



ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ

Журнал публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи по различным проблемам эволюционной, сравнительной и экологической физиологии, биохимии и морфологии



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 2, 2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Адаптационная изменчивость форменных элементов крови в годовом цикле жизнедеятельности сусликов *Urocitellus undulatus*
П. О. Теплова, Н. П. Комелина, А. Е. Егоров, К. И. Лизоркина, Н. М. Захарова 163
- Характеристики вызванных потенциалов в разных моделях творческой деятельности
Н. В. Шемякина, Ж. В. Нагорнова 173
- Особенности гуморального иммунного ответа при использовании белка, иммобилизованного на поверхности нано- и микрочастиц на основе поли(молочной кислоты)
Р. Г. Сахабеев, Д. С. Поляков, Е. С. Сеницына, В. А. Коржиков-Влах, И. О. Багаева, Е. Г. Коржикова-Влах, Т. П. Сесь, В. С. Терешина, М. М. Шавловский 185
- Экспрессионный профиль изогенных клеток ранней мезодермы, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека
А. В. Селезнева, Е. В. Коробко, С. Л. Киселев, Ю. Г. Суздальцева 195
- Стимуляция спинного мозга децеребрированной крысы двойными импульсами
В. А. Ляховецкий, П. Ю. Шкорбатова, О. В. Горский, Н. В. Павлова, Е. Ю. Баженова, П. Е. Мусиенко, Н. С. Меркульева 208
-
-

Contents

Vol. 60, No. 2, 2024

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Adaptive Variability of Blood-Forming Elements in the Annual Life Cycle of Ground Squirrels *Uroditellus Undulatus*
P. O. Teplova, N. P. Komelina, A. Y. Yegorov, K. I. Lizorkina, and N. M. Zakharova 163
- Event Related Brain Potentials' Characteristics in the Different Models of Verbal Creative Thinking
N. V. Shemyakina, and Zh. V. Nagornova 173
- Features of the Humoral Immune Response when using Protein Immobilized on the Surface of Nano- and Microparticles Based on Poly(lactic Acid)
R. G. Sakhabeev, D. S. Polyakov, E. S. Sinitsyna, V. A. Korzhikov-Vlakh, I. O. Bagaeva, E. G. Korzhikova-Vlakh, T. P. Ses', V. S. Tereshina, and M. M. Shavlovsky 185
- Expression Profile of the Isogenic Early Mesodermal Cells Differentiated from Induced Pluripotent Human Stem Cells
A. V. Selezneva, E. V. Korobko, S. L. Kiselev, and Y. G. Suzdaltseva 195
- Stimulation of the Spinal Cord of Decerebrated Rat with Double Pulses
V. A. Lyakhovetskii, P. Yu. Shkorbatova, O. V. Gorsky, N. V. Pavlova, E. Yu. Bazhenova, P. E. Musienko, and N. S. Merkulyeva 208
-
-

АДАПТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ В ГОДОВОМ ЦИКЛЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ СУСЛИКОВ *UROCITELLUS UNDULATUS*

© 2024 г. П. О. Теплова¹ *, Н. П. Комелина¹, А. Е. Егоров²,
К. И. Лизоркина¹, Н. М. Захарова¹

¹ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

* e-mail: p.o.teplova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2023

После доработки 21.12.2023

Принята к публикации 25.12.2023

В работе исследованы изменения всех форменных элементов крови длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* ($n = 100$) в разные периоды их жизнедеятельности. Гематологический анализ проводили на ветеринарном автоматическом анализаторе: измерялись лейкоцитарные, тромбоцитарные и эритроцитарные показатели летом (нормотермия, июнь – июль), осенью (подготовительный период, октябрь), в зимний торпидный (гипотермия, декабрь – февраль) и зимний активный период (эутермия, кратковременные пробуждения между баутами гипотермии, декабрь – февраль). Показано, что общее количество тромбоцитов и лейкоцитов сусликов осенью по сравнению с летом увеличилось на ~40%. В торпидный период тромбо- и лейкоцитов в крови сменились экстремальной тромбоцитопенией (снижение на ~90%) и лейкопенией (~80%), затрагивающей все субпопуляции лейкоцитов. При кратковременных зимних пробуждениях показатели быстро достигали “летних” значений, за исключением несколько увеличенного среднего объема тромбоцитов. С приближением осени наблюдался незначительный эритроцитоз (~10%), что в совокупности с изменениями остальных параметров может свидетельствовать о незначительной осенней гипоксии. В период торпора и во время зимней эутермии эритроцитарные показатели практически не отличались от контрольных летних значений, однако при этом как в осенний период подготовки к сезону спячки, так и во время ее обнаружено наличие атипичных форм эритроцитов. Полученные результаты обсуждаются в контексте адаптации форменных элементов крови длиннохвостого суслика к экстремальным условиям зимней спячки и ценны для исследования адаптивных способностей гомойотермных животных и человека.

Ключевые слова: длиннохвостый суслик, гипотермия, гибернация, гематология, физиологическая адаптация, гипоксия, гемостаз.

DOI: 10.31857/S0044452924020012, **EDN:** XBAOSR

ВВЕДЕНИЕ

Гетеротермия является широко распространенной адаптивной стратегией энергосбережения у некоторых видов животных и характеризуется прерыванием нормальных биологических функций [1]. Уникальной особенностью гетеротермов является устойчивость к колебаниям температуры тела [2, 3], которые сопровождаются глубоким физиологическим ремоделированием при каждом сезонном переходе с целью приспособления организма к экстремальным условиям окружающей среды [4].

Длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus* являются облигатными гибернаторами – считается, что они впадают в спячку независимо от доступно-

сти пищи и воды, температуры окружающей среды и фотопериода, и что данный процесс регулируется эндогенными циркадными ритмами [5]. В торпоре эти грызуны способны в сотни раз замедлять частоту сердечных сокращений и дыхательных движений, а температура их тела может опускаться до околонулевых значений. [6]. Очевидно, что столь сильные изменения в организме сусликов в течение годового цикла жизнедеятельности проявляются во многих физиолого-биохимических характеристиках, включая состояние форменных элементов крови. Например, в торпидном состоянии при резком снижении метаболизма, сопутствующей брадикардии и значительном снижении скорости кровотока, животные

не подвергаются тканевой гипоксии, тромбозу и инфекциям [7]. Это связывают с константностью эритроцитарных показателей и резко выраженной лейко- и тромбоцитопенией, достигающей 90% для разных видов сусликов [8, 9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на длиннохвостых сусликах *Urocitellus undulatus* (с 2019 по 2023 г.). Использовали животных обоего пола ($n = 100$, 59 самцов и 41 самка) массой тела 633 ± 18 г следующих групп: “летняя активность” (нормотермия, сезонный контроль, температура в области сердца 38°C , июнь – июль, $n = 25$); “осенняя активность” (предгибернационный период, температура в области сердца $36\text{--}37^\circ\text{C}$, октябрь, $n = 25$); “торпор/оцепенение” (гипотермия, температура в области сердца $0.5\text{--}5^\circ\text{C}$, декабрь – февраль, $n = 25$); “зимняя активность” (эутермия, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, ИВА, взятие материала через 5–14 ч после пробуждения, температура в области сердца $35\text{--}37^\circ\text{C}$, декабрь – февраль, $n = 25$).

Сусликов отлавливали в конце августа в местах их природного обитания (долина реки Лена, Якутия) и доставляли в лабораторию механизмов природного и искусственного гипобиоза ИБК РАН (Пушино, Московская область). До конца октября животных содержали в индивидуальных клетках в специально приспособленном неотапливаемом помещении с соблюдением естественного фотопериода, при достаточном количестве пищи (зерно, семена подсолнечника, овощи) и гнездового материала (*ad libitum*). Эксперименты на сусликах летнего периода проводили преимущественно в июне, осеннего – в первые две недели октября при ежедневном мониторинге животных [10]. В ноябре клетки с сусликами переносили в темное помещение с температурой $0\text{--}2^\circ\text{C}$ до окончания гибернационного периода (апрель).

Для мониторинга баутов в период спячки часть сусликов индивидуально размещали в находящиеся в холодильной камере деревянные ящики ($20 \times 20 \times 25$ см), в дно которых был установлен термистор (чувствительность, 0.2°C). Во время спячки температура подстилки достигала $0\text{--}4^\circ\text{C}$, тогда как при кратковременных периодах эутермии повышалась до 14°C . Для провокации пробуждения животных извлекали из ящика в середине баута (5–6 сутки гипотермии) и переносили в помещение с температурой воздуха $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Момент открывания глаз (через 3–5 ч) оценивали как окончательное пробуждение животного. Температуру сердечной мышцы у всех групп животных точечно измеряли с использованием датчика RET-3 (Physitemp, США, $\pm 0.1^\circ\text{C}$) сразу после вскрытия грудной клетки [11].

Методика забора крови и проведения гематологического анализа. Взятие цельной крови проводили с 10.00 до 11.00 ч незамедлительно после декапитации животных. Активных животных предварительно подвергали легкому наркозу (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг, внутримышечно). Биоматериал собирали в пластиковую капиллярную микропробирку (0.2 мл) с антикоагулянтом (K2-EDTA) для подсчета форменных элементов крови (Greiner Bio-One, Австрия). Подсчет осуществляли на ветеринарном гематологическом анализаторе BC-2800Vet (Mindray, Китай) с помощью реагентов ДиаВетТест (Диакон ДС, Россия), согласно протоколу изготовителя. Калибровку прибора осуществляли при помощи заводского набора BC-3D (Mindray, Китай). Определяли следующие гематологические показатели:

- лейкоцитарные: WBC (общее количество лейкоцитов), $\times 10^9/\text{л}$; LYMPH (лимфоциты), $\times 10^9/\text{л}$; MON (моноциты), $\times 10^9/\text{л}$; GRAN (гранулоциты, суммарно нейтрофилы, базофилы и эозинофилы), $\times 10^9/\text{л}$;
- тромбоцитарные: PLT (общее количество тромбоцитов), $\times 10^9/\text{л}$; MPV (средний объем тромбоцитов), фл; PDW (ширина распределения тромбоцитов по объему), %; PCT (тромбокрит), %;
- эритроцитарные: RBC (общее количество эритроцитов), $\times 10^{12}/\text{л}$; HGB (концентрация гемоглобина), г/л; HCT (гематокрит), %; MCV (средний объем эритроцита), фл; MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроците), пг; MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроците), г/л; RDW (ширина распределения эритроцитов), %.

Статистический анализ. Данные представлены в виде диаграммы размаха (box plot) при уровне значимости доверительного интервала $p < 0.05$. Статистический анализ выполняли в программах Statistica 10.0.1011 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 9.4.1.681 (GraphPad Software Inc., США). Анализ вида распределения данных проводили с использованием критериев нормальности Колмогорова–Смирнова и W-критерия Шапиро–Уилка. Различия между сезонами по гематологическим показателям анализировали с помощью одностороннего дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса, для последующего попарного сравнения разных групп использовали U-критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Для предварительной обработки данных и их визуализации применяли метод главных компонент (PCA) по всем 15 измеренным гематологическим показателям. Обработку проводили с использованием языка программирования R (версия 4.3.0) в среде RStudio (версия 2023.06.0+421).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод главных компонент [12] позволил нам провести предварительный анализ данных и визуализировать межгрупповые различия гематологиче-

ского профиля в течение годового цикла жизнедеятельности *U. undulatus*. Две главных компоненты (PC1 и PC2) описывают около 60% вариации исходных данных (рис. 1). Хорошо видно, что группы животных зимнего активного (ИВА) и летнего периодов существенно отличаются от группы торпидных сусликов (рис. 1a, c), меньше отличий наблюдается между летними и зимними активными животными (рис. 1a, b) против осенней группы сусликов, в то время как группа ИВА практически не отличима от летних животных (рис. 1d).

Также заметно, что за разделение на группы ответственна переменная PC1, тогда как переменная PC2, скорее, отвечает за внутригрупповую вариацию данных. Какие же исходные переменные (гематологические показатели крови) ответственны за подобное разделение на кластеры животных? Для ответа на это вопрос рассмотрим совместно рис. 1 и рис. 2. Видно, что кластер точек, соответ-

ствующий показателям крови – WBC, PLT, PCT, Gran, вносит наибольший вклад в переменную PC1, а кластер HGB, RBC, HCT в переменную PC2. Кроме того, можно сделать вывод, что показатели PDW, MPV, MCHC выше для группы животных зимнего торпидного периода в сравнении с другими группами, а показатели WBC, PLT, PCT, Gran, наоборот, ниже.

Для более детального анализа были построены диаграммы размаха (box plot).

На рис. 3 представлены результаты, показывающие сезонную динамику содержания лейкоцитов в крови длиннохвостых сусликов. Ранее нами уже были обнаружены изменения, происходящие в осенний период подготовки к спячке, а именно: увеличение общего числа лейкоцитов на 40% и гранулоцитов на 107% с одновременным снижением лимфоцитов на 20% [13]. В зимний торпидный период наблюдается лейкопения (снижение на 78%),

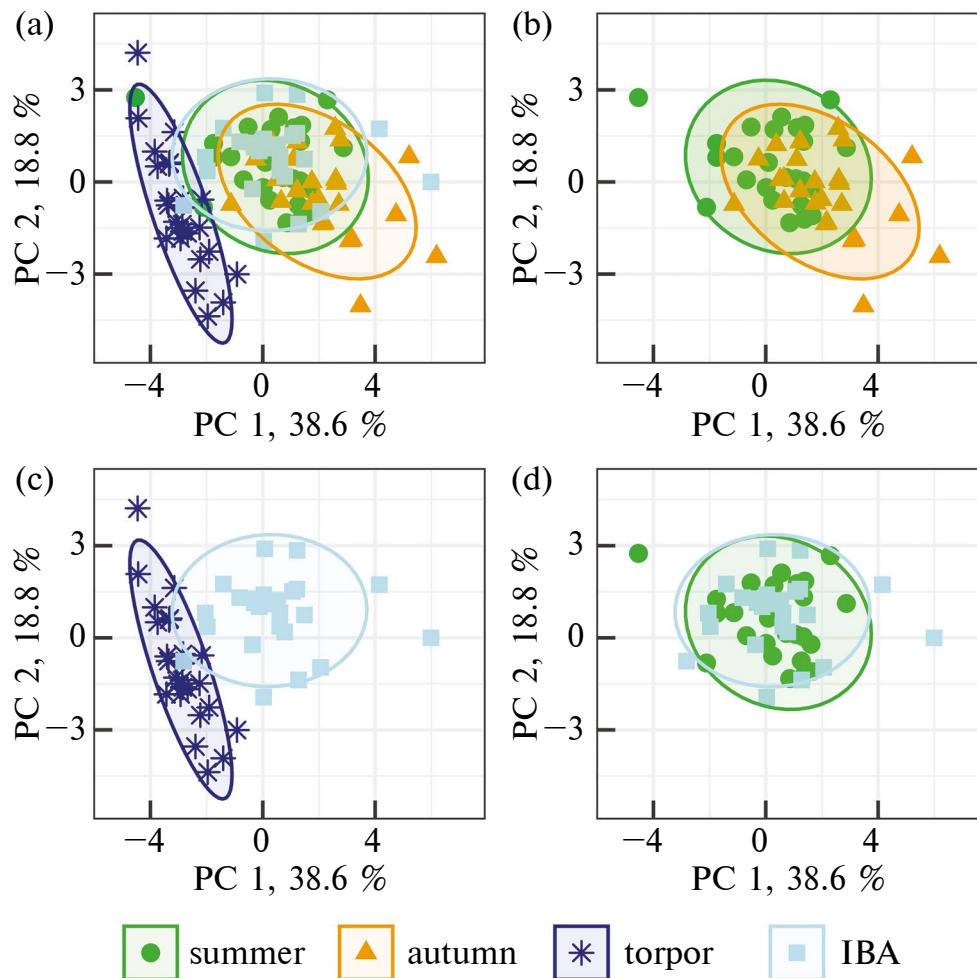


Рис. 1. Сезонные различия длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* (по показателям крови) в пространстве главных компонент PC1 и PC2. В процентах указана вариация изначальных переменных, объясняемых соответствующей главной компонентой. (a) – все группы животных, (b) – сравнение летних и осенних животных, (c) – сравнение животных в торпоре и при зимней активности, (d) – сравнение летних и зимних активных сусликов. Обозначения точек: зеленый круг – летние животные, оранжевый треугольник – группа осень, синяя звезда – суслики в торпоре, голубой квадрат – ИВА, зимняя активность. Каждая точка описывает одного суслика по 15 гематологическим индексам, $n = 25$ для каждой группы (см. методы).

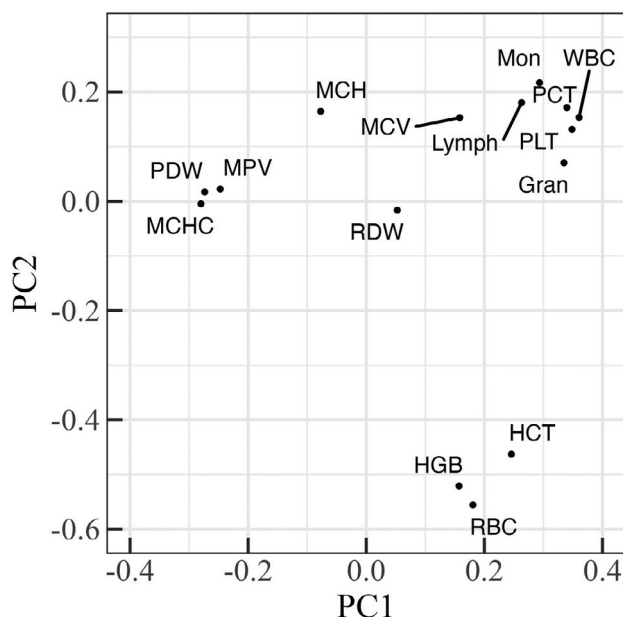


Рис. 2. График нагрузок, полученный в результате анализа методом главных компонент показателей крови длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*.

затрагивающая все субпопуляции лейкоцитов: лимфоцитов (на 63%), моноцитов (на 78%) и гранулоцитов (на 82%). Снижение показателей происходит до экстремально низких, околонулевых значений. При этом статистически значимых отличий показателей белых клеток крови между животными в период летней и зимней активности обнаружено не было.

Динамика изменений тромбоцитарных показателей в годовом цикле жизнедеятельности длиннохвостых сусликов представлена на рис. 4. В осенний период показано увеличение количества тромбоцитов и тромбокрита на 36% [13], которое сменяется ярко выраженной тромбоцитопенией (снижение

на 88%) в период зимней спячки. В торпидном состоянии обнаружено увеличение ширины распределения тромбоцитов по объему и среднего объема тромбоцитов (на 16% по сравнению с летом). После пробуждения количество тромбоцитов статистически не отличается от летних значений, как и в случае с лейкоцитами. Средний объем тромбоцитов при этом немного снижается по сравнению с торпором, однако все еще превышает летние показатели.

Рис. 5 подробно отражает сезонные изменения эритроцитарных показателей в периферической крови длиннохвостых сусликов. Самые многочисленные статистически значимые изменения произошли в группе осенних животных, которые находились на стадии подготовки к спячке. В этот период наблюдалось увеличение количества эритроцитов (на 8%), повышение концентрации гемоглобина (на 8%), увеличение гематокрита (в 1.1 раз), среднего объема эритроцита (на 3%), а также ширины распределения эритроцитов (в 1.2 раза). Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, наоборот, незначительно снизилась (на 2.5%).

В торпоре средний объем эритроцита уменьшился на 6%, что ниже летних значений (на 3%). Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, наоборот, увеличилась с осени (на 6%) с превышением летних значений (на 4%). Ширина распределения эритроцитов у торпидных животных уменьшилась по сравнению с осенними (в 1.1 раз), но не достигла летних значений (1.2 раза). При зимней активности данный параметр снова немного увеличивается и это единственный показатель, который сколько-нибудь отличается у активных зимних и летних сусликов. По результатам дисперсионного анализа среднее содержание гемоглобина в эритроците в течение годового цикла достоверно не изменялось, потому параметр МСН не отображен на рис. 5.

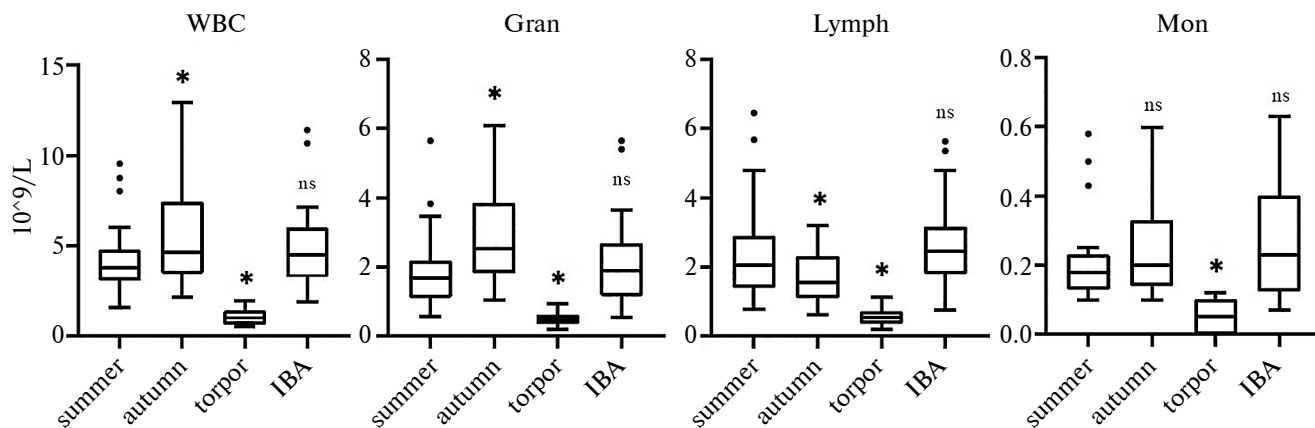


Рис. 3. Сезонные изменения лейкоцитарного пула в периферической крови сусликов *U. undulatus* ($n = 25$ для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, * – статистически значимые различия с группой “лето” ($p < 0.05$, здесь и далее U-критерий Манна–Уитни), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ($p \geq 0.05$). WBC – лейкоциты; Mon – моноциты; Lymph – лимфоциты; Gran – гранулоциты (суммарно нейтрофилы, базофилы и эозинофилы).

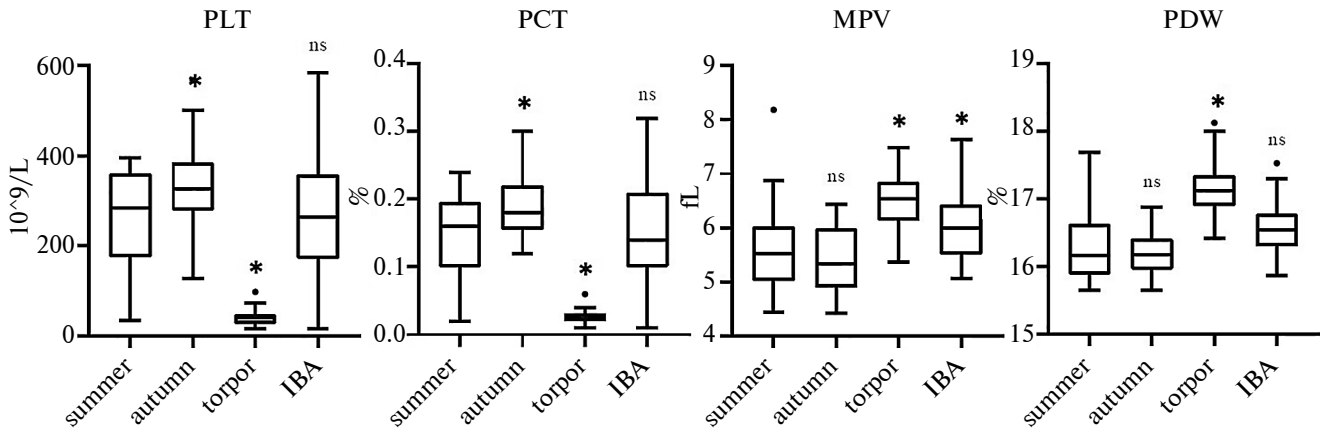


Рис. 4. Сезонные изменения тромбоцитов в периферической крови сусликов *U. undulatus* ($n = 25$ для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, * – статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ($p \geq 0.05$). PLT – количество тромбоцитов; PCT – тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцитов; PDW – ширина распределения тромбоцитов по объему.

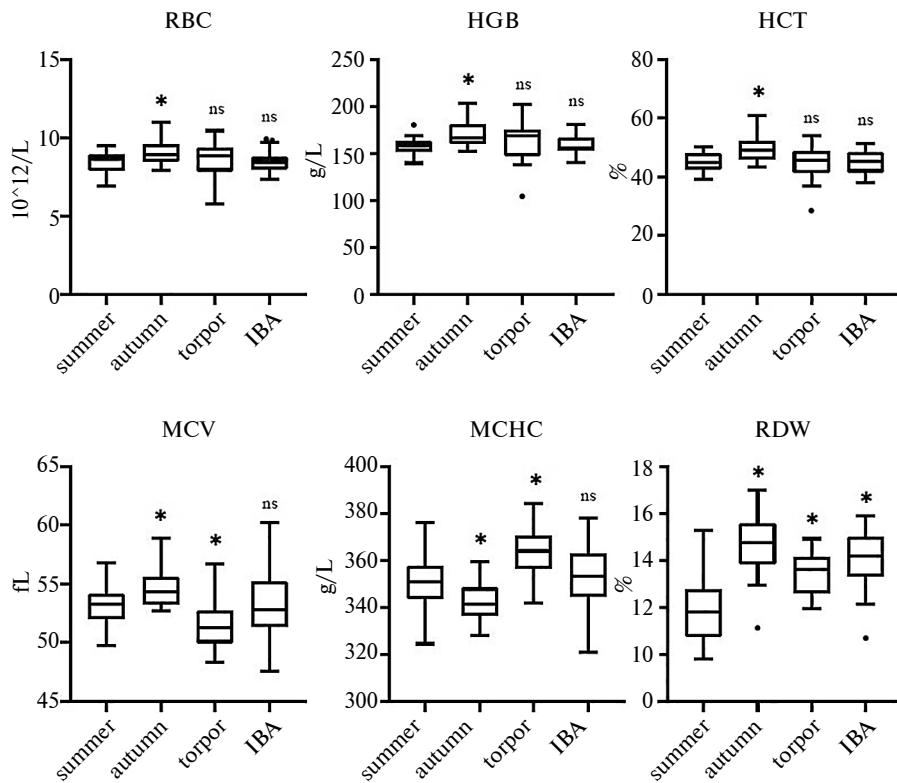


Рис. 5. Сезонные изменения эритроцитарных показателей в периферической крови сусликов *U. undulatus* ($n = 25$ для каждого времени года). Значения представлены в виде диаграммы размаха (box plot), где • – выбросы, * – статистически значимые различия между группами ($p < 0.05$), ns – по результатам статистической проверки достоверных отличий не обнаружено ($p \geq 0.05$). RBC – эритроциты; HGB – концентрация гемоглобина; HCT – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW – ширина распределения эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важно отметить, что благодаря накоплению данных, за несколько лет коллективу авторов впервые удалось получить столь широкую выборку результатов гематологического анализа для диких сусликов *U. undulatus* (25 животных в каждой группе).

Адаптации лейкоцитов

Феномен угнетения врожденного иммунитета за счет экстремальной лейкопении во время торпора (максимальное снижение до 90 % по сравнению с активным летним состоянием) показан для европейского хомяка (*Cricetus cricetus*), монгольского хомяка (*Allocricetulus curtatus*), обыкновенного ежа (*Erinaceus*

europaeus L.), европейского суслика (*Spermophilus citellus*), арктического суслика (*Urocitellus parryi*), 13-полосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*), бурого медведя (*Ursus arctos*) [8, 9, 14–19] и согласуется с нашими данными, полученными для длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*). Лейкопения затрагивает все субпопуляции лейкоцитов гибернаторов (рис. 3) и объясняется преимущественно процессом “маргинализации” клеток. Известно, что существует 2 взаимозаменяемых пула лейкоцитов: циркулирующие в крови и “маргинальные”, находящиеся в органах [20, 21]. В пользу данной гипотезы имеются исследования, показавшие, что в период гибернации (по сравнению с летним периодом и при пробуждении) количество лейкоцитов в некоторых органах повышается: в легких в основном аккумулируются нейтрофилы, а в кишечнике – лимфоциты [8, 19, 22, 23]. Одновременно с этим костный мозг сусликов в торпоре содержит меньше клеток, что говорит о невозможности синтезировать лейкоциты в нужном объеме *de novo* при пробуждении [24, 25], поскольку по общеизвестным данным, в костном мозге млекопитающих срок синтеза, например, нейтрофилов занимает несколько дней [26], а период зимней эутермии у суслика *Urocitellus undulatus* длится от 2 до 24 ч. Лимфопения объясняется также снижением синтеза клеток не только в костном мозге, но и в тимусе, обратимая инволюция которого, по-видимому, начинается уже в период осенней подготовки к спячке [13, 27].

Осень также является крайне важным адаптационным периодом в годовом цикле гибернаторов. В это время, вероятно, происходит обновление иммунных клеток, а также обеспечение необходимого пула лейкоцитов для последующих пробуждений. Существует гипотеза об активации врожденного иммунитета с целью клиренса (очистки) крови от патогенов перед и после спячки, поскольку в торпоре животные находятся в выраженном иммунодепрессивном состоянии [8]. Данная гипотеза согласуется с полученными нами данными о повышении общего числа лейкоцитов осенью за счет гранулоцитарной субпопуляции (рис. 3). Как уже было сказано ранее, увеличенный пул клеток затем доставляется на “хранение” во вторичные лимфоидные (селезенка, лимфоузлы) и прочие (кишечник, легкие) органы путем экстравазации [13]. Этот же механизм, по-видимому, позволяет гетеротермным животным быстро восстанавливать лейкоцитарный пул клеток до летних значений при зимних пробуждениях (ИВА).

Все вышеописанное наводит на предположение о том, что срок жизни лейкоцитов у гетеротермных животных может быть длиннее, чем у гомойотермных (как уже показано для эритроцитов и тромбоцитов) [7, 28], однако данная гипотеза нуждается в проведении дополнительных исследований. Недавно показано, что нейтрофилы обладают метаболиче-

ской пластичностью: в условиях голодания или из-за ограниченной доступности глюкозы клетки способны к метаболизму жирных кислот, которые являются основным источником энергии в спячке [29].

Адаптации тромбоцитов

Количественный анализ тромбоцитов в годовом цикле жизнедеятельности сусликов *U. undulatus* показал схожую с лейкоцитами картину. В подготовительный осенний период обнаруженный тромбоцитоз, вероятно, тоже связан с процессами клиренса крови, а также с репарацией возможных повреждений и накоплением клеток для последующего запаса в органах, преимущественно в синусоидах печени [7, 30, 31]. При этом осенью сохраняется процентное соотношение зрелых и молодых фракций тромбоцитов, о чем говорят практически не изменившиеся показатели MPV и PDW. Вероятно, равновесие объясняется тем, что одновременно происходят 2 события: фракция молодых тромбоцитов образуется путем отшнуровывания от мегакариоцитов костного мозга, а зрелая часть клеток мигрирует из органов [13]. Показано, что повышенная выработка тромбоцитов может являться частью иммунного ответа в ранней острой фазе, наряду с повышением нейтрофильных гранулоцитов [31]. Похожий тромбоцитарный профиль показан для летучих мышей, однако литературы, описывающей гемостатическую систему гибернаторов в осенний период, критически мало [32].

В торпидный период у длиннохвостого суслика нами зафиксирована ярко выраженная тромбоцитопения (снижение почти на 90%, рис. 4), схожая картина описана для европейского (*Spermophilus citellus*) и 13-полосного сусликов (*Ictidomys tridecemlineatus*) и является общей адаптацией для облигатных гибернаторов [7, 9]. Снижение количества тромбоцитов и факторов свертывания необходимо для того, чтобы обеспечить защиту гибернирующего животного от тромбообразования в условиях гипотермии, неподвижности и замедленного сердцебиения [7, 33]. В нашем эксперименте обнаружено, что соотношение зрелых и молодых фракций тромбоцитов в торпоре сдвигается в сторону преобладания молодых форм клеток (о чем говорит увеличение MPV и PDW, рис. 4). Данный феномен может быть связан с повышением ploидности мегакариоцитов и/или с увеличением срока жизни тромбоцитов именно гибернирующих видов животных [7, 31, 34, 35].

При пробуждении количество тромбоцитов суслика быстро возвращается к летним значениям (рис. 4), высвобождаясь из резервов органов. Физиологический смысл столь быстрого восстановления заключается в нормализации системы свертываемости крови для предотвращения кровотечений [7]. Средний объем тромбоцитов (MPV) остается не-

много увеличенным у активных зимних сусликов, что может говорить о незавершенном процессе восстановления системы гемостаза, а также миграции предшественников тромбоцитов из костного мозга в кровотоки [34, 36]. Напрашивается проведение дополнительных исследований размеров и форм клеток, т.к. данные параметры напрямую влияют на функциональную активность тромбоцитов. Например, известно, что при охлаждении и спячке тромбоциты способны обратимо изменять свою форму, это может являться адаптацией, защищающей клетки от повреждений при низких температурах [7].

В целом, все вышеописанные клеточные события указывают на сбалансированное (предусмотрительное) функционирование физиологических систем гемостаза и иммунного ответа.

Адаптации эритроцитов

Обсуждая изменения эритроцитарных показателей, важно отметить, что система красной крови является крайне стабильной и константной, а срок жизни самих эритроцитов исчисляется месяцами [37]. Поэтому даже небольшие изменения красных кровяных телец сусликов в осенний период подготовки к спячке, очевидно, тоже носят адаптационный характер. Только осенью происходит небольшое увеличение гематокрита, количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови (рис. 5). В свою очередь, увеличение гематокрита и размеров эритроцитов (наряду со скоростью кровотока, деформируемостью эритроцитов и лейкоцитов) оказывает прямое влияние на усиление процессов маргинализации лейкоцитов и тромбоцитов [38–43]. Небольшое увеличение количества эритроцитов с лета на осень отмечено у малого (*Spermophilus pygmaeus*) и крапчатого сусликов (*Spermophilus suslicus*) [44], количественное увеличение эритроцитов и гематокрита – у 13-полосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) [45]. Кроме этого, нами показано, что осенью у длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*) возрастает количество эритроцитов атипичных форм, о чем свидетельствует увеличение параметра RDW в 1.2 раза. Осенью наличие нетипичных форм красных кровяных клеток, а также небольшое увеличение более крупных (молодых) эритроцитов (MPV) может объяснять незначительное снижение средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) при общей увеличенной концентрации гемоглобина в крови (рис. 5). В целом, по совокупности всех измеренных нами эритроцитарных показателей можно говорить о не ярко выраженной гипоксии, и как следствие, можно сделать предположение о компенсаторном повышении уровня кислорода в тканях в ответ на эту гипоксию [37, 46]. Данный цикл биологических событий, вероятно, также является адаптацией организма

к предстоящей зимней спячке. Мы предполагаем, что это может быть связано с увеличенной потребностью тканей в кислороде в осенний период, что требует дополнительных исследований.

В торпоре количество эритроцитов у животных в нашем эксперименте стабилизируется до летних значений, что согласуется с данными, полученными для европейского суслика (*Spermophilus citellus*) при сравнении летнего активного и зимнего торпидного состояний [9]. Аналогичная стабилизация отмечена для гематокрита и концентрации гемоглобина. Среднее содержание гемоглобина в эритроците (МСН) в течение годового цикла остается неизменным, что также свидетельствует о высокой стабильности системы красной крови. Постоянство количества эритроцитов и уровня гемоглобина играет важную роль в годовом цикле гетеротермных животных, т.к. периоды пробуждения у них гораздо короче (часы), чем скорость гемопоэза (недели) [37, 47]. Сами пробуждения облигатных гибернаторов также являются энергозатратным процессом, требующим повышенного количества кислорода [48]. При этом в торпоре процентное содержание атипичных форм эритроцитов остается повышенным, и лишь немного уменьшается по сравнению с осенью. Данный феномен можно объяснить способностью эритроцитов гибернаторов не просто менять форму как у гомойотермов [37], а практически складываться пополам для облегченного продвижения по суженным сосудам вследствие гипотермии [45]. Возрастание количества нормальных клеток по сравнению с осенним периодом дополнительно подтверждается небольшим снижением среднего объема эритроцитов (MCV) и увеличением средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) (рис. 5). Во время спячки для длиннохвостых сусликов также показано замедление старения клеток красной крови и практически полное отсутствие их деструкции (по содержанию билирубина как продукта распада гемоглобина) [47]. Увеличенная продолжительность жизни эритроцитов более, чем в 2 раза (до 160 суток) показана для гибернирующих хомячков по сравнению с хомячками, не впадающими в торпор [15, 28, 47]. Помимо этого, эритроциты круглогодично выполняют защитную функцию за счет бактерицидного механизма оксиданса (окисление поверхности мембран), а также наличия иммуноглобулинов в составе мембран [33, 49], что имеет особо важное значение при иммунодепрессии во время торпора.

У зимних активных сусликов практически все эритроцитарные показатели возвращаются к летним параметрам. Исключение составляет ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), которая описывает неоднородность клеточной популяции (рис. 5). По-видимому, снижение температуры тела сусликов даже на 1 °С уже осенью может способствовать обратимому изменению формы части

эритроцитов. На примере малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*) доказано, что эритроциты гибернаторов играют важную роль в устранении окислительного стресса в процессе пробуждения [50].

Полученные результаты говорят о том, что кислородная емкость крови исследованных животных остается высокой на протяжении годового цикла жизнедеятельности и поддерживается как количественными, так и качественными перестройками в составе периферической крови.

Таким образом, нами показано, что важнейшие адаптивные изменения в крови гетеротермных сусликов *Urocyon undulatus* затрагивают все виды форменных элементов и начинаются осенью, задолго до наступления спячки. Полученные данные важны для оценки и коррекции адаптивных способностей гомойотермных животных и человека.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.М.З., П.О.Т.), сбор данных (Н.П.К., Л.К.И.), обработка данных (П.О.Т., Н.П.К., А.Е.Е.), написание и редактирование манускрипта (П.О.Т., Н.М.З.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с руководящими принципами, установленными Директивой Европейского Совета 2010/63/EU и Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 августа 1977 г. № 755 “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”. На проведение экспериментов с сусликами получено разрешение комиссии по биоэтике Института биофизики клетки РАН Пушкинского научного центра биологических исследований Российской академии наук, протокол 3/062019 от 13.06.2019.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме Государственного задания “Механизмы природного и искусственного гипобиоза” НИОКТР: 122041100276–0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco M, Contreras C, Nespolo R (2013) Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 166: 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.010>

2. Drew KL, Harris MB, LaManna JC, Smith MA, Zhu XW, Ma YL (2004) Hypoxia tolerance in mammalian heterotherms. *J Exp Biol* 207: 3155–3162. <https://doi.org/10.1242/jeb.01114>
3. Bieber C, Lebl K, Stalder G, Geiser F, Ruf T (2014) Body mass dependent use of hibernation: why not prolong the active season, if they can? *Functional Ecology* 28: 167–177. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12173>
4. Landes J, Pavard S, Henry P-Y, Terrien J (2020) Flexibility Is Costly: Hidden Physiological Damage from Seasonal Phenotypic Transitions in Heterothermic Species. *Front Physiol* 11: 985. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00985>
5. Mohr S, Bagriantsev S, Gracheva E (2020) Cellular, Molecular, and Physiological Adaptations of Hibernation: The Solution to Environmental Challenges. *Annu Rev Cell Dev Biol* 36: 315–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-012820-095945>
6. Ануфриев АИ (2013) Экологические механизмы температурных адаптаций млекопитающих и зимующих птиц Якутии. Изд-во СО РАН, Новосибирск [Anufriyev AI (2013) Ecological mechanisms of temperature adaptations in mammals and wintering birds of Yakutia. Izd-vo SO RAN. Novosibirsk. (In Russ)].
7. DeVrij EL, Bouma HR, Henning RH, Cooper ST (2023) Hibernation and hemostasis. *Front Physiol* 14: 1207003. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1207003>
8. Bouma HR, Carey HV, Kroese FGM (2010) Hibernation: the immune system at rest? *J Leukoc Biol* 88: 619–624. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310174>
9. Bouma HR, Strijkstra AM, Boerema, Deelman LE, Epema AH, Hut RA, Kroese FG, Henning RH (2010) Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. *Vet Immunol Immunopathol* 136: 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.03.016>
10. Ануфриев АИ, Охлопков ИМ (2015) Зимняя спячка трех видов Sciuridae в Якутии с температурой тела ниже нуля. *Экология* 2: 125–133. [Anufriyev AI, Okhlopov IM (2015) Hibernation of three species of Sciuridae in Yakutia with body temperature below zero. *Ekologiya* 2: 125–133. (In Russ)]
11. Захарова НМ (2014) Некоторые особенности разогрева гибернирующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении. *Фундамент исслед* 6: 1401–1405. [Zakharova NM (2014) Some features of warming of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus* during induced awakening. *Fundament* 6: 1401–1405. (In Russ)].
12. (2007) *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. Elsevier.
13. Теплова ПО, Комелина НП, Лизоркина КИ, Захарова НМ (2023) Особенности адаптационных изменений лейкоцитов и тромбоцитов якутских сусликов в предгибернационный осенний период. *Биофизика* 68: 926–931. [Teplova PO, Komelina NP, Lizorkina KI, Zakharova NM (2023) Characteristics of adaptation changes in leukocytes and platelets of Yakutian ground squirrels in the autumn period before hibernation. *Biofizika* 68: 926–931. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302923050125>

14. *Kuznetsova EV, Feoktistova NY, Naidenko SV, Surov AV, Tikhonova NB, Kozlovskii JuE* (2016) Seasonal Changes in Blood Cells and Biochemical Parameters in the Mongolian Hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Izv Akad Nauk Ser Biol*: 405–411.
15. *Reznik G, Reznik-Schüller H, Emminger A, Mohr U* (1975) Comparative studies of blood from hibernating and non-hibernating European hamsters (*Cricetus cricetus* L). *Lab Anim Sci* 25: 210–215.
16. *Suomalainen P, Rosokivi V* (1973) Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 17. The blood cell count of the hedgehog at different times of the year and in different phases of the hibernating cycle. *Ann Acad Sci Fenn Biol* 198: 18.
17. *Tøien Ø, Drew KL, Chao MI, Rice ME* (2001) Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R57283. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R572>
18. *Frerichs KU, Kennedy C, Sokoloff L, Hallenbeck JM* (1994) Local cerebral blood flow during hibernation, a model of natural tolerance to “cerebral ischemia”. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 193–205. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.26>
19. *Sahdo B, Evans AL, Arnemo JM, Frøbert O, Särndahl E, Blanc S* (2013) Body temperature during hibernation is highly correlated with a decrease in circulating innate immune cells in the brown bear (*Ursus arctos*): a common feature among hibernators? *Int J Med Sci* 10: 508–514. <https://doi.org/10.7150/ijms.4476>
20. *Iadocicco K, Monteiro LH, Chaui-Berlinck JG* (2002) A theoretical model for estimating the margination constant of leukocytes. *BMC Physiol* 2: 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-2-3>
21. *Colditz IG* (1985) Margination and emigration of leukocytes. *Surv Synth Pathol Res* 4: 44–68. <https://doi.org/10.1159/000156964>
22. *Inkovaara P, Suomalainen P* (1973) Studies on the physiology of the hibernating hedgehog. 18. On the leukocyte counts in the hedgehog's intestine and lungs. *Ann Acad Sci Fenn Biol* 200: 121.
23. *Kurtz CC, Carey HV* (2007) Seasonal changes in the intestinal immune system of hibernating ground squirrels. *Dev Comp Immunol* 31: 415–428. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.003>
24. *Yasuma Y, McCarron RM, Spatz M, Hallenbeck JM* (1997) Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Am J Physiol* 273: R1861–R1869. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1861>
25. *Аксенова ГЕ, Логвинович ОС, Афанасьев ВН, Лизоркина КИ* (2023) Параметры клеточного цикла и активность орнитиндекарбоксилазы в красном костном мозге гибернирующих сусликов *Urocitellus undulatus*. *Биофизика* 68: 964–972. [*Aksenova GE, Logvinovich OS, Afanas'ev VN, Lizorkina KI* (2023) Parametry kletocznego cikla i aktivnost' ornitindekarboksilazy v krasnom kostnom mozge giberniruyushchih suslikov *Urocitellus undulatus*]. *Cell cycle parameters and ornithine decarboxylase activity in red bone marrow of hibernating ground squirrels Uro-*
- citellus undulatus*]. *Biofizika* 68: 964–972. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302923050174>
26. *Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L* (2019) The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol* 40: 584–597. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>
27. *Novoselova EG, Kulikov AV, Glushkova OV, Cherenkov DA, Smirnova GN, Arkhipova LV* (2004) Effect of the Transplanted Thymus of Hibernating Ground Squirrels on the Age-Related Thymus Involution in Rats. *Dokl Biol Sci* 1–6: 272–273.
28. *Brock MA* (1960) Production and life span of erythrocytes during hibernation in the golden hamster. *Am J Physiol* 198: 1181–1186. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1960.198.6.1181>
29. *Kumar S, Dikshit M* (2019) Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front Immunol* 10: 2099 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02099>
30. *DeVrij EL, Bouma HR, Goris M, Weerman U, de Groot AP, Kuipers J, Giepmans BNG, Henning RH* (2021) Reversible thrombocytopenia during hibernation originates from storage and release of platelets in liver sinusoids. *J Comp Physiol B* 191: 603–615. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01351-3>
31. *Koupenova M, Livada AC, Morrell CN* (2022) Platelet and Megakaryocyte Roles in Innate and Adaptive Immunity. *Circ Res* 130: 288–308. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319821>
32. *Kovalchuk LA, Mishchenko VA, Chernaya LV, Snit'ko VP, Bolshakov VN* (2022) Assessment of Seasonal Variability of the Spectrum of Free Amino Acids in the Blood Plasma of the Boreal Bat Species (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) of the Ural Fauna. *Dokl Biochem Biophys* 507: 268–272. <https://doi.org/10.1134/S1607672922060060>
33. *Reddick RL, Poole BL, Penick GD* (1973) Thrombocytopenia of hibernation. Mechanism of induction and recovery. *Lab Invest* 28: 270–278.
34. *Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y* (1987) Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 70: 177–185.
35. *Winkelmann M, Pfitzer P, Schneider W* (1987) Significance of polyploidy in megakaryocytes and other cells in health and tumor disease. *Klin Wochenschr* 65: 1115–1131. <https://doi.org/10.1007/BF01734832>
36. *Yang S, Wang L, Wu Y, Wu A, Huang F, Tang X, Kantawong F, Anuchapreeda S, Qin D, Mei Q, Chen J, Huang X, Zhang C, Wu J* (2022) Apoptosis in megakaryocytes: Safeguard and threat for thrombopoiesis. *Front Immunol* 13: 1025945. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1025945>
37. *Corrons JLV, Casafont LB, Frasnado EF* (2021) Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Ann Hematol* 100: 2425–2433. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>
38. *Cooper S, Sell S, Nelson L, Hawes J, Benrud JA, Kohlnhofer BM, Burmeister BR, Flood VH* (2016) Von Willebrand factor is reversibly decreased during torpor in 13-lined ground squirrels. *J Comp Physiol B* 186: 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0941-5>

39. Fedosov DA, Gompper G (2014) White blood cell margination in microcirculation. *Soft Matter* 10: 2961–2970. <https://doi.org/10.1039/c3sm52860j>
40. Fitzgibbon S, Spann AP, Qi QM, Shaqfeh ESG (2015) In vitro measurement of particle margination in the microchannel flow: effect of varying hematocrit. *Biophys J* 108: 2601–2608. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.013>
41. Pretini V, Koenen MH, Kaestner L Fens MHAM, Schiffelers RM, Bartels M, Van Wijk R (2019) Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front Physiol* 10: 945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
42. Tokarev AA, Butylin AA, Ataullakhanov FI (2011) Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. *Biophys J* 100: 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3740>
43. Израилова ГР, Халилов РА, Адиева АА (2014) Современные подходы к исследованию гипотермии. *Фундамент исслед* 11:1046–1058. [Izrailova GR, Khalilov RA, Adiyeva AA (2014) Current approaches to hypothermia research. *Fundament Issled* 11: 1046–1058. (In Russ)].
44. Передрий НС (1973) Сезонные изменения гематологических показателей у сусликов популяций юга Украины. *Вестн зоол* 2: 21–25. [Peredriy NS (1973) Seasonal variation of haematological indices in ground squirrel populations of the south of Ukraine. *Vestnik Zool* 2: 21–25. (In Russ)].
45. Spurrier WA, Dawe AR (1973) Several blood and circulatory changes in the hibernation of the 13-lined ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 44: 267–282. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90479-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90479-9)
46. Бурых ЭА, Сороко СИ (2014) Компенсаторная роль системы кровообращения при острой гипоксической гипоксии у человека. *Экол чел* 7:30–36. [Burykh EA, Soroko SI (2014) Compensatory role of the circulatory system in acute hypoxic hypoxia in humans. *Hum Ecol* 7: 30–36. (In Russ)].
47. Ануфриев АИ (2008) Механизмы зимней спячки мелких млекопитающих Якутии, Новосибирск. [Anufriyev AI (2008) Mechanisms of winter hibernation in small mammals of Yakutia. Novosibirsk. (In Russ)].
48. Ma YL, Zhu X, Rivera PM, Tøien Ø, Barnes BM, LaManna JC, Smith MA, Drew KL (2005) Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1297–R1306. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00260.2005>
49. Reid ME, Mohandas N (2004) Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol* 41: 93–117. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.001>
50. Klichkhanov NK, Nikitina ER, Shihamirova ZM, Astaeva MD, Chalabov SI, Krivchenko AI (2021) Erythrocytes of Little Ground Squirrels Undergo Reversible Oxidative Stress During Arousal from Hibernation. *Front Physiol* 12: 730657. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730657>

ADAPTIVE VARIABILITY OF BLOOD-FORMING ELEMENTS IN THE ANNUAL LIFE CYCLE OF GROUND SQUIRRELS *UROCITELLUS UNDULATUS*

P. O. Teplova^{a, #}, N. P. Komelina^a, A. Y. Yegorov^b, K. I. Lizorkina^a, and N. M. Zakharova^a

^a Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

[#] e-mail: p.o.teplova@gmail.com

In this study, changes in all blood formed elements of long-tailed ground squirrel *Urocitellus undulatus* ($n=100$) during different periods of their life activity were investigated. The hematological analysis was performed on an automatic veterinary analyser: a indices of leukocytes, platelets and erythrocytes were measured in summer (normothermia, june-july), autumn (preparatory period, october), winter torpid (hypothermia, december-february) and winter active periods (IBA, euthermia, short awakenings between hypothermia stages, december-february). It was shown that the total counts of platelets and leukocytes of ground squirrel increased by ~40% in autumn compared to summer. During the torpor period, thrombocytosis and leukocytosis were replaced by extreme thrombocytopenia (~90%) and leukopenia (~80%). On awakening, the indices reached “summer” values, except for a slightly increased mean platelets volume. In autumn, an insignificant erythrocytosis (~10%) was observed, which, together with changes in other parameters, could indicate an unexpressed autumn hypoxia. In torpor and in winter euthermia, the erythrocyte indices were no difference with summer control values; however, the presence of atypical forms of erythrocytes was detected both in the autumn period of preparation for hibernation and during hibernation. The results are discussed in the context of the adaptation of the blood-forming elements of the ground squirrel to the extreme conditions of hibernation and are valuable for the study of the adaptive abilities of homoeothermic animals and humans.

Keywords: ground squirrel, hypothermia, hibernation, hematology, physiological adaptation, hypoxia, hemostasis.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В РАЗНЫХ МОДЕЛЯХ ТВОРЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

© 2024 г. Н. В. Шемякина*, Ж. В. Нагорнова

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

* E-mail: shemyakina_n@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2023

После доработки 15.02.2024

Принята к публикации 18.02.2024

В статье проводится сопоставление результатов трех ЭЭГ/ВП исследований вербальной творческой деятельности, реализованных в единой временной парадигме, но с использованием разных моделей творческих задач. Испытуемые (18–35 лет) выполняли задания – ПОСЛОВИЦЫ (дивергентная творческая задача на преодоление стереотипов долговременной памяти), ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИИИ (условно “конвергентная” творческая задача на активизацию семантических полей для отдаленных по смыслу понятий), АЛЬТЕРНАТИВНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ (дивергентная творческая задача на инициацию ассоциативного поиска). В творческих заданиях от испытуемых требовалось придумать оригинальное окончание пословицы (ПОСЛОВИЦЫ, Pr), найти слово, подходящее к трем предъявленным понятиям из разных семантических полей (RAT), придумать оригинальные способы использования обычных предметов (AUT), а в контрольных – вспомнить общеизвестное окончание пословицы (PrM), перечислить объекты из заданной категории (CAT). В работе анализировали амплитуды вызванных потенциалов (ВП) при сравнении заданий между собой. В задании ПОСЛОВИЦЫ наблюдалась большая негативность компонента N300 в лобных зонах коры (на интервале 280–346 мс после предъявления стимула), что, вероятно, может отражать торможение стереотипа долговременной памяти. В заданиях ПОСЛОВИЦЫ и ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИИИ семантический поиск и интеграция новой информации в сравнении с извлечением известной информации из памяти характеризовалась меньшими значениями амплитуды поздних компонентов ВП на интервале 698–786 мс. Большая амплитуда поздних компонентов ВП в теменных областях (524–624 мс) при дивергентном мышлении (AUT) может соотноситься с большей образностью данного задания (быстрым возникновением в уме изображений) по сравнению с вербально-абстрактными заданиями на ассоциации и изменение смысла пословиц. Таким образом, можно предположить, что на сравнительно ранних этапах обработки информации в вербальных творческих заданиях проявляется специфика разных моделей творческой деятельности при одинаковой временной парадигме и сходной специфике предъявления зрительных стимулов.

Ключевые слова: ЭЭГ, вызванные потенциалы, ВП, вербальное творчество, тест отдаленных ассоциаций, RAT, тест альтернативного использования, AUT, пословицы, P200, поздний позитивный компонент

DOI: 10.31857/S0044452924020022, **EDN:** XATNJV

ВВЕДЕНИЕ

Творчество – это потребность создания нового, поиск новизны, возникающие в ситуации внутренней мотивации развития. Или творчество – это уход от воздействий внешнего мира? Так или иначе, творчество – способность порождать идеи, которые характеризуются оригинальностью (новизной) и полезностью (применимостью) [1]. Согласно структуре интеллекта Гилфорда [2], творческие находки могут случаться при дивергентном мышлении – типе продуктивного мышления, в результате которого появляется множество вариантов решений поставленной задачи. При изучении творческих способностей в модели дивергентного мышления наиболее часто оценивается беглость (количество ответов),

гибкость (способность давать ответы из разных семантических областей), оригинальность (редкость встречаемости похожего ответа в соответствующей выборке) [3, 4] ответов. Дивергентное мышление часто противопоставляется конвергентному – типу продуктивного мышления, направленному на поиск одного верного, подходящего ответа к поставленной задаче на основе полученной информации.

Согласно ассоциативной теории творчества С. Медник [5], новая идея возникает благодаря ассоциативному процессу/поиску, при этом и дивергентное, и конвергентное мышление вносят свой вклад и чередуются при поиске решений. С точки зрения ассоциативной теории Медник рассматривает три способа достижения творческого решения: наитие (Serendipity),

аналогия (Similarity), опосредование (Mediation). Чем более отдаленные (но адекватные) ассоциации может найти человек, тем выше его творческие способности и, как следствие, — более оригинальны творческие решения [6, 7].

В теориях творческой деятельности особо подчеркивается способность преодолевать банальные, первые пришедшие на ум ассоциации и ответы, решать задачи при недостатке информации [8–10]. На физиологическом уровне, поиск творческого ответа может сопровождаться несколькими процессами, а именно — торможением наиболее жестких ассоциаций, активацией распределенной семантической сети, растормаживанием слабых связей и созданием новых ассоциативных цепочек. В нашем исследовании испытуемым предлагалось повторное предъявление стимулов для повышения уровня оригинальности ответов в заданиях. Повторное выполнение задания с одним и тем же стимулом или длительное его выполнение может сопровождаться так называемым “эффектом последовательности” (serial order effect): в начале выполнения задания испытуемый дает много ответов с низкой оригинальностью, затем — ответов становится меньше, но их оригинальность повышается [11, 12]. Данный эффект также связывают с разным вовлечением управляющих систем мозга в творческий процесс [13, 14]. В ряде исследований рассматриваются нейрофизиологические показатели активации управляющих систем мозга и когнитивного контроля при творческой деятельности [13, 15, 16] и влияние управляющих систем на оригинальность, гибкость и беглость творческого мышления [17, 18].

Исходя из рассмотренных теоретических предположений, для сравнительного рассмотрения, нами было предложено несколько вербальных творческих заданий: задание на преодоление стереотипа — придумать собственное окончание общеизвестных пословиц и поговорок [19, 20]; задание на ассоциативный поиск — найти слово, подходящее к каждому из трех предъявленных [21, 22] и задание на дивергентное мышление — придумать оригинальное использование обычных распространенных предметов [23]. Все задания были сконструированы в парадигме вызванных потенциалов и состояли из коротких проб, предполагая возможность многократного решения задачи и накопления ответов. Такой подход дает возможность оценивать синхронизированные по времени нейрофизиологические показатели (вызванные потенциалы (ВП) и связанную с событием синхронизацию/десинхронизацию ЭЭГ) [24] в сравнении с заданиями, в которых творческая деятельность рассматривается как непрерывный процесс, длящийся в течение некоторого продолжительного времени (например, минут) [25].

Целью исследования было изучение нейрофизиологических механизмов творческой деятельности при сопоставлении ВП в заданиях, основанных

на разных теориях творческого мышления: вовлекающих дивергентное, ассоциативное мышление и преодоление стереотипа долговременной памяти. Мы предполагаем, что перечисленные модели творческого мышления в разной степени вовлекают базовые когнитивные функции, такие как когнитивный контроль, долговременная и кратковременная память, зрительное воображение и др., что будет отражаться в различиях амплитуд ВП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участники. В исследовании с моделью ПОСЛОВИЦЫ (Proverbs, Pr) приняли участие 35 человек от 18 до 35 лет (31 женщина, 4 мужчины, медиана возраста 20 лет, первый — третий квартили 19–20.5 лет), они выполняли творческое задание Pr и контрольное к нему задание PrM; в исследовании с моделью ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ (remote associative test, RAT) приняли участие 35 человек от 18 до 35 лет (29 женщин, 6 мужчин, медиана возраста 20 лет, первый — третий квартили 19–20 лет). Часть участников исследования выполняло оба типа заданий (модели — пословицы и отдаленные ассоциации), но так как группы совпадали не полностью, в дальнейшем статистическом анализе они рассматриваются как независимые выборки, хотя это отчасти снижает чувствительность статистических тестов. В задании с моделью НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ (alternative uses task, AUT) приняли участие 74 человека от 18 до 26 лет (54 женщины, 20 мужчин, медиана возраста 19 лет, первый — третий квартили 19–20 лет), они выполняли творческое задание AUT и контрольное к нему задание CAT.

Задания. В исследованиях участникам предлагалось несколько творческих и контрольных заданий.

ПОСЛОВИЦЫ (Proverbs, Pr) — модель преодоления стереотипа. В этом задании испытуемые должны были придумать оригинальные окончания общеизвестных пословиц и поговорок, предъявляемых без последнего слова, изменяя их известный смысл на какой-то другой [19]. В качестве контрольной задачи (Proverbs — Memoгу, PrM) испытуемым предлагали назвать (вспомнить) общеизвестный вариант окончания предъявленной неоконченной (без последнего слова) пословицы или поговорки. В обеих задачах присутствовало извлечение информации из долговременной памяти. Отличие творческой задачи от нетворческой состояло в преодолении стереотипа долговременной памяти и поиске нового оригинального окончания пословицы или поговорки, меняющего ее смысл. Задания выполнялись блоками: Pr и PrM проб, последовательность блоков рандомизировалась между участниками. В каждом блоке было 104 стимула (пословицы, поговорки) — одинаковых для творческого и контрольного задания проб. Внутри каждого блока проб порядок следования по-

словicc также был рандомизирован между испытуемыми.

ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ – модель ассоциативного поиска (РАТ). В пробах испытуемым предъявлялись тройки слов, слова в каждой тройке принадлежали к разным семантическим полям. Задача испытуемых состояла в поиске такого слова, которое может употребляться с каждым из предъявленных трех, разрешалось изменять словоформы и добавлять предлоги. В нашем исследовании каждая тройка слов (всего 70) предъявлялась три раза (три последовательные пробы), задавая для участника несколько попыток найти ответ. Всего в этом задании предъявлялось 210 проб. Задание было сконструировано на основе теста отдаленных ассоциаций [5], часть стимулов (20 троек слов) была взята из русского теста отдаленных ассоциаций в адаптации Воронина [26], а 50 троек русских слов – разработаны авторами. Разработка дополнительных стимулов на основе теста и концепции творческой деятельности С. Медник для использования в широком спектре нейрофизиологических и поведенческих исследований ранее также осуществлялась для английского языка [21]. Пример выполнения задания: “случайная, гора, долгожданная”, возможные ответы – встреча (наиболее частотный), путник/турист, беседа и т. д.

НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ – модель дивергентного мышления (АУТ). В творческом задании АУТ испытуемым предъявлялось название распространенного повседневного объекта (например: носок, расческа, скрепка) с задачей придумать необычные, оригинальные способы использования этого предмета (один ответ в одной пробе). В контрольном задании САТ испытуемым предъявлялось название категории объектов (например: транспорт, виды спорта) и ставилась задача перечислить объекты из этой категории (один ответ в одной пробе). Творческое и контрольное задания выполнялись в виде коротких блоков, в каждом из которых предъявлялось одно название объекта/категории по 9–15 раз, последовательность блоков рандомизировалась между испытуемыми. Количество проб в коротких блоках было разным, чтобы испытуемые не могли предсказать длительность блоков и не считали количество предъявлений. Испытуемым предъявлялись более 100 проб в творческом задании и более 100 проб в контрольном задании. В каждой отдель-

ной пробе (для одного предъявления стимула) во всех заданиях испытуемый давал только один ответ.

Общая схема выполнения заданий в парадигме вызванных потенциалов. Все творческие и контрольные задания выполнялись в виде отдельных проб (рис. 1). На 300-й мс от начала каждой пробы предъявлялся текстовый стимул (пословица, тройка слов, словесное обозначение объекта/категории), длительность экспозиции которого составляла 400 мс. Слова в пословицах, тройки слов предъявлялись друг под другом (в две, три строки), чтобы уменьшить количество горизонтальных движений глаз во время чтения задания и создать сопоставимый зрительный паттерн при восприятии стимулов. Стимул сменялся точкой в центре экрана для фиксации взгляда. После предъявления стимула испытуемый (согласно инструкции) должен был найти ответ, мысленно его проговорить и нажать на кнопку мыши пальцем правой руки. Инструкция мысленной вербализации ответа была введена для уменьшения количества “ложных нажатий”, когда испытуемый обозначает наличие ответа, но затем не в состоянии его озвучить. Подобные пробы были единичными и исключались из последующего анализа ВП. Если ответ не был найден – нажимать на кнопку было не надо. На 5100 мс предъявлялся знак вопроса (“?”) длительностью предъявления 100 мс. После предъявления вопроса испытуемые должны были озвучить вслух свой ответ или сказать “нет”, если ответ не был найден. Длительность интервала между пробами варьировала в пределах от 1500 до 2500 мс.

Регистрация ЭЭГ/ВП. При выполнении заданий ПОСЛОВИЦЫ и ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ регистрация ЭЭГ проводилась от 31 AgCl электрода (Fp1, Fpz, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, FT7, FC3, FCz, FC4, FT8, T3, C3, Cz, C4, T4, TP7, CP3, CPz, CP4, TP8, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, Oz, O2), при выполнении задания НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ – от 15 электродов (Fpz, F7, F3, Fz, F4, F8, C3, C4, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2) с использованием 32-канального цифрового электроэнцефалографа “Мицар” (ООО “Мицар”, Санкт-Петербург) при помощи программного пакета WinEEG (Пономарев В.А., Кропотов Ю.Д., № государственной регистрации 2001610516 от 08.05.2001). Референтный электрод располагался на мочках обеих ушей, заземляющий электрод – в передне-центральной отведении на поверхности головы. Сопротивление электродов не

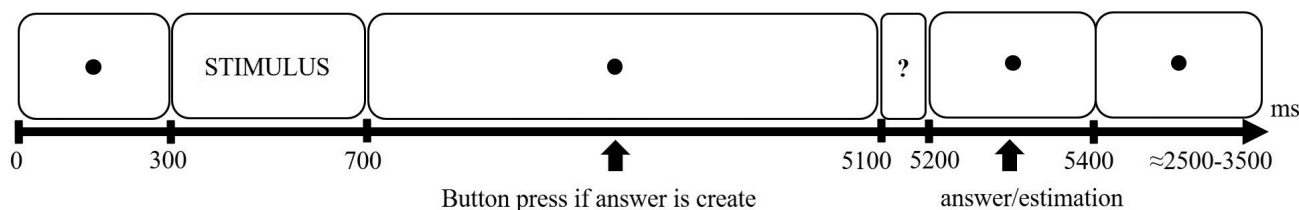


Рис. 1. Схема пробы.

превышало 5 кОм, частота квантования сигналов 500 Гц. ЭЭГ анализировали в полосе 1.6 Гц – 30 Гц.

Предобработка ЭЭГ/ВП. Артефакты, связанные с движением глаз, удалялись при помощи обнуления соответствующих независимых компонент [27–29]. Далее в ЭЭГ записях автоматически помечались и исключались из дальнейшего анализа пробы с артефактами движения глаз, с медленными волнами (0–1 Гц с амплитудой больше 50 мкВ), быстрыми волнами (20–35 Гц с амплитудой выше 35 мкВ), фрагменты ЭЭГ с амплитудой сигнала больше 100 мкВ [30].

Анализ ВП. В творческих и контрольных заданиях для расчета ВП учитывали только те пробы, где испытуемый давал ответ с нажатием кнопки. Для каждого испытуемого и каждого отведения рассчитывали индивидуальные усредненные ВП в окне от –300 до 2000 мс от начала предъявления стимула для отдельных типов творческих и контрольных заданий (Pr, RAT, AUT, PrM, CAT). Временные интервалы и зоны интереса для статистического анализа определяли по полумаксимуму разностных волн для каждого сравнения.

Статистический анализ. Так как ЭЭГ при выполнении заданий регистрировалась от разного количества электродов, статистический анализ различий ВП проводился в два этапа.

Первое сравнение включало в себя задания: придумать оригинальное окончание пословицы (Pr), вспомнить общеизвестное окончание пословицы (PrM), и найти слово, подходящее к трем предъявленным понятиям (RAT). Для статистического анализа использовался дисперсионный анализ ANOVA для повторных исследований с оценкой главных эффектов факторов и взаимодействия между ними: внутригруппового фактора ЗОНА (31 отведение) и межгруппового фактора ЗАДАНИЕ (3 задания). Временные интервалы различий амплитуд ВП также выделяли по полумаксимумам разностной волны между сравниваемыми заданиями. Было выделено 2 временных интервала для оценки: 280–346 мс и 698–786 мс после предъявления стимула.

Второе сравнение включало в себя все задания: придумать оригинальное окончание пословицы (Pr), вспомнить общеизвестное окончание пословицы (PrM), найти слово, подходящее к трем предъявленным (RAT), придумать необычное исполь-

зование (AUT), перечислить объекты из заданной категории (CAT). Использовался дисперсионный анализ ANOVA для повторных исследований для оценки главных эффектов факторов и взаимодействия между ними: внутригрупповой фактор ЗОНА (15 отведений) и межгрупповой фактор ЗАДАНИЕ (5 заданий). Было выделено 2 временных интервала для оценки: 200–296 мс и 524–624 мс.

Проводился расчет следующих поведенческих показателей выполнения заданий: (1) время ответа – время (мс) от начала предъявления стимула до нажатия на кнопку (обозначение нахождения ответа). Время ответа оценивалось в каждой пробе каждого задания и усреднялось для каждого участника и по группе; (2) количество ответов – рассчитывался процент найденных ответов (при нажатии на кнопку и наличии озвученного ответа) от общего количества предъявленных проб в каждом задании.

Для поведенческих показателей оценивалось соответствие распределения нормальному (с использованием критерия Шапиро–Уилкса) и использовался соответствующий критерий параметрической или непараметрической статистики: ANOVA или ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса и медианный тест для сравнения нескольких независимых групп. Анализ проводился в программном пакете Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведенческие данные. При выполнении заданий оценивали количество ответов (процент проб с ответами от всего количества проб данного класса) и время ответа (время нажатия на кнопку от момента предъявления стимула).

Время ответа при выполнении каждого из заданий не отклонялось от нормального распределения согласно критерию Шапиро–Уилкса. В соответствии с критерием Шапиро–Уилкса также не было выявлено отклонения распределения количества ответов от нормального – во всех заданиях, кроме CAT (перечислить объекты из категорий). В задании CAT количество ответов было больше 80% у большинства участников. Соответственно, для сравнения времени ответа между заданиями использовался дисперсионный анализ (сравнение

Таблица 1. Показатели выполнения тестовых заданий (M±SD).

Задание	Количество ответов, %	Время ответа, мс
Pr (придумать окончание пословиц)	53 ± 22	3207 ± 437
PrM (воспроизвести окончание пословицы)	70.5 ± 14.5	2027 ± 475
RAT (отдаленные ассоциации)	43 ± 20	2946 ± 486
AUT (необычное использование)	59 ± 17	2042 ± 536
CAT (объекты из категорий)	85 ± 11 (87, 81–93)*	1678 ± 494

Примечание: * распределение не соответствует нормальному. Дополнительно приведены медиана и квартили распределения.

независимых групп), для сравнения количества ответов использовался Критерий Краскела–Уоллиса и медианный тест. Время ответа различалось между заданиями: $F_{(4, 240)} = 77.2$, $p < 0.001$. Количество ответов также значимо отличалось между заданиями: по критерию Краскела–Уоллиса – $H_{(4, 245)} = 114.2$, $p < 0.001$. На рис. 2 приведены результаты апостериорных анализов: LSD критерия Фишера для времени ответа и медианного теста для количества ответов.

В контрольных заданиях PrM и CAT наблюдается значимая отрицательная корреляция (по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена) между количеством ответов и временем ответа: $r_s = -0.36$, $p < 0.05$ и $r_s = -0.24$, $p < 0.05$ соответственно. Среди творческих заданий, только в модели дивергентного мышления (AUT) наблюдалась значимая отрицательная корреляция между количеством ответов и временем ответа: $r_s = -0.27$, $p < 0.05$. Так как время ответа оценивалось в каждой пробе, а количество ответов – это общий процент ответов из ста возможных в задании, – отрицательная корреляция этих показателей отражает, вероятно, общую беглость мышления.

Сравнение заданий ПОСЛОВИЦЫ и ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИИИ. Выявлен значимый эффект взаимодействия факторов ЗАДАНИЕ \times ЗОНА во временном интервале 280–346 мс: $F_{(60, 3180)} = 3.0$, $\epsilon(G-G) = 0.11$, $p < 0.006$. Между творческими заданиями (Pr “найти оригинальное окончание пословицы” и RAT “найти слово, ассоциирующееся с тремя предъявленными”) различия выявлены в лобных областях F3, Fz, FC3, FCz, FC4, в которых амплитуда была более негативной в задании Pr (пословицы),

чем в задании RAT (ассоциации) и в затылочных областях O1, Oz, O2, в которых амплитуда была выше в задании Pr, чем в задании RAT (Рис. 3, I). В контрольном задании PrM (вспомнить общеизвестное окончание пословицы) амплитуда была более негативной в отведении Fz и выше (позитивной) – в отведениях Oz, O2 по сравнению с заданием RAT (ассоциации).

На временном интервале 698–786 мс был значимым эффект фактора ЗАДАНИЕ: $F_{(2, 106)} = 3.3$, $p < 0.04$. В этом интервале амплитуда при выполнении контрольного задания PrM “вспомнить общеизвестное окончание пословицы” была выше по сравнению с обоими творческими заданиями Pr “найти оригинальное окончание пословицы” и RAT “найти слово, ассоциирующееся с тремя предъявленными” (см. рис. 3, II).

Сравнение заданий ПОСЛОВИЦЫ, ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИИИ и НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ. В модели НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ (придумать необычное использование предмета и перечислить объекты из категории) выявлена большая амплитуда компонента P2 по сравнению с моделями ПОСЛОВИЦЫ и ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИИИ. На интервале 200–296 мс эффект фактора ЗАДАНИЕ: $F_{(4, 248)} = 9.7$, $p < 0.0001$ (см рис. 4, I).

В интервале 524–624 мс различия в лобных областях обусловлены увеличением латентности позднего положительного компонента, а в затылочных и теменных областях – его большей амплитудой (см рис. 4, II). Эффект взаимодействия факторов ЗАДАНИЕ \times ЗОНА: $F_{(56, 3472)} = 7.2601$, $\epsilon(G-G) = 0.21$, $p < 0.0001$.

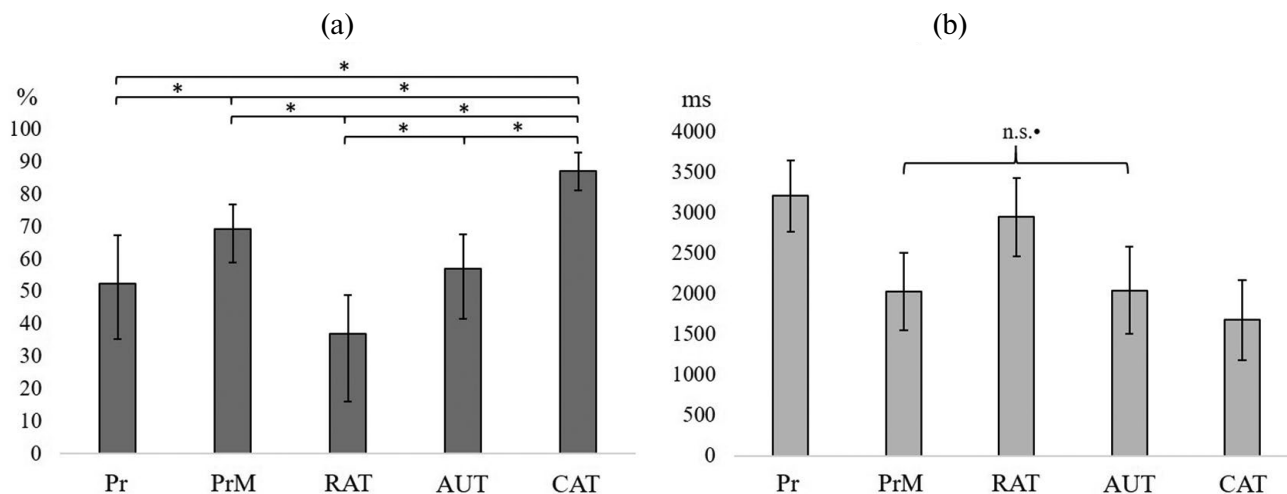


Рис. 2. Количество ответов (а) и время ответа (б) в творческих и контрольных заданиях.

По оси X – задания: Pr – придумать оригинальное окончание пословицы, меняющее ее смысл; PrM – назвать общеизвестное окончание пословицы; RAT – найти слово, употребимое с каждым из трех предъявленных; AUT – придумать оригинальные способы употребления обычных предметов; CAT – перечислить объекты из категорий. По оси Y – процент ответов, % (а), время ответа, мс (б). На рис. (а) – количество ответов (%) медианы и 2–3 квартили, скобки обозначают различия между заданиями ($p < 0.05$). На рис. (б) – время ответа (мс), среднее и стандартное отклонение. Время ответа во всех заданиях отличается друг от друга, за исключением обозначенного (n. s. •) сравнения (PrM vs AUT).

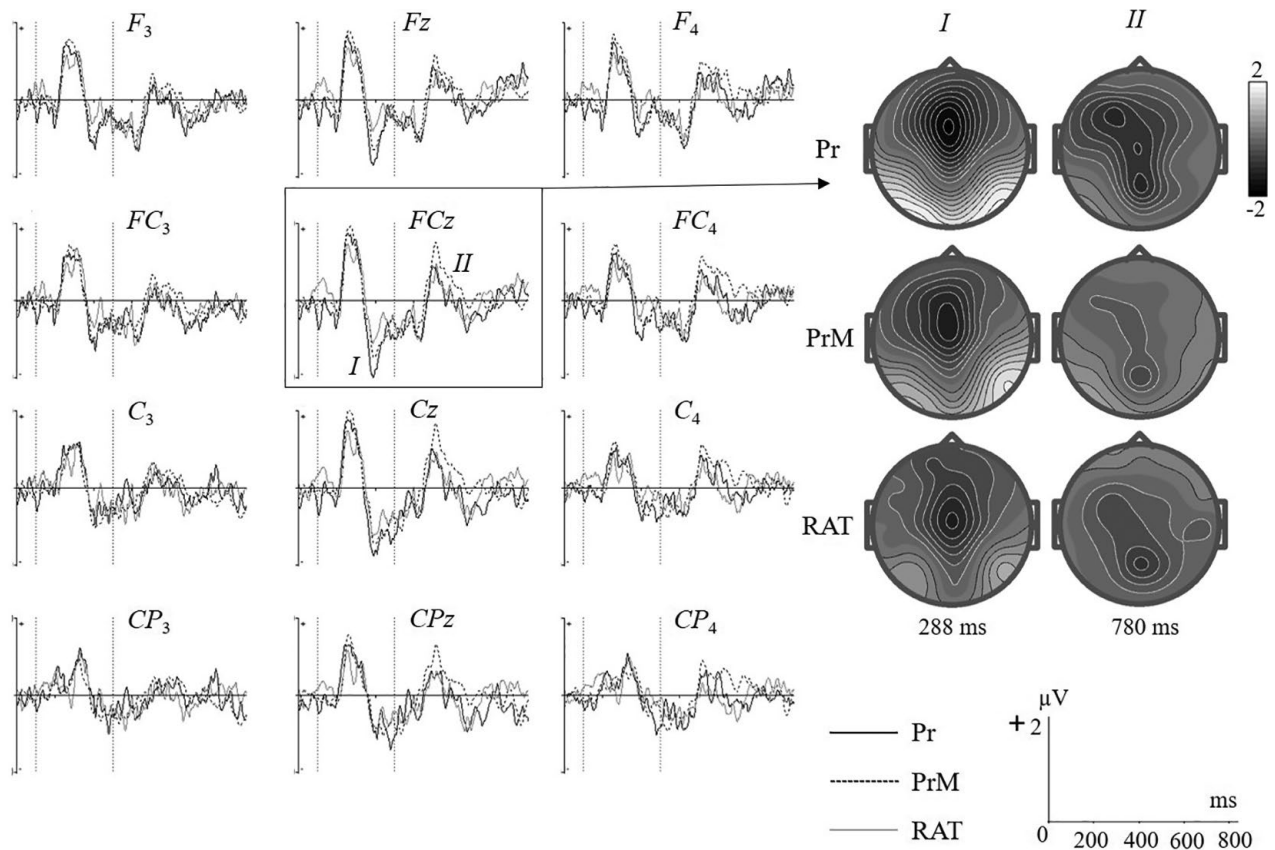


Рис. 3. Вызванные потенциалы при выполнении заданий в моделях ПОСЛОВИЦЫ и ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ. Черная линия – задание Pr, “придумать оригинальное окончание пословицы”; Черная пунктирная линия – задание PrM, “вспомнить общеизвестное окончание пословицы”; Серая линия – задание RAT, “найти слово, которое может употребляться с каждым из трех предъявленных”. F3–CP4 – позиции электродов (модифицированная система 10/10). На каждом графике по оси x – время (мс), по оси y – амплитуда (мкВ). Топограммы представляют распределение амплитуд в указанный момент времени в выделенных интервалах различий: (I) – 280–346 мс, (II) – 698–786 мс.

Таблица 2. Результаты апостериорного сравнения амплитуд ВП между моделями ПОСЛОВИЦЫ, ОТДАЛЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ и НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ во временном интервале 524–624 мс.

Задания	AUT	CAT
Pr	Fz , T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2	Fpz , Fz , T6, O1, O2
PrM	F3 , Fz , F4 , T5, P4, T6, O1, O2	Fpz , F3 , Fz , F4 , C3, T6, O1, O2
RAT	Fz , T5, P3, P4, T6, O1, O2	F3 , Fz , T6, O1, O2

Примечание: Приведены названия электродов, для которых апостериорный анализ (LSD критерия Фишера) выявил значимые эффекты в соответствующих сравнениях. Жирным шрифтом выделены электроды, амплитуда ВП, в которых была более позитивной в первом из сравниваемых состояний (например, в Pr относительно AUT).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Творческие задания, использованные в этом исследовании, разработаны для оценки разных аспектов вербальной творческой деятельности. Уже на уровне поведенческих данных о времени ответа и количестве ответов можно сделать предположение о вовлечении различных управляющих систем в процесс творческой деятельности. Наибольшее время ответа (3207 ± 437 мс) наблюдалось при выполнении творческого задания (Pr) в модели ПОСЛОВИЦЫ. В этом задании (Pr) на первый план выходила не-

обходимость затормозить стереотип долговременной памяти – то есть отказаться от общеизвестного окончания пословицы и придуматься свое. Особо подчеркивалась задача изменить первоначальный смысл пословицы. При выполнении задания Pr наблюдается большая амплитуда негативной волны на интервале 280–346 мс в сравнении с заданием RAT в лобных областях коры. В этом временном интервале рассматриваемые различия, с одной стороны, могут быть соотнесены с семейством компонентов N200 – негативной волной с максимумом амплитуды

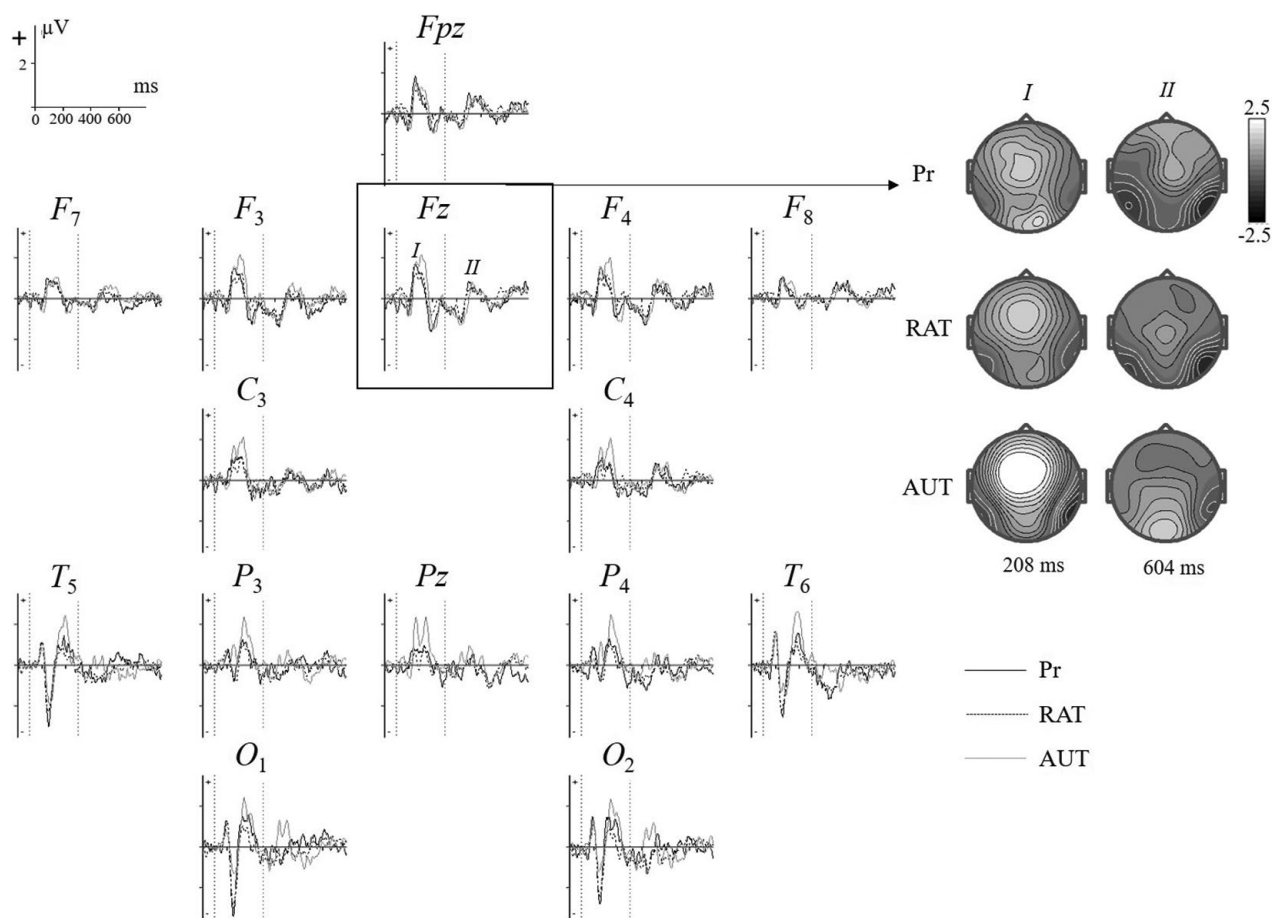


Рис. 4. Вызванные потенциалы при выполнении творческих заданий в моделях ПОСЛОВИЦЫ, АССОЦИИИ, НЕОБЫЧНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ.

Черная линия – задание Pr, “придумать оригинальное окончание пословицы”; черная пунктирная линия – задание RAT, “найти слово, которое может употребляться с каждым из трех предъявленных”; серая линия – задание AUT, “придумать оригинальные способы употребления объектов”. Fpz-O2 – позиции электродов (модифицированная система 10/20). На каждом графике по оси x – время (мс), по оси y – амплитуда (мкВ). Топограммы представляют распределение амплитуд в указанный момент времени в выделенных интервалах различий: (I) – 200–296 мс, (II) – 524–624 мс.

на интервале от 200 до 350 мс [31]. Данный компонент ВП связан с механизмами когнитивного контроля, его амплитуда в лобных областях увеличивается в пробах с подавлением ответа (предъявлением неконгруэнтного стимула) в парадигме Go-NoGo, данный компонент интерпретируется как отражающий обнаружение конфликтной информации [31] и проактивный когнитивный контроль в задачах, связанных с эффектом Струпа [32] Вместе с тем в ряде исследований при оценке семантического содержания стимулов авторы выделяют компонент N300, амплитуда которого более негативна при несопадении смыслового содержания двух стимулов, предъявляемых последовательно. Компонент N300 имеет центрально-лобное распределение и рассматривается в исследованиях, связанных с оценкой семантического содержания изображений и их категоризацией [33, 34]. В исследовании [35] большая негативность N300 во временном интервале 280–360 мс наблюдалась при несопадении изображения машины и словесной метафоры, обозначающей животно-

го. Компонент N300 связывали и с семантическим праймингом, в исследованиях которого амплитуда N300 в лобных областях была более негативна для семантически несвязанных слов по сравнению со связанными [36]. Максимум амплитуды компонента N300 в отличие от более позднего семантического компонента N400 имеет центрально-лобное распределение. Амплитуда более позднего семантического компонента N400, локализация максимума которого наблюдается в центральных и теменных областях, рядом авторов соотносится с увеличением сложности интеграции новой семантической информации в контекст и процессами торможения семантической информации [37] и имеющегося знания [38]. В исследовании Debrulle и соавт. [38] в задаче соотнесения смысла двух слов, предъявляемых последовательно (второго, третьего) направленное внимание к дистрактору (слову, предъявленному первым в самом начале) увеличивало время реакции, если смысл целевого слова был связан с дистрактором, но не со смыслом слова-прайма. Заданное

инструкцией игнорирование слова-дистрактора приводило к большей негативности компонента N400 в ответ на это слово. Авторы предположили, что компонент N400 отражает не столько процессы семантической интеграции, сколько процессы торможения семантического знания. Мы предполагаем, что в нашем исследовании при создании оригинального окончания пословицы в первую очередь необходимо было затормозить стереотип долговременной памяти – общеизвестный смысл пословицы. Так как в нашем задании тормозился смысл не одного слова, а всей фразы (пословицы), данное торможение может соотноситься с эффектом большей негативности отрицательного компонента во временном окне N200/N300, наблюдаемым при рассогласовании смысла слов (можно обозначить как “эффект Струпа в семантическом поле”). Так, бóльшая негативность N300 наблюдалась при рассогласовании смысла слова (обозначающего цветной предмет) и цвета шрифта, не соответствующего типичному цвету этого предмета [39, 40]. В нашем исследовании амплитуда наблюдаемого негативного компонента с латентностью 280–346 мс была наименьшей при выполнении задания RAT, в котором, вероятно, на ранних этапах поиска ассоциаций происходит не торможение нерелевантных ассоциаций, а, напротив, активация семантического поиска.

В задании RAT время принятия решения также было достаточно большим (2946 ± 486 мс) и не коррелировало с количеством найденных ответов, как и в задании Pr. Мы можем предположить, что в этих двух моделях творческой деятельности в меньшей степени задействуется фактор беглости вербального мышления или извлечения из памяти. В контрольном задании (вспомнить общеупотребимое окончание пословицы, PrM) – наблюдается отрицательная корреляция между количеством ответов и временем ответа в каждой отдельной пробе, указывающая, вероятно, на связь беглости извлечения из памяти и продуктивности выполнения данного задания. В исследовании Wang и соавт. [41] изучали влияния перцептивной и понятийной беглости на ВП при извлечении из памяти и выявили, что перцептивная беглость влияет на амплитуды ВП в интервале 100–200 мс, тогда как понятийная беглость влияет на амплитуды ВП на интервале 300–700 мс. При вспоминании и узнавании ранее предъявленных объектов, на которые создавался понятийный прайминг: амплитуда ВП в лобных областях была выше на интервале 300–500 мс, по сравнению с условием отсутствием прайминга. В теменных областях понятийный прайминг приводил к уменьшению латентности пика амплитуды поздней положительной волны и увеличению ее амплитуды на интервале 500–700 мс. В нашем исследовании вспоминание последнего слова пословицы (PrM),

по-видимому, актуализирует весь ее смысл и может соотноситься с достаточно поздними эффектами в ВП.

Далее, в нашем исследовании различия между творческими заданиями Pr и RAT и контрольным заданием (вспомнить окончание пословицы, PrM) наблюдались на интервале 698–786 мс, в котором амплитуда была ниже при выполнении обоих творческих заданий по сравнению с контрольным (PrM). Данный эффект при выполнении творческих задач, вероятно, сопоставим с результатами исследования [42], где были выявлены меньшие значения амплитуд поздних компонентов ВП на интервале 500–900 мс при восприятии новых метафор и бессмысленных фраз по сравнению с обычными (неоригинальными/контрольными) осмысленными фразами. В исследовании [43] амплитуды поздних компонентов ВП для усредненных центральных и теменных зон во временном окне 500–900 мс по мнению авторов были чувствительны к процессам семантической интеграции и расширения концепций, так как при установлении связи между ранее несвязанными понятиями (оценка оригинального использования предмета) амплитуда ВП была ниже, чем при восприятии давно установленного смысла (обычное, неоригинальное использование). В теменных областях на временном интервале 500–900 мс в исследовании [42] при творческой деятельности наблюдалась более негативная волна, что, согласно мнению авторов, свидетельствовало о продолжающихся процессах семантического поиска.

В приведенных работах участники оценивали предъявленные им варианты оригинальных и не оригинальных фраз, в отличие от нашего исследования, в котором участники сами должны были придумать новый смысл (задание ПОСЛОВИЦЫ) или открыть для себя новые ассоциации (задание RAT). В нашем исследовании, по сравнению с приводимыми выше, различия имели более фронтальное распределение. Мы предполагаем, что бóльшая амплитуда в контрольном задании “вспомнить общеизвестное окончание пословицы (PrM)” может отражать механизмы семантической интеграции и долговременной памяти. Так, согласно литературным данным, амплитуда позднего положительного компонента в лобных областях коры (600–800 мс) была выше при восприятии идиоматических выражений (закрепленных в памяти) по сравнению с буквальными фразами в исследовании [44].

В контрольном задании (PrM) по сравнению с обеими творческими задачами (Pr, RAT) время ответа было значимо меньше (2027 ± 475 мс по сравнению с 3207 ± 437 мс и 2946 ± 486 мс) и наблюдалась значимая связь между скоростью ответа, свидетельствующая о влиянии когнитивной беглости на выполнение задания на память.

При общем сравнении творческих заданий на преодоление стереотипа (Pr) и поиск отдаленных ассоциаций (RAT) с заданием “придумать необычное использование” (AUT) наблюдаются более низкие амплитуды положительного компонента ВП на временном интервале 200–296 мс, что может соответствовать компоненту P200. В лингвистических исследованиях показано увеличение амплитуды P200 при повторном предъявлении слов [45]. Одно из объяснений заключается в том, что амплитуда P200 обратно коррелирует со степенью ко-активации среди лексических слов-кандидатов [46] и при повторении слова такая ко-активация снижается. Тем не менее, мы не можем связать амплитуду P200 только с лексическими процессами, так как в условиях выравненного по частоте предъявления AUT (одинаково частого) амплитуда P200 также была ниже при выполнении заданий в условиях совместной деятельности по сравнению с индивидуальной [23]. Уменьшение амплитуды P200 в условиях социального взаимодействия могло быть связано с перераспределением фокуса внимания от восприятия и обработки стимулов в задаче к обработке социальных сигналов. В задачах придумать собственное оригинальное окончание пословицы (Pr) и найти отдаленные ассоциации (RAT) наблюдается и ко-активация различных конкурирующих лексических единиц и торможение первых распространенных ассоциаций, что, по-видимому, отражается в более низкой амплитуде компонента P2. Задание на дивергентное мышление (придумать необычное использование AUT), отличается от других творческих заданий меньшей длительностью ответа (2042 ± 536 мс по сравнению с 3207 ± 437 мс и 2946 ± 486 мс) и обратной корреляцией скорости ответа и количества ответов, свидетельствуя о связи творческой продуктивности при дивергентном мышлении с когнитивной беглостью. В задневисочных и затылочных областях амплитуда позднего компонента (524–624 мс) была выше при создании необычных способов употребления предметов (AUT) по сравнению с остальными творческими заданиями (RAT, Pr). Мы предполагаем, что при выполнении данного задания возможно привлечение механизмов зрительного воображения при продумывании способов использования обычных объектов. Известно, что при сравнении вспоминания конкретных и абстрактных слов наблюдается большая амплитуда на временном интервале 500–700 мс и 700–1000 мс при восприятии конкретного слова (обозначающего предметы, которые могут быть зрительно представлены) [47]. В нашем исследовании, одной из основных стратегий придумывания способов использования предметов, вероятно, является представление (в том числе, зрительного) конкретных условий и способов использования, тогда как и смысл пословиц, и отдаленные ассоциации – более абстрактные понятия.

В проведенном исследовании мы рассматривали начальные стадии обработки информации при выполнении разных типов творческих заданий (различия ВП до 800 мс). В эти этапы, вероятно, входит процесс торможения первоначально возникающих ассоциаций вербальной долговременной памяти, процессы семантической интеграции и зрительного воображения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование было направлено на выявление различий ВП при разных типах творческой деятельности – выполнении заданий, направленных на вовлечение дивергентного мышления, ассоциативного мышления и преодоления стереотипа долговременной памяти. Большая негативность компонента с латентностью N300, вероятно, отражает торможение долговременного стереотипа, что соотносится с выполнением творческого задания пословицы (Pr) – придумать окончание, меняющее смысл пословицы. Семантический поиск и интеграция новой информации в сравнении с извлечением известной информации из памяти (PrM) характеризовались меньшими значениями амплитуды позднего компонента ВП на интервале 698–786 мс в заданиях пословицы (Pr) и отдаленные ассоциации (RAT). Продуктивность выполнения творческого задания на дивергентное мышление (AUT), так же как и контрольного задания (перечислить предметы из категории, CAT) была, по-видимому, связана с вербальной беглостью, на что указывает отрицательная корреляция между количеством ответов и временем ответа, в то время как выполнение других творческих заданий не характеризовалось подобными закономерностями. При выполнении заданий Pr и RAT на интервале 524–624 мс в теменных и затылочных областях выявлена меньшая амплитуда (более отрицательная) по сравнению с заданием AUT, что может быть связано с продолжающимися процессами семантического синтеза, так как время принятия решения в данных заданиях было значительно дольше, чем в задании AUT (3207 ± 437 мс и 2946 ± 486 мс по сравнению с 2042 ± 536 мс). Большая амплитуда поздних компонентов в теменных областях (и положительная волна в затылочных областях) при дивергентном мышлении (AUT) может соответствовать большей образности данного задания по сравнению с более вербально-абстрактными заданиями на ассоциации и изменение смысла пословиц. Так как время обозначения нахождения ответа в разных творческих заданиях происходило от 2000 до 3000 мс, а в статье рассматриваются различия до 800 мс, мы можем заключить, что на сравнительно ранних этапах обработки информации в вербальных творческих заданиях проявляется специфика ВП для разных моделей творческой деятельности при сходных условиях предъявления.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Вклад авторов: идея работы и планирование экспериментов (Н.В.Ш.), регистрация, обработка и анализ данных (Н.В.Ш., Ж.В.Н.), написание и редактирование рукописи (Н.В.Ш., Ж.В.Н.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проведенные с участием испытуемых исследования, соответствовали этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. Испытуемые давали добровольное информированное согласие на участие в исследованиях. Процедуры были одобрены Этическим комитетом института (ИЭФБ РАН) – № 2-02 от 02.02.2022.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-28-02073).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Runco MA, Jaeger GJ* (2012) The standard definition of creativity. *Creat Res J* 24: 92–96. <https://doi.org/10.1080/10400419.2012.650092>
2. *Guilford JP* (1967) *The Nature of Human Intelligence*. New York: McGraw-Hill.
3. *Guilford JP* (1962) Potentiality for creativity. *Gifted Child Quarterly* 6: 87–90.
4. *Torrance EP* (2000). *Research review for the Torrance Tests of Creative Thinking Figural and Verbal forms A and B*. Bensenville, IL: Scholastic Testing Services.
5. *Mednick S* (1962). The associative basis of the creative process. *Psychol Rev* 69:220–232. <https://doi.org/10.1037/h0048850>
6. *Wu CL, Huang SY, Chen PZ, Chen HC* (2020) A Systematic Review of Creativity-Related Studies Applying the Remote Associates Test From 2000 to 2019. *Front Psychol* 11:573432. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.573432>
7. *Vitrano D, Altarriba J, Leblebici-Basar D* (2021) Revisiting Mednick's (1962) Theory of Creativity with a Composite Measure of Creativity: The Effect of Stimulus Type on Word Association Production. *J Creat Behavior* 55: 925–936. <https://doi.org/10.1002/jocb.498>
8. *Бехтерева НП* (2006) Магия творчества и психофизиология. Факты, соображения, гипотезы. СПб: Изд-во “Институт мозга человека РАН” 79. [*Bekhtereva NP* (2006) The magic of creativity and psychophysiology. Facts, considerations, hypotheses. St. Petersburg: Publishing house “Institute of Human Brain RAS” 79. (In Russ)].
9. *Ушаков ДВ* (2011) Психология интеллекта и одаренности. М.: Изд-во “Институт психологии РАН” 464. [*Ushakov DV* (2011) *Psychology of intelligence and talent*. M.: Publishing house “Institute of Psychology RAS” 464. (In Russ)].
10. *Bechtereva NP* (2009) The usefulness of psychophysiology in the maintenance of cognitive life. *Int J Psychophysiol* 73:83–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2008.03.016>
11. *Kraus B, Cadle C, Simon-Dack S* (2019) EEG alpha activity is moderated by the serial order effect during divergent thinking. *Biol Psychol* 145:84–95. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2019.04.003>
12. *Agnoli S, Zanon M, Mastroia S, Avenanti A, Corazza GE* (2020) Predicting response originality through brain activity: An analysis of changes in EEG alpha power during the generation of alternative ideas. *Neuroimage* 207:116385. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116385>
13. *Wang M, Hao N, Ku Y, Grabner RH, Fink A* (2017) Neural correlates of serial order effect in verbal divergent thinking. *Neuropsychologia* 99:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2017.03.001>
14. *Nagy B, Czigler I, Csizmadia P, File D, Fáy N, Gaál ZA* (2023) Investigating the involvement of cognitive control processes in innovative and adaptive creativity and their age-related changes. *Front Hum Neurosci* 17:1033508. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1033508>
15. *Benedek M, Schickel RJ, Jauk E, Fink A, Neubauer AC* (2014) Alpha power increases in right parietal cortex reflects focused internal attention. *Neuropsychologia* 56:393–400. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2014.02.010>
16. *Heinonen J, Numminen J, Hlushchuk Y, Antell H, Taatila V, Suomala J* (2016). Default Mode and Executive Networks Areas: Association with the Serial Order in Divergent Thinking. *PLoS One* 11: e0162234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162234>
17. *Zabelina DL, Friedman NP, Andrews-Hanna J.* (2019) Unity and diversity of executive functions in creativity. *Conscious Cogn* 68:47–56. <https://doi.org/10.1016/j.concog.2018.12.005>
18. *Palmiero M, Fusi G, Crepaldi M, Borsa VM, Rusconi ML* (2022) Divergent thinking and the core executive functions: a state-of-the-art review. *Cogn Process* 23:341–366. <https://doi.org/10.1007/s10339-022-01091-4>
19. *Shemyakina NV, Danko SG, Nagornova ZhV, Starchenko MG, Bechtereva NP* (2007) Changes in the power and coherence spectra of the EEG rhythmic components during solution of a verbal creative task of overcoming a stereotype. *Hum Physiol* 33: 524–530. <https://doi.org/10.1134/S0362119707050027>
20. *Shemyakina NV, Nagornova ZV* (2020) Does the Instruction “Be Original and Create” Actually Affect the EEG Correlates of Performing Creative Tasks? *Hum Physiol* 46: 587–596. <https://doi.org/10.1134/S0362119720060092>
21. *Bowden EM, Jung-Beeman M* (2003) Normative data for 144 compound remote associate problems. *Behav Res Methods Instrum Comput* 35:634–639. <https://doi.org/10.3758/bf03195543>

22. *Razumnikova OM* (2007) Creativity related cortex activity in the remote associates task. *Brain Res Bull* 73:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.02.008>
23. *Nagornova ZV, Galkin VA, Vasenkina VA, Grokhotova AV, Shemyakina NV* (2022). Neurophysiological Characteristics of Alternative Uses Task Performance by Means of ERP and ERS/ERD Data Analysis Depending on the Subject's Productivity and Originality Levels. *Hum Physiol* 48: 609–632. <https://doi.org/10.1134/S036211972270013X>
24. *Shemyakina NV, Nagornova ZhV* (2020) Event-related changes in EEG spectral power corresponding to creative and trivial decisions. *Russ J Physiol* 106:880–889. <https://doi.org/10.31857/S0869813920070067>
25. *Shemyakina NV, Nagornova ZV* (2019) EEG “Signs” of Verbal Creative Task Fulfillment with and without Overcoming Self-Induced Stereotypes. *Behav Sci (Basel)* 10(1):17. <https://doi.org/10.3390/bs10010017>
26. *Воронин АН, Галкина ТВ* (1994) Диагностика вербальной креативности (адаптация теста Медника). Методы психологической диагностики. Сборник статей. Выпуск 2. Отв. ред. А.Н. Воронин. М: Изд-во “Институт психологии РАН”: 40–81.
27. *Vigario RN* (1997) Extraction of ocular artefacts from EEG using independent component analysis. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 103(3): 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0013-4694\(97\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0013-4694(97)00042-8)
28. *Jung TP, Makeig S, Humphries C, Lee TW, McKeown MJ, Iragui V, Sejnowski TJ* (2000) Removing electroencephalographic artifacts by blind source separation. *Psychophysiology* 37:163–178. <https://doi.org/10.1111/1469-8986.3720163>
29. *Tereshchenko EP, Ponomarev VA, Kropotov YD, Müller A* (2009) Comparative efficiencies of different methods for removing blink artifacts in analyzing quantitative electroencephalogram and event-related potentials. *Hum Physiol* 35:241–247. <https://doi.org/10.1134/S0362119709020157>
30. *Kozhushko NJ, Nagornova ZV, Evdokimov SA, Shemyakina NV, Ponomarev VA, Tereshchenko EP, Kropotov JD* (2018) Specificity of spontaneous EEG associated with different levels of cognitive and communicative dysfunctions in children. *Int J Psychophysiol* 128:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2018.03.013>
31. *Folstein JR, Van Petten C* (2008) Influence of cognitive control and mismatch on the N2 component of the ERP: a review. *Psychophysiology*. 45:152–170. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2007.00602.x>
32. *Hinault T, Larcher K, Zazubovits N, Gotman J, Dagher A* (2019) Spatio-temporal patterns of cognitive control revealed with simultaneous electroencephalography and functional magnetic resonance imaging. *Hum Brain Mapp* 40:80–97. <https://doi.org/10.1002/hbm.24356>
33. *McPherson WB, Holcomb PJ* (1999) An electrophysiological investigation of semantic priming with pictures of real objects. *Psychophysiology* 36:53–65. <https://doi.org/10.1017/s0048577299971196>
34. *Hamm JP, Johnson BW, Kirk IJ* (2002) Comparison of the N300 and N400 ERPs to picture stimuli in congruent and incongruent contexts. *Clin. Neurophysiol* 113:1339–1350. [http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2457\(02\)00161-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-2457(02)00161-X)
35. *Ma Q, Hu L, Xiao C, Bian J, Jin J, Wang Q* (2016) Neural correlates of multimodal metaphor comprehension: Evidence from event-related potentials and time-frequency decompositions. *Int J Psychophysiol* 109:81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2016.09.007>
36. *Franklin MS, Dien J, Neely JH, Huber E, Waterson LD* (2007) Semantic priming modulates the N400, N300, and N400RP. *Clin Neurophysiol* 118:1053–1068. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2007.01.012>
37. *Debruille JB* (2007) The N400 potential could index a semantic inhibition. *Brain Res Rev* 56:472–477. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.001>
38. *Debruille JB, Ramirez D, Wolf Y, Schaefer A, Nguyen TV, Bacon BA, Renoult L, Brodeur M* (2008) Knowledge inhibition and N400: a within- and a between-subjects study with distractor words. *Brain Res* 1187:167–183. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.021>
39. *Xiao X, Qiu J, Zhang Q* (2009) The dissociation of neural circuits in a Stroop task. *Neuroreport* 20:674–678. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832a0a10>
40. *Wei D, Qiu J, Tu S, Tian F, Su Y, Luo Y* (2010) Earthquake experience interference effects in a modified Stroop task: an ERP study. *Neurosci Lett* 474:121–125. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.03.005>
41. *Wang W, Li B, Gao C, Guo C* (2018) The temporal dynamics of perceptual and conceptual fluency on recognition memory. *Brain Cogn* 127:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2018.07.002>
42. *Abraham A, Rutter B, Hermann C* (2021) Conceptual expansion via novel metaphor processing: An ERP replication and extension study examining individual differences in creativity. *Brain Lang* 221:105007. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2021.105007>
43. *Kröger S, Rutter B, Hill H, Windmann S, Hermann C, Abraham A* (2013) An ERP study of passive creative conceptual expansion using a modified alternate uses task. *1Brain Res* 1527:189–198. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.007>
44. *Proverbio AM, Crotti N, Zani A, Adorni R* (2009) The role of left and right hemispheres in the comprehension of idiomatic language: an electrical neuroimaging study. *BMC Neurosci* 10:116. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-116>
45. *Petten CV, Kutas M, Kluender R, Mitchiner M, McIsaac H* (1991) Fractionating the word repetition effect with event-related potentials. *J Cogn Neurosci* 3:131–150. <https://doi.org/10.1162/jocn.1991.3.2.131>
46. *Hsu CH, Lee CY* (2023) Reduction or enhancement? Repetition effects on early brain potentials during visual word recognition are frequency dependent. *Front Psychol* 14:994903. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2023.994903>
47. *Peng Y, Liu Y, Guo C* (2019) Examining the neural mechanism behind testing effect with concrete and abstract words. *Neuroreport* 30:113–119. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001169>

EVENT RELATED BRAIN POTENTIALS' CHARACTERISTICS IN THE DIFFERENT MODELS OF VERBAL CREATIVE THINKING

N. V. Shemyakina^{a, #}, and Zh. V. Nagornova^a

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

[#] *e-mail: shemyakina_n@mail.ru*

The comparative study of three different models of creative thinking in unified event-related (ERP) paradigm is presented. The subjects (18–35 years old) performed the following tasks: PROVERBS (a divergent creative task to overcome stereotypes of long-term memory), REMOTE ASSOCIATIONS (a convergent creative task activating remote semantic fields), ALTERNATIVE USES TASK (a divergent creative task with the initiation of the associative search process). In the creative tasks, subjects required to create an original ending to a proverb (Pr), find a word that could be matched with three presented words from different semantic fields (RAT), invent original ways of using common objects (AUT). In the control tasks subjects were required to recall a well-known ending to a proverb (PrM), and to list/name objects from a given category (CAT). The ERP amplitudes were analyzed when comparing the tasks with each other. Greater negativity was observed for the N300 component in frontal regions (280–346 ms after stimuli onset) in the Pr task, which probably reflects inhibition of the patterns of long-term memory. In the Pr and RAT tasks, semantic retrieval and integration of new information versus retrieval of known information from memory (PrM) was characterized by lower amplitude values of late components at the 698–786 ms interval. The greater amplitude of late ERP components in parietal regions (524–624 ms) during divergent thinking (AUT) may correspond to the greater emergence of images in this task compared to more abstract RAT and Pr tasks. Thus, even in the early stages of information processing in verbal creative tasks performance, the specificity of different models of creative thinking is appears in the same temporal paradigm and similar visual stimuli presentation.

Keywords: EEG, event-related potentials (ERP), verbal creativity, remote association task (RAT), alternative uses task (AUT), proverbs, P200, late positivity

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БЕЛКА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ПОВЕРХНОСТИ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ)

© 2024 г. Р. Г. Сахабеев^{1,*}, Д. С. Поляков², Е. С. Сеницына³,
В. А. Коржиков-Влах^{3,4}, И. О. Багаева⁴, Е. Г. Коржикова-Влах³,
Т. П. Сесь⁵, В. С. Терешина¹, М. М. Шавловский²

¹ Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

* e-mail: helm505@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023

После доработки 09.01.2024

Принята к публикации 11.01.2024

Исследование направлено на оценку влияния состава и размера микро- и наночастиц (МЧ, НЧ) на иммуногенность связанного с ними белкового антигена. Для сравнительного анализа были получены МЧ и НЧ на основе поли(молочной кислоты) (ПМК) и блок-сополимера поли(этиленгликоля) с поли(молочной кислотой) (ПЭГ-*b*-ПМК). Для ковалентной модификации всех типов полимерных частиц был использован рекомбинантный белок слияния бета2-микроглобулин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder (β 2M-sfGFP). Иммунизация модельного белка β 2M-sfGFP проведена на поверхности частиц за счет реакции активированных сложных эфиров с аминокетонами белка. Иммунизация мышей с использованием комплексного антигена (белок β 2M-sfGFP, иммобилизованный на поверхности МЧ и НЧ разных составов) проводилась в четыре этапа. Иммуногенность оценивалась по уровню специфических антител к sfGFP с помощью иммуноферментного анализа. Результаты показали значительное увеличение уровня антител в контрольных группах, которые были иммунизированы смесью модельного белка и частиц разной природы и размеров, по сравнению с опытными группами, которые были иммунизированы конъюгатами соответствующих частиц с модельным белком. В опытных группах наибольшее количество специфических антител было выявлено в случае иммунизации мышей конъюгатом белка и НЧ на основе ПМК или ПЭГ-*b*-ПМК. Введение блока ПЭГ в состав ПМК не оказало существенного влияния на иммуногенность белка, в то время как размер частиц имел существенное значение. НЧ на основе ПМК или ПЭГ-*b*-ПМК демонстрировали более высокую иммуногенность по сравнению с МЧ таких же составов, что может быть использовано в практических целях для разработки вакцин (НЧ-белок) или “систем-ловушек” (МЧ-белок), связывающих проникающие в организм вирусы.

Ключевые слова: полимерные микро- и наночастицы, поли(молочная кислота), гуморальный иммунный ответ

DOI: 10.31857/S0044452924020034, **EDN:** XATDXM

ВВЕДЕНИЕ

Значительные достижения в области получения полимерных нано- и микрочастиц (НЧ и МЧ) стимулировали развитие биомедицинских материалов для доставки лекарств, включая ее адресный вариант [1]. На сегодняшний день носители на основе НЧ и МЧ находят все большее применение для создания вакцин [2, 3] и ловушек для элиминации различных патогенов и вирусов из кровотока [4, 5]. Все эти об-

ласти применения сопряжены с иммобилизацией на поверхности полимерных частиц нацеливающего лиганда, рецептора или антигена (в зависимости от поставленной задачи), которыми, как правило, являются белки [6] или (поли)пептиды [7]. Это может способствовать возникновению иммунного ответа при применении подобных систем *in vivo*. В отличие от области разработки вакцин, требующей наличие и усиление иммунного ответа на белок, связанный с носителем (адьювантом) [8], системы адресной

доставки и ловушки вирусных частиц/патогенов, наоборот, во избежание преждевременной элиминации из организма, должны быть относительно инертны и не должны стимулировать значительных иммунных реакций [9].

Из литературных данных известно, что физико-химические характеристики полимерных частиц оказывают влияние на их поведение в биологических системах *in vitro* и *in vivo* [10, 11]. Такие характеристики, как размер, поверхностный заряд, а также жесткость наночастиц оказывают существенное влияние на цитотоксичность, внутриклеточное проникновение и скорость захвата макрофагами. Положительно заряженные наночастицы демонстрируют значительную цитотоксичность, тогда как положительно заряженные микрочастицы характеризуются относительно высокой скоростью захвата макрофагами. В целом, эффективность внутриклеточного проникновения у наночастиц выше, чем у микрочастиц, а жесткие наночастицы имеют более высокую скорость проникновения в клетку, чем деформируемые наночастицы. Очевидно, что размер частиц будет оказывать влияние на иммуногенность связанного с ними белка через усиление гуморального или Т-клеточного иммунного ответа. Выбор размера и функциональных свойств полимерных частиц должен быть обусловлен ожидаемым эффектом от их применения. В связи с этим получение систематических данных о влиянии частиц различного размера и их поверхностных свойств на иммунный ответ является крайне актуальным для понимания основ направленного конструирования систем с заданным терапевтическим эффектом.

Среди многообразия существующих полимерных НЧ и МЧ, безусловное преимущество имеют системы, полученные на основе нетоксичных, биосовместимых и биоразлагаемых полимеров [12]. К таким полимерам относятся, например, сложные полиэфиры алифатических гидроксикислот (поли(молочная кислота) (ПМК), поликапролактон, полигидроксibuтират и др.) [13], различные синтетические полипептиды [14], а также некоторые природные полисахариды (гиалуроновая кислота, гепарин, хондроитин сульфат, и др.) [15]. Для увеличения продолжительности жизни наночастиц в кровотоке, зачастую поверхность полимерных частиц дополнительно функционализируется так, чтобы обеспечить “стелс-эффект”, или, другими словами, эффект невидимости для иммунной системы, в частности для мононуклеарных фагоцитов [16]. Известно, что такими свойствами обладают, например, поли(этиленгликоль) (ПЭГ) [17] и поли(глутаминовая кислота) [18].

Целью настоящей работы являлось изучение гуморального иммунного ответа у мышей на введение ПМК/ПЭГ- β -ПМК НЧ/МЧ, несущих на поверхности модельный белок. В качестве последнего

был использован белок слияния бета2-микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком (β 2M-sfGFP). НЧ/МЧ на основе ПМК и ее блок-сополимера с поли(этиленгликолем) (ПЭГ- β -ПМК) были выбраны в качестве объектов исследования, поскольку они активно изучаются в качестве носителей лекарств, антигенов и ловушек для связывания патогенов *in vivo*. Кроме того, ПМК и ПЭГ- β -ПМК одобрены для получения биомедицинских материалов и их клинического использования [19, 20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез ПМК и ПЭГ- β -ПМК

Гомополимер ПМК и сополимер ПЭГ- β -ПМК получали методом полимеризации с раскрытием цикла D, L-лактида по ионно-координационному механизму в вакууме. В качестве инициаторов для синтеза сополимера использовали монометилловый эфира ПЭГ ($M_n = 5000$), а для гомополимера – воду. В качестве катализатора полимеризации использовали октоат олова (II). Мольные соотношения реагентов: [D, L-лактид]:[Sn(Oct)₂] = 920, [D, L-лактид]:[H₂O] = 300 и [D, L-LD]:[mPEG-OH] = 1500. Полимеризацию проводили в течение 1 ч при температуре 130 °С. Структуры полимеров подтверждали методом ¹H ЯМР-спектроскопии [21]. Средневесовую молекулярную массу (M_w) и дисперсность (D) полимеров определяли методом гель проникающей жидкостной хроматографии с использованием хроматографической системы Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с рефрактометрическим детектором RID10-A и колонкой Agilent PLgel MIXED-D (5 мкм, 7.5 мм × 300 мм). Для калибровки колонки использовали стандартные образцы полистирола с молекулярными массами в диапазоне от 2000 до 450000 (Waters, США). Анализ проводили в тетрагидрофуране при температуре 40 °С. Характеристики полученных полимеров: ПМК – $M_w = 23200$, $D = 1.13$; ПЭГ- β -ПМК – $M_w = 55000$, $D = 30300$, $D = 1.2$.

Получение микрочастиц на основе ПМК и ПЭГ- β -ПМК

Формирование МЧ осуществляли методом одинарной эмульсии. Органическая фаза состояла из растворов ПМК или ПЭГ- β -ПМК в дихлорметане (50 мг/мл). В случае МЧ в качестве водной фазы использовали 1 %-й раствор поли(винилового спирта) (ПВС) в дистиллированной воде ($M_w = 130000$, степень гидролиза 99 %). Эмульсию получали, диспергируя органическую фазу в водной с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD2070 с микрозондом MS73 диаметром 3 мм (Bandelin, Германия). Органическую фазу вводили в водную

фазу со скоростью 2 мл/мин с помощью однокапельного инфузионного насоса Инстилар 1438 (Диксион, Россия) при перемешивании с помощью магнитной мешалки (MR Hei-Mix S, Heidolph, Германия) со скоростью 800 об/мин. Дополнительно систему обрабатывали ультразвуком с использованием зондового гомогенизатора при мощности 18 % в течение 180 с (время введения органической фазы), затем повышали мощность УЗ-гомогенизатора до 35 % и обрабатывали систему еще в течение 90 с. Соотношение объемов органической и водной фаз составляло 1:20. Для формирования суспензии из системы удалили дихлорметан с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Германия). Затем полученные частицы осаждали центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C). Далее системы редиспергировали под действием ультразвукового гомогенизатора при мощности 15 % в течение 7 с в дистиллированной воде и снова осаждали. Для удаления избытков ПВС процедуру промывания частиц повторяли дважды. Фракционирование частиц по размерам реализовали центрифугированием в течение 2 мин (1000 g, 4°C). Для экспериментов использовали фракцию крупных частиц. Выход МЧ для ПМК составлял 52 %, а МЧ на основе сополимера ПЭГ-б-ПМК – 55 %.

Получение наночастиц на основе ПМК и ПЭГ-б-ПМК

Получение наночастиц на основе ПМК и ПЭГ-б-ПМК проводили методом наноосаждения (со)полимера из раствора в ацетонитриле в воду при интенсивном перемешивании, как описано нами ранее [21]. Концентрация полимеров в органической фазе составляла 5 мг/мл. Соотношение органической фазы к водной составляло 1/5. Введение органической фазы в водную проводилось при скорости 2 мл/мин и скорости перемешивания 900 об/мин. Систему оставляли открытой при перемешивании в течение 24 ч (23°C) для удаления органического растворителя. Выход НЧ на основе ПМК составил 81 %, а для ПЭГ-б-ПМК – 93 %.

Изучение характеристик полученных микро- и наночастиц

Измерение гидродинамического диаметра (D_H) и индекса полидисперсности (ИПД), а также ζ -потенциала наночастиц проводили методом динамического и электрофоретического рассеяния света с использованием прибора Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) при рассеивающем угле 173° и температуре 25°C. Анализ результатов измерения проводился в автоматическом режиме при использовании штатного программного обеспечения

прибора Malvern Nano-ZS. Измерения проводили в воде при концентрации наночастиц 0.1–0.2 мг/мл. Все измерения проводили не менее 3-х раз.

Ковалентная иммобилизация белка на поверхности нано- и микрочастиц

Для иммобилизации белка β 2M-sfGFP на поверхности МЧ и НЧ на основе ПМК и ПЭГ-б-ПМК осуществляли модификацию поверхности частиц, состоящую из 3 стадий. На первой стадии на поверхности МЧ и НЧ генерировали свободные карбоксильные группы путем частичного щелочного гидролиза ПМК: для НЧ 0.01 М раствором NaOH в течение 15 мин, а для МЧ раствором 0.1 М NaOH в течение 30 мин при комнатной температуре (25°C) [22]. Далее НЧ очищали в течении 1 ч посредством диализа против дистиллированной воды, а МЧ отделяли центрифугированием и дважды промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием в течение 10 мин (10000 g, 4°C) и редиспергированием в течение 7 с. На второй стадии проводили активацию свободных карбоксильных групп. Для этого полученные карбоксилированные МЧ и НЧ инкубировали в 0.005 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (pH 5.4), содержащей N-гидроксисукцинимид (N-ГС), в течение 10 мин. После этого в систему добавляли аликвоту (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида гидрохлорида (КДИ) и проводили реакцию в течение 30 мин при перемешивании (Biosan Multi RS-60, Латвия) со скоростью 30 об/мин (КДИ: N-ГС = 1:2, моль/моль). От избытка непрореагировавших реагентов НЧ и МЧ промывали так же, как описано выше для первой стадии. Далее к частицам, содержащим на поверхности активированные сложноэфирные группы, добавляли белок β 2M-sfGFP. Для иммобилизации белка на поверхности МЧ брали 1.09 мг β 2M-sfGFP и 160 мг частиц, максимальная теор. емкость – 6.8 мкг/мг. Для иммобилизации белка на поверхности НЧ брали 1.6 мг белка на 160 мг НЧ, максимальная теор. емкость – 10 мкг/мг. Время иммобилизации для систем с МЧ составило 2 ч, а для НЧ 1 ч, процесс осуществляли в 0.01М боратном буферном растворе (pH 8.5) при перемешивании со скоростью 20 об/мин (Biosan Multi RS-60, Латвия). После окончания иммобилизации белка, МЧ центрифугировали и отмывали 5 раз 0.01 М фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ, pH 7.4). Для удаления непрореагировавшего белка в случае НЧ использовали метод ультрафильтрации (модули для ультрафильтрации Amicon 100 кДа), заменяя водную фазу на ФСБ, pH 7.4, в течение 5 циклов ультрафильтрации. Измерение концентрации β 2M-sfGFP белка анализировали спектрофотометрически (ThermoScientific NanoDrop 2000, США) по поглощению на длине волны 490 нм.

Количество ковалентно иммобилизованного белка рассчитывали по разнице массы белка в исходных растворах, взятых для иммобилизации, и массы несвязавшегося белка, рассчитанной по результатам анализа надосадочной жидкости и промывных растворов, собранных после проведения иммобилизации.

Синтез, выделение и очистка рекомбинантного белка $\beta 2M$ -sfGFP

Белок $\beta 2M$ -sfGFP получали из клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой, содержащей ген слитого белка $\beta 2$ -микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком [23]. Культивирование проводили в условиях аэрации при 37°C до достижения оптической плотности $A_{600} = 0.6-1.0$. Синтез $\beta 2M$ -sfGFP индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогактопиранозидом до конечной концентрации 250 мкМ, культивирование продолжали в течение ночи при 37°C в условиях аэрации. Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g и однократно отмывали физиологическим раствором с последующим осаждением при 10000 g. К отмывому клеточному осадку добавляли раствор PBS, содержащий 10 мМ имидазола. Клетки разрушали ультразвуком (частотой 3 кГц 3 интервала по 30 с) на холоде. После разрушения бактериальных клеток суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 30000 g. Профильтрованный супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никелевом сорбенте Ni-NTA Agarose (50–150 мкм, Invitrogen, ThermoFisher, США). Концентрацию полученного белка определяли по поглощению при длине волны 490 нм. Чистоту полученных белковых препаратов оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия или без денатурации. Для измерения концентрации полученного белка использовали спектрофотометр Thermo Scientific NanoDrop 2000. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм.

Иммунизация и получение сыворотки крови мышей

В работе были использованы самки-гибриды F1 (C57BL х CBA), масса которых в среднем составляла 20–25 г (возраст 4–6 месяцев). Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/24 ч, с предоставлением корма и воды. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество препарата рассчитывали исходя из того, чтобы количество белка $\beta 2M$ -sfGFP составляло 1 мкг на 1 мышь. Препараты вводились

в физрастворе в объеме 0.4 мл на животное. Вся работа выполнялась в соответствии с международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Иммунизацию экспериментальных животных проводили в 4 этапа с интервалом в 2 недели.

Иммуноферментный анализ

Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [24]. В лунки 96-луночного планшета вносили раствор глутарового альдегида. Инкубировали 1 ч, затем в лунки вносили по 100 мкл раствора sfGFP. Спустя 1 ч вносили раствор обезжиренного молока с добавлением 0.5% Tween 20. Далее в лунки планшета вносили сыворотки мышей, через 1 ч – специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Спустя еще 1 ч – проявитель и измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера. При выполнении ИФА внутри одного периода иммунизации (2, 4, 6 или 8 недель) брались одинаковые разведения мышинных сывороток. В частности, разведение для срока 2 недели составляло 1/125, для срока 4 недели – 1/250, для срока 6 недель – 1/1000, для срока 8 недель – 1/2000. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Измерение производили в капле жидкости (2 мкл). Относительное содержание антител в экспериментальных группах определяли путем отнесения оптической плотности, измеренной в образцах экспериментальных групп, к оптической плотности в образцах соответствующих контрольных групп.

Статистическая обработка данных

Для попарного сравнения групп использовали критерий Ньюмена–Кейлса. Проверку на нормальность осуществляли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Все статистические расчеты и построение графиков были выполнены в программе Rstudio 1.1.453. Все графики box plot представлены в виде медиан с доверительными интервалами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение микро- и наночастиц на основе поли(молочной кислоты) с иммобилизованным модельным белком $\beta 2M$ -sfGFP

С целью сравнения влияния МЧ и НЧ одинаковой природы, как носителей белков, на гуморальный иммунный ответ в данной работе были получены МЧ и НЧ на основе ПМК и ПЭГ- β -ПМК. Для обоих

Таблица 1. Характеристики исходных и модифицированных белком нано- и микрочастиц на основе ПМК и ПЭГ-*б*-ПМК.

Вид частиц		Характеристики исходных полимерных частиц			Характеристики частиц, модифицированных белком			
		D_H (нм)	ИПД	Дзета-потенциал (мВ)	$Q_{им.}$ (мкг белка/мг частиц)	D_H (нм)	ИПД	Дзета-потенциал (мВ)
МЧ	ПМК	1396	0.32	-37 ± 6	2.32	1432	0.36	-42 ± 3
	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	1355	0.27	-31 ± 5	1.94	1538	0.38	-37 ± 4
НЧ	ПМК	110	0.09	-36 ± 3	9.40	127	0.22	-41 ± 4
	ПЭГ- <i>б</i> -ПМК	75	0.08	-32 ± 5	9.80	83	0.21	-39 ± 6

полимеров МЧ были получены методом одинарной эмульсии, тогда как НЧ – методом наноосаждения. Последний не требует применения стабилизаторов (ПАВ), а НЧ формируются с узким распределением по размерам. Характеристики полученных полимерных частиц представлены в таблице 1. Для обоих полимеров гидродинамический диаметр (D_H) МЧ составлял около 1400 нм, а для НЧ значения D_H были близки к 100 нм.

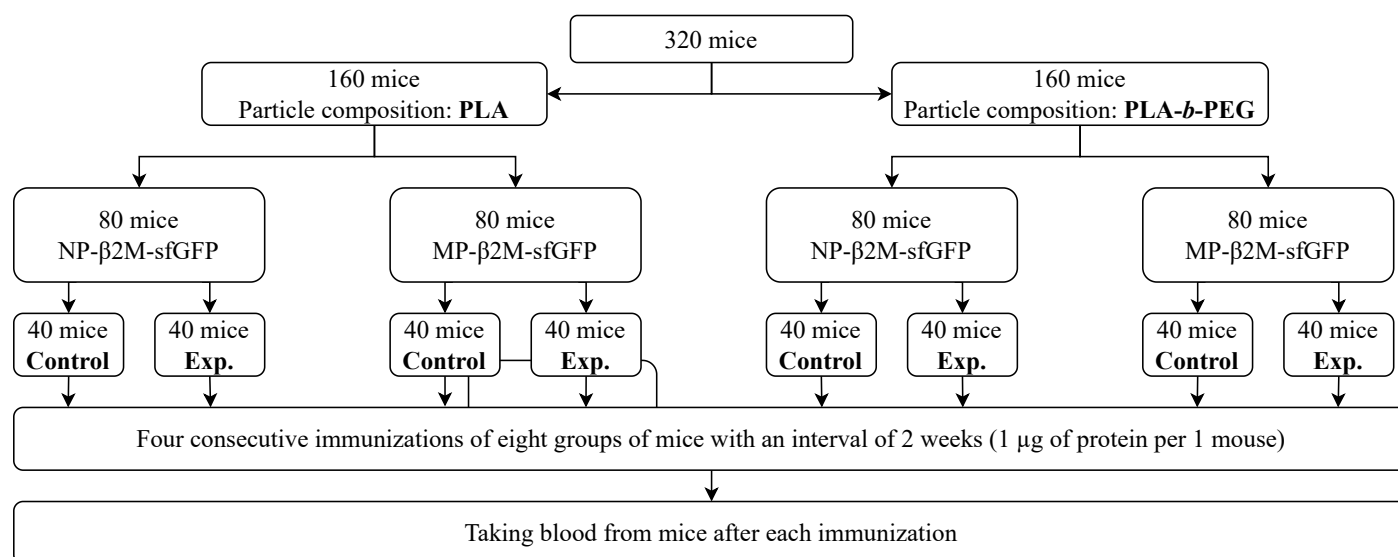
В качестве модельного белка был выбран рекомбинантный белок слияния бета2-микроглобулин человека с зеленым флуоресцентным белком Superfolder ($\beta 2M$ -sfGFP). Ранее нами было показано, что эффективность иммобилизации данного модельного белка на поверхности микрочастиц выше, чем у зеленого флуоресцентного белка (sfGFP) [25]. Иммобилизацию белка проводили за счет реакции активированных сложных эфиров, полученных на поверхности МЧ и НЧ путем активации предварительно сгенерированных карбоксильных групп с аминокеттоаминогруппами белка. Иммобилизация белка на поверхности НЧ и МЧ приводила к увеличению ги-

дродинамического диаметра наночастиц, индекса полидисперсности (ИПД) и снижению дзета-потенциала (таблица 1). Эффективность иммобилизации белка на поверхности МЧ составляла около 30% и превышала 90% в случае НЧ. Более высокая иммобилизационная емкость в случае НЧ обусловлена большей удельной площадью поверхности в единице массы по сравнению с МЧ.

Изучение иммуногенности белка $\beta 2M$ -sfGFP, иммобилизованного на поверхности полимерных нано- и микрочастиц

Для изучения влияния типа частиц на иммуногенность модельного белка $\beta 2M$ -sfGFP, иммобилизованного на поверхности частиц (комплексный антиген), была проведена иммунизация 8 равных по численности групп мышей. Иммунизация мышей проводилась по схеме, представленной на рис. 1.

Суммарно иммунизации были подвергнуты 320 мышей, поделенные на 2 группы в зависимости от типа полимера, а именно ПМК или ПЭГ-*б*-ПМК.

**Рис. 1.** Схема эксперимента по изучению иммуногенности белка $\beta 2M$ -sfGFP в составе комплексных антигенов с НЧ и МЧ на основе ПМК и ПЭГ-*б*-ПМК.

Каждая из этих групп была разделена еще на 2 группы по размеру полимерных частиц, а именно НЧ и МЧ. В свою очередь, для каждой из этих 4 групп были созданы контроли, в которых белок $\beta 2M$ -sfGFP находился в виде смеси с полимерными частицами (контрольные группы). Иммунизацию животных проводили 4-кратно с интервалами в 2 недели с забором крови у мышей из щечной вены спустя 13 дней после каждой иммунизации.

Гуморальный иммунный ответ

В качестве системы детекции иммунного ответа использованы sfGFP и антитела к нему. Для оценки содержания специфических антител к sfGFP в сыворотке крови мышей был использован метод ИФА. При помощи критерия Шапиро–Уилка было уста-

новлено, что в каждой группе распределение не было нормальным ($p < 0.001$). Поэтому для попарного сравнения восьми групп использовали непараметрический статистический критерий Ньюмена – Кейлса.

Нами было проанализировано влияние размера полимерных НЧ и МЧ, а также введение блока ПЭГ в состав ПМК на иммуногенность связанного с ним белка на всех этапах иммунизации (рис. 2). Установлено, что уровень антител к sfGFP был значимо выше ($p < 0.001$) в группах экспериментальных животных, подвергшихся иммунизации комплексным антигеном в виде НЧ ПМК или НЧ ПЭГ- β -ПМК, содержащих на поверхности белок $\beta 2M$ -sfGFP, по сравнению с группами, в которых иммунизация проводилась с использованием комплексного антигена на основе МЧ ПМК или МЧ ПЭГ- β -ПМК с иммобилизованным на поверхности белком. При

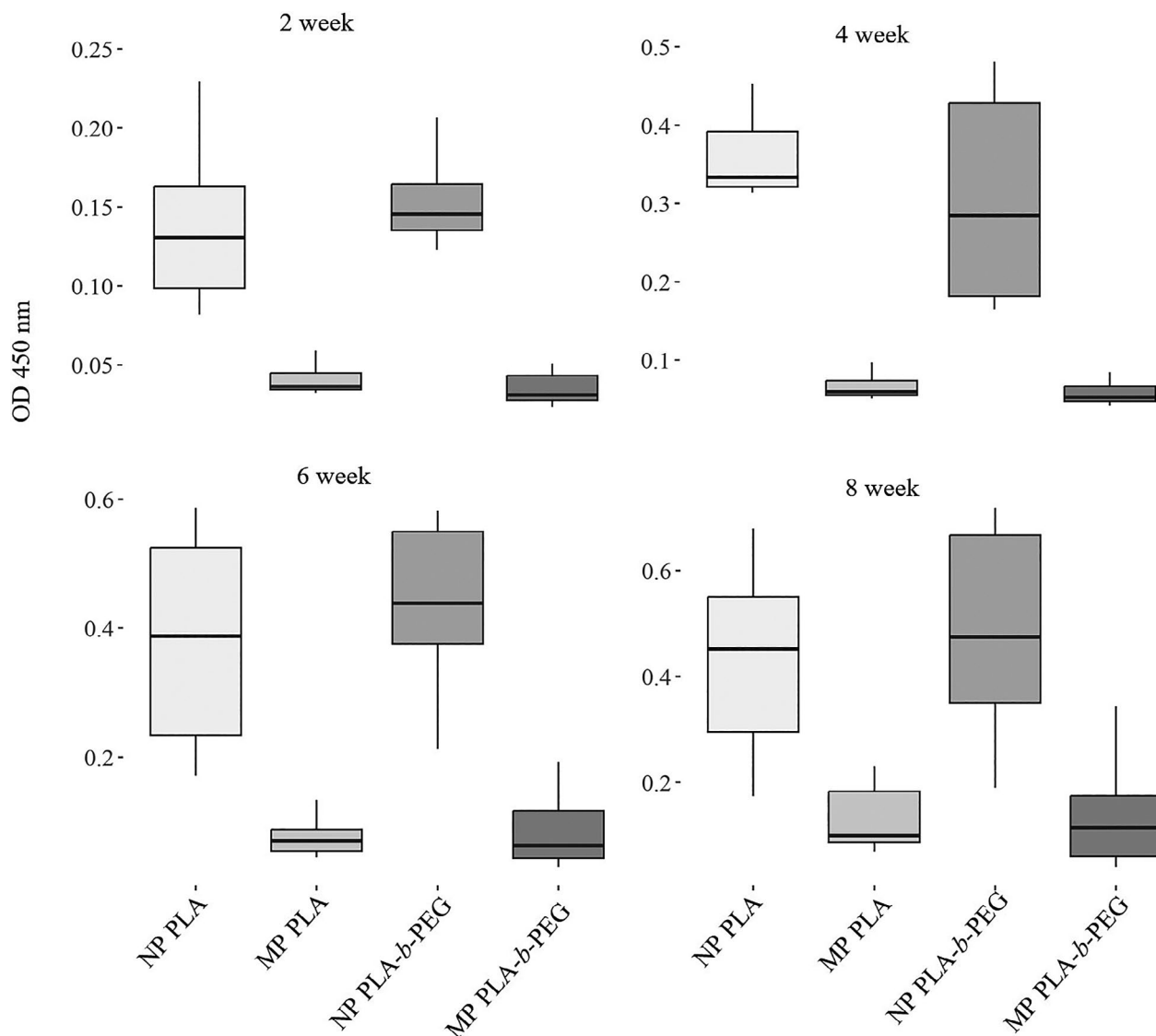


Рис. 2. Тенденции в изменении уровня специфических антител против модельного белка в сыворотках крови мышей, иммунизированных антигенами различного состава и размера (оптические плотности растворов внутри каждого срока измерены при одинаковом разведении сывороток крови).

этом количество антител к sfGFP статистически не отличалось ($p > 0.05$) между группами, в которых животные подверглись иммунизации частицами одного размера, но с разным составом полимеров (НЧ ПМК и НЧ ПЭГ- β -ПМК; МЧ ПМК и МЧ ПЭГ- β -ПМК соответственно). Таким образом, введение блока ПЭГ в состав ПМК не оказывало влияния на иммуногенность связанного с ними белка, в отличие от размера частиц на основе тех же полимеров.

Также был произведен статистический анализ контрольных групп (смесь белка β 2M-sfGFP и с каждым из типов немодифицированных частиц, соответственно). Как и в наших предыдущих исследованиях [26], было установлено, что уровень специфических антител к sfGFP в сыворотке крови был значительно ниже ($p < 0.01$) в случае иммунизации комплексным антигеном, состоящим из белка ковалентно конъюгированного с полимерными частицами, по сравнению с физической смесью белка и частиц.

Уровень специфических антител к sfGFP в сыворотке крови во всех контрольных группах статистически не отличался ($p > 0.05$) после каждого этапа иммунизации. На рисунке 3 представлены кумулятивные результаты относительного содержания специфических антител к модельному белку после каждой стадии иммунизации мышей комплексными антигенами на основе НЧ ПМК и МЧ ПМК. В опытных группах содержание антител к модельному белку было ниже по сравнению с контрольными группами. При этом в опытных группах комплексные антигены, полученные с использованием частиц меньшего размера (НЧ), демонстрировали большую иммуногенность по сравнению с комплексными ан-

тигенами, полученными на основе более крупных частиц (МЧ). При иммунизации мышей комплексными антигенами, полученными на основе МЧ/НЧ ПЭГ- β -ПМК картина распределения специфических антител была аналогичной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При внутрибрюшинном введении мышам модифицированных модельными белками частиц индуцируется менее выраженный гуморальный иммунный ответ по сравнению со смесью частиц с белком (контроль). Выраженность гуморального иммунного ответа зависит от размеров частиц. Частицы с диаметром 1400 нм оказались менее эффективны в плане выработки специфических антител против модельного белка, чем частицы с диаметром 100 нм. При этом состав частиц (ПМК, ПМК-ПЭГ), в отличие от их размеров, не влияет на выраженность гуморального иммунного ответа. В свою очередь, ранее более выраженный специфический клеточный иммунный ответ был обнаружен в опытных группах мышей, которые были иммунизированы конъюгатом модельного белка и микрочастиц, по сравнению с контрольными группами мышей, которые были иммунизированы смесью модельного белка и микрочастиц [27]. При этом показано, что микрочастицы эффективно поглощаются макрофагами [25]. Таким образом, можно заключить, что с точки зрения применения полимерных частиц для создания “ловушек” для связывания вирусов и патогенов перспективнее использовать полимерные МЧ ($D_H > 1000$ нм). Последние, будучи модифицированы антителами/рецепторными белками,

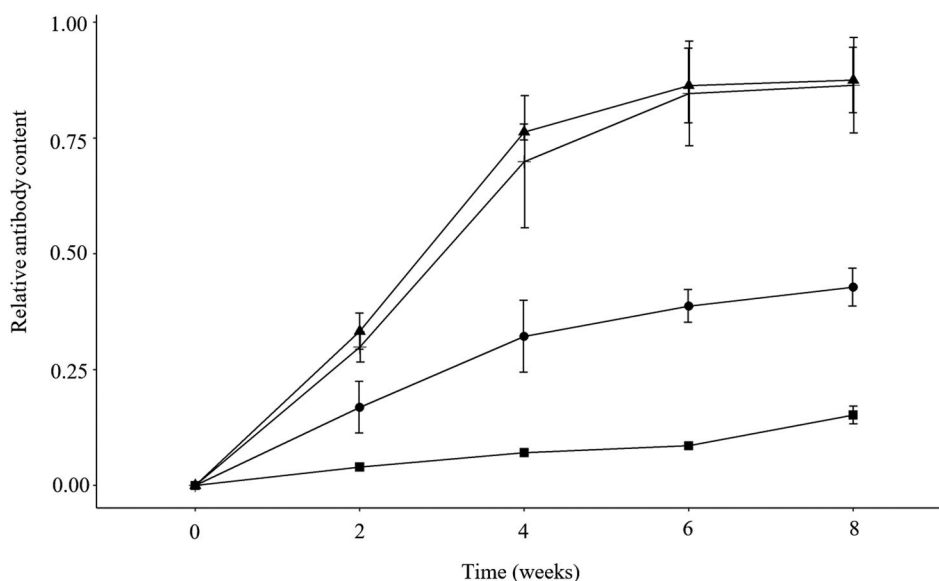


Рис. 3. Оценка относительного содержания специфических антител после введения антигена, находящегося на поверхности микро- и наночастиц на основе поли(молочной кислоты) во всех четырех иммунизациях. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами. • – Конъюгат белка с НЧ ПМК; ▲ – Смесь белка с НЧ ПМК; ■ – Конъюгат белка с МЧ ПМК; + – Смесь белка МЧ ПМК.

способными связываться с вирусными антигенными белками, вызывают в основном активацию клеточного иммунного ответа, что актуально при борьбе с тяжелыми формами вирусной инфекции и хроническими вирусными инфекциями. В перспективе такие “системы-ловушки”, связывающие проникающие в организм вирусы, могут процессироваться антиген-представляющими клетками, что будет способствовать запуску противовирусного иммунного ответа. При этом использование таких частиц не зависит от антигенного репертуара вируса, поскольку они направлены на связывание мало изменяющихся поверхностных белков вирусных частиц.

НЧ (~100 нм), несущие на поверхности иммобилизованные белки, вызывают, в основном, сильный гуморальный иммунный ответ и выработку специфических иммуноглобулинов. Вследствие этого, НЧ наиболее перспективны для разработки вакцин против тех или иных вирусных инфекций. В случае применения их в качестве систем доставки риск выработки антител на белок, используемый в качестве вектора для доставки и связанный с поверхностью НЧ, также существует. Минимизировать процесс нежелательной иммуногенности можно, выбирая в качестве векторов для адресной доставки низкомолекулярные вещества, пептиды и неиммуногенные белки, идентифицируемые организмом как “свой”.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.С.П., В.А.К.-В., Е.Г.К.-В., М.М.Ш.), экспериментальная работа (Р.Г.С., Д.С.П., Е.С.С., И.О.Б. и В.А.К.-В.), сбор данных (Р.Г.С., Д.С.П., В.А.К.-В.), обработка данных (Р.Г.С., Д.С.П., Е.Г.К.-В., И.О.Б.), написание и редактирование манускрипта (Р.Г.С., Е.Г.К.-В., В.С.Т., Е.С.С. и М.М.Ш.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Локального этического комитета Института экспериментальной медицины (выписка из протокола № 3/19 от 25.04.2019).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по получению МЧ и НЧ на основе ПМК и ПЭГ-6-ПМК, их карбоксилированию, ковалентной иммобилизации белка на поверхности частиц, а также характеристики полученных полимерных систем выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21–73–20104). Работы по получению модельных рекомбинантных белков, иммунизации и определению уровня антител выполнены в рамках го-

сударственных заданий Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022–0009 (рег. № НИОКТР 122020300191–9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Basinska T, Gadzinowski M, Mickiewicz D, Slomkowski S* (2021) Functionalized Particles Designed for Targeted Delivery. *Polymers (Basel)* 13:2022. <https://doi.org/10.3390/polym13122022>
2. *Kaba SA, Brando C, Guo Q, Mittelholzer C, Raman S, Tropel D, Aebi U, Burkhard P, Lanar DE* (2009) A Non-adjuncted Polypeptide Nanoparticle Vaccine Confers Long-Lasting Protection against Rodent Malaria. *J Immunol* 183:7268–7277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901957>
3. *Cappellano G, Abreu H, Casale C, Dianzani U, Chiochetti* (2021) Nano-Microparticle Platforms in Developing Next-Generation Vaccines. *Vaccines* 9:606. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060606>
4. *Polyakov D, Sinitsyna E, Grudinina N, Antipchik M, Sakhabeev R, Korzhikov-Vlakh V, Shavlovsky M, Korzhikova-vlakh E, Tennikova T* (2021) Polymer Particles Bearing Recombinant LEL CD81 as Trapping Systems for Hepatitis C Virus. *Pharmaceutics* 13: 672. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1305067>
5. *Guryanov I, Cipriani S, Fiorucci S, Zashikhina N, Marchianò S, Scarpelli P, Korzhikov-Vlakh V, Popova E, Korzhikova-Vlakh E, Biondi B, Formaggio F, Tennikova T* (2017) Nanotraps with biomimetic surface as decoys for chemokines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 13:2575–2585. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.07.006>
6. *Bajracharya R, Song JG, Patil BR, Lee SH, Noh H-M, Kim D-H, Kim G-L, Seo S-H, Park J-W, Jeong SH, Lee CH, Han H-K* (2022) Functional ligands for improving anticancer drug therapy: current status and applications to drug delivery systems. *Drug Deliv* 29:1959–1970. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2089296>
7. *Islam Y, Leach AG, Smith J, Pluchino S, Coxonl CR, Sivakumaran M, Downing J, Fatokun AA, Teixidó M, Ehtezazi T* (2020) Peptide based drug delivery systems to the brain. *Nano Express* 1:012002. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/ab9008>
8. *Sinyakov MS, Dror M, Lublin-Tennenbaum T, Salzberg S, Margel S, Avtalion RR* (2006) Nano- and microparticles as adjuvants in vaccine design: Success and failure is related to host natural antibodies. *Vaccine* 24:6534–6541. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.021>
9. *Jiskoot W, van Schie RMF, Carstens MG, Schellekens H* (2009) Immunological Risk of Injectable Drug Delivery Systems. *Pharm Res* 26:1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9855-9>

10. *Alqahtani MS, Syed R, Alshehri M* (2020) Size-Dependent Phagocytic Uptake and Immunogenicity of Gliadin Nanoparticles. *Polymers (Basel)* 12:2576. <https://doi.org/10.3390/polym12112576>
11. *Baranov M V., Kumar M, Sacanna S, Thutupalli S, van den Bogaart G* (2021) Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. *Front Immunol* 11:607945. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607945>
12. *Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT* (2011) Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 49:832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
13. *Seyednejad H, Ghassemi AH, Van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE* (2011) Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *J Control Release* 152:168–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.12.016>
14. *Lee D, Rejinold N, Jeong S, Kim Y-C* (2018) Stimuli-Responsive Polypeptides for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)* 10:830. <https://doi.org/10.3390/polym10080830>
15. *Farasati Far B, Naimi-Jamal MR, Safaei M, Zarei K, Moradi M, Yazdani Nezhad H* (2022) A Review on Biomedical Application of Polysaccharide-Based Hydrogels with a Focus on Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)* 14:5432. <https://doi.org/10.3390/polym14245432>
16. *Butcher NJ, Mortimer GM, Minchin RF* (2016) Unravelling the stealth effect. *Nat Nanotechnol* 11:310–311. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.6>
17. *Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM* (2016) PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 99(Pt A):28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
18. *Romberg B, Metselaar J, Baranyi L, Snel C, Bunger R, Hennink W, Szebeni J, Storm G* (2007) Poly(amino acid)s: Promising enzymatically degradable stealth coatings for liposomes. *Int J Pharm* 331:186–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.018>
19. *Wang Yan, Wen Qu, Choi H Stephanie* (2016) FDA's Regulatory Science Program for Generic PLA/ PLGA-Based Drug Products. *Am Pharm Rev* June 15:188841.
20. *Elmowafy EM, Tiboni M, Soliman ME* (2019) Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J Pharm Investig* 2019494 49:347–380. <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00439-x>
21. *Sinitsyna E, Bagaeva I, Gandalipov E, Fedotova E, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Korzhikova-Vlakh E* (2022) Nanomedicines Bearing an Alkylating Cytostatic Drug from the Group of 1,3,5-Triazine Derivatives: Development and Characterization. *Pharmaceutics* 14:2506. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112506>
22. *Korzhikov-Vlakh V, Averianov I, Sinitsyna E, Nashchekina Y, Polyakov D, Guryanov I, Lavrentieva A, Raddatz L, Korzhikova-Vlakh E, Scheper T, Tennikova T* (2018) Novel Pathway for Efficient Covalent Modification of Polyester Materials of Different Design to Prepare Biomimetic Surfaces. *Polymers (Basel)* 10:1299. <https://doi.org/10.3390/polym10121299>
23. *Solovyov KV, Polyakov DS, Grudinina NA, Egorov VV, Morozova I V, Aleynikova TD, Shavlovsky MM* (2011) Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins ttr-sfgfp and β 2M-sfGFP. *Prep Biochem Biotechnol* 41:337–349. <https://doi.org/10.1080/10826068.2010.548433>
24. *Polyakov DS, Antimonova OI, Sakhabeev RG, Grudinina NA, Khodova AE, Sinitsyna ES, Korzhikov-Vlakh VA, Tennikova TB, Shavlovsky M* (2017) Poly(lactic acid) nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Russ J Infect Immun* 7: 123–129. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-123-129>
25. *Sakhabeev RG, Поляков ДС, Грудини́на НА, Антимонова ОИ, Коржиков-Влах ВА, Аликарпова ЭР, Синицына ЕС, Шавловский ММ* (2023) Фагоцитоз иммунными клетками полимерных микрочастиц, модифицированных белками. *Цитология* 65:376–383. [Sakhabeev RG, Polyakov DS, Grudinina NA, Antimonova OI, Korzhikov-Vlakh VA, Alikparova ER, Sinitsyna ES, Shavlovsky MM (2023) Phagocytosis of protein-modified polymer microparticles by immune cells. *Cytology* 65:376–383. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0041377123040119>
26. *Sakhabeev RG, Поляков ДС, Грудини́на НА, Вишня АА, Козловская АА, Синицына ЕС, Коржиков-Влах ВА, Тенникова ТБ, Шавловский ММ* (2019) Гуморальный иммунный ответ на антиген, иммобилизованный на наночастицах из сополимера поли(молочной кислоты) и полиэтиленгликоля. *Мол мед* 17:32–36. [Sakhabeev RG, Polyakov DS, Grudinina NA, Vishnya AA, Kozlovskaya AA, Sinitsyna ES, Korzhikov-Vlakh VA, Tennikova TB, Shavlovsky MM (2019) The humoral immune response to the antigen immobilized on nanoparticles of copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol. *Mol med* 17:32–36. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29296/24999490-2019-03-06>
27. *Sakhabeev RG, Поляков ДС, Гошина АД, Вишня АА, Кудрявцев ИВ, Синицына ЕС, Коржиков-Влах ВА, Тенникова ТБ, Шавловский ММ* (2021) Усиление специфического Т-клеточного иммунного ответа при иммобилизации антигена на микро- и наночастицах. *Инф иммун* 11(4):777–783. [Sakhabeev RG, Polyakov DS, Goshina AD, Vishnya AA, Kudryavtsev IV, Sinitsyna ES, Korzhikov-Vlakh VA, Tennikova TB, Shavlovsky MM (2021) Enhancing the specific T cell immune response against micro- and nanoparticle immobilized antigen. *Russ J Infect Immun* 11(4):777–783. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ETS-1374>

FEATURES OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE WHEN USING PROTEIN IMMOBILIZED ON THE SURFACE OF NANO- AND MICROPARTICLES BASED ON POLY(LACTIC ACID)

R. G. Sakhabeev^{a, #}, D. S. Polyakov^b, E. S. Sinitsyna^c, V. A. Korzhikov-Vlakh^{c, d}, I. O. Bagaeva^d,
E. G. Korzhikova-Vlakh^c, T. P. Ses^e, V. S. Tereshina^a, and M. M. Shavlovsky^b

^a *St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russia*

^b *Institute of Experimental Medicine, St.-Petersburg, Russia*

^c *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^d *Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^e *First Pavlov State Medical University Of St Petersburg, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: helm505@mail.ru*

The study is aimed at evaluating the influence of composition and size of micro- and nanoparticles (MPs and NPs) on the immunogenicity of protein antigen associated with them. For comparative analysis, MPs and NPs based on poly(lactic acid) (PLA) and block copolymer of poly(ethylene glycol) with poly(lactic acid) (PEG-b-PLA) were obtained. Recombinant human beta2-microglobulin fusion protein with superfolder green fluorescent protein (β 2M-sfGFP) was used for covalent modification of all types of polymer particles. Immobilization of the model protein β 2M-sfGFP was carried out on the surface of the particles through the reaction of activated esters with the amino groups of the protein. Immunization of mice using complex antigen (β 2M-sfGFP protein immobilized on the surface of MPs and NPs of different compositions) was carried out in four steps. Immunogenicity was assessed by the level of specific antibodies to sfGFP using enzyme-linked immunoassay. The results showed a significant increase in antibody levels in the control groups, which were immunized with a mixture of model protein and particles of different nature and sizes, compared to the experimental groups, which were immunized with conjugates of the corresponding particles with model protein. In the experimental groups, the highest number of specific antibodies was detected in the case of immunization of mice with the conjugate of protein and PLA or PEG-b-PLA-based NPs. The introduction of PEG block into the PLA composition did not significantly affect the immunogenicity of the protein, while the particle size was of significant importance. PLA- or PEG-b-PLA-based NPs showed higher immunogenicity compared to MPs of the same compositions, which can be used for practical purposes to develop vaccines (NP-protein) or "trapping systems" (MP-protein) that bind infiltrating viruses.

Keywords: polymeric micro- and nanoparticles, poly(lactic acid), humoral immune response

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ИЗОГЕННЫХ КЛЕТОК РАННЕЙ МЕЗОДЕРМЫ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. А. В. Селезнева, Е. В. Коробко, С. Л. Киселев, Ю. Г. Суздальцева*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* e-mail: yu_suzdaltseva@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2023

После доработки 08.01.2024

Принята к публикации 14.01.2024

Образование рубца при нормальной регенерации поврежденных тканей у взрослых может приводить к заметным косметическим и функциональным дефектам органов и существенно влиять на качество жизни. Напротив, известно, что ткани плода до третьего триместра беременности способны к полной регенерации с восстановлением исходной архитектуры и функциональной активности. Понимание клеточных и молекулярных механизмов регенерации ран плода создаст основу для разработки успешного лечения, направленного на минимизацию рубцевания. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в восстановлении тканей, поскольку секретируемые ими цитокины, хемокины, факторы роста и внеклеточные везикулы участвуют в регуляции миграции, ангиогенеза, синтеза и ремоделирования внеклеточного матрикса. Мезодермальная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) позволяет воспроизвести последовательные этапы эмбриогенеза *in vitro* и создать изогенные клеточные модели МСК, соответствующие разным стадиям развития человека. В данной работе в результате специфически направленной многостадийной мезодермальной дифференцировки ИПСК были получены изогенные линии клеток примитивной полоски, латеральной и параксиальной мезодермы и проведен сравнительный анализ их экспрессионных профилей. Показано, что полученные клетки латеральной мезодермы (ЛМ) и параксиальной мезодермы (ПМ), являются предшественниками для МСК. МСК, полученные в результате дифференцировки клеток как ЛМ, так и ПМ, обладали сходным профилем по экспрессии панмезодермальных маркеров. Сравнительный анализ функциональной активности МСК и их предшественников в провоспалительном микроокружении позволит получить молекулярные инструменты для лучшего понимания фундаментальных механизмов регенерации тканей плода и определить терапевтические мишени для минимизации рубцевания и патологических процессов, характеризующихся чрезмерной фиброплазией.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека; регенерация тканей

DOI: 10.31857/S0044452924020043, EDN: XAQQKH

ВВЕДЕНИЕ

У взрослых заживление ран, как правило, завершается образованием рубцов, которые могут вызывать функциональные осложнения и психологические проблемы [1, 2]. Хотя клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе заживления ран и образования рубцов, хорошо описаны, а современные лекарства и определенные техники позволяют ранам заживать быстрее с меньшим образованием рубцов, по-настоящему эффективных методов лечения рубцов до сих пор не существует [3, 4]. Вместе с тем известно, что ткани плода млекопитающих на протяжении первого и второго триместров развития быстро заживают без образования рубцов

с восстановлением первоначальной структуры ткани с нормальной трехмерной архитектурой коллагена, типичной дифференцировкой клеток, полным эпителиальным покрытием и эпидермальными придатками [5, 6]. Сравнительные исследования механизмов регенерации тканей у взрослых и плодов позволили бы определить конкретную молекулярную или клеточную мишень в процессе рубцевания, чтобы разработать новое лекарственное средство, которое потенциально могло бы улучшить жизнь многих пациентов. Но поскольку такие исследования сильно ограничены этическими проблемами и практически недоступностью эмбриональных тканей человека разных стадий развития, физиологические,

клеточные и молекулярные механизмы безрубцовой регенерации плода в настоящее время остаются практически неизвестными.

Многообещающие технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) расширили наши возможности как в фундаментальных исследованиях, так и в клинических приложениях, позволив моделировать развитие человека, генетические заболевания и получать дифференцированные клетки для трансплантации пациентам. Отслеживание дифференцировки ИПСК в режиме реального времени позволяет достичь уровня экспериментальной доступности различных клеточных моделей, недостижимого *in vivo*. Данный подход представляется наиболее оптимальным для исследования фенотипических и функциональных особенностей клеток взрослого и плода с целью выяснения механизмов, ответственных за безрубцовое заживление [7].

Регенерация ткани невозможна без участия мезенхимальных стромальных клеток (МСК), так как восстановление паренхимы происходит на создаваемом ими молекулярном каркасе из белков внеклеточного матрикса. МСК выполняют регуляторную функцию в месте повреждения за счет способности динамически изменять свой фенотип, функциональную активность, экспрессию и секреторный профиль под действием внешних сигналов из микроокружения, способствуя успешному заживлению [8, 9]. Цитокины, хемокины, факторы роста и внеклеточные везикулы, секретруемые МСК, участвуют в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих ангиогенез, рекрутирование клеток в очаг воспаления, ремоделирование внеклеточного матрикса [10, 11]. Также было показано, что МСК проявляют иммуномодулирующие эффекты при взаимодействии с иммунными клетками [12, 13]. Вызывая функциональные изменения в иммунных клетках, МСК обладают способностью регулировать баланс между вырабатываемыми провоспалительными и противовоспалительными факторами, создавая цитокиновое микроокружение, необходимое для успешного заживления [14–16]. Фибротические нарушения в различных тканях связывают с хронической активацией МСК провоспалительными медиаторами, которые вызывают их трансдифференцировку в рубцовые миофибробласты с пролиферативными, мигрирующими, сократительными, иммуномодулирующими и фагоцитарными свойствами [17].

Логично предположить, что заживление тканей плода без рубцов происходит с участием фетальных МСК (мезодермальных предшественников), которые фенотипически и функционально отличаются от взрослых. Хотя взрослые МСК, выделенные из различных тканей, обладают сходным

фенотипом, пролиферативным и дифференцировочным потенциалом [18], они происходят из различных по развитию клеточных популяций клонально-специфических мезодермальных предшественников, происходящих из нервного гребня, параксиальной мезодермы и мезодермы латеральной пластинки [19–21]. Дифференцировка ИПСК в мезодермальном направлении позволяет воспроизвести последовательные этапы эмбриогенеза *in vitro* и создать изогенные клеточные модели МСК, соответствующие разным стадиям развития человека. Разработка и описание свойств клеточных моделей МСК и их предшественников, дифференцированных из ИПСК, является важным этапом, обеспечивающим последующие сопоставительные исследования их функциональной активности в условиях провоспалительного микроокружения.

В настоящей работе была исследована возможность получения изогенных линий клеток примитивной полоски, параксиальной мезодермы (ПМ) и латеральной мезодермы (ЛМ) эмбриона человека, а также клеток, соответствующих по своим характеристикам МСК взрослого человека из ИПСК. Для этого были использованы протоколы многостадийной последовательной специфически направленной дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении с использованием комбинации экзогенных специфических ингибиторов, факторов роста и биологически активных низкомолекулярных соединений. Полученные линии клеток были охарактеризованы по экспрессии генов, специфических для мезодермальных клеток эмбриона человека. Проведена оценка изменения экспрессии генов в клетках в процессе мезодермальной дифференцировки ИПСК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование ИПСК человека. Клеточную линию ИПСК человека endo-iPS12 [22] культивировали в CO₂ – инкубаторе MCO-19M (Sanyo, Япония) при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ на стандартной пластиковой посуде для культивирования клеток (Corning Costar, США), пресорбированной раствором Vitronectin XF (Stemcell Technologies, Канада) в среде ncTarget (Nuwacell, Китай) с ежедневной заменой. По достижении 80% конfluenceнтности ИПСК дезагрегировали с использованием реактива ReLeSR (Stemcell Technologies, Канада) и пересевали в соотношении 1:4. Подсчет клеток производили в автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США). При пересеве в среду для культивирования добавляли ингибитор Rho киназы (ROCK) Y-27632 (STEMCELL Technologies, США) в концентрации 5 мкМ на одни сутки. ИПСК характеризовали по

морфологии с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 40 CFL (Zeiss AG, Германия), оборудованного цифровой монохромной камерой AxioCam 202 mono (Zeiss AG, Германия), а также по экспрессии маркеров *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Дифференцировка ИПСК в ПМ. ИПСК выращивали по методике, описанной выше. При достижении 50% конфлюэнтности проводили депривацию средой DMEM/F12 (HyClone, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина 2 мМ глютамина, 100 мкг/мл инсулина, 50 мкг/мл трансферрина (все ПанЭко, Россия), 10 нг/мл активина А (R&D Systems, США), 20 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF) (Sigma Aldrich, Германия), 20 нг/мл WNT-1 человека (Sigma Aldrich, Германия), и культивировали клетки в течение суток. Затем клетки культивировали в течение 6 суток в этой же среде, но без bFGF с добавлением 1% концентрата липидов (Thermo Fisher Scientific, США), 40 мкМ тиоглицерола (Sigma Aldrich, Германия), заменяя среду каждый день. Образцы клеток собирали на 2 и 7 день культивирования. Полученные клетки характеризовали по морфологии, тестировали на экспрессию маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, а также оценивали уровень экспрессии маркеров параксиальной мезодермы эмбриона человека *TBX1*, *MIXL1*, *WNT5A*, *DLL1*, *MSGN1*, *MEOX1*.

Дифференцировка ИПСК в ЛМ. Клетки ЛМ получали по методике дифференцировки ИПСК в ПМ, приведенной в предыдущем абзаце, используя BMP4 человека (Sigma Aldrich, Германия) вместо WNT-1. Полученные клетки характеризовали по морфологии, тестировали на экспрессию маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, а также оценивали уровень экспрессии маркеров латеральной мезодермы эмбриона человека *TBX1*, *MIXL1*, *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*.

Получение МСК из ЛМ и ПМ, дифференцированных из ИПСК. Для получения МСК ЛМ и ПМ, дифференцированные из ИПСК, культивировали в стандартной безсывороточной среде Advance Stem Cell Basal Medium (HyClone, США), поддерживающей рост недифференцированных мезенхимальных прогениторных клеток взрослого человека, содержащей 10% смеси факторов роста Advance Stem Cell Growth Supplement, (HyClone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 Ед./мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) в течение 3-х недель. При достижении плотности монослоя 80–90% МСК рассевали в соотношении 1:3 с использованием раствора, содержащего 0.025% трипсина и 0.01% ЭДТА (HyClone, США). Полученные клетки тестировали на соответствие критериям, установленным для МСК [18] по экспрессии поверхностных маркеров CD90, CD73, CD105 и по способности дифферен-

цироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Выделение РНК из культивированных клеток проводили с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по методике, описанной в приложенном к набору руководстве пользователя. Определение концентрации РНК проводили по величине оптического поглощения на длине волны 260 нм (A260) с учетом коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 0.025$ (мкг/мл)·1 см⁻¹ на флюориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя с использованием набора QubitTM RNA Broad Range (BR) (Thermo Fisher Scientific, США). Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле, образец РНК считали подходящим для ПЦР в случае четкой визуализации двух полос, соответствующих 28S и 18S субъединицам РНК. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия), согласно руководству пользователя, приложенному к набору, используя олиго-dT-праймеры, ревертазу MMLV, ингибитор рибонуклеаз дитиотреитол DTT, дезоксирибонуклеотиды dNTP. Для количественной ПЦР использовали реакционную смесь qPCRmix-HS-SYBR (Евроген, Россия), включающую интеркалирующий краситель SYBR Green I. ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Швейцария). В качестве праймеров использовали оригинальные специфические комплементарные пары олигодезоксинуклеотидов к анализируемым генам, представленные в табл. 1.

Специфичность продуктов ПЦР подтверждали анализом кривой плавления в LightCycler[®] 96 Software (Roche Diagnostics, Швейцария) и электрофорезом в 2% агарозном геле. Для анализа размера фрагментов нуклеиновых кислот использовали маркеры молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Визуализацию нуклеиновых кислот проводили в геледокументирующей системе EBOX VX5/20LM (Vilber Lourmat, Франция).

При анализе содержания мРНК генов данные для каждого образца нормировали по экспрессии гена домашнего хозяйства (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH)). Все эксперименты дублировали для каждого образца. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Статистическая обработка результатов исследований. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05. Расчеты выполняли в программе Statistica 6.0.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, специфичных для генов человека

Название гена	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
<i>POU5F1</i>	F CAAAGCAGAAACCCTCGTGC R TGATCTGCTGCAGTGTGGG
<i>SOX2</i>	F TTTGTCCGAGACGGAGAAGC R TAACTGTCCATGCGCTGGTT
<i>NANOG</i>	F ATCTGCTTATTCAGGACAGCCC R AAAGGCTGGGGTAGGTAGGT
<i>TBXT</i>	F CCAATGGGGGTGGCTTCTT R ATGGGTGAGGGGTGTGTAGT
<i>MIXL1</i>	F CGAGTCCAGGATCCAGCTTTT R CTCCAACCCCGTTTGGTTCCG
<i>HAND1</i>	F ATCAAGACTCTGCGCCTAGC R AGGAAAACCTTCGTGCTGCT
<i>HAND2</i>	F GCCAAGGACGACCAGAATGG R GGTTTTCTTGTCTGTTGCTGCT
<i>FOXF1</i>	F CGGCTTCCGAAGGAAATGC R CGGCAAGTGGCCGTTTCAT
<i>BMP4</i>	F GGAGCTTCCACCACGAAGAA R GGAAGCCCCTTTCCCAATCA
<i>WNT5A</i>	F TAGCCTGAAGACATGCTGGC R TGACCTGTACCAACTTGCCC
<i>MEOX1</i>	F TTGCGGTAAACCTGGACCTC R CTTGGAGAGGCTGTGGAGTC
<i>DLL3</i>	F CACCGCTATGTGTGCGAGTG R GTTCATGGTCTCCGTCTCCC
<i>MSGN1</i>	F TCCCCCTCTCAGAGCCTTTC R TGACTTTGGTGCCCTTCTGG
<i>PDGFRB</i>	F TGGCCCTCAAAGGCGAG R TTCTTTGCGGGGGTATGTCC
<i>KDR</i>	F GTAACCCGGAGTGACCAAGG R AACCAAGGTACTTCGCAGGG
<i>APLNR</i>	F ACCTACACGTACCGGGACTA R GTGGTGCGTAACACCATGAC
<i>GAPDH</i>	F ATGGCAAATTCATGGCACC R GACTCCACGACGTACTCAGC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика клеток в процессе дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении

Ранее было показано, что в линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека образование клеток примитивной полоски инициируется после

активации передачи сигналов трансформирующего фактора роста- β (TGFB), WNT и FGF [23, 24]. А бифуркация первичной полоски на латеральную и параксиальную мезодерму может быть вызвана компенсирующими сигналами BMP и WNT. Было показано, что активация WNT и блокирование передачи сигналов BMP аннулируют латеральную мезодерму и расширяют параксиальную мезодерму. Напротив, ингибирование WNT и экзогенный BMP индуцируют латеральную мезодерму [23].

В нашей работе мы использовали линию ИПСК человека endo-iPS12, полученную в результате трансдукции эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) ретровирусными векторами, содержащими кДНК генов *Oct3/4*, *Sox2*, *KLF4* и *cMyc* [22]. Для индукции дифференцировки ИПСК в клетки примитивной полоски мы использовали среду, содержащую bFGF в течение суток. Затем для индукции ПМ использовали среду, содержащую WNT-1, а для индукции ЛМ использовали среду, содержащую BMP4, и культивировали клетки в течение 6 суток. Образцы собирали на 2 и 7 и 21 день культивирования. Морфологические изменения клеток при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении представлены на рис. 1.

Исходные колонии ИПСК были плоские, имели ровный край. Мелкие, круглые клетки внутри колонии имели высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, т.е. крупное ядро и небольшой объем цитоплазмы и были связаны плотными контактами (рис. 1a).

В процессе дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении клетки постепенно увеличивались в размерах и приобретали фибробластоподобную морфологию. Однако клетки ПМ и ЛМ все же различались по морфологии и размерам, что было особенно заметно к 7 дню культивирования. Клетки ПМ были более мелкими и относительно более округлыми по сравнению с клетками ЛМ (рис. 1b, d). Тем не менее и клетки ПМ, и клетки ЛМ при культивировании в стандартной безсывороточной среде, поддерживающей рост недифференцированных МСК, приобретали фенотипические характеристики МСК взрослого человека (рис. 1c, e).

Изменение экспрессии генов плюрипотентности при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении

Изогенные культуры клеток, полученные в результате дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении, исследовали на экспрессию генов плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, генов, характерных для клеток примитивной полоски – *TBXT* и *MIXL1*, генов, экспрессирующих

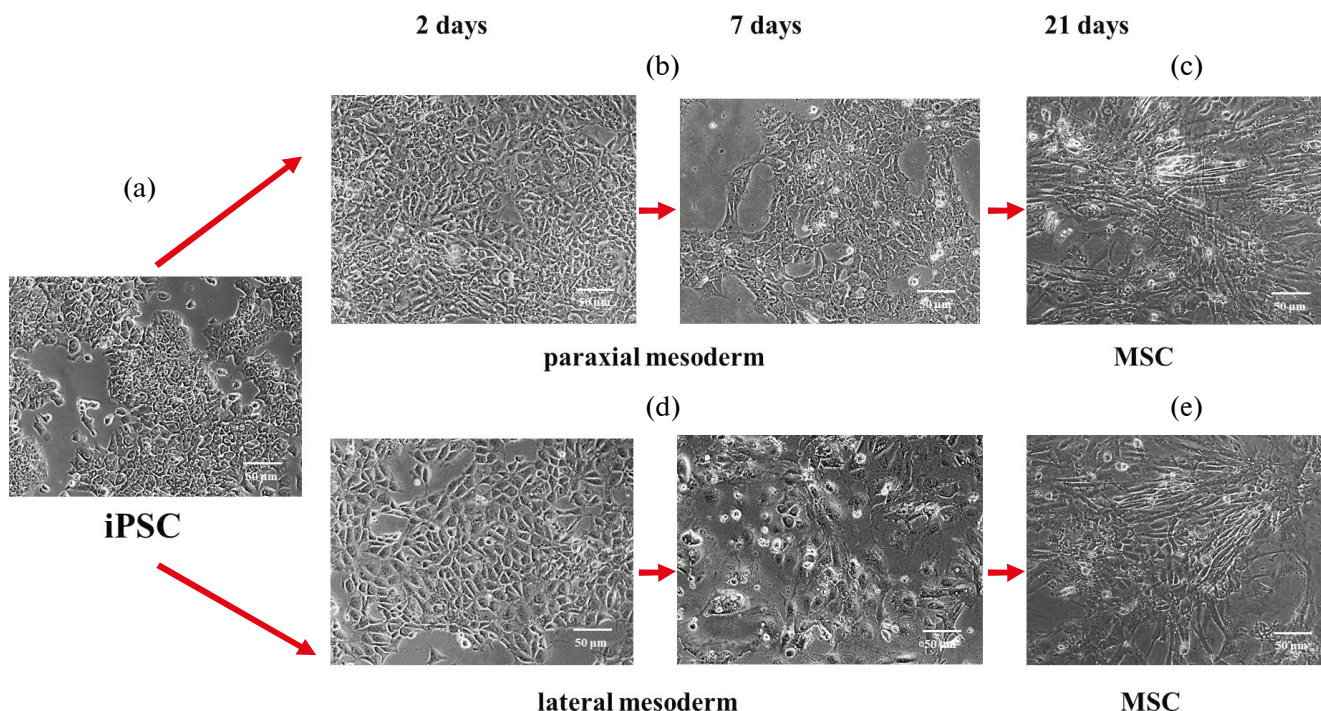


Рис. 1. Морфологические изменения клеток при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении. (а) – исходная культура ИПСК. (б) – морфологические изменения клеток при индукции дифференцировки ИПСК в парааксиальную мезодерму. (с) – МСК, полученные из клеток парааксиальной мезодермы. (д) – морфологические изменения клеток при индукции дифференцировки ИПСК в латеральную мезодерму. (е) – МСК, полученные из клеток латеральной мезодермы. Фазовый контраст. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. MSC – мезенхимальные стромальные клетки.

ся в ПМ и ЛМ – *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *MEOX1*, а также рецепторов, характерных для МСК – *PDGFR*, *KDR* и *APLN*.

Клетки исходной культуры ИПСК экспрессировали гены плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* (рис. 2а). В процессе дифференцировки уровень экспрессии этих генов в клетках ЛМ и ПМ, значительно снижался к 7 дню культивирования относительно исходной культуры ИПСК. К 21 дню культивирования в МСК экспрессия этих генов не обнаруживалась (рис. 2б, с).

Экспрессия генов примитивной полосы при индукции мезодермальной дифференцировки ИПСК

Ранее было показано, что для клеток примитивной полосы эмбриона человека характерна коэкспрессия генов *TBX1* и *MIXL1* [23, 24]. Исследование уровня экспрессии этих маркеров при мезодермальной дифференцировке ИПСК показало, что на второй день культивирования гены *TBX1* и *MIXL1* экспрессировались как в клетках ЛМ, так и в ПМ, (рис. 3а). Однако при дальнейшем культивировании уровень экспрессии этих генов в клетках обеих

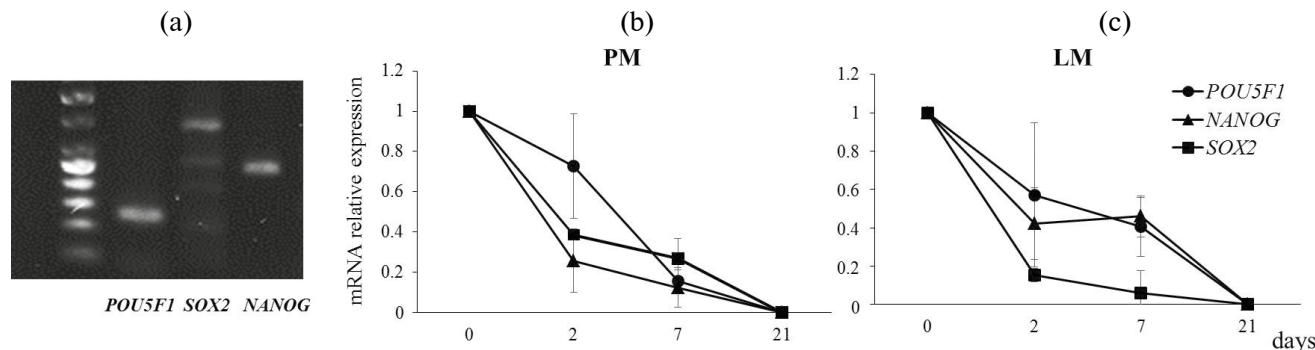


Рис. 2. Экспрессия маркеров плюрипотентности при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении. (а) – Экспрессия генов *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* в исходной культуре ИПСК. Электрофореграмма продуктов ПЦР. Изменение экспрессии маркеров плюрипотентности в ИПСК в процессе дифференцировки в парааксиальную мезодерму (б) и латеральную мезодерму (с). Представлены средние величины и их ошибки 3-х независимых экспериментов. РМ – парааксиальная мезодерма. ЛМ – латеральная мезодерма.

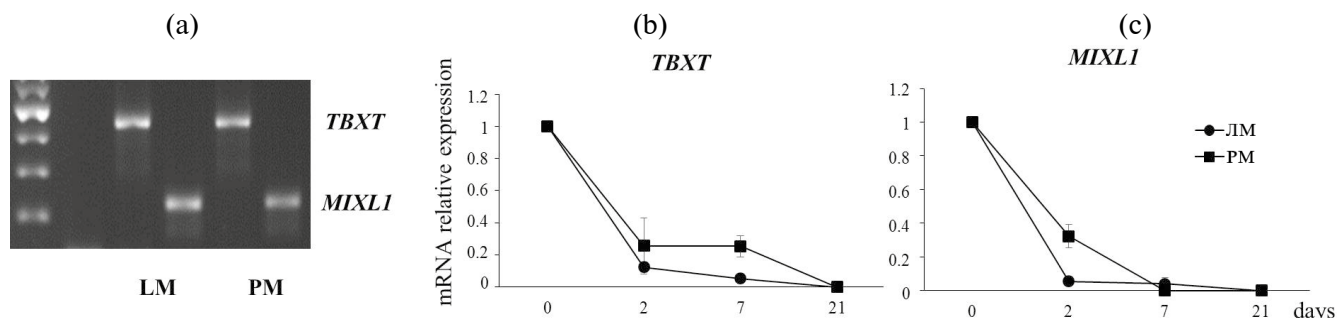


Рис. 3. Экспрессия генов примитивной полоски в клетках латеральной и параксиальной мезодермы, дифференцированных из ИПСК. (a) – коэкспрессия генов *TBXT* и *MIXL1* в клетках ЛМ и ПМ на 2 день культивирования. Электрофореграмма продуктов ПЦР. (b) и (c) – динамика изменения экспрессии генов *TBXT* и *MIXL1* в процессе дифференцировки ИПСК в ПМ и ЛМ. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. ПМ – параксиальная мезодерма. ЛМ – латеральная мезодерма.

культур быстро снижался. Этот факт указывает на то, что при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении клетки в стадии примитивной полоски находятся кратковременно (рис. 3b, c).

Изменение экспрессионного профиля клеток ЛМ при дифференцировке из ИПСК

Клетки ЛМ получали из ИПСК через стадию примитивной полоски под воздействием комбинаций активина А, bFGF и BMP4. Образцы кле-

ток собирали на 2-й и 7-й день культивирования. В полученных клетках оценивали уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLNR*. Мы показали, что уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2*, и *BMP4*, характерных для клеток латеральной пластинки в эмбрионе человека, существенно возрастал в клетках ЛМ к 7-му дню культивирования по сравнению с исходной культурой ИПСК и клетками ПМ (рис. 4). Значимых различий в уровнях экспрессии остальных генов между ИПСК, клетками ЛМ и ПМ

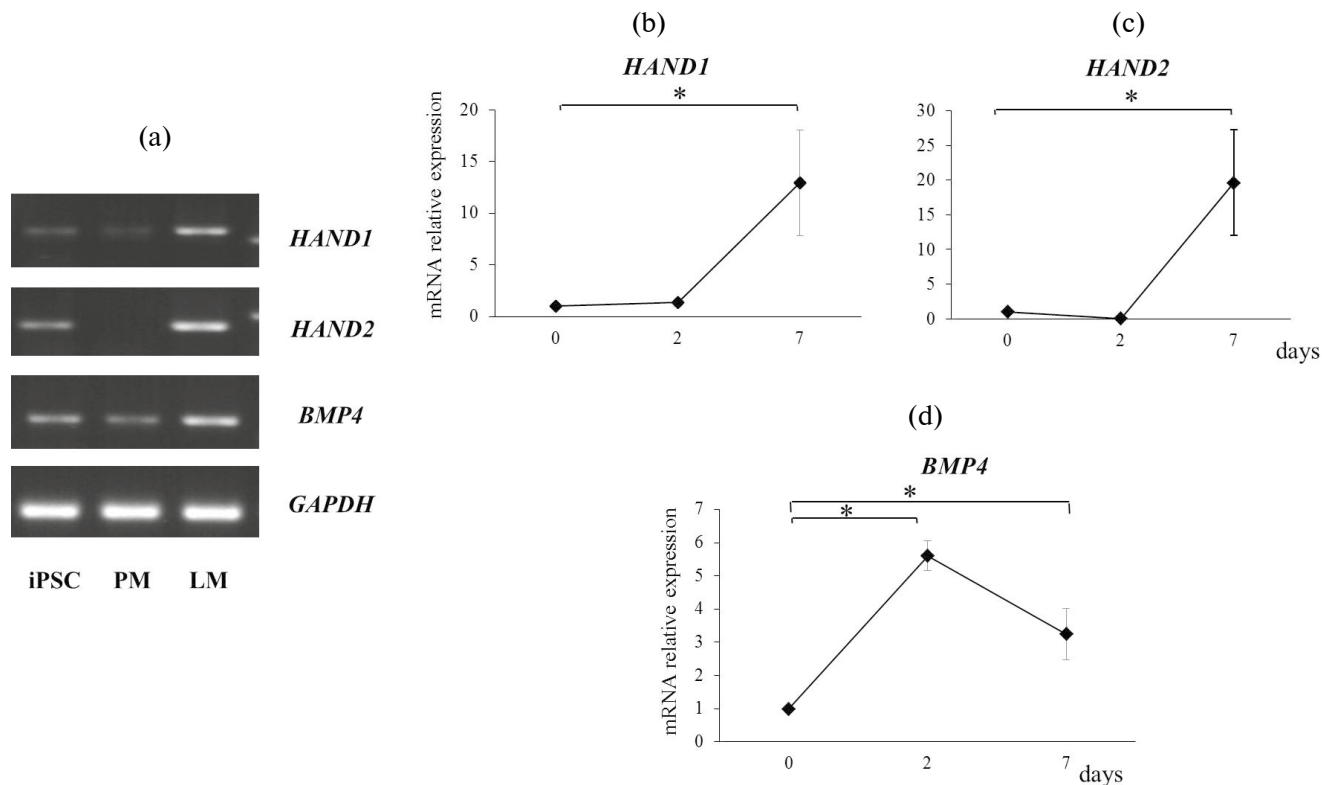


Рис. 4. Экспрессия генов *HAND1*, *HAND2*, *BMP4* в клетках ЛМ, дифференцированных из ИПСК. (a) – уровень экспрессии генов в ИПСК, клетках ЛМ и ПМ на 7-й день культивирования. Электрофореграмма продуктов ПЦР. Изменение экспрессии генов *HAND1* (b), *HAND2* (c), *BMP4* (d) в процессе дифференцировки ИПСК в ЛМ. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность различий при $p < 0.05$. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. ПМ – параксиальная мезодерма. ЛМ – латеральная мезодерма.

в процессе дифференцировки выявлено не было (данные не представлены).

Изменение экспрессионного профиля клеток ПМ в процессе дифференцировки из ИПСК

Клетки ПМ получали из ИПСК через стадию примитивной полоски под воздействием комбинации активина А, bFGF и морфогена WNT-1. Образцы клеток собирали на 2-й и 7-й дни культивирования. Полученные клетки, так же как и клетки ЛМ, тестировали на экспрессию генов *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLN1*. Мы показали, что уровень экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4* снижался в клетках ПМ к 7-му дню культивирования по сравнению с клетками ЛМ (рис. 5а, б, с). В полученных клетках ПМ экспрессировались гены *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1B*, характерные для клеток ПМ в эмбрионе человека. Однако значимых различий в уровнях экспрессии этих генов между клетками ЛМ и ПМ выявлено не было (данные не представлены). Было также обнаружено снижение уровня экспрессии гена *WNT5A* в ЛМ и ПМ по сравнению с исходной линией ИПСК (рис. 5д).

Параксиальная мезодерма у эмбрионов сегментирована на сомитомеры. Показано, что ранние предшественники сомитов при дифференцировке в культуре плюрипотентных клеток человека экспрессируют ген *MEOX1* [23, 25, 26]. В наших экспериментальных условиях мы не выявили экспрессии этого гена в клетках ПМ. Однако при одностадийной неспецифической мезодермальной дифференцировке ИПСК в условиях культивирования в стандартной среде, поддерживающей рост МСК взрослого человека на 7 день культивирования в клетках обнаруживалась экспрессия гена *MEOX1* (рис. 5е). Этот факт указывает на то, что протоколы многостадийной мезодермальной дифференцировки ИПСК, используемые в данной работе, не позволяют получить клетки пресомитной мезодермы. Однако полученные результаты подтверждают принципиальную возможность получения таких клеток из ИПСК *in vitro*.

Дифференцировка клеток ЛМ и ПМ в МСК

Далее клетки ЛМ и ПМ были дифференцированы в МСК посредством культивирования в стандартной среде для поддержания роста

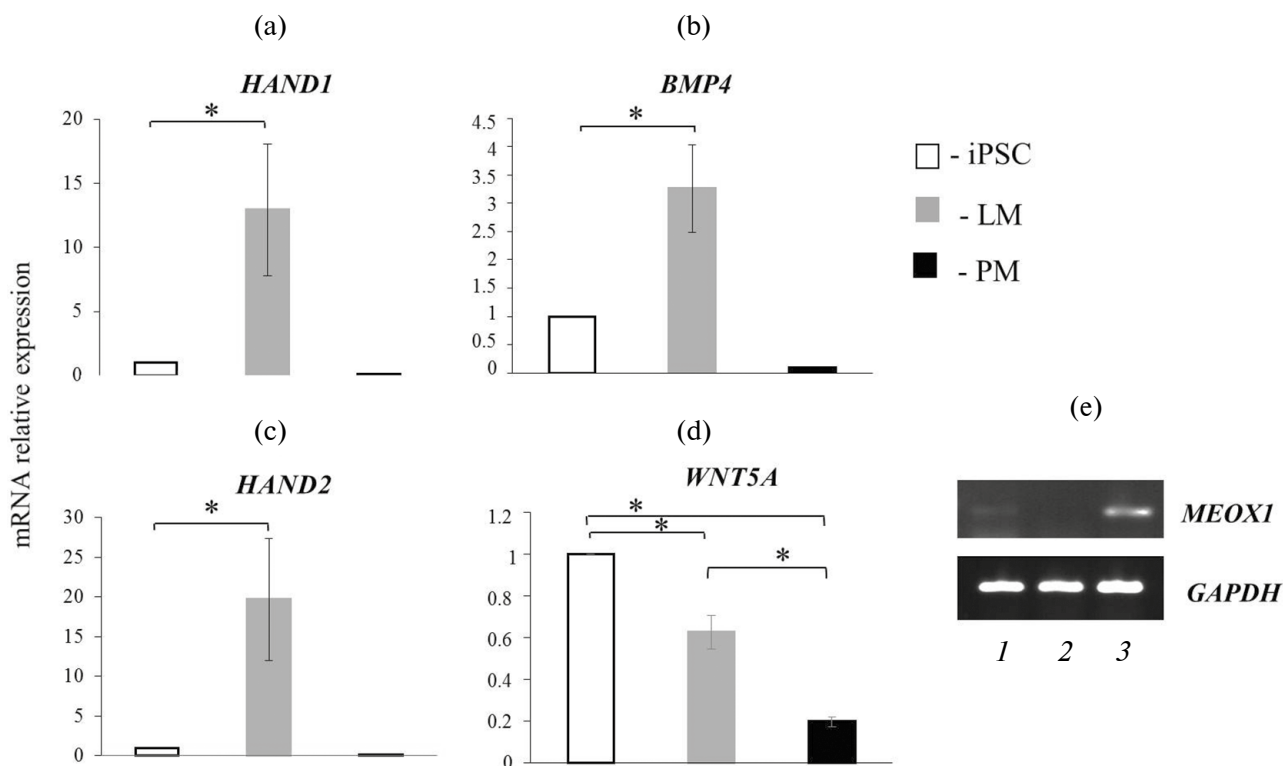


Рис. 5. Относительная экспрессия генов в клетках ПМ и ЛМ, дифференцированных из ИПСК. Уровень экспрессии генов *HAND1* (а), *HAND2* (б), *BMP4* (с) и *WNT5A* (д) на 7-й день дифференцировки относительно исходной культуры ИПСК. Представлены средние величины и их ошибки 3 независимых экспериментов. Звездочка показывает достоверность различий при $p < 0.05$. (е) – экспрессия гена пресомитной мезодермы *MEOX1* в клетках при специфической многостадийной и неспецифической одностадийной дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении на 7-й день культивирования. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. PM – параксиальная мезодерма. LM – латеральная мезодерма. 1 – клетки ЛМ, 2 – клетки ПМ, 3 – клетки, полученные в результате спонтанной мезодермальной дифференцировки ИПСК в стандартной среде для культивирования МСК.

недифференцированных МСК взрослого человека. Через три недели культивирования как из ЛМ, так и из ПМ были получены клетки фибробластоподобной морфологии, способные к адгезии к пластиковой поверхности. Исследование экспрессии панмезодермальных маркеров в МСК, дифференцированных из ЛМ и ПМ, не выявило различий между этими клетками. Полученные клетки обладали сходными уровнями экспрессии всех исследованных маркеров: *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *MEOX1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLN*. Кроме того, полученные из ЛМ и ПМ клетки по экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90 и CD73, отсутствию экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34 и HLA-DR, а также способности дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении соответствовали МСК взрослого человека (данные не представлены).

Таким образом, из одного источника ИПСК были созданы и охарактеризованы изогенные модели МСК и их предшественников: клеток ЛМ и ПМ. Обнаружено, что полученные в результате дифференцировки ИПСК клетки ПМ и ЛМ обладают существенными отличиями в эпигенетическом статусе по сравнению с исходными ИПСК и МСК взрослого организма. Показано, что полученные клетки ПМ и ЛМ обладают экспрессионным профилем, характерным для этих клеток в эмбрионе человека. Полученные изогенные линии клеток МСК, ПМ и ЛМ позволят изучать молекулярные механизмы регенерации тканей на различных стадиях развития организма.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Безрубцовое заживление ран с полным восстановлением первоначальной структуры ткани у плода млекопитающих первого и второго триместров развития было экспериментально продемонстрировано на овцах [27], кроликах [28], крысах [29] и мышах [30]. Кроме того, экспериментальная модель ран кожи плода человека была описана Лоренцем в 1992 г. [31]. Было показано, что замечательной особенностью ран у плодов в эти периоды развития является полное отсутствие миофибробластов, что контрастирует с их появлением в более поздние фетальные и постнатальные периоды [32, 33]. Было обнаружено, что в фетальных фибробластоподобных клетках (МСК) уровни α -SMA значительно снижены по сравнению со взрослыми [34]. У фетальных фибробластов менее выражена сократительная реакция на жесткий внеклеточный матрикс и TGF- β 1 по сравнению с их кожными аналогами у взрослых [35, 36]. После ранения фетальные фибробласты мигрируют в раны и пролиферируют там гораздо быстрее, чем у взрослых [37]. Однако антифибротическая активность фетальных фибробластов изу-

чена недостаточно и имеющиеся к настоящему времени данные, полученные на животных моделях, не позволяют выявить конкретные молекулярные механизмы, ответственные за безрубцовое заживление фетальных ран.

Возможность получения изогенных клеточных моделей, соответствующих различным стадиям развития человека, открывает новые пути для исследования фенотипических и функциональных особенностей мезодермальных клеток взрослого и плода в провоспалительном микроокружении для выяснения механизмов, ответственных за безрубцовое заживление.

В настоящее время разработано множество стратегий спонтанной и направленной дифференцировки ИПСК человека в специализированные клетки трех зародышевых листков [38, 39, 40]. При мезодермальной дифференцировке ИПСК была продемонстрирована возможность получения как гемопоэтических клеток, так и различных типов популяций стромальных мезенхимальных клеток, включая МСК, кардиомиоциты, теноциты, хондроциты [41–46].

Недавние исследования показали, что при дифференцировке ИПСК в мезодермальном направлении МСК могут быть получены через несколько промежуточных стадий, включая стадии примитивной полосы [24, 47], нервного гребня [41, 48], нейромезодермальных предшественников [49], мезодермы боковой пластинки [47, 50], параксиальной мезодермы и сомитов [26]. Было установлено, что сигнальные молекулы WNT, FGF, BMP и ACTIVIN/NODAL играют важную роль в индукции и навигации альтернативных мезодермальных путей при дифференцировке ИПСК в МСК [23, 25, 51, 52]. В этой работе мы предприняли попытку получения изогенных линий МСК и их предшественников из параксиальной и латеральной мезодермы при последовательной дифференцировке одной линии ИПСК.

В последнее время идентифицированы как индуктивные, так и репрессивные сигнальные молекулы, определяющие этапы, имитирующие последовательность событий, происходящих во время эмбрионального развития, преодолевая которые, ИПСК способны вырабатывать разнообразное мезодермальное потомство. Было обнаружено, что образование примитивной полосы в линиях ИПСК инициируется после активации сигнальных путей TGF β , WNT и FGF. В нескольких работах было показано, что полученные из ИПСК клетки примитивной полосы характеризуются коэкспрессией транскрипционных факторов BRACHYURY, кодируемого геном *TBX1*, и MIXL1 [23, 24]. В нашей работе мы обнаружили, что в результате воздействия bFGF и активина А в культуре ИПСК снижается уровень экспрессии маркеров плюрипотентности *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* и происходит коммитирование кле-

ток в мезодермальном направлении. В результате в культуре возникала популяция клеток, коэкспрессирующих *TBX1* и *MIXL1* и, следовательно, фенотипически относящихся к примитивной полоске. Однако такие клетки существовали в культуре краткосрочно, быстро переходя в следующую фазу дифференцировки.

Раздвоение первичной полоски на ЛМ и ПМ в плюрипотентных клетках человека может быть вызвано компенсирующей активацией сигнальных путей BMP и WNT. Ранее было показано, что активация WNT с одновременным блокированием сигналов BMP в плюрипотентных клетках человека блокирует образование ЛМ и усиливает развитие ПМ. Напротив, ингибирование WNT и добавление экзогенного BMP индуцируют развитие ЛМ. Было показано, что клетки ЛМ характеризуются экспрессией *HAND1* и *FOXF1*. Клетки ПМ определяются по экспрессии *DLL3* и *MSGN1* [23, 26, 50, 53]. В нашей работе воздействие BMP4 на клетки примитивной полоски вызывало усиление в них экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4*. Ген *FOXF1* также экспрессировался в этих клетках. Однако уровень экспрессии *FOXF1* клетках не претерпевал значимых изменений в процессе дифференцировки в ЛМ. Таким образом, в результате использования протокола дифференцировки через стадию примитивной полоски, были получены клетки, фенотипически соответствующие клеткам ЛМ эмбриона человека. С другой стороны, в наших экспериментальных условиях при воздействии на клетки примитивной полоски морфогена WNT-1 в них происходило снижение уровня экспрессии генов *HAND1*, *HAND2* и *BMP4* по сравнению с клетками ЛМ. Эти клетки также экспрессировали гены *DLL3* и *MSGN1*. Следовательно, клетки, полученные из ИПСК через стадию примитивной полоски с использованием WNT-1, фенотипически можно отнести к клеткам ПМ эмбриона человека.

ПМ у эмбрионов сегментирована на сомитомеры. Ингибирование сигнальных путей FGF/ERK и WNT направляет дифференцировку клеток ПМ, происходящих из плюрипотентных клеток человека, в сторону ранних предшественников сомитов, экспрессирующих *MEOX1* и *FOXC2* [23, 25, 26]. В наших экспериментах клетки ПМ, полученные при дифференцировке ИПСК, не экспрессировали ген *MEOX1*. Следовательно, используемый нами протокол специфической дифференцировки ИПСК в ПМ, к сожалению, не позволяет получить клетки пресомитной мезодермы.

Полученные нами с использованием линейно-специфических протоколов дифференцировки ИПСК клетки ЛМ, так же как и клетки ПМ, были способны в дальнейшем давать начало клеткам, соответствующим МСК взрослого человека по паттернами экспрессии генов, по экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90 и CD73, отсут-

ствию экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34 и HLA-DR, а также способности дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении. Таким образом, мы установили, что полученные нами клетки ПМ и ЛМ, дифференцированные из ИПСК, являются предшественниками МСК.

В работах других исследователей также было показано, что МСК, полученные из ИПСК, демонстрируют типичный профиль поверхностных маркеров и потенциал дифференцировки, однако приобретают некоторые эпигенетические, фенотипические и функциональные особенности, отличные от МСК, выделенных из тканей взрослого человека. В нескольких исследованиях было показано, что МСК, полученные из ИПСК, обладают усиленной пролиферативной активностью и более высоким уровнем экспрессии CD10 и CD24, чем у взрослых МСК [49, 50, 54, 55]. Более того, МСК, полученные из ИПСК через ЛМ и ПМ, продемонстрировали более высокий остеогенный и хондрогенный, но меньший адипогенный потенциал *in vitro* по сравнению со взрослыми МСК [26, 47, 50]. В нашей работе нам не удалось провести сравнения между изогенными МСК, дифференцированными из ИПСК через ЛМ и ПМ, и МСК взрослого человека, т.к. исходными клетками для получения ИПСК были клетки эндотелия HUVEC.

В нашей работе нам также не удалось выявить различия между МСК, полученными из ПМ и ЛМ, по экспрессии мезодермальных маркеров, которые мы использовали в этой работе. Однако в других работах было показано, что МСК, происходящие из ИПСК, приобретают сигнатуру генов, связанную с омоложением, в частности экспрессию *INHBE*, *DNMT3B*, *POU5F1P1*, *CDKN1C* и *GCNT2*, которые также экспрессируются в ИПСК, но не в родительских взрослых МСК [56, 57]. Детальное сравнение транскриптомов между МСК, происходящими из ИПСК, и МСК взрослых показало, что факторы транскрипции развития *HOXD1*, *NKX2-5*, *LHX2* и *FGF12*, а также маркеры *LIFR*, *PTGFRN*, *PVR* специфически активировались в МСК, происходящих из ИПСК [58].

В нескольких исследованиях сообщалось, что помимо линейно-специфической дифференцировки МСК могут быть получены непосредственно из ИПСК без какого-либо сигнального контроля промежуточных стадий с использованием сред, содержащих сыворотку [59–61]. В этой работе мы также опробовали протокол одностадийной неспецифической дифференцировки ИПСК в МСК с использованием стандартной среды для культивирования МСК. На 7-й день культивирования в культуре появлялись популяции клеток, экспрессирующих панмезодермальные маркеры, в том числе *MEOX1*. Полученные результаты указывают на то, что при такой неспецифической дифференцировке в культуре могут

одновременно образовываться популяции клеток, фенотипически относящихся к разным по развитию клонально-специфическим мезодермальным предшественникам.

Фенотипические свойства и функциональное состояние МСК в значительной степени зависят от сигналов, поступающих из внешнего микроокружения, и определяют успешность заживления раны, а также степень рубцевания. Ранее нами было показано, что у взрослого человека воздействие IFN- γ и рецепторное взаимодействие молекул HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на МСК с их контррецепторами CTLA4/CD28 на Т-лимфоцитах, индуцируя синтез IDO в МСК, образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую снижению активации и пролиферации активированных иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции в хронических ранах [14, 62–64]. Однако функциональная активность МСК в ранах взрослого человека, хотя и стимулирует заживление, не препятствует образованию рубца [64].

Мы полагаем, что создание линий изогенных мезодермальных клеток различных стадий развития человека, дифференцированных из ИПСК, и сравнительный анализ их функциональной активности при рецептор-зависимой активации провоспалительных сигнальных путей позволит выявить ключевые молекулы и терапевтические мишени, минимизирующие образование рубцов. Понимание механизмов заживления ран предоставит возможности для разработки новых терапевтических средств, основанных на точном ингибировании или стимуляции элементов пути заживления ран.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и участием людей в качестве объектов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00026).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Ю.Г.), проведение экспериментов и сбор данных (С.А.В., К.Е.В.), обработка данных (С.Ю.Г., С.А.В.), написание и редактирование текста статьи (С.Ю.Г., К.С.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shaw TJ, Martin P* (2009) Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 18):3209–3213. <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>
2. *Marshall CD, Hu MS, Leavitt T, Barnes LA, Lorenz HP, Longaker MT* (2018). Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 7(2):29–45. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0696>
3. *Hu MS, Maan ZN, Wu JC, Rennert RC, Hong WX, Lai TS, Cheung AT, Walmsley GG, Chung MT, McArdle A, Longaker MT, Lorenz HP* (2014) Tissue engineering and regenerative repair in wound healing. *Ann Biomed Eng* 42(7):1494–1507. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1010-z>
4. *Kim EY, Hussain A, Khachemoune A* (2022) Evidence-based management of keloids and hypertrophic scars in dermatology. *Arch Dermatol Res* 315(6):1487–1495. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02509-x>
5. *Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP* (2003) Fetal wound healing. *Front Biosci* 1;8: s1240–1248. <https://doi.org/10.2741/1183>
6. *Moore AL, Marshall CD, Barnes LA, Murphy MP, Ransom RC, Longaker MT* (2018) Scarless wound healing: Transitioning from fetal research to regenerative healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 7(2):10.1002/wdev.309. <https://doi.org/10.1002/wdev.309>
7. *Suzdaltseva Y, Kiselev SL* (2023) Mesodermal Derivatives of Pluripotent Stem Cells Route to Scarless Healing. *Int J Mol Sci* 24(15):11945. <https://doi.org/10.3390/ijms241511945>
8. *Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI* (2019) Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 4:22. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0083-6>. eCollection 2019
9. *Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M* (2017) Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 23(6):515–528. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0365>
10. *Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Shi Y* (2022) The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):92. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
11. *Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE* (2017) Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev* 26(9):617–631. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0349>
12. *Le Blanc K, Davies LC* (2015) Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett* 168(2):140–146. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.004>
13. *Weiss ARR, Dahlke MH* (2019) Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* 10:1191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>

14. *Suzdaltseva Y, Goryunov K, Silina E, Manturova N, Stupin V, Kiselev SL* (2022) Equilibrium among Inflammatory Factors Determines Human MSC-Mediated Immunosuppressive Effect. *Cells* 11(7):1210. <https://doi.org/10.3390/cells11071210>
15. *Guillén MI, Platas J, Pérez Del Caz MD, Mirabet V, Alcaraz MJ* (2018) Paracrine Anti-inflammatory Effects of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Human Monocytes. *Front Physiol* 31(9):661. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00661>
16. *Mareschi K, Castiglia S, Sanavio F, Rustichelli D, Mura-ro M, Defedele D, Bergallo M, Fagioli F* (2016) Immunoregulatory effects on T lymphocytes by human mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow, amniotic fluid, and placenta. *Exp Hematol* 44(2):138–150.e1. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.009>
17. *Jiang D, Scharffetter-Kochanek K* (2020) Mesenchymal Stem Cells Adaptively Respond to Environmental Cues Thereby Improving Granulation Tissue Formation and Wound Healing. *Front Cell Dev Biol* 8:697. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00697>
18. *Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
19. *Cheung C, Bernardo AS, Trotter MW, Pedersen RA, Sinha S* (2012) Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat Biotechnol* 30(2):165–173. <https://doi.org/10.1038/nbt.2107>
20. *Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, Sánchez-Cabo F, Méndez-Ferrer S* (2014) The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 3: e03696. <https://doi.org/10.7554/eLife.03696>
21. *Sheng G* (2015) The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC Dev Biol* 15:44. <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0094-5>
22. *Shutova MV, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Kiselev SL* (2009) Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae* 1(2):91–92. <https://PMC3347519>
23. *Loh KM, Chen A, Koh PW, Deng TZ, Sinha R, Tsai JM, Barkal AA, Shen KY, Jain R, Morganti RM, Shyh-Chang N, Fernhoff NB, George BM, Wernig G, Salomon REA, Chen Z, Vogel H, Epstein JA, Kundaje A, Talbot WS, Beachy PA, Ang LT, Weissman IL* (2016) Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. *Cell* 166(2):451–467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.011>
24. *Tran NT, Trinh QM, Lee GM, Han YM* (2012) Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. *Stem Cells Dev* 21(7):1165–1175. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0346>
25. *Xi H, Fujiwara W, Gonzalez K, Jan M, Liebscher S, Van Handel B, Schenke-Layland K, Pyle AD* (2017) In Vivo Human Somatogenesis Guides Somite Development from hPSCs. *Cell Rep* 18(6):1573–1585. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.040>
26. *Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M* (2018) Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development* 145(16):dev165431. <https://doi.org/10.1242/dev.165431>
27. *Burrington JD* (1971) Wound healing in the fetal lamb. *J Pediatr Surg* 6(5):523–528. [https://doi.org/10.1016/0022-3468\(71\)90373-3](https://doi.org/10.1016/0022-3468(71)90373-3)
28. *Somasundaram K, Prathap K* (1970) Intra-uterine healing of skin wounds in rabbit fetuses. *J Pathol* 100(2):81–86. <https://doi.org/10.1002/path.1711000202>
29. *Goss AN* (1977) Intra-uterine healing of fetal rat oral mucosal, skin and cartilage wounds. *J Oral Pathol* 6(1):35–43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1977.tb01792.x>
30. *Gnyawali SC, Sinha M, El Masry MS, Wulff B, Ghatak S, Soto-Gonzalez F, Wilgus TA, Roy S, Sen CK* (2020) High resolution ultrasound imaging for repeated measure of wound tissue morphometry, biomechanics and hemodynamics under fetal, adult and diabetic conditions. *PLoS One* 15(11): e0241831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241831>
31. *Lorenz HP, Longaker MT, Perkocho LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS* (1992) Scarless wound repair: a human fetal skin model. *Development* 114(1):253–259. <https://doi.org/10.1242/dev.114.1.253>
32. *Estes JM, Vande Berg JS, Adzick NS, MacGillivray TE, Desmoulière A, Gabbiani G* (1994) Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds. *Differentiation* 56(3):173–181. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.1994.5630173.x>
33. *Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS* (1997) Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J Pediatr Surg* 32(7):1017–1021. [https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(97\)90390-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(97)90390-0)
34. *Satish L, Johnson S, Wang JH, Post JC, Ehrlich GD, Kathju S* (2010) Chaperonin containing T-complex polypeptide subunit eta (CCT-eta) is a specific regulator of fibroblast motility and contractility. *PLoS One* 5(4): e10063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010063>
35. *Moulin V, Tam BY, Castilloux G, Auger FA, O'Connor-McCourt MD, Philip A, Germain L* (2001) Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity. *J Cell Physiol* 188(2):211–222. <https://doi.org/10.1002/jcp.1110>
36. *Jerrell RJ, Leih MJ, Parekh A* (2019) The altered mechanical phenotype of fetal fibroblasts hinders myofibroblast differentiation. *Wound Repair Regen* 27(1):29–38. <https://doi.org/10.1111/wrr.12677>
37. *Brink HE, Miller GJ, Beredjikian PK, Nicoll SB* (2006) Serum-dependent effects on adult and fetal tendon fibroblast migration and collagen expression. *Wound Repair Regen* 14(2):179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00108.x>

38. Nekrasov ED, Vigont VA, Klyushnikov SA, Lebedeva OS, Vassina EM, Bogomazova AN, Chestkov IV, Semashko TA, Kiseleva E, Suldina LA, Bobrovsky PA, Zimina OA, Ryazantseva MA, Skopin AY, Illarionov SN, Kaznacheyeva EV, Lagarkova MA, Kiselev SL (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Neurodegener* 11:27. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0092-5>
39. Philonenko ES, Shutova MV, Khomyakova EA, Vassina EM, Lebedeva OS, Kiselev SL, Lagarkova MA (2017) Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Mesodermal and Ectodermal Derivatives Is Independent of the Type of Isogenic Reprogrammed Somatic Cells. *Acta Naturae* 9(1):68–74. <https://PMC5406662>
40. Panova AV, Klementieva NV, Sycheva AV, Korobko EV, Sosnovtseva AO, Krasnova TS, Karpova MR, Rubtsov PM, Tikhonovich YV, Tiulpakov AN, Kiselev SL (2022) Aberrant Splicing of INS Impairs Beta-Cell Differentiation and Proliferation by ER Stress in the Isogenic iPSC Model of Neonatal Diabetes. *Int J Mol Sci* 23(15):8824. <https://doi.org/10.3390/ijms23158824>
41. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, Shimomura K, Hart DA, Hideki Y, Norimasa N (2017) Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells Int* 2017:1960965. <https://doi.org/10.1155/2017/1960965>
42. Kimura M, Furukawa H, Shoji M, Shinozawa T (2019) Increased mesodermal and mesendodermal populations by BMP4 treatment facilitates human iPSC line differentiation into a cardiac lineage. *J Stem Cells Regen Med* 15(2):45–51. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1502009>
43. Wang Y, Wang H, Guo J, Gao J, Wang M, Xia M, Wen Y, Su P, Yang M, Liu M, Shi L, Cheng T, Zhou W, Zhou J (2020) LGR4, Not LGR5, Enhances hPSC Hematopoiesis by Facilitating Mesoderm Induction via TGF- β Signaling Activation. *Cell Rep* 31(5):107600. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107600>
44. Kamatani T, Hagizawa H, Yarimitsu S, Morioka M, Koyamatsu S, Sugimoto M, Kodama J, Yamane J, Ishiguro H, Shichino S, Abe K, Fujibuchi W, Fujie H, Kaito T, Tsumaki N (2022) Human iPSC cell-derived cartilaginous tissue spatially and functionally replaces nucleus pulposus. *Biomaterials* 284:121491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121491>
45. Philonenko ES, Tan Y, Wang C, Zhang B, Shah Z, Zhang J, Ullah H, Kiselev SL, Lagarkova MA, Li D, Dai Y, Samokhvalov IM (2021) Recapitulative haematopoietic development of human pluripotent stem cells in the absence of exogenous haematopoietic cytokines. *J Cell Mol Med* 25(18):8701–8714. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16826>
46. Nakajima T, Ikeya M (2021). Development of pluripotent stem cell-based human tenocytes. *Dev Growth Differ* 63(1):38–46. <https://doi.org/10.1111/dgd.12702>
47. Liu TM, Yildirim ED, Li P, Fang HT, Denslin V, Kumar V, Loh YH, Lee EH, Cool SM, Teh BT, Hui JH, Lim B, Shyh-Chang N (2020) Ascorbate and Iron Are Required for the Specification and Long-Term Self-Renewal of Human Skeletal Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 14(2):210–225. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.01.002>
48. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J (2014) Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. *PLoS One* 9(12):e112291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112291>. eCollection 2014
49. Wang H, Li D, Zhai Z, Zhang X, Huang W, Chen X, Huang L, Liu H, Sun J, Zou Z, Fan Y, Ke Q, Lai X, Wang T, Li X, Shen H, Xiang AP, Li W (2019) Characterization and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells with Neuromesodermal Origin from Human Pluripotent Stem Cells. *Theranostics* 9(6):1683–1697. <https://doi.org/10.7150/thno.30487>. eCollection 2019
50. Wei Y, Wang B, Jia L, Huang W, Xiang AP, Fang C, Liang X, Li W (2022) Lateral Mesoderm-Derived Mesenchymal Stem Cells With Robust Osteochondrogenic Potential and Hematopoiesis-Supporting Ability. *Front Mol Biosci* 9:767536. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.767536>. eCollection 2022
51. Umeda K, Zhao J, Simmons P, Stanley E, Elefanty A, Nakayama N (2012) Human chondrogenic paraxial mesoderm, directed specification and prospective isolation from pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2:455. <https://doi.org/10.1038/srep00455>
52. Kishimoto K, Iwasawa K, Sorel A, Ferran-Heredia C, Han L, Morimoto M, Wells JM, Takebe T, Zorn AM (2022) Directed differentiation of human pluripotent stem cells into diverse organ-specific mesenchyme of the digestive and respiratory systems. *Nat Protoc* 17(11):2699–2719. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00733-3>
53. Smith CA, Humphreys PA, Naven MA, Woods S, Mancini FE, O'Flaherty J, Meng QJ, Kimber SJ (2023) Directed differentiation of hPSCs through a simplified lateral plate mesoderm protocol for generation of articular cartilage progenitors. *PLoS One* 18(1):e0280024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280024>
54. Kimbrel EA, Kouris NA, Yavanian GJ, Chu J, Qin Y, Chan A, Singh RP, McCurdy D, Gordon L, Levinson RD, Lanza R (2014) Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev* 23(14):1611–1624. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0554>
55. Eto S, Goto M, Soga M, Kaneko Y, Uehara Y, Mizuta H, Era T (2018) Mesenchymal stem cells derived from human iPSC cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLoS One* 13(7):e0200790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200790>. eCollection 2018

56. *Spitzhorn LS, Megges M, Wruck W, Rahman MS, Otte J, Degistirici Ö, Meisel R, Sorg RV, Oreffo ROC, Adjaye J* (2019) Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Res Ther* 10(1):100. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1209-x>
57. *Wruck W, Graffmann N, Spitzhorn LS, Adjaye J* (2021) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Acquire Rejuvenation and Reduced Heterogeneity. *Front Cell Dev Biol* 9:717772. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717772>
58. *Billing AM, Ben Hamidane H, Dib SS, Cotton RJ, Bhagwat AM, Kumar P, Hayat S, Yousri NA, Goswami N, Suhre K, Rafii A, Graumann J* (2016) Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep* 6:21507. <https://doi.org/10.1038/srep21507>
59. *Liu Y, Goldberg AJ, Dennis JE, Gronowicz GA, Kuhn LT* (2012) One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One* 7(3): e33225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033225>
60. *Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, Ross AM, Lahann J, Parent JM, Krebsbach PH* (2012) Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* 30(6):1174–1181. <https://doi.org/10.1002/stem.1084>
61. *Diederichs S, Tuan RS* (2014) Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells Dev* 23(14):1594–1610. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0477>
62. *Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V* (2017) Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int* 2017:6516854. <https://doi.org/10.1155/2017/6516854>
63. *Suzdaltseva YG, Goryunov KV, Rubtsov YP* (2018) The Role of Intercellular Contacts in Induction of Indoleamine-2,3-Dioxygenase Synthesis in MMSC from Adipose Tissue. *Cell and Tissue Biology* 12: 391–401. <https://doi.org/10.1134/S1990519X18050085>
64. *Suzdaltseva Y, Zhidkih S, Kiselev SL, Stupin V* (2020) Locally Delivered Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Chronic Inflammation in Long-Term Non-healing Wounds: A Randomized Study. *Stem Cells Int* 2020:5308609. <https://doi.org/10.1155/2020/5308609>

EXPRESSION PROFILE OF THE ISOGENIC EARLY MESODERMAL CELLS DIFFERENTIATED FROM INDUCED PLURIPOTENT HUMAN STEM CELLS

A. V. Selezneva, E. V. Korobko, S. L. Kiselev, and Y. G. Suzdaltseva[#]

Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[#] *e-mail: yu_suzdaltseva@mail.ru*

Scar formation during normal regeneration of damaged tissue can lead to noticeable cosmetic and functional defects of organs and significantly affect the quality of life. However, it is known that fetal tissues before the third trimester of pregnancy are capable of complete regeneration with the restoration of the original architecture and functional activity. Understanding the cellular and molecular mechanisms of fetal wound regeneration will provide the basis for the development of successful treatments aimed to minimize scarring. Mesenchymal stromal cells (MSCs) play an important role in tissue repair, since the cytokines, chemokines, growth factors and extracellular vesicles they secrete are involved in the regulation of migration, angiogenesis, synthesis and remodeling of the extracellular matrix. Mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) makes possible to reproduce the successive stages of embryogenesis *in vitro* and to create isogenic cell models of MSCs corresponding to different stages of human development. In this work, we performed the directed multistage mesodermal differentiation of iPSCs into isogenic cell lines of the primitive streak, lateral and paraxial mesoderm and a comparative analysis of their expression profiles was carried out. It was shown that the resulting cells of the lateral mesoderm (LM) and paraxial mesoderm (PM) are precursors for MSCs. MSCs obtained as a result of differentiation of both LM and PM cells had a similar profile for the expression of pan-mesodermal markers. Comparative analysis of the functional activity of MSCs and their precursors in a pro-inflammatory microenvironment will provide molecular tools for a better understanding of the fundamental mechanisms of fetal tissue regeneration and identify therapeutic targets to minimize scarring and pathological processes characterized by excessive fibroplasia.

Keywords: mesenchymal stromal cells; human pluripotent stem cells differentiation; tissue regeneration

СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА ДЕЦЕРЕБРИРОВАННОЙ КРЫСЫ ДВОЙНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

© 2024 г. В. А. Ляховецкий¹, П. Ю. Шкорбатова¹, О. В. Горский^{1,2}, Н. В. Павлова¹,
Е. Ю. Баженова¹, П. Е. Мусиенко^{1,2,†,*}, Н. С. Меркульева^{1,†,*}

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: mer-natalia@yandex.ru, pol-spb@mail.ru

† авторы с равным вкладом

Поступила в редакцию 22.11.2023

После доработки 06.03.2024

Принята к публикации 07.06.2024

Анализ ответов, обусловленных электрической стимуляцией, – одна из экспериментальных парадигм изучения возбудимости нервной системы. В частности, широко используется методика регистрации ответов мышц на электрическую эпидуральную стимуляцию (ЭС) спинного мозга (СМ) человека и животных. У крыс, децеребрированных на преколликулярном уровне, анализировали ответы *mm. tibialis anterior* (ТА) и *gastrocnemius medialis* (GM) при ЭС спинальных сегментов L2, L4, L6 и трансвертебральной стимуляции (ТС) на уровне позвонков VL2, VL4, VL6 одиночными и двойными импульсами. Находили токи, при которых амплитуда сенсорного компонента ответа для одиночного импульса и одного из импульсов пары была максимальна. На минимальном из этих токов анализировали отношение амплитуд сенсорного компонента ответа на первый и второй импульсы к амплитуде сенсорного компонента ответа на одиночный импульс. Для обеих мышц было получено ослабление ответа на оба импульса пары при ТС VL2 и VL4, при этом при стимуляции VL2 ответ ТА на второй импульс был ниже, чем на первый. Напротив, при ЭС всех сегментов интереса для обеих мышц было получено облегчение ответа на второй импульс. Подобный эффект облегчения качественно наблюдался и для двух других мышц, *mm. iliacus* и *vastus lateralis*. Таким образом, использование двойных импульсов при стимуляции позволило выявить зависимость отклика нейронных сетей СМ от способа их активации (ТС или ЭС). Облегчение ответа на второй импульс при ЭС предположительно объясняется уменьшением пресинаптического торможения вследствие децеребрации.

Ключевые слова: децеребрированная крыса, эпидуральная стимуляция, трансвертебральная стимуляция, вызванный потенциал, облегчение ответа на парные импульсы

DOI: 10.31857/S0044452924020051, EDN: XANEMU

ВВЕДЕНИЕ

Анализ ответов, вызванных электрической стимуляцией, – одна из экспериментальных парадигм исследования нервной системы. Сравнение ответов мышц при электрической стимуляции спинного мозга (СМ) или спинномозговых нервов в норме и при спинальной травме позволяет выявить природу нарушений работы нейрональных спинальных сетей и наблюдать за процессом их восстановления в клинической и экспериментальной практике [1–4].

В ответе мышц на электрическую стимуляцию СМ различают коротколатентный моторный компонент, связанный с непосредственным электрическим раздражением моторных волокон нерва, и более длиннолатентный сенсорный компонент, связанный с реакцией спинальных нейронных сетей

на воздействие. В свою очередь, сенсорный компонент можно подразделить на подкомпоненты, обладающие различной латентностью, обусловленные реакцией моно-, олиго- и полисинаптических нейронных циклов на воздействие [5]. Электрическая стимуляция может осуществляться как одиночными, так и двойными (парными) импульсами или же пачками импульсов. При стимуляции двойными импульсами, как правило, наблюдается угасание сенсорного компонента ответа на второй импульс пары [5–7].

Наряду с кошкой крыса используется для исследования локомоции, в частности, широко распространена хроническая модель спинальной травмы вследствие контузии или перерезки СМ [2, 8]. Важной составляющей методик восстановления локомоции является электрическое воздействие на СМ –

эпидуральное [2], подкожное [9] или накожное [10]. Прежде нами также предлагался трансвертебральный способ крепления стимулирующего электрода, пригодный как для хронических, так и острых экспериментов [11]. Этот способ менее инвазивен, чем эпидуральная стимуляция (ЭС) и в то же время, в отличие от накожной стимуляции, обеспечивает возможность прицельной стимуляции определенных корешков СМ.

В острых экспериментах возможно использовать модель децеребрированных грызунов, у которых отсечена часть головного мозга выше передних холмов. Данная модель способна как к спонтанной локомоции [12, 13], так и к локомоции, вызванной стимуляцией мезэнцефалической локомоторной области [12, 14] или ЭС [15].

Прежде при ЭС децеребрированной крысы в исследованиях вызванных ответов мышц использовались лишь одиночные импульсы. Двойные импульсы использовались нами ранее как вспомогательное средство для определения латентностей сенсорного и моторного компонента ответа мышцы при трансвертебральной стимуляции (ТС) децеребрированной крысы [11].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ вызванных ответов мышц задних конечностей децеребрированной крысы на одиночные и двойные импульсы при ТС и ЭС поясничных сегментов. Поскольку ТС и ЭС приводят к сходным паттернам мышечных ответов на одиночные импульсы, подобным кривым рекрутирования при стимуляции большеберцового или седалищного нерва [5], мы предполагали, что ответ на двойные импульсы не будет зависеть от способа электрической стимуляции: ответ на второй импульс пары будет ниже, чем на первый. Между тем ответ мышц зависит от положения сайта стимуляции: чем он ближе к дорсальным и вентральным корешкам сегментов СМ, содержащих мотонейронные пулы определенной мышцы, тем большими будут ее сенсорный и моторный компонент ответа на стимуляцию [11, 16]. Поэтому в данной работе мы использовали ТС трех позвонков: VL2, VL4 и VL6, и ЭС трех сегментов СМ: L2, L4 и L6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выборка. Опыты были выполнены на 9 децеребрированных крысах, самцах линии Вистар весом 250–300 г. Экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Директивы Совета Европы 2010 / 63ЕУ Европейского парламента о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Протокол исследования № 131-03-06 от 12 декабря 2022 г. был одобрен Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ.

Хирургические процедуры. Животных наркотизировали смесью изофлурана (Laboratories Karizoo, S.A., Испания) на кислороде (4–5% для индукции и 1–2% для поддержания анестезии, скорость 0.8 л/мин, наркозно-дыхательный аппарат Зоомед, Россия). Производили билатеральную имплантацию биполярных миографических электродов в мышцы голени: переднюю большеберцовую (*m. tibialis anterior*, ТА, флексор стопы) и медиальную икроножную (*m. gastrocnemius medialis*, GM, экстензор стопы). У одного животного электроды также имплантировали слева в подвздошную мышцу (*m. iliacus*, IL, флексор бедра) и в латеральную широкую мышцу (*m. vastus lateralis*, VL, экстензор колена). Электроды представляли собой пару проводов из нержавеющей стали в тефлоновой изоляции (AS632, Cooner Wire, Chatsworth, CA, США) диаметром 0.3 мм с участками без изоляции длиной 0.5 мм.

После лигирования сонных артерий голову крысы закрепляли в стереотаксе и проводили децеребрацию на преколликкулярном уровне при помощи вертикально опускаемого лезвия, закрепленного в держателе стереотаксиса; оставшуюся рострально от разреза кору головного мозга удаляли при помощи кюретки. Методика проведения процедуры децеребрации была подробно описана ранее [15].

Для проведения ТС животное помещали в специальную стереотаксическую раму, где голова жестко фиксировалась ушными и челюстными зажимами, а тело в области груди, живота и таза поддерживали несколько полосок мягкой ткани. Задние конечности находились в безопорном состоянии. Ручной дрелью горизонтально просверливали сквозные отверстия (диаметр 1 мм) в остистых отростках позвонков VL2, VL4, VL6 вблизи их основания. Для проведения ЭС, в стереотаксической раме позвоночник закрепляли зажимами в области поперечных отростков позвонков VT11–VT12 и VL4–VL5. Производили интерламинэктомию в позвонках VT13–VL2, чтобы открыть доступ к сегментам L2–L6 СМ (рис. 1а, б). За 20–30 мин до начала эксперимента анестезию отключали, а температуру тела животного повышали до 37°C [17]. Эксперимент начинали через 40–50 мин после проведения децеребрации.

Электрофизиологическое исследование. Стимуляцию осуществляли прямоугольными бифазными импульсами монополярно (Model 2100, A-M Systems, Sequim, WA, США). Для ТС проволочный электрод, тефлоновая изоляция которого была удалена полосой 2 мм, на расстоянии 2 см от кончика провода, поочередно помещали в отверстие каждого из остистых отростков и фиксировали на входе и выходе. Вызванные потенциалы мышц регистрировали при ТС позвонков VL2, VL4, VL6 одиночными (длительность импульса 0.2–0.3 мс, сила тока 100–3000 мкА, шаг 100 мкА) и двойными (межстимульный

интервал 20 мс, длительность импульса 0.2–0.3 мс, 100–3000 мкА, шаг 100 мкА) импульсами. Сила тока при подаче обоих импульсов была одинакова, оба импульса подавались на один позвонок.

ЭС проводили при помощи серебряного шарикового электрода диаметром 0.5 мм, которым касались твердой мозговой оболочки над сегментами L2–L6 в области средней линии СМ. Индифферентный электрод, изготовленный из иглы 21G, располагался под кожей живота в области белой линии. Вызванные потенциалы мышц регистрировали при ЭС сегментов L2, L4 и L6 одиночными (длительность импульса 0.2–0.3 мс, сила тока 10–300 мкА, шаг 10 мкА) и двойными (межстимульный интервал 20 мс, длительность импульса 0.2–0.3 мс, сила тока 10–200 мкА, шаг 10 мкА) импульсами. Для нескольких животных при ЭС одного из сегментов использовали межстимульный интервал в 50 мс. Сила тока при подаче обоих импульсов была одинакова, оба импульса подавались на один сегмент.

Как одиночные, так и двойные импульсы подавались 1 раз в сек (частота 1 Гц), при каждой амплитуде тока подавалось 10 импульсов. При ЭС верхнепоясничных сегментов токи для вызова моторного компонента мышечного ответа достаточно высоки [16], поэтому в данной работе анализ ограничен исследованием сенсорного компонента мышечного

ответа, выделенного на основе латентности (более 6 мс). Для анализа вызванных потенциалов использовали среднюю амплитуду сенсорного компонента ответов ТА и GM на одиночные импульсы (H), а также на первый (H1) и второй (H2) импульс пары (рис. 1с).

Сигналы от ЭМГ электродов усиливались (Model 1700, A-M Systems, Sequim, WA, USA) и оцифровывались с частотой дискретизации 20 кГц (LTR-EU-16, АЦП LTR11, L-Card, Москва, Россия). Обработку ЭМГ проводили в пакете прикладных программ для решения задач технических вычислений MATLAB (Mathworks, Natick, MA, USA) с помощью специализированных скриптов, разработанных авторами статьи.

Точное определение стимулируемого при ЭС сегмента производили *post-mortem* у каждого животного на основании положения дорсальных корешков, так как положение поясничных и крестцовых сегментов СМ крысы относительно позвонков варьирует (см. различия положений сегментов в [18], рис. 1 и [19], рис. 1b Supplement), поэтому у некоторых животных вызванные потенциалы были зарегистрированы не во всех сегментах интереса.

Эксперимент прекращали при ухудшении состояния животного; при этом в анализ вошли файлы, полученные до этого ухудшения. Данное

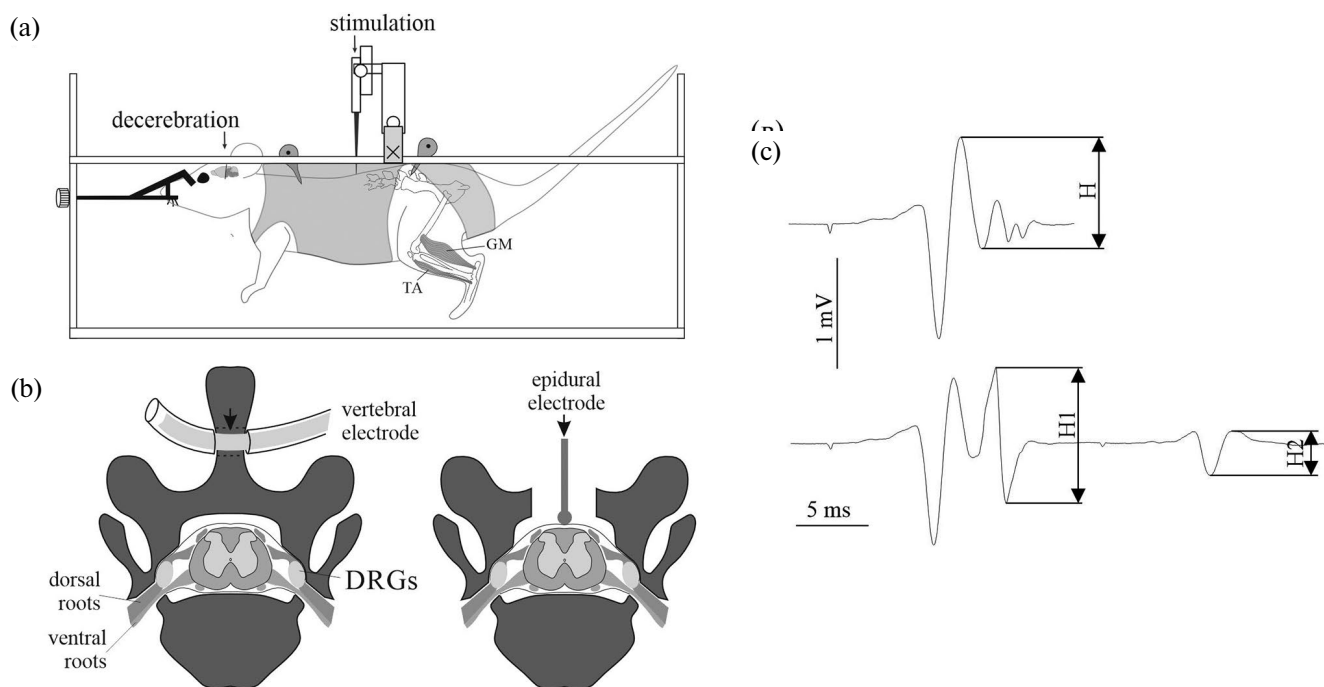


Рис. 1. Схема эксперимента по трансвертебральной и эпидуральной стимуляции спинного мозга крысы. (а) – схема экспериментальной установки. Decerebration – зона децеребрации, stimulation – зона фиксации стимулирующего электрода, ТА – *m. tibialis anterior*, GM – *m. gastrocnemius medialis*; (б) – положение вертебрального (vertebral) и эпидурального (epidural) стимулирующих электродов относительно позвонка и спинного мозга, dorsal roots – дорсальные корешки спинного мозга, ventral roots – вентральные корешки спинного мозга, DRG – дорсальный корешковый ганглий; (в) Определение амплитуд сенсорного компонента одиночного (H) импульса и первого (H1) и второго (H2) импульса при парной стимуляции. На примере среднего вызванного ответа правого GM при трансвертебральной стимуляции VL2 крысы #9 на токе 900 мкА.

обстоятельство также уменьшало количество зарегистрированных значений в какой-либо экспериментальной точке. Длительность эксперимента не превышала 9 ч.

Статистический анализ. Статистической обработке подвергались данные, полученные при исследовании ответов мышц TA и GM на ТС и ЭС одиночными и двойными (с межстимульным интервалом 20 мс) импульсами. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. В случае, если исследуемые параметры были распределены нормально по критерию д'Агостини – Пирсона, использовались параметрические критерии анализа (критерий Стьюдента для одной выборки или же парный критерий (t), одномерная ANOVA (F) с пост-хок тестом Тьюки), в противном случае использовались непараметрические критерии (критерий Уилкоксона для одной выборки или же парный критерий (W), критерий Краскела – Уоллиса (KW) с пост-хок тестом Данна). Статистическую значимость оценивали на уровне $p < 0.05$ (объектом исследования являлась мышца животного) с помощью программного обеспечения для статистической обработки данных Prism 7.0 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Типичная картина изменения ответов на двойные импульсы при ТС и ЭС по мере увеличения амплитуды тока стимуляции для мышц TA и GM, вызванные потенциалы которых подвергались статистической обработке, приведена на рис. 2а. При ТС в первую очередь появляются более длиннолатентные сенсорные компоненты ответа, предположительно имеющие моносинаптическую природу (MR). Затем, по мере увеличения амплитуды стимуляционного тока, возникают коротколатентные компоненты ответа, по-видимому, связанные с непосредственной стимуляцией вентральных корешков CM (ER) [11]. Видно, что при ТС сенсорный компонент ответа на второй импульс имеет меньшую амплитуду, чем при ответе на первый импульс ($H_2 < H_1$). Напротив, при ЭС сегмента L2 наблюдаются только сенсорные компоненты ответа, имеющие моносинаптическую природу (MR) [5], причем сенсорный компонент ответа на второй импульс имеет большую амплитуду, чем при ответе на первый импульс ($H_2 > H_1$).

Можно предполагать, что на относительно низких частотах стимуляции (менее 0.2 Гц) ответы на одиночные импульсы и на первый импульс парной стимуляции будут идентичны, в этом гипотетическом случае можно ограничиться анализом ответов на двойные импульсы. Однако при выбранной нами из практических соображений, связанных с ограниченным временем опыта и из-

менением функционального состояния животного в ходе опыта, частоте стимуляции 1 Гц ответы на одиночный импульс и первый импульс пары не были одинаковы, поэтому для оценки степени изменения сенсорного компонента ответа мышц на двойную стимуляцию была использована следующая вычислительная процедура. Было проведено сравнение амплитуд ответов на первый и второй импульс пары (межстимульный интервал 20 мс), а также их отношений к ответу на одиночный импульс. При этом надо учитывать, что кривая рекрутирования сенсорного компонента ответа как при ЭС [4, 16], так и при ТС [15] по мере увеличения тока стимуляции выходит на плато или снижается; в таком случае наблюдаемые эффекты могут теряться. Поэтому для дальнейшего анализа особенностей ответов на двойные импульсы была использована следующая процедура (рис. 2b). По кривой рекрутирования для ТС определяли ток I_H , при котором сенсорный компонент ответа на одиночный импульс достигал максимального значения (выделен жирным), и ток I_{H1} , при котором сенсорный компонент ответа на первый импульс пары достигал максимального значения. На рис. 2b (слева) показан пример, когда токи I_H и I_{H1} совпадают, что наблюдается не всегда. Если эти два тока были различны, то на минимальном из них определяли отношения амплитуд сенсорных компонентов ответа на первый и второй импульсы пары к ответу на одиночный импульс ($H1/H$ и $H2/H$, соответственно). По кривой рекрутирования для ЭС определяли ток I_H , при котором сенсорный компонент ответа на одиночный импульс достигал максимального значения (выделен жирным), и ток I_{H2} , при котором сенсорный компонент ответа на второй импульс пары достигал максимального значения. На рис. 2b (справа) ток I_H меньше тока I_{H2} . На минимальном из этих двух токов определяли отношения амплитуд сенсорных компонентов ответа на первый и второй импульсы пары к ответу на одиночный импульс ($H1/H$ и $H2/H$ соответственно). Токи интереса отмечены на рис. 2b пунктирными прямоугольниками. У каждого животного для каждой точки стимуляции были получены ответы как на двойные, так и на одиночные импульсы, поэтому все индивидуальные отношения $H1/H$ и $H2/H$ содержат в знаменателе одну и ту же амплитуду одиночного импульса H . Сравнивая эти отношения между собой, можно судить о том, какой импульс, первый или второй, вызывает больший ответ.

При ТС одного и того же позвонка токи I_H и I_{H1} не отличались друг от друга (рис. 3а). Между тем, при ТС позвонка VL6 токи I_H и I_{H1} для TA и GM выше, чем при ТС позвонков VL2 и VL4 (рис. 3а). Для токов I_H у TA $KW(3) = 17.2$, $p < 0.0002$; пост-хок тест Данна показывает, что отличия между I_H в трех

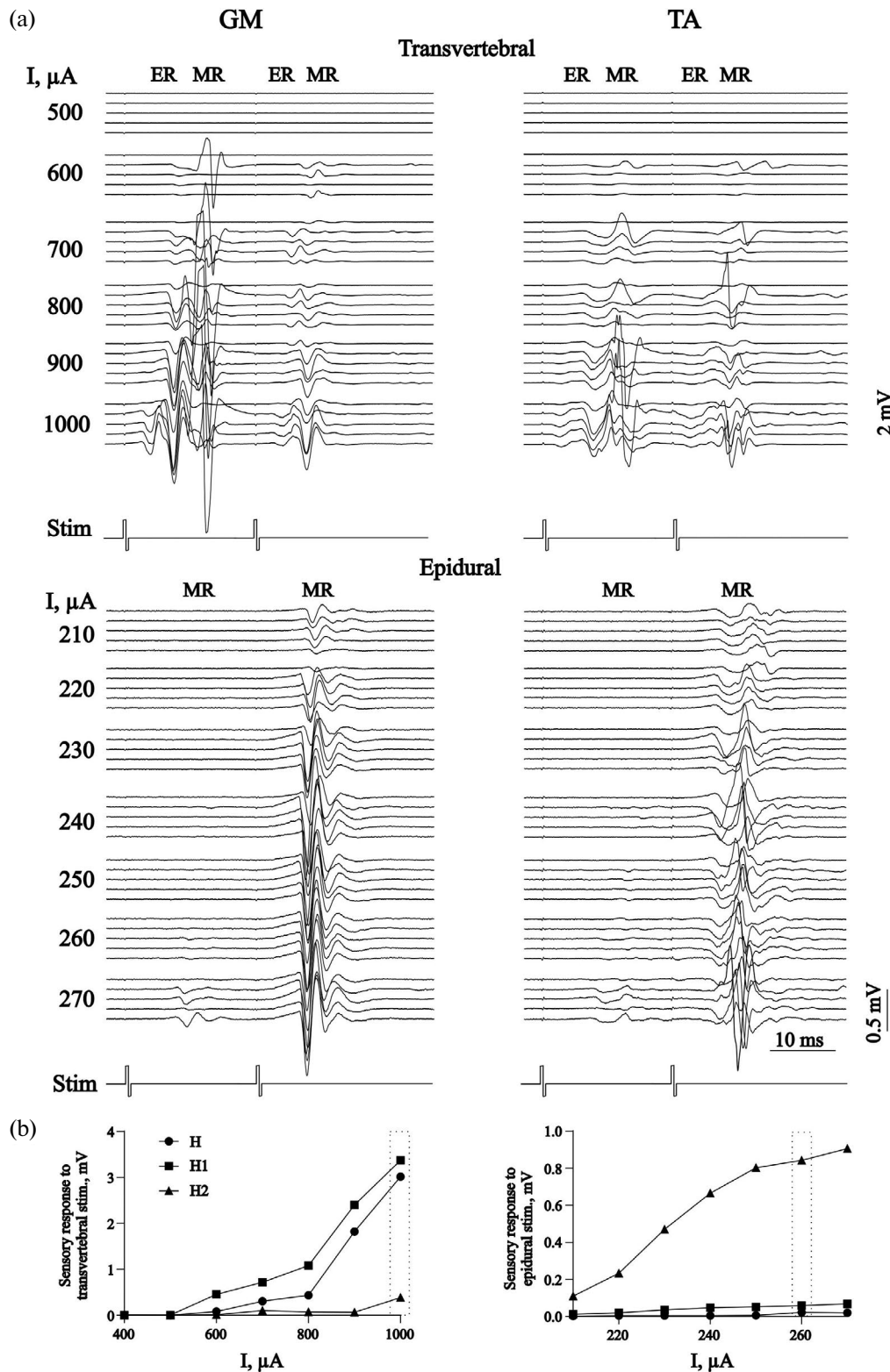


Рис. 2. Зависимость вызванных потенциалов от тока стимуляции: (а) – изменение вызванных ответов мышц на двойные импульсы по мере роста тока при трансвертебральной (transvertebral) (ТС) и эпидуральной (epidural) стимуляции (ЭС). На каждом токе показано пять индивидуальных ответов мышцы. На примере правых *m. gastrocnemius medialis* (GM) и *m. tibialis anterior* (TA) при ТС VL2 и ЭС L2 крысы #9. Stim – стимуляционный канал. ER – ранние, моторные компоненты ответа мышцы, MR – средние, сенсорные моносинаптические компоненты ответа мышцы; (б) – кривые рекрутирования при ТС (слева) и ЭС (справа). H, H1, H2 – амплитуды сенсорного компонента ответа на одиночный импульс и на первый и второй импульс пары соответственно. Пунктирным прямоугольником выделены значения, используемые в дальнейшем анализе. На примере GM при ТС VL2 и ЭС L2 крысы #9.

стимулируемых позвонках выражаются в том, что I_H VL2 (1245 ± 624 мкА) и I_H VL4 (1389 ± 154 мкА) ниже, чем I_H VL6 (2042 ± 313 мкА), $p < 0.01$. Для токов I_{H1} у ТА $KW(3) = 16.1$, $p < 0.0003$; пост-хок тест Данна показывает, что отличия между I_{H1} в трех стимулируемых позвонках выражаются в том, что I_{H1} VL2 (1285 ± 654 мкА) и I_{H1} VL4 (1311 ± 203 мкА) ниже, чем I_{H1} VL6 (2000 ± 245 мкА), $p < 0.01$. Для токов I_H у GM $F(3) = 6.63$, $p < 0.0045$; пост-хок тест Тьюки показывает, что отличия между I_H в трех стимулируемых позвонках выражаются в том, что I_H VL2 (1305 ± 703 мкА) и I_H VL4 (1278 ± 222 мкА) ниже, чем I_H VL6 (1936 ± 323 мкА), $p < 0.05$. Для токов I_{H1} у GM $F(3) = 5.63$, $p < 0.009$; пост-хок тест Тьюки показывает, что отличия между I_{H1} в трех стимулируемых позвонках выражаются в том, что I_{H1} VL2 (1285 ± 694 мкА) и I_{H1} VL4 (1289 ± 203 мкА) ниже, чем I_{H1} VL6 (1859 ± 282 мкА), $p < 0.01$.

Ответы при ТС VL2 и VL4 двойными импульсами (рис. 3b) ниже, чем при стимуляции одиночными. Эффект несколько более выражен для ТА: отношение амплитуды ответа на второй и первый импульс к амплитуде одиночного импульса ниже 1 при ТС VL2 ($H2/H = 0.56 \pm 0.27$, $t(9) = 5.1$, $p < 0.0001$) и при ТС VL4 ($H1/H = 0.72 \pm 0.29$, $t(8) = 2.8$, $p < 0.02$ и $H2/H = 0.62 \pm 0.37$, $t(8) = 3.0$, $p < 0.02$). При этом для GM отношение к амплитуде одиночного импульса ниже 1 только при ТС VL4 ($H2/H = 0.46 \pm 0.41$, $t(8) = 3.87$, $p < 0.005$). Отметим, что при ТС VL2 для ТА уменьшение амплитуды ответа более выражено для второго импульса пары: $H1/H$ выше, чем $H2/H$ (0.79 ± 0.38 и 0.56 ± 0.27 , $t(9) = 2.3$, $p < 0.05$). При стимуляции VL6 выявлены значительные разбросы данных, поэтому отличия между отношениями ответов на первый и второй импульс к ответу на одиночный импульс не были получены.

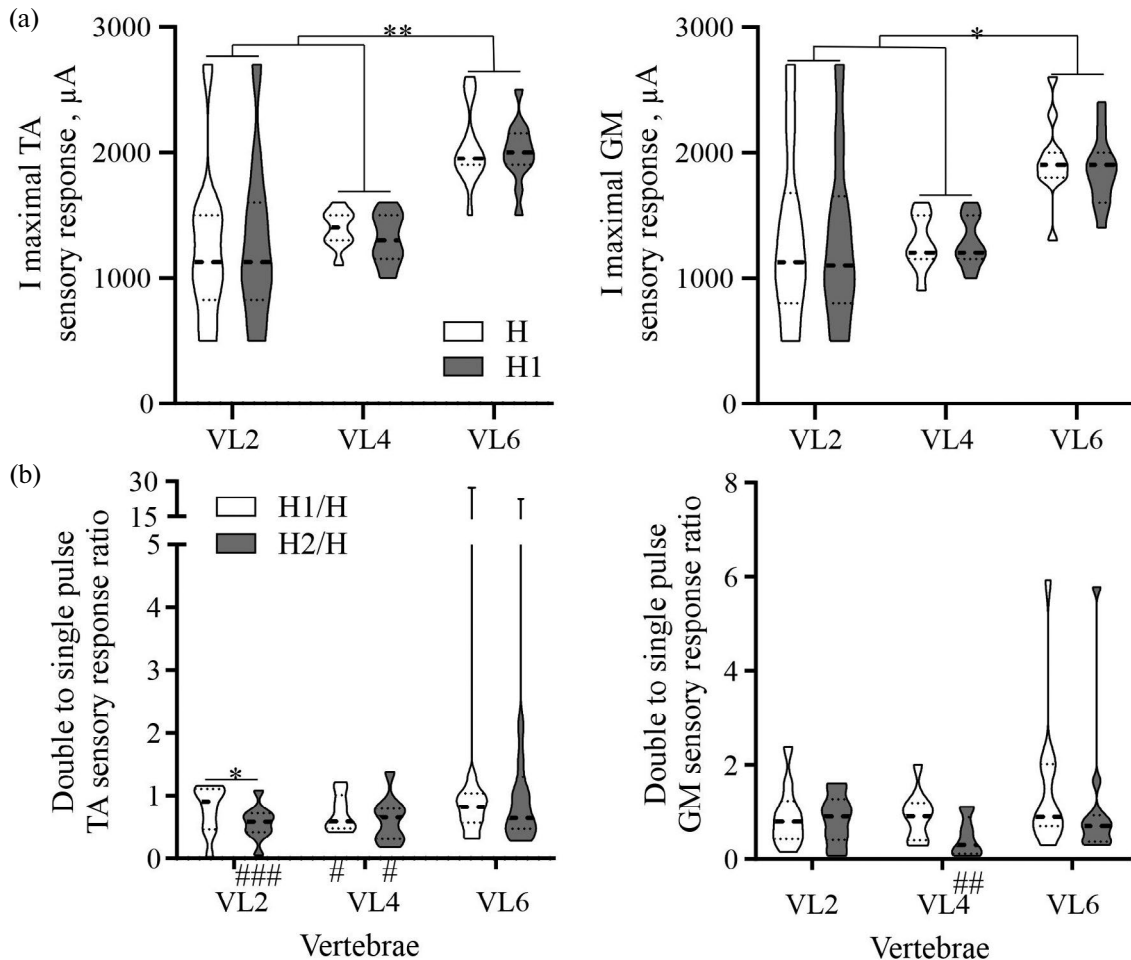


Рис. 3. Характеристики сенсорного компонента ответа *m. tibialis anterior* (ТА) и *m. gastrocnemius medialis* (GM) при трансвертебральной стимуляции с межстимульным интервалом 20 мс: (а) — токи, при которых регистрировался максимальный сенсорный ответ на одиночный (H) и первый из пары (H1) импульс при стимуляции позвонков (Vertebrae) VL2, VL4, VL6. *, ** — $p < 0.05$, $p < 0.01$ отличия между токами стимуляции; (б) Отношения амплитуд сенсорных компонентов ответа на первый и второй импульсы пары к ответу на одиночный импульс ($H1/H$ и $H2/H$ соответственно). #, ##, ### — $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ отличия от ответа на одиночный импульс, *, ** — $p < 0.05$, $p < 0.01$ отличия между ответами на первый и второй импульс пары.

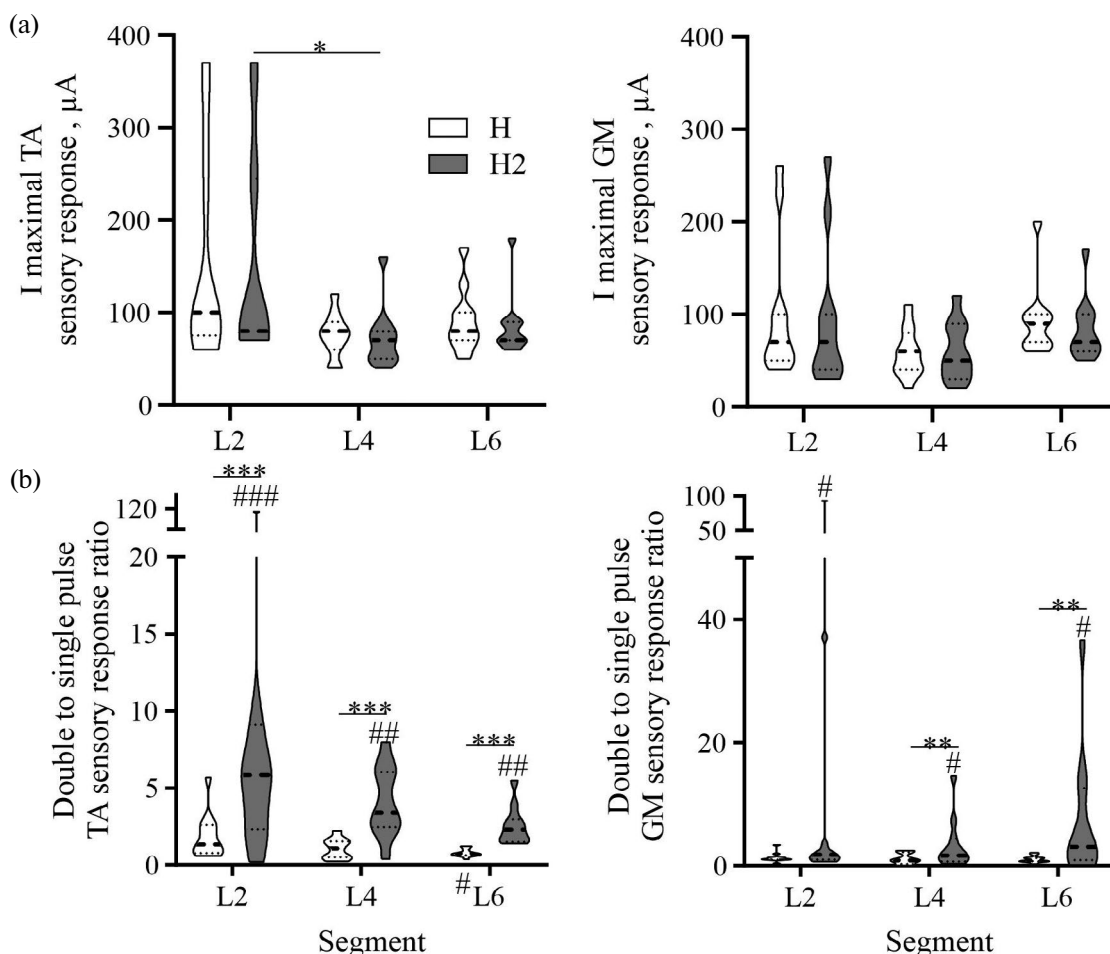


Рис. 4. Характеристики сенсорного компонента ответа *m. tibialis anterior* (ТА) и *m. gastrocnemius medialis* (GM) при эпидуральной стимуляции с межстимульным интервалом 20 мс: (а) Токи, при которых регистрировался максимальный сенсорный ответ на одиночный (Н) и второй из пары (Н2) импульсы при стимуляции сегментов (Segment) L2, L4, L6. * – $p < 0.05$ отличия между токами стимуляции; (б) Отношения амплитуд сенсорных компонентов ответа на первый и второй импульсы пары к ответу на одиночный импульс (Н1/Н и Н2/Н соответственно). #, ##, ### – $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ отличия от ответа на одиночный импульс, **, *** – $p < 0.01$, $p < 0.001$ отличия между ответами на первый и второй импульсы пары.

При ЭС токи I_H и I_{H2} не отличались друг от друга при стимуляции одного и того же сегмента (рис. 4а). Между тем при ЭС сегмента L2 токи I_{H2} для ТА выше, чем при ЭС сегмента L4: $KW(3) = 6.6$, $p < 0.04$, пост-хок тест Данна показывает, что отличия между I_{H2} в трех стимулируемых сегментах выражаются в том, что I_{H2} L2 (149 ± 114 мкА) выше, чем I_{H2} L4 (73 ± 33 мкА), $p < 0.04$. Для GM наблюдается значительная тенденция отличия токов I_H между сегментами: $KW(3) = 5.9$, $p = 0.053$.

Ответ на второй импульс пары при ЭС L2, L4 и L6 (рис. 4б) выше, чем при стимуляции одиночными импульсами. Для ТА отношение Н2/Н выше 1 при ЭС L2 (15.87 ± 30.89 , $W(13) = 89$, $p < 0.001$), L4 (4.10 ± 2.28 , $t(10) = 4.5$, $p < 0.01$) и L6 (2.52 ± 1.24 , $t(10) = 4.1$, $p < 0.01$). Для GM отношение Н2/Н выше 1 при ЭС L2 (13.14 ± 28.60 , $W(11) = 52$, $p < 0.02$), L4 (3.41 ± 4.23 , $W(11) = 48$, $p < 0.04$) и L6 (7.48 ± 10.85 , $W(11) = 50$, $p < 0.03$). Ответ на первый импульс пары достоверно ниже, чем ответ при стимуляции оди-

ночными импульсами, только для ТА при ЭС L6 ($H1/H = 0.78 \pm 0.25$, $t(10) = 4.1$, $p < 0.02$).

Для всех сегментов интереса ответ на первый импульс пары у ТА ниже, чем на второй ($H1/H < H2/H$) (L2: 1.83 ± 1.41 и 15.87 ± 30.89 , $W(13) = 89$, $p < 0.001$, L4: 1.05 ± 0.66 и 4.10 ± 2.28 , $t(10) = 5.0$, $p < 0.001$, L6: 0.78 ± 0.25 и 2.52 ± 1.24 , $W(11) = 66$, $p < 0.01$). Для GM ответ на первый импульс пары ниже, чем на второй при ЭС L4 и L6 ($H1/H < H2/H$) (L4: 1.09 ± 0.89 и 3.41 ± 4.23 , $W(11) = 60$, $p < 0.005$, L6: 1.07 ± 0.54 и 7.49 ± 10.85 , $W(11) = 58$, $p < 0.007$).

У одного животного были зафиксированы ответы IL и VL на ЭС всех сегментов интереса с межстимульным интервалом 20 мс; также у нескольких животных были зафиксированы ответы ТА и GM на ЭС некоторых сегментов интереса с межстимульным интервалом 50 мс (рис. 5). Из рисунка видно, что во всех случаях ответ на второй импульс был выше, чем на первый. При этом величины Н1/Н и Н2/Н

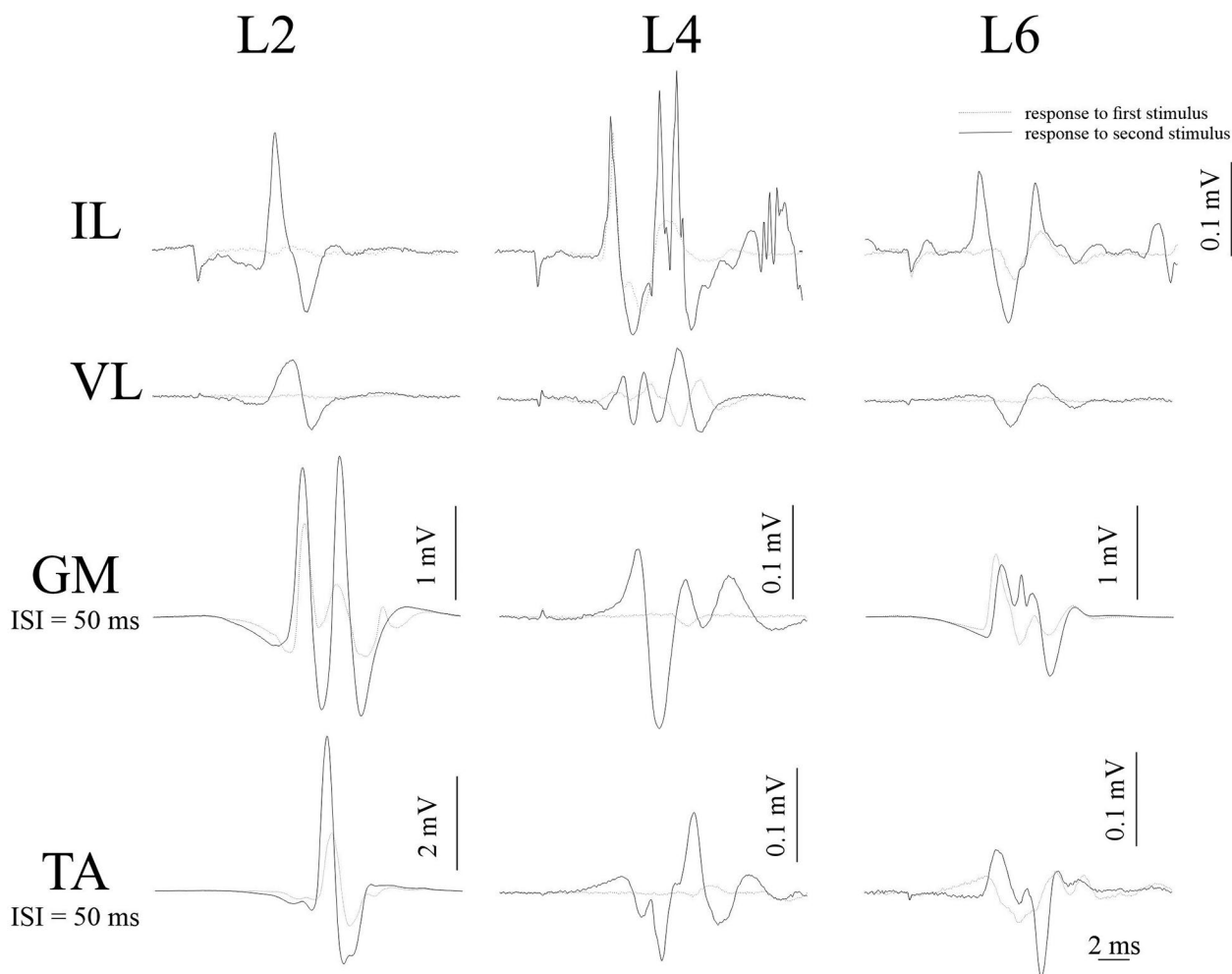


Рис. 5. Примеры средних вызванных ответов, обусловленных эпидуральной стимуляцией двойными импульсами, *m. iliacus* (IL) и *m. vastus lateralis* (VL) (межстимульный интервал 20 мс; крыса #11, сегмент L2 – ответы при амплитуде тока 120 мкА, сегменты L4 и L6 – ответы при амплитуде тока 60 мкА); *m. gastrocnemius medialis* (GM) и *m. tibialis anterior* (TA) (межстимульный интервал 50 мс; крыса #45, сегмент L2 – ответы при амплитуде тока 120 мкА, крыса #11, сегмент L4 – ответы при амплитуде тока 50 мкА, крыса #10, сегмент L6 – ответы при амплитуде тока 70 мкА), штрих – ответ на первый стимул, сплошная линия – ответ на второй стимул.

составляют для TA при ЭС L2–3.23 и 8.20, L4–0.26 и 1.27, L6–0.46 и 1.13 соответственно, а для GM при ЭС L2–0.68 и 1.34, L4–0.06 и 0.78, L6–1.46 и 2.01 соответственно (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Моносинаптический и нервно-мышечный ответ на второй импульс у млекопитающих – результат суперпозиции менее длительного процесса возбуждения и более длительного процесса торможения (депрессии) [20]. Паттерны ответов на двойные импульсы при ТС и ЭС поясничных сегментов децеребрированной крысы различались, что лишь частично подтвердило нашу первоначальную гипотезу. При ТС амплитуда импульсов пары по отношению к одиночному импульсу уменьшалась, при этом для TA при ТС VL2 ответ на второй импульс

пары был ниже, чем на первый. При ЭС ответ на второй импульс пары превышал ответ как на первый импульс, так и ответ на одиночный импульс для всех исследованных мышц. Качественно показано, что эффект облегчения сохранялся и при увеличении межстимульного интервала с 20 до 50 мс. Амплитуда первого импульса пары уменьшалась лишь для TA при ЭС L6.

Выбор токов стимуляции. Угасание ответа на второй импульс более выражено на субмаксимальных токах, при которых сенсорный компонент ответа составляет 50–75% от максимального (см. [21], рис. 5; [22], рис. 10; [23], рис. 3). Между тем облегчение ответа на второй импульс, наблюдаемое при ЭС, представлялось целесообразным изучать при больших токах, на которых максимально выражен сенсорный компонент ответа, и менее значимы флюктуации его амплитуды [21], в связи с чем была

разработана вышеупомянутая вычислительная процедура. Сила тока, при которой был получен максимальный компонент сенсорного ответа на одиночный и двойной импульс, достоверно не отличается в рамках стимулируемого позвонка или сегмента, что хорошо согласуется с вычислительной моделью афферентной стимуляции популяции мотонейронов [24], согласно которой сила токов I_{H1} и I_{H2} подобна друг другу. Между тем сила токов I_H и I_{H1} для ТА и GM выше при ТС VL6, чем при ТС VL2 и VL4, что может быть связано с достоверным ростокаудальным увеличением высоты остистых отростков позвоночника крысы [25]. Напротив, сила тока выше при ЭС L2, чем при ЭС L4, что согласуется с вычислительной моделью ЭС [16], согласно которой сила тока, необходимая для вызова сенсорного компонента ответа мышцы, уменьшается в каудальном направлении.

Топичность эффектов угасания и облегчения. Наблюдаемые эффекты угасания и облегчения ответа на второй импульс присутствуют при стимуляции как более ростральных, так и более каудальных локусов. Подобная генерализованность угасания ответов на второй импульс была показана прежде на хронических крысах с интактным СМ – степень депрессии при ЭС двойными стимулами сегментов L2 и S1 не различалась [5].

Следует отметить, что пулы мотонейронов ТА и GM частично расположены в одних и тех же сегментах: мотонейроны, иннервирующие ТА, находятся в зоне от середины сегмента L3 до начала сегмента L5, а мотонейроны, иннервирующие GM, – в зоне от середины сегмента L4 до начала сегмента S1 [26]. Это неизбежно приводит к одновременной активации ТА и GM как при ЭС, так и при ТС. При этом, согласно литературным данным, селективность при вызове сенсорного компонента ответа ниже, чем при вызове моторного компонента. Значительная селективность в сенсорных компонентах ответов ТА и GM показана лишь при ЭС сегмента L2 в острых экспериментах на наркотизированных крысах [16]. При ТС децеребрированных крыс зоны вызова сенсорного компонента ответа ТА и GM более широки (в ростокаудальном направлении) по сравнению с зоной вызова моторного компонента их ответа [11]. Более широкие зоны вызова сенсорного компонента ответа по сравнению с моторным были также показаны у человека при накожной стимуляции в различных локусах вдоль позвоночника (например, для VL) [7]. Таким образом, стимуляция СМ одновременно (хотя, быть может, в несколько различной степени, зависящей от положения электрода) вызывает ответы в обеих вышеуказанных мышцах-антагонистах. Известно, однако, что для данной пары мышц кондиционирующая стимуляция нерва, содержащего моторные волокна GM, не изменяет ответ ТА, а кондицио-

нирующая стимуляция нерва, содержащего моторные волокна ТА, облегчает ответ GM [27]. Таким образом, одновременная стимуляция и ТА, и GM, скорее всего, не является причиной как депрессии ответа на второй стимул при ТС, так и облегчения ответа ТА при ЭС.

Дополнительным аргументом в пользу того, что одновременная стимуляция антагонистов не является причиной наблюдаемых нами эффектов, является наблюдаемое в данной работе облегчение ответа IL на второй импульс при ЭС – моторные пулы этой мышцы, флексора бедра, расположены наиболее рострально, и, вероятно, в наименьшей степени занимают те же сегменты, что мотонейронные пулы ее антагониста, средней ягодичной мышцы, *m. gluteus medius* [19].

Отличия в ответах ТА и GM проявляются при ТС VL2 и VL4, но не VL6, что может быть связано с меньшей выраженностью моторного компонента ответа этих мышц при стимуляции данных позвонков [11]. При увеличении частоты стимуляции тормозные интернейроны вентральных рогов поясничного утолщения СМ крысы увеличивают степень торможения [28]. Вероятно, ЭС более каудальных сегментов (L6) в большей степени, при тех же токах стимуляции, активирует не только дорсальные, но и вентральные корешки [16], что увеличивает вклад тормозных процессов в формирование ответа мышцы и ведет к достоверному уменьшению ответа на первый импульс пары для ТА.

Угасание ответа на второй импульс при ТС. Увеличение частоты импульсов при стимуляции пачками импульсов, как правило, ведет к угасанию сенсорного компонента ответа [2, 29]. При этом степень угасания зависит от статуса нервной системы как человека (спинальная травма [30], глубокая стимуляция мозга при болезни Паркинсона [31]), так и лабораторных животных (спинализация крысы [2], введение анестетиков крысе [32]). Уменьшение ответа ТА на первый импульс пары при ТС VL4 может быть связано с увеличением средней частоты стимуляции (два импульса в секунду вместо одного). Известный эффект подавления сенсорного компонента ответа на второй импульс пары [3, 16, 21, 23] выражается в уменьшении ответа на второй импульс как по сравнению с первым импульсом пары (у ТА при ТС VL2), так и по сравнению с ответом на одиночный импульс (у ТА при ТС VL2, VL4, у GM при ТС VL4). Возможно, моторный компонент ответа, возникающий при ТС при относительно низком токе стимуляции [11], несколько препятствует облегчению сенсорного компонента мышечного ответа на второй импульс.

Облегчение ответа на второй импульс при ЭС. При ЭС для ТА и GM при стимуляции всех сегментов интереса наблюдался эффект облегчения

сенсорного ответа на второй импульс пары. В ряде работ показано крайне изменчивое облегчение ответа при парной или пачечной стимуляции: стимуляция нерва наркотизированной кошки (средний межстимульный интервал 15 мс, максимальное облегчение на 20 %, [20]); межстимульный интервал от 6 до 22 мс, максимальное облегчение на 723 %, [1]), ЭС шейного утолщения СМ наркотизированной обезьяны (частота пачечной стимуляции – 90–110 Гц, максимальное облегчение на второй импульс на 80 %, [33]), ЭС верхнегрудного отдела СМ человека, находящегося под анестезией (межстимульный интервал до 10 мс, ответ наблюдается лишь на второй импульс, [34]), накожная стимуляция лучевого нерва человека (частота пачечной стимуляции – 100 Гц, максимальное облегчение на второй и третий импульс до 30 %, [24]). Это облегчение, как правило, объясняется временной суммацией возбуждающих постсинаптических потенциалов на первый и второй импульсы [1, 24]. Интервал облегчения удлиняется при интактной нервно-мышечной передаче за счет того, что разряды мышечных веретен при сокращении мышцы в ответ на первый импульс могут облегчить последующий мышечный ответ [1, 21]. Однако в вышеприведенных литературных данных интервал облегчения не достигает используемого в нашей работе межстимульного интервала в 50 мс.

Ответы интернейронов дорсальных рогов СМ грызунов при увеличении частоты стимуляции имеют сложную картину: возбуждающие интернейроны дорсальных рогов СМ хомяка снижают степень возбуждения, в то время как тормозные интернейроны дорсальных рогов поясничного утолщения могут как увеличивать, так и снижать степень торможения [35]. Это позволяет предположить, что наблюдаемый нами феномен облегчения ответа на второй импульс при ЭС может быть обусловлен снижением тормозных влияний со стороны интернейронов дорсальных рогов СМ.

Зеркальный паттерн ответов при ЭС и ТС показывает, что временная суммация лишь частично объясняет полученные нами данные: в рамках одной экспериментальной модели децеребрированной крысы различные сайты стимуляции значительно влияют на баланс возбуждающих и тормозных процессов. Возможно, децеребрация является причиной повышенной возбудимости спинальных нейронных сетей. Длительная фаза возбуждения (до 200 мс) наблюдается при стимуляции медиального продольного пучка *in vitro* у препарата СМ новорожденных крысят, очевидно лишенного тормозных влияний со стороны головного мозга, – ответ на второй импульс пары облегчается в 1.5–2 раза [36]. Можно предположить, что ЭС в большей степени, чем ТС, влияет на тормозные интернейронные сети дорсальных рогов СМ, опо-

средованно снижая степень пресинаптического торможения.

Предполагается, что мишени стимуляции несколько зависят от ее типа (эпидуральная или трансвертебральная). Моторный ответ на ТС возникает в результате стимуляции вентральных корешков, представляющих собой аксоны мотонейронов от одноименного сегмента, в местах их выхода из позвоночного канала, а сенсорный ответ – в результате стимуляции дорсальных корешков как в зонах их входа в СМ, так и на всей их протяженности в спинномозговом канале в тех позвонках, где СМ уже отсутствует [11, 37]. Моторный ответ на ЭС возникает в результате прямой стимуляции мотонейронов или же моторных волокон в составе вентральных корешков [2]. Сенсорный ответ возникает в результате стимуляции афферентных входов в дорсальной части СМ и дорсальных корешков [16]. При этом мишенью ЭС являются как дорсальные корешки сегмента, над которым расположен эпидуральный электрод, так и дорсальные корешки, проходящие над дорсальной поверхностью этого сегмента (например, дорсальные корешки сегментов L4-L6 при ЭС сегмента S1 крысы) [16, 19].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта СПбГУ № 93022925 (оплата работы О.В.Г., Н.В.П.), поддержана грантами РНФ 21-15-00235 (анализ данных); РНФ 22-15-00092 (проведение нейрофизиологических экспериментов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Этического комитета в области исследований на животных СПбГУ, протокол № 131-03-06 от 12 декабря 2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.А.Л., П.Е.М., Н.С.М.), сбор данных (П.Ю.Ш., О.В.Г., Е.Ю.Б., Н.В.П., В.А.Л., Н.С.М.), обработка данных (В.А.Л.), написание и редактирование манускрипта (П.Ю.Ш., В.А.Л., О.В.Г., Н.С.М., П.Е.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McLeod JG, Van der Meulen JP* (1967) Effect of cerebellar ablation on the H reflex in the cat. *Arch Neurol* 16: 421–432.
<https://doi.org/10.1001/archneur.1967.00470220085010>
2. *Lavrov I, Gerasimenko YP, Ichiyama RM, Courtine G, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR* (2006) Plasticity of spinal cord reflexes after a complete transection in adult rats: relationship to stepping ability. *J Neurophysiol* 96: 1699–1710.
<https://doi.org/10.1152/jn.00325.2006>
3. *Hofstoetter US, Freundl B, Binder H, Minassian K* (2019) Recovery cycles of posterior root-muscle reflexes evoked by transcutaneous spinal cord stimulation and of the H reflex in individuals with intact and injured spinal cord. *PLoS One* 14: e0227057.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227057>
4. *Sharma P, Shah PK* (2021) *In vivo* electrophysiological mechanisms underlying cervical epidural stimulation in adult rats. *J Physiol* 599: 3121–3150.
<https://doi.org/10.1113/JP281146>
5. *Gerasimenko YP, Lavrov IA, Courtine G, Ichiyama RM, Dy CJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR* (2006) Spinal cord reflexes induced by epidural spinal cord stimulation in normal awake rats. *J Neurosci Methods* 157: 253–263.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.05.004>
6. *Courtine G, Harkema SJ, Dy CJ, Gerasimenko YP, Dyhre-Poulsen P* (2007) Modulation of multisegmental monosynaptic responses in a variety of leg muscles during walking and running in humans. *J Physiol* 582(Pt 3): 1125–1139.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128447>
7. *Roy FD, Gibson G, Stein RB* (2012) Effect of percutaneous stimulation at different spinal levels on the activation of sensory and motor roots. *Exp Brain Res* 223: 281–289.
<https://doi.org/10.1007/s00221-012-3258-6>
8. *Verma R, Viridi JK, Singh N, Jaggi AS* (2019) Animals models of spinal cord contusion injury. *Korean J Pain* 32: 12–21.
<https://doi.org/10.3344/kjp.2019.32.1.12>
9. Павлова НВ, Богачева ИН, Баженова ЕЮ, Горский ОВ, Мошонкина ТР, Герасименко ЮП (2019) Восстановление двигательных функций у спинализованных крыс при электрической стимуляции спинного мозга и локомоторной тренировке. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 565–577. [*Pavlova NV, Bogacheva IN, Bazhenova EYu, Gorskiy OV, Moshonkina TR, Gerasimenko YuP* (2019) Restoration of motor functions in spinal rats by electrical stimulation of the spinal cord and locomotor training. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 105: 565–577. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S086981391905008X>
10. *Malloy DC, Knikou M, Côté M-P* (2022) Adapting human-based transcutaneous spinal cord stimulation to develop a clinically relevant animal model. *J Clinical Medicine* 11: 2023.
<https://doi.org/10.3390/jcm11072023>
11. *Shkorbatova P, Lyakhovetskii V, Pavlova N, Popov A, Bazhenova E, Kalinina D, Gorskiy O, Musienko P* (2020) Mapping of the spinal sensorimotor network by transvertebral and transcutaneous spinal cord stimulation. *Frontiers in systems neuroscience* 14: 555593.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2020.555593>
12. *Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF* (1984) Hindlimb muscle activity during locomotion in the rat (*Rattus norvegicus*) (Rodentia: Muridae). *J Zool Lond* 203: 427–440.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb02342.x>
13. *Nakanishi ST, Whelan PJ* (2012) A decerebrate adult mouse model for examining the sensorimotor control of locomotion. *J Neurophysiol* 107: 500–515.
<https://doi.org/10.1152/jn.00699.2011>
14. *Skinner RD, Garcia-Rill E* (1984) The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. *Brain Res* 323: 385–389.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90319-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90319-6)
15. Шкорбатова ПЮ, Ляховецкий ВА, Горский ОВ, Павлова НВ, Баженова ЕЮ, Калинина ДС, Мусиенко ПЕ, Меркульева НС (2023) Электрическая эпидуральная стимуляция спинного мозга децеребрированной крысы. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 109: 798–816. [*Shkorbatova PYu, Lyakhovetskii VA, Gorskiy OV, Pavlova NV, Bazhenova EYu, Kalinina DS, Musienko PE, Merkul'yeva NS* (2023) Electric epidural stimulation of the spinal cord of the decerebrated rat. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 109: 798–816. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923060092>
16. *Capogrosso M, Wenger N, Raspopovic S, Musienko P, Beauparlant J, Bassi Luciani L, Courtine G, Micera S* (2013) A computational model for epidural electrical stimulation of spinal sensorimotor circuits. *J Neurosci* 33: 19326–19340.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1688-13.2013>
17. *Ghali GZ, Ghali MGZ* (2020) Microneurosurgical techniques and perioperative strategies utilized to optimize experimental supracollicular decerebration in rats. *J integrative neurosci* 19: 137–177.
<https://doi.org/10.31083/j.jin.2020.01.1153>
18. *Gilerovich EG, Moshonkina TR, Fedorova EA, Shishko TT, Pavlova NV, Gerasimenko YP, Otellin VA* (2008) Morphofunctional characteristics of the lumbar enlargement of the spinal cord in rats. *Neurosci Behav Physiol* 38: 855–860.
<https://doi.org/10.1007/s11055-008-9056-8>
19. *Wenger N, Moraud EM, Gandar J, Musienko P, Capogrosso M, Baud L, Le Goff CG, Barraud Q, Pavlova N, Dominići N, Minev IR, Asboth L, Hirsch A, Duis S, Kreider J, Mortera A, Haverbeck O, Kraus S, Schmitz F, DiGiovanna J, van den Brand R, Bloch J, Detemple P, Lacour SP, Bézard E, Micera S, Courtine G* (2016) Spatiotemporal neuromodulation therapies engaging muscle synergies improve motor control after spinal cord injury. *Nat Med* 22: 138–145.
<https://doi.org/10.1038/nm.4025>
20. *Curtis DR, Eccles JC* (1960) Synaptic action during and after repetitive stimulation. *J Physiol* 150: 374–398.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1960.sp006393>
21. *Granit R* (1950) Reflex self-regulation of muscle contraction and autogenetic inhibition. *J Neurophysiol* 13: 351–372.
<https://doi.org/10.1152/jn.1950.13.5.351>
22. *Lloyd DP, Wilson VJ* (1957) Reflex depression in rhythmically active monosynaptic reflex pathways. *J Gen Physiol* 40: 409–426.
<https://doi.org/10.1085/jgp.40.3.409>
23. *Minassian K, Gilje B, Rattay F, Pinter MM, Binder H, Gerstenbrand F, Dimitrijevic MR* (2004) Stepping-like movements in humans with complete spinal cord injury induced

- by epidural stimulation of the lumbar cord: electromyographic study of compound muscle action potentials. *Spinal Cord* 42:401–416.
<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101615>
24. *Dideriksen JL, Muceli S, Dosen S, Laine CM, Farina D* (2015) Physiological recruitment of motor units by high-frequency electrical stimulation of afferent pathways. *J Appl Physiol* (1985). 118: 365–376.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00327.2014>
 25. *Jaumard NV, Leung J, Gokhale AJ, Guarino BB, Welch WC, Winkelstein BA* (2015) Relevant anatomic and morphological measurements of the rat spine. *Spine* 40: E1084–E1092.
<https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000001021>
 26. *Mohan R, Tosolini AP, Morris R* (2015) Segmental distribution of the motor neuron columns that supply the rat hindlimb: A muscle/motor neuron tract-tracing analysis targeting the motor end plates. *Neuroscience* 307: 98–108.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.030>
 27. *Wilson VJ, Talbot WH, Diecke FP* (1960) Distribution of recurrent facilitation and inhibition in cat spinal cord. *J Neurophysiol* 23: 144–153.
 28. *Tanabe M, Kaneko T* (1996) Paired pulse facilitation of GABAergic IPSCs in ventral horn neurons in neonatal rat spinal cord. *Brain Res* 716:101–106.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00051-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00051-0)
 29. *Meinck HM* (1976). Occurrence of the H reflex and the F wave in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 41: 530–533.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(76\)90064-x](https://doi.org/10.1016/0013-4694(76)90064-x)
 30. *Calancie B, Broton JG, Klose KJ, Traad M, Difini J, Ayyar DR* (1993) Evidence that alterations in presynaptic inhibition contribute to segmental hypo- and hyperexcitability after spinal cord injury in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 89: 177–186.
[https://doi.org/10.1016/0168-5597\(93\)90131-8](https://doi.org/10.1016/0168-5597(93)90131-8)
 31. *Andrews JC, Roy FD, Ba F, Sankar T* (2020). Intraoperative changes in the H-reflex pathway during deep brain stimulation surgery for Parkinson's disease: A potential biomarker for optimal electrode placement. *Brain Stimul* 13: 1765–1773.
<https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.09.024>
 32. *Ho SM, Waite PM* (2002) Effects of different anesthetics on the paired-pulse depression of the h reflex in adult rat. *Exp Neurol* 177: 494–502.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8013>
 33. *Guiho T, Baker SN, Jackson A* (2021) Epidural and transcutaneous spinal cord stimulation facilitates descending inputs to upper-limb motoneurons in monkeys. *J Neural Eng* 18: 046011.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/abe358>
 34. *Taylor BA, Fennelly ME, Taylor A, Farrell J* (1993) Temporal summation – the key to motor evoked potential spinal cord monitoring in humans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 104–106.
 35. *Zhang W, Schneider SP* (2011). Short-term modulation at synapses between neurons in laminae II–V of the rodent spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 105:2920–2930.
<https://doi.org/10.1152/jn.00684.2010>
 36. *Floeter MK, Lev-Tov A* (1993) Excitation of lumbar motoneurons by the medial longitudinal fasciculus in the in vitro brain stem spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Neurophysiol* 70: 2241–2250.
<https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.6.2241>
 37. *Lyakhovetskii V, Shkorbatova P, Gorskii O, Musienko P* (2022) Forward stepping evoked by transvertebral stimulation in the decerebrate cat. *Neuromodulation* S1094–7159(22)01373–3.

STIMULATION OF THE SPINAL CORD OF DECEREBRATED RAT WITH DOUBLE PULSES

**V. A. Lyakhovetskii^a, P. Yu. Shkorbatova^a, O. V. Gorsky^{a,b}, N. V. Pavlova^a, E. Yu. Bazhenova^a,
P. E. Musienko^{a,b,†}, and N. S. Merkulyeva^{a,‡}**

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

^b Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

[‡] e-mail: mer-natalia@yandex.ru, pol-spb@mail.ru

[†] authors with equal contribution

Analysis of responses on electrical stimulation is one of the experimental paradigms to study the excitability of the nervous system. In particular, the technique of recording muscle responses evoked by electrical epidural stimulation (ES) of the spinal cord (SC) in humans and animals is widely used. In rats decerebrated at the precollicular level, responses of *mm. tibialis anterior* (TA) and *gastrocnemius medialis* (GM) on ES of the L2, L4, L6 spinal segments and transvertebral stimulation (TS) of the VL2, VL4, VL6 vertebrae with single and double pulses were analyzed. The currents at which the amplitude of the sensory component of the response for a single pulse and one of the pulses of the pair was maximum were determined. At the minimum of these currents, the ratio of the amplitudes of the sensory component of the response to the first and second pulses to the amplitude of the sensory component of the response to a single pulse was analyzed. For both muscles, a weakening of the response to both pulses of the pair was obtained with TS VL2 and VL4, while when stimulating VL2, the TA response to the second pulse was lower than to the first. On the contrary, with ES of all segments of interest, a facilitation of the response to the second pulse was obtained for

both muscles. A similar facilitation was qualitatively observed for two other muscles, *mm. iliacus* and *vastus lateralis*. Thus, the use of double pulses during stimulation made it possible to identify the dependence of the response of SC neural networks on the method of their activation (TS or ES). The facilitation of the response to the second pulse during ES is presumably explained by a decrease in presynaptic inhibition due to decerebration.

Keywords: decerebrated rat, epidural stimulation, transvertebral stimulation, evoked potential, paired pulse facilitation