SCN10A*, продуцирующего каналы  $Na_v1.8$ . Можно заключить, что эндогенный убаин выполняет важнейшую функцию модуляции функциональной активности каналов  $Na_v1.8$  при взаимодействии с первичным сенсорным нейроном. В соответствии с нашими данными, эндогенный убаин может являться эндогенным анальгетиком. Практическим результатом проведенного исследования стало предположение, согласно которому доставка убаина в качестве лекарственной субстанции к мембране ноцицептивного нейрона в наномолярной концентрации должна приводить к безопасному и эффективному антиноцицептивному действию этого агента на уровне организма.

**Ключевые слова:** ноцицептивные нейроны, каналы  $Na_v1.8$ , метод локальной фиксации потенциала, метод органотипической культуры ткани, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, эндогенный убаин.

# Possible physiological function of endogenous ouabain

V. A. Penniyaynen<sup>✉1</sup>, V. B. Plakhova<sup>1</sup>, S. A. Podzorova<sup>1</sup>, S. G. Terekhin<sup>1</sup>, B. V. Krylov<sup>1</sup>

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

## Authors

Valentina A. Penniyaynen,  
SPIN: 6610-3718,  
Scopus AuthorID: 6603501257,  
ORCID: 0000-0003-3936-8681,  
e-mail: [pvalentina2@yandex.ru](mailto:pvalentina2@yandex.ru)

Vera B. Plakhova,  
SPIN: 4184-7669,  
Scopus AuthorID: 6603237137,  
ORCID: 0000-0002-1983-852X,  
e-mail: [verapl@mail.ru](mailto:verapl@mail.ru)

Svetlana A. Podzorova,  
SPIN: 3974-3430,  
Scopus AuthorID: 6602224180,  
ORCID: 0000-0003-0003-9338,  
e-mail: [sveap@yandex.ru](mailto:sveap@yandex.ru)

Stanislav G. Terekhin,  
SPIN: 6993-1862,  
Scopus AuthorID: 57191375298,  
ORCID: 0000-0002-8180-9391,  
e-mail: [stasok32@yandex.ru](mailto:stasok32@yandex.ru)

Boris V. Krylov,  
SPIN: 3946-6408,  
Scopus AuthorID: 7004655760,  
ORCID: 0000-0001-5258-1597,  
e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

## For citation:

Penniyaynen, V. A., Plakhova, V. B.,  
Podzorova, S. A., Terekhin, S. G.,  
Krylov, B. V.

(2021) Possible physiological  
function of endogenous ouabain.

*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 96–101.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

**Received** 21 January 2021;

reviewed 31 January 2021;

accepted 1 February 2021.

**Finding:** This study is part of the  
World-Class Research Center  
Programme. It was supported  
by the Ministry of Science and  
Higher Education of the Russian  
Federation (agreement no. 075-15-  
2020-921 of 13.11.2020).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Our results suggest that endogenous ouabain triggers two different signaling processes. The first, fast process, modulates the activation gating device of the Na<sub>v</sub>1.8 channels, thereby reducing their functional activity. The second, slow process, decreases the density of Na<sub>v</sub>1.8 channels in the membrane of the primary sensory neuron. We assume that in this case, endogenous ouabain triggers a downstream cascade leading to a decrease in the expression of the SCN10A gene that produces Na<sub>v</sub>1.8 channels. It can be concluded that endogenous ouabain, when it interacts with the primary sensory neuron, performs important function of modulating functional activity of Na<sub>v</sub>1.8 channels. The practical result of the study was the assumption that the delivery of ouabain as a drug substance to the membrane of a nociceptive neuron in nanomolar concentration should lead to a safe and effective antinociceptive action of this agent at the organismal level.

**Keywords:** nociceptive neurons, Na<sub>v</sub>1.8 channels, patch-clamp method, organotypic nerve culture method, confocal laser scanning microscopy, endogenous ouabain.

## Введение

Na,K-АТФаза — это электрогенная транс-мембранная АТФаза, находящаяся во внешней плазматической мембране клеток (Skou 1957). Этот фермент создает разность потенциалов между наружной и внутренней сторонами

мембраны благодаря поддержанию градиентов концентраций ионов натрия и калия между вне- и внутриклеточной средой клетки. В настоящее время появилось большое количество данных о том, что этот белок также выполняет еще и трансдукторную функцию (Askari 2019; Cui, Xie 2017; Kometiani et al. 1998;

Krylov et al. 1999; Lichtstein et al. 2018; Xie, Askari 2002). Специфические модуляторы Na,K-АТФазы, кардиотонические стероиды, известные как эндогенные дигиталисоподобные вещества, влияют на ферментативную активность Na,K-АТФазы, что проявляется в регуляции пролиферации, дифференцировки, в стимулировании аутофагии, апоптоза. Эти эффекты различаются в зависимости от типа клеток, а также от концентрации кардиотонических стероидов.

Эндогенный убаин (ЭУ) обнаружен в кровотоке и в гипоталамусе теплокровных животных в наномолярной концентрации (Hamlyn et al. 1991; Kawamura et al. 1999). Молекулярный механизм его влияния в таких низких концентрациях на ноцицептивную систему остается малоизученным. Выяснению возможной физиологической роли ЭУ посвящена настоящая работа. Нами использованы особо чувствительные методы для прижизненных исследований молекулярных механизмов модуляции ответов первичного сенсорного нейрона, где Na,K-АТФаза, выступая в качестве трансдуктора сигнала, способна модулировать потенциалочувствительность каналов  $Na_v1.8$ , ответственных за кодирование ноцицептивных сигналов (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019).

## Методы исследования

### Метод локальной фиксации потенциала

Эксперименты выполнены с использованием модифицированного метода краткосрочного культивирования диссоциированных изолированных сенсорных нейронов дорзальных ганглиев крыс линии *Wistar*, который был подробно описан ранее (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) был использован в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell recording») (Hamill et al. 1981). В работе использовались стандартные растворы (Pennyunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Реактивы приобретались в фирме Sigma (США). Количественное измерение эффективного заряда ( $Z_{eff}$ ), переносимого активационной воротной системой при открывании каналов  $Na_v1.8$ , осуществляли путем построения логарифмической потенциалочувствительности  $L(E)$  (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019), используя метод Алмерса (Almers 1978).

### Органотипическая культура нервной ткани

Применяемый нами метод подробно описан в наших предыдущих работах (Lopatina et al. 2012; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Объектами исследования были эксплантаты спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов. Экспериментальные эксплантаты культивировали в присутствии убаина (Sigma, США) в концентрации 0,1 нмоль/л в течение трех суток. Эксплантаты спинальных ганглиев исследовали с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Для этого проводили иммуоцитохимическое окрашивание эксплантатов.

### Имуоцитохимический метод

Для визуализации эксплантатов и дальнейшей иммуофлуоресцентного анализа проводили иммуоцитохимическое окрашивание органотипической культуры спинальных ганглиев к маркеру каналов  $Na_v1.8$  и нейрофиламентам. Использовали следующие первичные и вторичные антитела: anti-sodium channel  $Na_v1.8$ , anti-neurofilament 200, anti-rabbit-TRITC и anti-rabbit-FITC. Антитела, используемые в работе, приобретались в фирме Sigma (США). Эксплантаты фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (рН 7.4) в фосфатно-солевом буфере (PBS; Sigma, США) в течение 3 минут, затем промывали PBS. После проводили пермеабиллизацию в 0,3%-ном растворе Triton X-100 в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре с дальнейшей отмывкой образцов, затем клетки инкубировали в 10%-ном растворе фетальной сыворотки коровы в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа. Эксплантаты инкубировали с первичным антителом в течение ночи при 4 °С. После этого промывали клетки раствором PBS 3 раза. Инкубировали культуру клеток со вторичными антителами 1 час в темноте при 37 °С. Для визуализации ядер эксплантаты окрашивали DAPI (Sigma, США). Препараты хранили при 4 °С, затем их использовали для дальнейших исследований.

### Имуофлуоресцентный метод

Для оценки результатов иммуоцитохимического окрашивания и для количественного анализа действия ЭУ применяли систему компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящую из лазерного сканирующего микроскопа «LSM 710» (Carl Zeiss, Германия), интегрированного с инвертированным микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), персонального компьютера и про-

граммного обеспечения ZEN\_2012 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции количественно регистрировали в относительных единицах (о. е.). Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия принимали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Данные, полученные методом локальной фиксации потенциала, показали, что после приложения 1 нмоль/л убаина в наружный раствор величина эффективного заряда снижалась с контрольного значения заряда  $Z_{\text{eff}} = 6,7 \pm 0,4$  ( $n = 15$ ) до  $4,8 \pm 0,5$  ( $n = 15$ ). Обнаруженный эффект не устранялся предварительным действием неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налтрексона (50 мкмоль/л). Этот факт свидетельствует о непосредственном взаимодействии убаина с соответствующим сайтом Na,K-АТФазы, а не с опиоидоподобными рецепторами, связь которых с медленными натриевыми каналами была обнаружена ранее (Krylov et al. 1999; 2017). Специфичность обнаруженного механизма проявляется еще и в том, что другой сердечный гликозид, дигоксин, не влияет на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов. Приложение 100 нмоль/л дигоксина с наружной стороны мембраны не изменяло величину эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов. Отметим, что особенности химической структуры молекулы дигоксина не позволяют ему, в отличие от убаина, способного хелатировать свободные ионы кальция с участием гидроксильных групп стероидной части молекулы, активировать трансдукторный сайт связывания молекулы Na,K-АТФазы мембраны исследуемого ноцицептивного нейрона.

Детальное исследование эффектов низких концентраций убаина показало, что влияние этого агента на эффективный заряд и, как следствие, на трансдукторную функцию Na,K-АТФазы носит монотонный дозозависимый характер в диапазоне от 1 пмоль/л до 1000 нмоль/л. Даль-

нейшее повышение концентрации убаина приводило к нарушению монотонности концентрационной зависимости. Этот эффект может трактоваться как результат воздействия чрезвычайно низких (эндогенных) концентраций убаина именно на трансдукторную, а не на насосную функцию Na,K-АТФазы. Эта зависимость может быть аппроксимирована с помощью уравнения Хилла ( $K_D = 3$  нмоль/л). Именно она отражает процесс лиганд-рецепторного связывания «эндогенного» убаина, приложенного в наномолярных концентрациях, с трансдукторным сайтом Na,K-АТФазы. Очевидно, что узнавание атакующей молекулы «трансдукторным» сайтом может происходить в соответствии с наличием дополнительного фактора. Этим фактором, согласно нашему предположению, служит способность убаина хелатировать свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , находящиеся в примембранном пространстве с наружной стороны мембраны ноцицептивного нейрона. Только хелатный комплекс убаин- $\text{Ca}^{2+}$  способен активировать трансдукторный сайт Na,K-АТФазы, свободный убаин этим сайтом не узнается. Вероятно, важнейшим фактором лиганд-рецепторного связывания является образование ион-ионных связей между хелатным комплексом убаин- $\text{Ca}^{2+}$  и трансдукторным сайтом. Подчеркнем, что, согласно нашему предположению, свободная молекула убаина (без кальция) неспособна активировать этот сайт.

Интенсивность флуоресценции была изменена методом конфокальной лазерной микроскопии на эксплантатах спинальных ганглиев, как в контрольных опытах, так и после воздействия ЭУ в концентрации 0,1 нмоль/л. Применение исследуемого агента в субнаномолярной концентрации приводило к ингибированию роста нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев, что было визуализировано с использованием антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  и нейрофиламентам и оценено путем измерения флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  (рис.). Интенсивность флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  в мембране сенсорных нейронов спинальных ганглиев измеряли в относительных единицах (о. е.). После воздействия ЭУ она составляла  $4,0 \pm 0,6$  о. е. ( $n = 16$ ), а в контрольных опытах —  $5,2 \pm 0,4$  о. е. ( $n = 17$ ). Результаты иммунофлуоресцентного анализа свидетельствуют о статистически достоверном снижении уровня флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  после воздействия ЭУ.

Наши результаты свидетельствуют о том, что ЭУ запускает два разных сигнальных процесса. Первый, быстрый процесс, приводит к модуляции

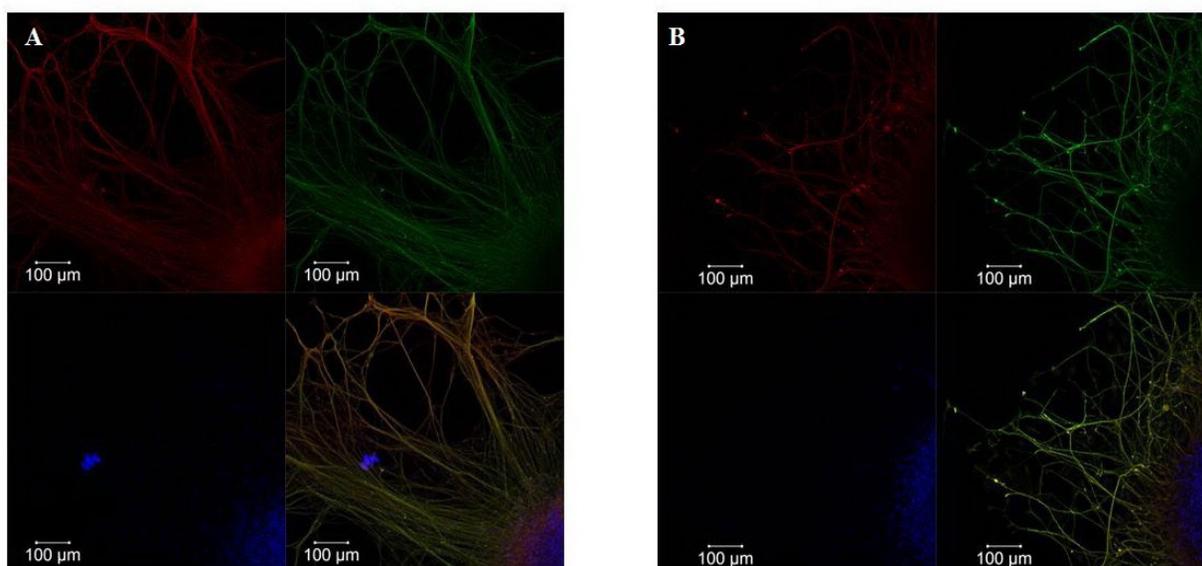


Рис. Влияние эндогенного убаина (ЭУ) на плотность каналов  $\text{Na}_v1.8$  в органотипической культуре нервной ткани. Фрагмент зоны роста эксплантата спинальных ганглиев. А — контроль; В — после воздействия ЭУ. Окраска антителами к нейрофиламентам (красный), каналам  $\text{Na}_v1.8$  (зеленый) и ядра DAPI (синий),  $\times 10$

Fig. Effect of endogenous ouabain (EO) on the density of  $\text{Na}_v1.8$  channels in organotypic nerve tissue culture. Fragment of the explant growth zone of the dorsal root ganglia (third day of culturing). A — control; B — EO-treated explant. Immunostaining with antibodies to neurofilaments (red),  $\text{Na}_v1.8$  channels (green) and DAPI nuclei (blue),  $\times 10$

активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$ , что снижает их функциональную активность. Второй, медленный процесс, ведет к снижению плотности каналов  $\text{Na}_v1.8$  в мембране первичного сенсорного нейрона. Мы предполагаем, что в этом случае ЭУ запускает внутриклеточный каскад, ведущий к снижению экспрессии гена  $\text{SCN10A}$ , продуцирующего каналы  $\text{Na}_v1.8$ . Можно заключить, что эндогенный убаин выполняет важнейшую функцию модуляции функциональной активности каналов  $\text{Na}_v1.8$  при взаимодействии

с первичным сенсорным нейроном. В соответствии с нашими данными, ЭУ может являться эндогенным анальгетиком. Практическим результатом проведенного исследования стало предположение, согласно которому доставка убаина в качестве лекарственной субстанции к мембране ноцицептивного нейрона в наномолярной концентрации должна приводить к безопасному и эффективному антиноцицептивному действию этого агента на уровне организма.

## References

- Almers, W. (1978) Gating currents and charge movements in excitable membranes. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 82. Berlin: Springer Publ., pp. 96–190. <https://www.doi.org/10.1007/BFb0030498> (In English)
- Askari, A. (2019) The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacology Research & Perspectives*, vol. 7, no. 4, article e00505. <https://www.doi.org/10.1002/prp2.505> (In English)
- Cui, X., Xie, Z. (2017) Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules*, vol. 22, no. 6, article 990. <https://www.doi.org/10.3390/molecules22060990> (In English)
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E. et al. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv — European Journal of Physiology*, vol. 391, no. 2, pp. 85–100. <https://www.doi.org/10.1007/BF00656997> (In English)
- Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S. et al. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 14, pp. 6259–6263. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.88.14.6259> (In English)
- Kawamura, A., Guo, J., Itagaki, Y. et al. (1999) On the structure of endogenous ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 12, pp. 6654–6659. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.96.12.6654> (In English)

- Kometiani, P., Li, J., Gnudi, L. et al. (1998) Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 24, pp. 15249–15256. <https://www.doi.org/10.1074/jbc.273.24.15249> (In English)
- Krylov, B. V., Derbenev, A. V., Podzorova, S. A. et al. (1999) Morfin umen'shaet chuvstvitel'nost' k potentsialu medlennykh natrievykh kanalov [Morphine decreases the voltage sensitivity of the slow sodium channels]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal imeni I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 85, no. 2, pp. 225–236. (In Russian)
- Krylov, B. V., Rogachevskii, I. V., Shelykh, T. N., Plakhova, V. B. (2017) *Frontiers in pain science. Vol. 1. New non-opioid analgesics: Understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and chemical studies*. Sharjah: Bentham Science Publ., 203 p. (In English)
- Lichtstein, D., Ilani, A., Rosen, H. et al. (2018) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase signaling and bipolar disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 8, article 2314. <https://www.doi.org/10.3390/ijms19082314> (In English)
- Lopatina, E. V., Yachnev, I. L., Penniyaynen, V. A. et al. (2012) Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>,K by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. *Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 33–39. <https://www.doi.org/10.2174/157340612799278531> (In English)
- Penniyaynen, V. A., Plakhova, V. B., Rogachevskii, I. V. et al. (2019) Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology*, vol. 26, no. 3–4, pp. 245–252. <https://www.doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.06.003> (In English)
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Yachnev, I. V. et al. (2019) Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 97, no. 5, pp. 400–406. <https://www.doi.org/10.1139/cjpp-2018-0602> (In English)
- Skou, J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 23, pp. 394–401. [https://www.doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90343-8](https://www.doi.org/10.1016/0006-3002(57)90343-8) (In English)
- Xie, Z., Askari, A. (2002) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 10, pp. 2434–2439. <https://www.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x> (In English)



УДК 612.884+612.65+615.214

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-102-110>

## Модуляция воспалительного болевого и гормонального ответов стрессом в препубертатный период развития у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс

И. П. Буткевич<sup>✉1</sup>, В. А. Михайленко<sup>1</sup>, Е. А. Вершинина<sup>1</sup>

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

### Сведения об авторах

Ирина Павловна Буткевич,  
SPIN-код: 9248-2288,  
Scopus AuthorID: 7004037979,  
ORCID: 0000-0002-1201-9185,  
e-mail: [irinabutkevich@yandex.ru](mailto:irinabutkevich@yandex.ru)

Виктор Анатольевич Михайленко,  
SPIN-код: 9111-0369,  
Scopus AuthorID: 57215986246,  
ORCID: 0000-0003-4221-7702,  
e-mail: [viktormikhailenko@yandex.ru](mailto:viktormikhailenko@yandex.ru)

Елена Андреевна Вершинина,  
SPIN-код: 1082-8759,  
Scopus AuthorID: 6701609543,  
ORCID: 0000-0002-8873-4409,  
e-mail: [ver\\_elen@mail.ru](mailto:ver_elen@mail.ru)

### Для цитирования:

Буткевич, И. П., Михайленко,  
В. А., Вершинина, Е. А.

(2021) Модуляция  
воспалительного болевого  
и гормонального ответов  
стрессом в препубертатный  
период развития у пренатально  
стрессированных взрослых  
самцов и самок крыс.

*Интегративная физиология*, т. 2,  
№ 1, с. 102–110.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-102-110>

**Получена** 21 января 2021; прошла  
рецензирование 3 февраля 2021;  
принята 6 февраля 2021.

**Финансирование:** Исследование  
выполнено при финансовой  
поддержке РФФИ в рамках  
проекта № 17-04-00214а.

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Стресс в критические периоды развития (неонатальный, подростковый периоды) может оказывать абнормальное влияние на развитие гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГТАКС), морфогенетических и нейрохимических процессов головного мозга, увеличивая риск психопатологий. Наряду с этим увеличивается число работ, указывающих на возможное адаптивное влияние стресса. Практическая значимость этой проблемы вызывает большой интерес к изучению механизмов, с помощью которых стресс в раннем возрасте повышает стрессоустойчивость организма, но многие вопросы остаются нерешенными. Имеющиеся доклинические данные, полученные при использовании различных типов стресса (материнская депривация, лимитированное гнездо, социальный и пренатальный стресс), дают возможность выдвинуть предположение о важном вкладе изменений во время развития серотонинергической системы в индивидуальные различия восприимчивости стрессовых событий в дальнейшем онтогенезе. Баланс между ГТАКС и серотонинергической системой в процессе развития является одним из главных условий нормального функционирования стрессовой системы. Впервые примененный нами болевой стресс при сочетании с пренатальным стрессом позволил обнаружить долговременное повышение резистентности болевой системы у крысы. Ранее мы показали усиление воспалительного болевого ответа, тревожно-депрессивного поведения у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс. Цель настоящей работы — исследовать влияние стресса в препубертатный период развития на пролонгированный воспалительный болевой ответ, тревожно-депрессивное поведение и стрессорную реактивность ГТАКС у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс. Кроме того, нас интересовал вопрос, изменит ли препубертатный стресс влияние агониста серотонинергических рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> бупирона и ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, которые вводили депрессивным крысам во время беременности, на поведенческие и гормональную реакции у взрослого пренатально стрессированного потомства.

**Ключевые слова:** стресс, воспалительная боль, депрессивноподобное поведение, кортикостерон, онтогенез, крыса.

# Modulation of inflammatory pain and hormonal responses by stress in the prepubertal period of development in prenatally stressed adult male and female rats

I. P. Butkevich<sup>✉1</sup>, V. A. Mikhailenko<sup>1</sup>, E. A. Vershinina<sup>1</sup>

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

## Authors

Irina P. Butkevich,  
SPIN: 9248-2288,  
Scopus AuthorID: 7004037979,  
ORCID: 0000-0002-1201-9185,  
e-mail: irinabutkevich@yandex.ru

Viktor A. Mikhailenko,  
SPIN: 9111-0369,  
Scopus AuthorID: 57215986246,  
ORCID: 0000-0003-4221-7702,  
e-mail: viktormikhailenko@yandex.ru

Elena A. Vershinina,  
SPIN: 1082-8759,  
Scopus AuthorID: 6701609543,  
ORCID: 0000-0002-8873-4409,  
e-mail: ver\_elen@mail.ru

## For citation:

Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A.,  
Vershinina, E. A.  
(2021) Modulation of inflammatory  
pain and hormonal responses  
by stress in the prepubertal period  
of development in prenatally  
stressed adult male and female rats.  
*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 102–110.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-102-110>

**Received** 21 January 2021;  
reviewed 3 February 2021;  
accepted 6 February 2021.

**Funding:** This study was supported  
by the Russian Foundation for Basic  
Research (project no. 17-04-  
00214a).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Stress during critical periods of development can have an abnormal effect on the development of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system (HPA axis), morphogenetic and neurochemical processes of the brain, increasing the risk of psychopathologies. Along with this, there is an increasing number of works indicating the possible adaptive influence of stress. This issue is of practical value which explains the popularity of studies in the mechanisms by which stress at an early age increases the body's resistance to stress. The available data suggest an important contribution of the serotonergic system to individual differences in the susceptibility to stress events further in life. The balance between the HPA axis and serotonergic system during development is one of the main conditions for the normal functioning of the stress system. We were the first to use pain stress to study the mechanisms of stress neutralization by another pain stress. Previously, we showed an increase in inflammatory pain response in prenatally stressed adult male and female rats. The aim of this work was to investigate the effect of stress during the prepubertal period of development on inflammatory pain, anxiety / depression disorders, and stress reactivity of the HPA axis in prenatally stressed adult male and female rats. In addition, we studied the question of whether prepubertal stress may change the effect of the 5-HT1A receptor agonist buspirone and the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine administered to depressed rats during pregnancy on behavioral and hormonal responses in the adult prenatally stressed offspring.

**Keywords:** stress, inflammatory pain, depressive-like behavior, corticosterone, ontogenesis, the rat.

## Введение

Стресс во время критических периодов развития увеличивает риск формирования психических отклонений, что подтверждается данными, полученными на человеке и животных (Monk et al. 2019). Гипоталамо-гипофизарно-адренортикарная система (ГТАКС) в норме обеспечивает адекватный стрессорный ответ, мобилизуя запас энергии, подавляя иммунный ответ и усиливая эффекты, опосредуемые сим-

патической нервной системой (de Kloet et al. 2005). Периферический гормон ГТАКС кортизол у человека и кортикостерон у животных проникает через гематоэнцефалический барьер, влияет на развитие головного мозга и этим на поведение. При сильном стрессе в пренатальном периоде гормональная защитная система плаценты не справляется с этой функцией, что приводит к поступлению избыточного количества глюкокортикоидов в головной мозг плода и, как следствие, к нарушению в нем интенсив-

но происходящих в этот период развития морфогенетических процессов. Последствия этих нарушений имеют долговременный характер, проявляющийся во многих нейробиологических системах, включая ГТАКС, разные типы поведения и ноцицептивную систему (Кнаерен et al. 2014). Стресс в препубертатный период развития, который характеризуется реорганизацией в нейрогормональных и медиаторных системах и высокой пластичностью, обуславливающей повышенную чувствительность к раздражителям, является, как и пренатальный стресс, фактором риска для нарушения поведения и функциональной активности нейроэндокринных систем (McCormick et al. 2010).

В последнее время увеличивается число работ, указывающих на возможное адаптивное влияние стресса (van Bodegom et al. 2017). Практическая значимость этой проблемы вызывает большой интерес к изучению механизмов, с помощью которых негативный стресс в раннем возрасте, модифицируя процессы развития в центральной нервной системе, может создать условия для повышения стрессоустойчивости организма к новому подобному стрессу в дальнейшем постнатальном онтогенезе (Daskalakis et al. 2013). Проведенные исследования на животных, в которых в качестве стресса применяли материнскую депривацию, лимитированное гнездо, хронический умеренный стресс, социальный или пренатальный стресс, а влияние стресса в раннем возрасте изучали преимущественно на стрессоустойчивость к эмоциональному и социальному типам стресса, позволили сделать предположение о важном вкладе изменений во время раннего развития серотонинергической системы в индивидуальные различия восприимчивости стрессовых событий во взрослом возрасте (Brummelte et al. 2017).

Впервые примененный нами болевой стресс в сочетании с пренатальным стрессом позволил обнаружить долговременное повышение резистентности болевой системы у крысы (Butkevich et al. 2016). Полученные нами данные позволили использовать болевой стресс для исследования механизмов феномена нейтрализации стресса другим стрессом (Mooney-Leber et al. 2020). Одним из главных условий нормального функционирования стрессовой системы является баланс в процессе развития между ГТАК и серотонинергической системами. Морфофункциональные связи между ГТАКС, серотонинергической и ноцицептивной системами определяют их тесное нейробиологическое взаимодействие. Ранее мы показали усиление пролонгированного воспалительного болевого

ответа, тревожно-депрессивного поведения у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс (Butkevich et al. 2019). Цель настоящей работы — исследовать влияние стресса в препубертатный период развития на пролонгированный воспалительный болевой ответ, тревожно-депрессивное поведение и стрессорную реактивность ГТАКС у пренатально стрессированных взрослых самцов и самок крыс. Кроме того, нас интересовал вопрос, изменит ли препубертатный стресс влияние агониста серотонинергических рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> бупирона и ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина, которые вводили их депрессивным матерям во время беременности, на поведенческие и гормональную реакции у взрослых пренатально стрессированных крыс. Вопрос является актуальным, во-первых, потому, что серотонинергический рецептор типа 1A (5-HT<sub>1A</sub> рецептор) является одной из важных мишеней пренатального стресса, и, во-вторых, как известно, не всем пациентам, страдающим депрессией, помогают антидепрессанты. Можно предположить, что одной из причин является стресс, пережитый в критические периоды развития, который снижает чувствительность к антидепрессантам.

## Материалы и методы

Эксперименты проведены на взрослом (90-дневном) потомстве Вистар крыс (самки  $n = 82$  и самцы  $n = 78$ ), рожденном от 50 самок, полученных, как и самцы ( $n = 30$ ), из биокolleкции (ЦКП Биокolleкция ИФ РАН) и доставленных в виварий лаборатории. В процессе экспериментов были соблюдены основные нормы и правила биомедицинской этики (European Community Council Directives 86/609/EEC). Все животные содержались в стандартных условиях (свободный доступ к воде и пище, 12-часовой день, свет с 8:00). Беременность определяли по мазку из влагалища, наличие сперматозоидов в мазке обозначали нулевым днем беременности. Внутривентрикулярную инъекцию препаратов проводили с девятого дня беременности до родов (флуоксетин 10 мг/кг, Sigma, бупирон 3,5 мг/кг, Sigma, физиологический раствор), контрольные крысы подвергались только взятию в руки. Используемые дозы препаратов были апробированы нами ранее (Butkevich et al. 2019). С 15-го дня беременности до родов самок, подвергнутых инъекциям (кроме контрольных самок), утром и вечером в течение 60 мин подвергали ограничительному стрессу, помещая крыс в цилиндры, резко ограничивающие

движение животных. Стресс в последнюю неделю беременности самки крысы вызывает у плода чрезмерное повышение уровня кортикоостерона, что приводит в дальнейшем к развитию депрессивноподобного поведения у потомства (Weinstock 2017), поэтому такой тип стресса используют в качестве модели пренатального стресса для потомства. Введение стрессированным беременным крысам антидепрессанта флуоксетина или анксиолитика буспирона нивелирует негативное влияние пренатального стресса (Butkevich et al. 2019).

На следующие сутки после рождения в каждом помете оставляли по 4 разнополых крысенка. В исследование были включены следующие группы крыс: пренатально не стрессированные (контрольные), пренатально стрессированные с введением физиологического раствора (на графиках обозначены как пренатальный стресс), пренатально стрессированные с введением флуоксетина, пренатально стрессированные с введением буспирона.

Крыс (самцы  $n = 40$ , самки  $n = 44$ ) в возрасте 25 дней (ранний препубертатный период развития) подвергали стрессу воспалительной боли (подкожная инъекция формалина 2,5%, 10  $\mu$ l в подошву левой задней конечности) и через три дня — стрессу принудительного плавания. При достижении 90-дневного возраста у этих животных исследовали воспалительный болевой ответ в формалиновом тесте (подкожная инъекция формалина 2,5%, 50  $\mu$ l в подошву левой задней конечности) и через трое суток — уровень выраженности депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания. Остальные крысы с пренатальными воздействиями и контрольные крысы (самцы  $n = 38$ , самки  $n = 38$ ) не были подвергнуты стрессу в препубертатном периоде. В 90-дневном возрасте у них исследовали воспалительный болевой ответ в формалиновом тесте и уровень выраженности депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания по той же схеме, что и у животных, подвергнутых препубертатному стрессу.

В стандартизированном формалиновом тесте, широко используемом для оценке антиноцицептивного действия препаратов, регистрировали в тоническую фазу двухфазного поведенческого ответа число сгибаний + встряхиваний (спинальный уровень) и продолжительность реакции вылизывания в сек (супраспинальный уровень) в ответ на подкожную инъекцию формалина в подошву левой задней конечности (Butkevich, Vershinina 2003). В тесте принудительного плавания каждую крысу помещали

на 5 мин в цилиндр с водой (диаметр 25 см, высота 60 см, температура воды 24–25 °C) и регистрировали время иммобильности, проведенное крысой в неподвижном состоянии (показатель депрессивноподобного поведения). Через 30 мин после завершения теста принудительного плавания у самок крыс декапитацией собирали кровь. Кровь центрифугировали, плазму крови хранили при температуре –20 °C. Содержание кортикоостерона в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы (Хема-Medica Co Cat No: K210R).

Полученные данные проверяли на нормальность выборок с использованием критерия Колмогорова — Смирнова с последующим текстом статистических методов. Анализ полученных данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программном комплексе SPSS Inc с последующими множественными апостериорными сравнениями по Бонферрони. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические решения принимали на 5%-ном уровне значимости.

## Результаты исследований и обсуждение

### *Воспалительный болевой ответ*

Пренатальный стресс увеличил болевой ответ спинального (рис. 1А) и супраспинального уровней ( $p < 0,01$ ) (рис. 1С, D) по сравнению с ответом у контрольных крыс; пренатально введенные флуоксетин и буспирон уменьшили болевой ответ по сравнению с соответствующими болевыми ответами у пренатально стрессированных крыс ( $p < 0,05$  во всех случаях) (рис. 1А, В, С, D).

Препубертатный стресс внес следующие изменения в болевой ответ на спинальном уровне у крыс с пренатальными воздействиями по сравнению с ответами у крыс без препубертатного стресса: увеличил болевой ответ у самцов по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ), у пренатально стрессированных самцов ( $p < 0,05$ ) (рис. 1А) и самок ( $p < 0,01$ ) (рис. 1В). Вследствие того, что препубертатный стресс увеличил болевой ответ у пренатально стрессированных крыс, флуоксетин и буспирон проявили антиноцицептивный эффект и уменьшили болевой ответ у пренатально стрессированных самцов ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  флуоксетин и буспирон соответственно) и самок ( $p < 0,01$  флуоксетин и буспирон). На супраспинальном уровне (рис. 1С, D) препубертатный стресс оказал

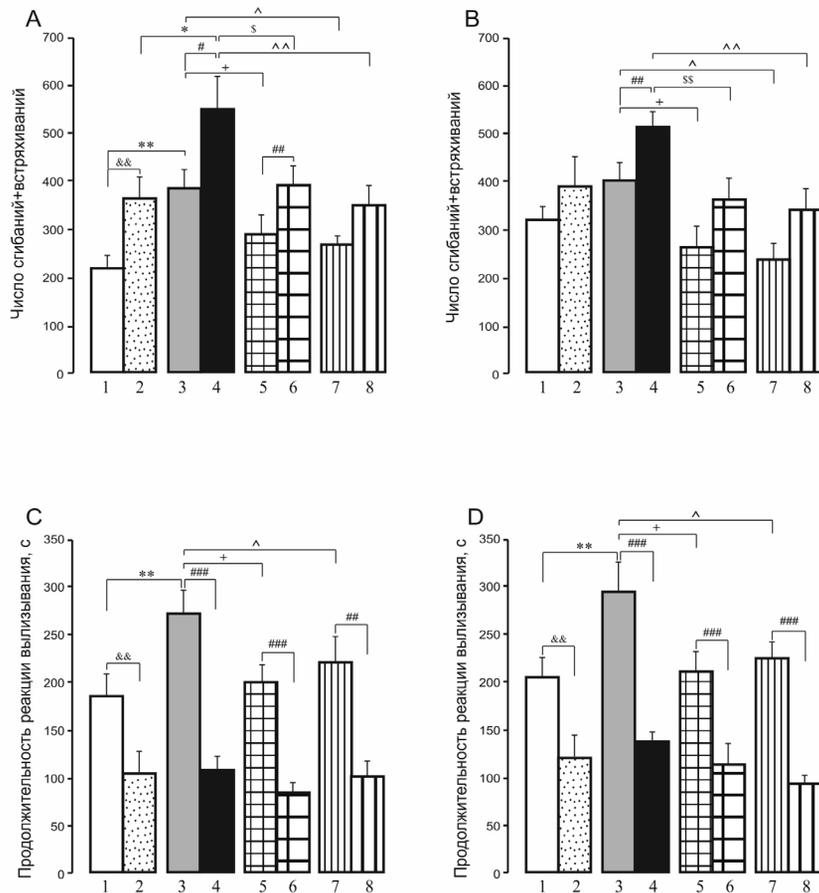


Рис. 1. Средние значения числа сгибаний + встряхиваний (А, В) и продолжительности вылизывания (С, D) у самцов (А, С) и самок (В, D) крыс, подвергнутых пренатальным воздействиям (пренатальный стресс, введение флуоксетина и буспирона) и сочетанию этих воздействий и стрессу в препубертатный период развития. 1 — контроль, 2 — препубертатный стресс, 3 — пренатальный стресс, 4 — пренатальный стресс + препубертатный стресс, 5 — флуоксетин + пренатальный стресс, 6 — флуоксетин + пренатальный стресс + препубертатный стресс, 7 — буспирон + пренатальный стресс, 8 — буспирон + пренатальный стресс + препубертатный стресс. \* $p < 0,05$  между сочетанием двух стрессов и препубертатным стрессом; \*\* $p < 0,01$  между пренатальным стрессом и контролем;  $^+p < 0,05$ , между «флуоксетин + пренатальный стресс» и пренатальным стрессом;  $^sp < 0,05$  и  $^{ss}p < 0,01$  между «флуоксетин + сочетание двух стрессов» и сочетанием двух стрессов;  $^ap < 0,05$  между «буспирон + пренатальный стресс» и пренатальным стрессом,  $^{aa}p < 0,01$  между «буспирон + сочетание двух стрессов» и сочетанием двух стрессов;  $^{\&\&}p < 0,01$  между препубертатным стрессом и контролем;  $^{\#}p < 0,05$ ,  $^{\#\#}p < 0,01$ ,  $^{\#\#\#}p < 0,001$  между пренатальным стрессом и сочетанием двух стрессов, а также между препаратом (флуоксетин или буспирон) + пренатальный стресс и препаратом (флуоксетин или буспирон) + сочетание стрессов

Fig. 1. Average values of the number of flexions + shaking (A, B) and the duration of licking (C, D) in male (A, C) and female (B, D) rats exposed to prenatal effects (prenatal stress, administration of fluoxetine or buspirone) and the combination of these influences and stress in the prepubertal period of development. 1 — control, 2 — prepubertal stress, 3 — prenatal stress, 4 — prenatal stress + prepubertal stress, 5 — fluoxetine + prenatal stress, 6 — fluoxetine + prenatal stress + prepubertal stress, 7 — buspirone + prenatal stress, 8 — buspirone + prenatal stress + prepubertal stress. \* $p < 0.05$  between a combination of two stresses and prepubertal stress; \*\* $p < 0.01$  between prenatal stress and control;  $^+p < 0.05$ , between fluoxetine + prenatal stress and prenatal stress;  $^sp < 0.05$  and  $^{ss}p < 0.01$  between fluoxetine + combination of two stresses and combination of two stresses;  $^ap < 0.05$  between buspirone + prenatal stress and prenatal stress,  $^{aa}p < 0.01$  between buspirone + combination of two stresses and a combination of two stresses;  $^{\&\&}p < 0.01$  between prepubertal stress and control;  $^{\#}p < 0.05$ ,  $^{\#\#}p < 0.01$ ,  $^{\#\#\#}p < 0.001$  between prenatal stress and combination of two stresses, and between drug (fluoxetine or buspirone) + prenatal stress and drug (fluoxetine or buspirone) + stress combination

противоположное влияние на воспалительный болевой ответ по сравнению с влиянием на ответ спинального уровня. Так, у крыс обоего пола было обнаружено уменьшение продолжительности вылизывания у контрольных ( $p < 0,01$ ), у пренатально стрессированных крыс более чем на 50% ( $p < 0,001$ , в обоих случаях) и у крыс с препаратами ( $p < 0,001$  с флуоксетином у самцов и самок, с буспироном —  $p < 0,01$  у самцов и  $p < 0,001$  у самок).

### *Депрессивноподобное поведение*

Пренатальный стресс увеличил время иммобильности у крыс обоего пола (рис. 2А, В) по сравнению с этим показателем у контрольных крыс; пренатально введенные флуоксетин и буспирон уменьшили этот показатель у самцов ( $p < 0,001$  флуоксетин и буспирон) и самок ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  флуоксетин и буспирон соответственно). Половые различия обнаружены у контрольных крыс ( $p < 0,01$ ) и у пренатально стрессированных ( $p < 0,001$ ) с меньшим показателем у самок в обоих случаях.

Препубертатный стресс внес следующие изменения в депрессивноподобное поведение у крыс с пренатальными воздействиями по сравнению с показателем депрессивноподобного поведения у крыс без препубертатного стресса: увеличил время иммобильности у пренатально стрессированных самок ( $p < 0,001$ ), но не изменил у пренатально стрессированных самцов и самок с флуоксетином и буспироном. У крыс с препубертатным стрессом буспирон уменьшил время иммобильности у самцов и самок, флуоксетин — только у самцов ( $p < 0,01$  во всех случаях) (рис. 2А, В). Препубертатный стресс нивелировал половые различия, обнаруженные у пренатально стрессированных крыс (рис. 2А, В).

### *Кортикостерон*

Пренатальный стресс увеличил содержание кортикостерона в плазме крови в ответ на принудительное плавание у взрослых самок крыс по сравнению с содержанием гормона у контрольных крыс, пренатальное введение буспирона снизило реактивность ГГКС ( $p < 0,05$  в обоих случаях). Стресс в препубертатный период развития увеличил содержание кортикостерона в ответ на принудительное плавание по сравнению с содержанием гормона у контрольных крыс, у пренатально стрессированных по сравнению с пренатально стрессированными без препубертатного стресса, а также у пренатально стрессированных крыс с флуоксетином ( $p < 0,05$  во всех случаях) и буспироном ( $p < 0,01$ ) (рис. 3).

Сравнение настоящих и ранее нами полученных результатов в условиях сочетания пренатального стресса и стресса воспалительной боли в более ранний период развития (Butkevich et al. 2020a; 2020b) позволяет сделать заключение, что болевой стресс как в неонатальный, так и в препубертатный периоды развития вызывает у пренатально стрессированных крыс снижение проноцицептивного влияния пренатального стресса. В результате уменьшенного болевого ответа флуоксетин и буспирон не проявляют антиноцицептивный эффект. Вероятно, механизмы, лежащие в основе сложного взаимодействия между пренатальным и болевым стрессом в исследованные нами критические периоды развития, участвуют в усилении взаимосвязи серотонинергической, ноцицептивной систем и ГГКС, в результате которого происходит коррекция нейрональной дисрегуляции, приводящей к модуляции активности антидепрессантов в зависимости от уровня организации болевого ответа в ЦНС. Литературные данные о влиянии пренатального стресса и боли на серотонинергическую и иммунную системы, а также данные о противовоспалительных свойствах флуоксетина и буспирона предполагают участие взаимодействия иммунной и нервной систем в опосредовании антиноцицептивных эффектов препаратов (Sharifi et al. 2015).

Обнаруженная в наших работах дифференцированная чувствительность болевого ответа спинального и супраспинального уровней к болевому стрессу, действующему однонаправленно в разные критические периоды индивидуального развития, усиливает информативность формалинового теста для оценки влияний стрессовых событий на ноцицептивную систему. Исходя из существующего представления о взаимосвязи боли и депрессии, можно предполагать, что ослабление проноцицептивного эффекта пренатального стресса, вызванного препубертатным стрессом, в болевом ответе супраспинального уровня будет соответствовать ослаблению депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания. Однако оказалось, наоборот, препубертатный стресс не смягчил влияние пренатального стресса, а у самок даже усилил его, обнаружив сходство с влиянием препубертатного стресса на болевой ответ спинального уровня. Вероятно, зависимые от пола, стресса и гормонов изменения нейромимунной и глиальной активации могли повлиять на кортиколимбические структуры и их функции.



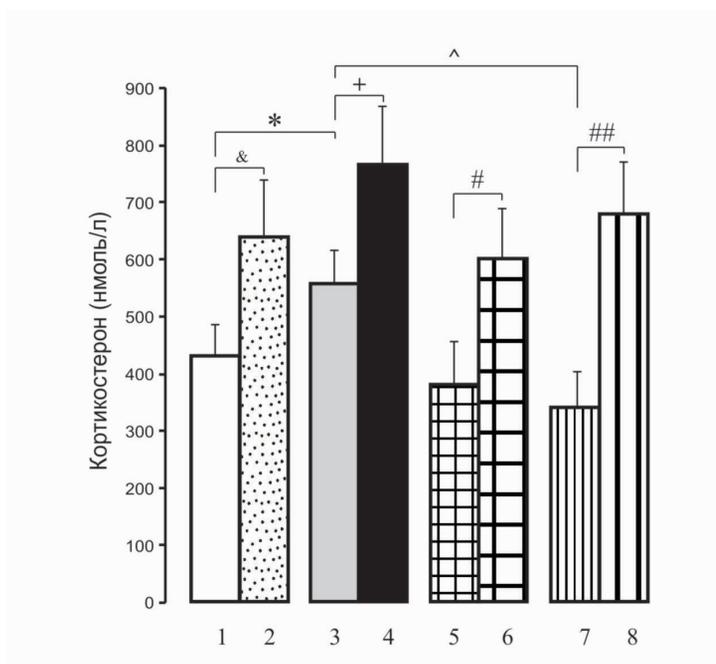


Рис. 3. Средние значения стрессорного ответа кортикостерона в плазме крови на принудительное плавание у самок крыс, подвергнутых пренатальным воздействиям (пренатальный стресс, введение флуоксетина и бупирона) и сочетанию этих воздействий и стрессу в препубертатный период развития.

1 — контроль, 2 — препубертатный стресс, 3 — пренатальный стресс, 4 — пренатальный стресс + препубертатный стресс, 5 — флуоксетин + пренатальный стресс, 6 — флуоксетин + пренатальный стресс + препубертатный стресс, 7 — бупирон + пренатальный стресс, 8 — бупирон + пренатальный стресс + препубертатный стресс. \* $p < 0,05$  между пренатальным стрессом и контролем; \* $p < 0,05$  между пренатальным стрессом и сочетанием двух стрессов; & $p < 0,05$  между препубертатным стрессом и контролем; # $p < 0,05$  между «флуоксетин + сочетание стрессов» и «флуоксетин + пренатальный стресс»; ## $p < 0,01$  между «бупирон + сочетание стрессов» и «бупирон + пренатальный стресс»

Fig. 3. Average values of stress response of corticosterone in blood plasma in response to forced swimming in female rats subjected to prenatal effects (prenatal stress, administration of fluoxetine and buspirone) and the combination of these effects and stress in the prepubertal period of development. 1 — control, 2 — prepubertal stress, 3 — prenatal stress, 4 — prenatal stress + prepubertal stress, 5 — fluoxetine + prenatal stress, 6 — fluoxetine + prenatal stress + prepubertal stress, 7 — buspirone + prenatal stress, 8 — buspirone + prenatal stress + prepubertal stress. \* $p < 0.05$  between prenatal stress and control; \* $p < 0.05$  between prenatal stress and a combination of two stresses; & $p < 0.05$  between prepubertal stress and control; # $p < 0.05$  between fluoxetine + stress combination and fluoxetine + prenatal stress; ## $p < 0.01$  between buspirone + stress combination and buspirone + prenatal stress

Таким образом, препубертатный стресс формирует фенотип с повышенной стрессоустойчивостью к воспалительной боли у пренатально стрессированных взрослых крыс обоего пола. Достоверность различий в содержании кортикостерона в плазме крови в ответ на принудительное плавание, обнаруженная у крыс с пренатальными воздействиями, нивелируется у особей, подвергнутых сочетанию пренатальных воздействий и стресса в препубертатном периоде. Наблюдаемое «выравнивание» стрессорной реактивности ГАКС у последних спекулятивно можно сравнить с «выравниванием» у них бо-

левых ответов, организованных на супраспинальном уровне, тогда как повышение содержания кортикостерона в плазме крови — с увеличением болевых ответов спинального уровня.

### Благодарности

Мы благодарим Е. Н. Лаврову и Н. А. Уланову, старших лаборантов лаборатории, наших бессменных многолетних ассистентов за помощь в проведении экспериментов, а также д. б. н. Е. И. Тюлькову (лаб. регуляции функций нейронов мозга, зав. д. б. н. Е. А. Рыбникова) за проведение анализа по кортикостерону.

## References

- Brummelte, S., Mc Glanaghy, E., Bonnin, A., Oberlander, T. F. (2017) Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*, vol. 342, pp. 212–231. <https://www.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.037> (In English)
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A. (2020a) The effect of stress and antidepressants in the prenatal period on different types of adaptive behavior and cognitive abilities of prepubertal female rats. *Zhurnal evolyutsionnoj biokhimii i fiziologii — Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 56, no. 2, pp. 127–137. <https://www.doi.org/10.31857/S0044452920020035>
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A. (2020b) The influence of perinatal stress and antidepressants on different types of adaptive behavior and cognitive abilities of prepubertal female rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 56, no. 2, pp. 133–144. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093020020052> (In English)
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A., Aloisi, A. M. (2016) Effects of neonatal pain, stress and their interrelation on pain sensitivity in later life in male rats. *The Chinese Journal of Physiology*, vol. 59, no. 4, pp. 225–231. <https://www.doi.org/10.4077/CJP.2016.BAE412> (In English)
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A., Barr, G. A. (2019) Differences between the prenatal effects of fluoxetine or buspirone alone or in combination on pain and affective behaviors in prenatally stressed male and female rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 13, article 125. <https://www.doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00125> (In English)
- Butkevich, I. P., Vershinina, E. A. (2003) Maternal stress differently alters nociceptive behaviors in the formalin test in adult female and male rats. *Brain Research*, vol. 961, no. 1, pp. 159–165. PMID: 12535789. (In English)
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J. et al. (2013) The three-hit concept of vulnerability and resilience: Towards understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 9, pp. 1858–1873. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008> (In English)
- De Kloet, E. R., Joëls, M., Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 6, pp. 463–475. <https://www.doi.org/10.1038/nrn1683> (In English)
- Knaepen, L., Pawluski, J. L., Patijn, J. et al. (2014) Perinatal maternal stress and serotonin signaling: Effects on pain sensitivity in offspring. *Developmental Psychobiology*, vol. 56, no. 5, pp. 885–896. <https://www.doi.org/10.1002/dev.21184> (In English)
- McCormick, C. M., Mathews, I. Z., Thomas, C., Watters, P. (2010) Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain and Cognition*, vol. 72, no. 1, pp. 73–85. <https://www.doi.org/10.1016/j.bandc.2009.06.003> (In English)
- Monk, C., Lugo-Candelas, C., Trimpff, C. (2019) Prenatal developmental origins of future psychopathology: Mechanisms and pathways. *Annual Review of Clinical Psychology*, vol. 15, pp. 317–344. <https://www.doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050718-095539> (In English)
- Mooney-Leber, S. M., Brummelte, S. (2020) Neonatal pain and reduced maternal care alter adult behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity in a sex-specific manner. *Developmental Psychobiology*, vol. 62, no. 5, pp. 631–643. <https://www.doi.org/10.1002/dev.21941> (In English)
- Sharifi, H., Nayebe, A. M., Farajnia, S., Haddadi, R. (2015) Effect of chronic administration of buspirone and fluoxetine on inflammatory cytokines in 6-Hydroxydopamine-lesioned rats. *Drug Research*, vol. 65, no. 8, pp. 393–397. <https://www.doi.org/10.1055/s-0034-1374615> (In English)
- van Bodegom, M., Homberg, J. R., Henckens, M. J. A. G. (2017) Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 11, article 87. <https://www.doi.org/10.3389/fncel.2017.00087> (In English)
- Weinstock, M. (2017) Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of Stress*, vol. 6, pp. 3–13. <https://www.doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.004> (In English)