

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 5, 2021

Все статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в "Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology" ISSN 0022-0930, ©Pleiades Publishing, Ltd.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Сравнительный анализ выявления микроглии у млекопитающих и человека с использованием маркирования пуринергических рецепторов P2Y₁₂
Д. Э. Коржевский, Д. Л. Цыба, О. В. Кирик, О. С. Алексеева 363
- Особенности возрастной динамики нейронов наружного коленчатого тела кошки при использовании фронтальных и сагиттальных срезов
А. А. Михалкин, Н. С. Меркульева 373
- Влияние солей азида, фторида, ортованадата и эдта натрия на экто-атфазную активность эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.)
Ю. А. Силкин, Е. Н. Силкина, М. Ю. Силкин 380
- Сезонная динамика системы красной крови малой лесной мыши (*Apodemus uralensis*) в горах Центрального Кавказа
М. М. Емкужева, Ф. А. Темботова, З. А. Берсекова, З. Х. Боттаева, А. Х. Чанаев 392
- Изучение влияния неонатальной воспалительной боли на когнитивные процессы и реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы у крыс препубертатного возраста
В. А. Михайленко, И. П. Буткевич, Е. А. Вершинина 402
- Экспрессия маркеров нейровоспаления и апоптоза в височной доле головного мозга у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией
А. В. Литовченко, Ю. М. Забродская, Д. А. Ситовская, Л. К. Хужахметова, В. Г. Нездоровина, Е. Д. Бажанова 411
- Активность ферментов энергетического обмена и аденилатная система камер сердца черноморской скорпены (*Scorpaena porcus* L.) при острой гипоксии
Е. Э. Колесникова, А. А. Солдатов, И. В. Головина, И. В. Сысоева, А. А. Сысоев, Т. А. Кухарева 420
- Профилактическое введение белка теплового шока HSP70 ослабляет лихорадочную реакцию при эндотоксемии у голубей (*Columba livia*) и крыс
К. В. Лапина, И. В. Гужова, И. В. Екимова 430
- Фагоцитарная активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре регулируется инсулином и ганглиозидом GM1
Т. В. Соколова, М. П. Рычкова, Н. Е. Басова, Д. С. Васильев, Н. Ф. Аврова, М. Г. Ефимова 442
-
-

Contents

Vol. 57, No. 5, 2021

EXPERIMENTAL ARTICLES

- A comparison of microglia detection in mammals and humans using purinergic receptor P2Y₁₂ labeling
D. E. Korzhevskii, D. L. Tsyba, O. V. Kirik, O. S. Alekseeva 363
- Features of the Age-Related Dynamics of Cat Lateral Geniculate Nucleus Neurons as Revealed in Frontal versus Sagittal Slices
A. A. Mikhalkin, N. S. Merkulyeva 373
- Seasonal Dynamics of Erythropoiesis in the Pygmy Wood Mouse (*Apodemus uralensis*) of the Central Caucasus Mountains
M. M. Emkuzheva, F. A. Tembotova, Z. A. Bersekova, Z. Kh. Bottaeva, Φ. Kh. Chapaev 380
- The Effect of Azide, Fluoride, Orthovanadate, and EDTA sodium salts on ecto-ATPase activity of Red Blood Cells in a Scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) and Thornback Ray (*Raja clavata* L.)
Yu. A. Silkin, E. N. Silkina, M. Yu. Silkin 392
- The effect of neonatal inflammatory pain on cognitive processes and reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in prepubertal rats
V. A. Mikhailenko, I. P. Butkevich, E. A. Vershinina 402
- Markers of Neuroinflammation and Apoptosis in the Temporal Lobe of Patients with Drug-Resistant Epilepsy
A. V. Litovchenko, Yu. I. Zabrodsкая, D. A. Sitovskaya, L. K. Khuzhakhmetova, V. G. Nezdorovina, E. D. Bazhanova 411
- Activity of energy metabolism enzymes and the adenylate system in heart chambers of a black sea (*Scorpaena porcus* L.) under acute hypoxia
E. E. Kolesnikova, A. A. Soldatov, I. V. Golovina, I. V. Sysoeva, A. A. Sysoev, T. A. Kukhareva 420
- Prophylactic administration of the heat shock protein HSP70 relieves endotoxemia-induced febrile reaction in pigeons (*Columba livia*) and rats
K. V. Lapshina, I. V. Guzhova, I. V. Ekimova 430
- The phagocytic activity of rat brain astrocytes in primary culture is regulated by insulin and GM1 ganglioside
T. V. Sokolova, M. P. Rychkova, N. E. Basova, D. S. Vasilev, N. F. Avrova M. G. Yefimov 442
-
-

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКРОГЛИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКИРОВАНИЯ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ P2Y12

© 2021 г. Д. Э. Коржевский¹, Д. Л. Цыба¹, О. В. Кирик¹, О. С. Алексеева^{1,2,*}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: osa72@inbox.ru

Поступила в редакцию 01.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 19.04.2021 г.

Проблема выбора адекватного метода выявления микроглии актуальна для современных нейрофизиологических и междисциплинарных исследований в связи с отсутствием универсальных подходов, позволяющих визуализировать эту популяцию клеток в препаратах головного мозга человека и лабораторных животных. В настоящем исследовании изучалась возможность использования пуринергического рецептора P2Y12 в качестве маркера для сравнительного анализа микроглии у человека и нескольких неродственных видов животных (кролик, крыса, мышь, суслик). Для исследования применялись антитела к рекомбинантному пептиду, соответствующему 303–342 аминокислотам P2Y12 рецептора человека. Показано, что наилучшие результаты выявления микроглии были характерны для человека, кролика и крысы. У суслика и мыши, помимо выявляемой микроглии, обнаруживалась неспецифическая реакция со стороны других клеток, отрицательное влияние которой на качество получаемых изображений можно уменьшить, используя средства конфокальной микроскопии. Во всех исследованных случаях отмечалось отсутствие иммунопозитивных макрофагов и клеток амебoidalной микроглии, что свидетельствует о перспективности использования P2Y12 как высокоселективного маркера покоящейся микроглии. В рамках настоящего исследования впервые была проведена визуализация микроглии головного мозга кролика и суслика с использованием антител против пуринергического рецептора P2Y12.

Ключевые слова: микроглия, пуринергические рецепторы, иммуногистохимия, конфокальная микроскопия, человек, млекопитающие

DOI: 10.31857/S0044452921050028

В последние годы в нейрофизиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследованиях все чаще используются методы иммуногистохимии [1–9], которые, при условии их правильного применения, позволяют получать важные сведения об изменениях функционального статуса клеток нервной системы. В связи с высокой сложностью методов иммуногистохимии и особенностями иммунологических подходов, используемых для визуализации белковых маркеров, при проведении иммуногистохимических реакций нередко возникают проблемы, связанные со специфичностью используемых реагентов [10–12], которые не всегда могут быть определены с учетом результатов общепринятых контрольных процедур [13–15]. Не является редкостью и несо-

ответствие заявленных производителем характеристик антител их действительным свойствам [12, 16]. Особую важность для сравнительных физиологических и эволюционных исследований представляет проблема видовой специфичности антигенных маркеров, которые в ряде случаев для таких исследований оказываются непригодны, либо имеют ограничения, которые невозможно выявить, ориентируясь лишь на данные, предоставляемые производителем реактивов [12, 17]. В частности, не указывается весь перечень видов животных, на материале которых возможно использование данных антител. И если информацию о давно известных маркерах можно восполнить, изучая литературные источники, то относительно новые маркеры и антитела требуют тщательного изучения их пригод-

ности для решения конкретных исследовательских задач. В качестве примера подобного подхода можно привести анализ использования одного продукта из общедоступной линейки антител к введенному в исследовательскую практику в 1996 г. микроглиальному маркеру Iba-1 [18]. В результате проведенного исследования было установлено, что один вариант первичных антител позволяет получать сопоставимые результаты при исследовании микроглии у мыши, крысы, кролика и человека [19], хотя в информации производителя содержится указание только на человека и крысу.

В 2003 г. были получены первые данные о присутствии пуриnergического рецептора P2Y₁₂ на мембране клеток микроглии [20]. К настоящему моменту опубликовано около 150 научных статей, в которых использованы различные антитела к этому маркеру, но ни в одной из них не проводилось детального исследования видоспецифичности антител, демонстрирующего возможность их использования для межвидового сравнительного анализа микроглии. В связи с тем, что P2Y₁₂ не экспрессируется другими клетками головного мозга, кроме микроглиальных [21], и является маркером функционального состояния клетки [22, 23], его использование в сравнительных физиологических и биохимических исследованиях представляется перспективным.

В последние годы наблюдается увеличение числа исследований, в которых клетки микроглии выявляют с использованием антител к белку P2Y₁₂ [24–28]. Используются различные антитела к данному белку при изучении мозга лабораторных животных и человека, однако до настоящего времени сравнительная оценка возможностей селективного выявления микроглиоцитов у различных видов млекопитающих и человека с использованием маркера P2Y₁₂ не проводилась.

В связи с вышеизложенным целью данной работы стало изучение возможности использования антител к рецептору P2Y₁₂ в качестве маркера отростчатой микроглии головного мозга человека и животных (кролика, суслика, крысы и мыши) с использованием различных иммуноцитохимических подходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили срезы коры большого мозга человека и головной мозг половозрелых самцов ряда млекопитающих: крыс линии *Wistar*, сусликов вида *Spermophilus pygmaeus*, мышей линии C57BL/6 и кроликов породы *Шиншилла* ($n = 3$ в каждой группе). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к приказу МЗ

СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Материал головного мозга человека получен из архива отдела общей и частной морфологии ФГБНУ “ИЭМ”, созданного в соответствии с заключением ЛЭК ФГБНУ “ИЭМ” от 11.12.2009 г. Исследование лабораторных животных (мыши, крысы, кролики) проводили в соответствии с заключением локального этического комитета ФГБНУ “ИЭМ” от 25.04.2019 г. Исследование сусликов проводили в соответствии с заключением комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол № 2/2020 от 27.02.2020 г.).

Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [29], обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике. Морфологическому исследованию подвергали серийные фронтальные срезы мозга толщиной 5 мкм, приготовленные на ротационном микротоме Leica RM2125RT (Leica, Германия). После депарафинирования, регидратации и теплового демаскирования срезы использовали для иммуногистохимического исследования.

Выявление рецепторов P2Y₁₂ производили с помощью кроличьих поликлональных антител (Novus Biologicals, США). Для разведения антител (1:500–1:3000) использовали разбавитель антител (Dako/Agilent, США). Используемые антитела были получены при иммунизации животных рекомбинантным белком с аминокислотной последовательностью KSFNRSLISMLKCPNSATLSLQDN-RKKEQDGGDPNEETPM, соответствующей 303–342 аминокислотам P2Y₁₂ рецептора человека, что следует из указаний производителя антител и проверки аминокислотной последовательности с использованием сервиса RefSeq [30]. Для выявления связавшихся с антигеном первичных антител использовали набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Пероксидазную метку выявляли с помощью диаминобензидинового хромогена (DAB+; Dako/Agilent, США). После проведения иммуноцитохимических реакций часть срезов подкрашивали гематоксилином либо альциановым синим. В качестве контролей использовали срезы, которые обрабатывались аналогичным образом, за исключением одного этапа, на котором вместо разведенных разбавителем первичных антител на препараты наносили только разбавитель антител.

Для конфокальной лазерной микроскопии в качестве вторичных антител для выявления рецепторов P2Y₁₂ использовали набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США) и анти-HRP Fab-фрагменты иммуноглобулинов козы, конъюгированные с флуорохромом RRX (Jackson ImmunoResearch, США), максимум флуоресценции которого соответствует длине волны $\lambda_{em} = 590$ нм.

Анализ препаратов в проходящем свете и фото-съемку выполняли с использованием микроскопа Leica DM750 и фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Препараты, подготовленные для флуоресцентного исследования, изучали с использованием конфокального лазерного микроскопа LSM800 (Carl Zeiss, Германия). При проведении сравнительного анализа интенсивности реакции параметры захвата изображения настраивались по самой яркой реакции на препаратах головного мозга человека и не менялись в течение всего эксперимента. Обработку полученных изображений и построение графиков интенсивности флуоресценции проводили в программе Zen-2012 (Carl Zeiss, Германия). Анализ и сравнение аминокислотных последовательностей проводили с помощью онлайн инструмента BLAST [31] и алгоритма множественного выравнивания MUSCLE [32] в программе MegaX [33].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате постановки иммуногистохимических реакций, проводимых в одинаковых условиях, у всех видов исследуемых животных и человека была обнаружена специфическая иммунореактивность, которая демонстрировала присутствие в нервной ткани коры большого мозга отростчатых клеток, имеющих типичное строение рамифицированной (отростчатой) микроглии. Наиболее интенсивная реакция была получена на препаратах коры большого мозга человека (рис. 1а). Продукт реакции равномерно распределялся в теле клетки, в отростках наблюдались его небольшие скопления. Фоновая реакция была минимальной. Содержимое кровеносных сосудов было иммунонегативным. Клеток, которые можно было бы отнести к амeboидной микроглии и периваскулярным макрофагам, выявлено не было.

На препаратах мозга крысы (рис. 1б) интенсивность иммуногистохимической реакции была достаточно высокой для проведения анализа структуры клеток микроглии, но слабее, чем у человека. Хорошо прослеживалось сложное ветвление отростков. Тела клеток редко попадали в плоскость среза. При этом отмечались следующие особенности – слабая реакция в перинуклеарной области и ее отсутствие в ядрах клеток. При использовании больших увеличений микроскопа отмечалась кластеризация рецептора P2Y₁₂ в области плазмалеммы. Содержимое сосудов было иммунонегативным.

На препаратах головного мозга кролика (рис. 1с) реакция была интенсивной, но несколько слабее, чем у микроглии мозга человека и близкой к ней (по интенсивности реакции) микроглии мозга крысы. Хорошо визуализировались отростки мик-

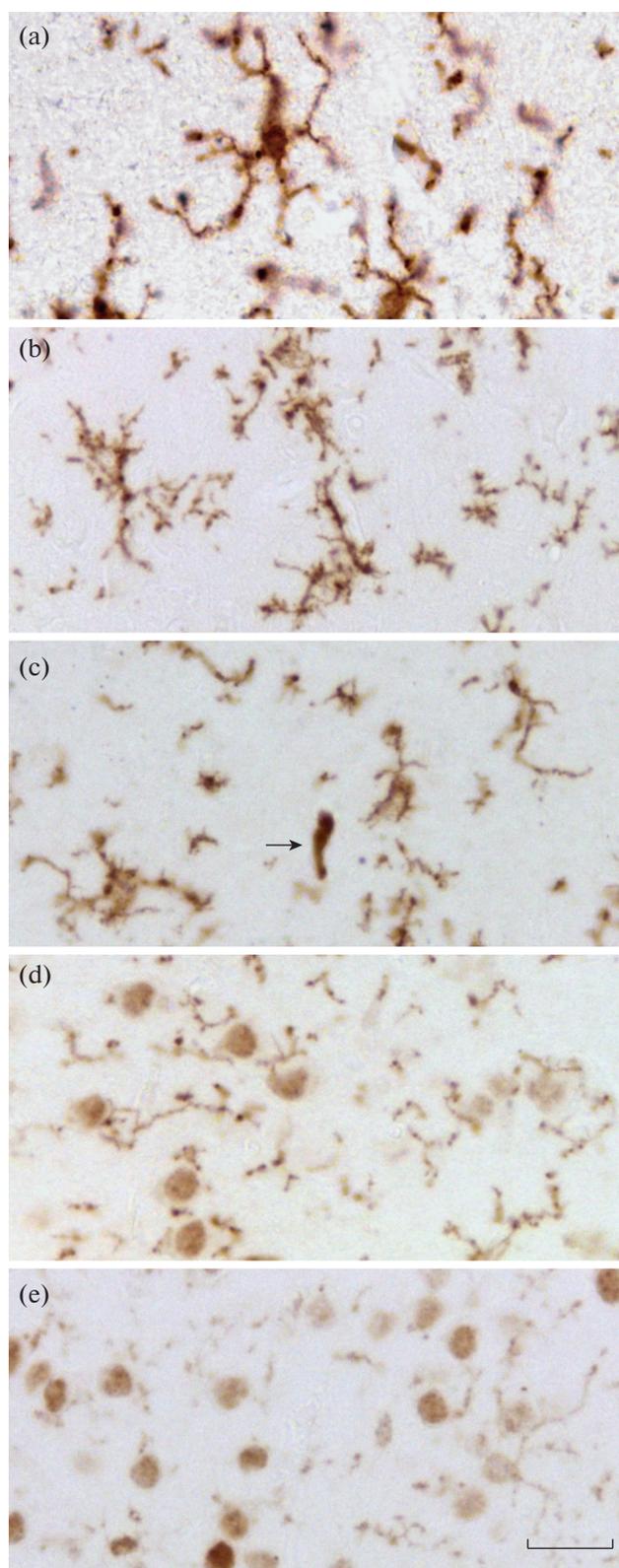


Рис. 1. Микроглия коры большого мозга: а – человека, б – крысы, с – кролика, д – суслика, е – мыши. Стрелка указывает на иммунопозитивный кровеносный сосуд. Иммуногистохимическая реакция на P2Y₁₂, визуализация с помощью хромогена DAB⁺. Масштабный отрезок равен 20 мкм.

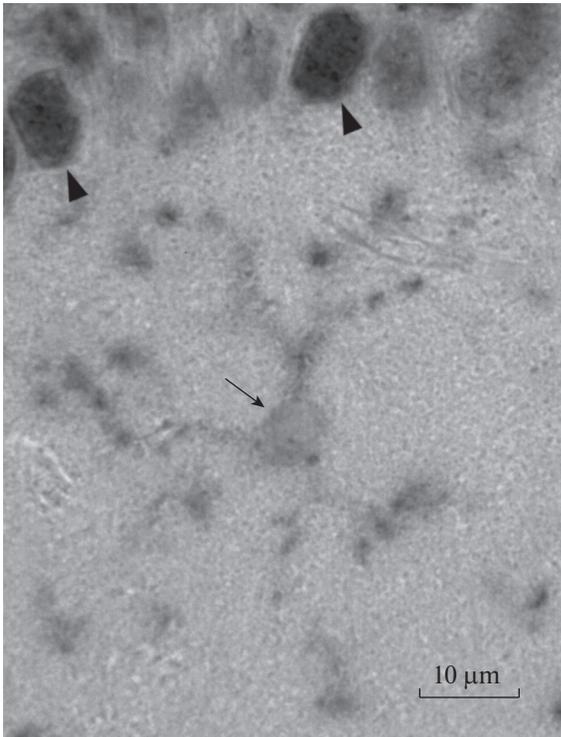


Рис. 2. Гиппокамп мыши. Стрелка указывает на область ядра микроглиоцита. Головки стрелок указывают на иммунопозитивные ядра пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа. Иммуноцитохимическая реакция на P2Y₁₂, визуализация с помощью хромогена DAB⁺, без подкраски.

роглиоцитов. Продукт иммуногистохимической реакции был распределен равномерно. От более толстых отростков отходили многочисленные тонкие и короткие отростки. Хорошо просматривался периметр тела клеток. Ядра клеток были иммунонегативными. Помимо микроглиоцитов, в препаратах коры головного мозга кролика иммунореактивным было бесструктурное содержимое кровеносных сосудов (см. рис. 1с). При изучении крупных сосудов, содержащих эритроциты, наблюдалась преимущественная реакция внеэритроцитарных компонентов содержимого кровеносных сосудов (сыворотка крови).

В препаратах головного мозга суслика (рис. 1d) интенсивность иммуногистохимической реакции в целом была слабее. При этом положительная реакция обнаруживалась не только в отростках микроглиоцитов, но и в ядрах отдельных нейронов. Указанные особенности затрудняли возможность оценки протяженности и ветвления отростков. Тела клеток микроглии визуализировались неотчетливо. Реакция в просвете кровеносных сосудов мозга отсутствовала.

Наименьшая интенсивность реакции со стороны микроглии была характерна для препаратов го-

ловного мозга мыши (рис. 1е). Микроглия визуализировалась неотчетливо. Ее отростки имели вид тонких ниточек и точек. При этом ярко окрашивались ядра и тела других клеток, преимущественно нейронов (рис. 2). Содержимое сосудов не окрашивалось. Во всех изученных случаях клетки амeboидной микроглии и периваскулярные макрофаги не выявлялись.

При конфокальной лазерной микроскопии препаратов, полученных с помощью разведения первичных антител 1 : 1000, максимальная интенсивность флуоресценции (при одинаковых параметрах захвата изображения и одинаковых условиях постановки реакции) наблюдалась в препаратах мозга человека (рис. 3b, 3d) и кролика (рис. 3a, 3c). При этом микроглия в срезах головного мозга крысы, суслика и мыши не визуализировалась. Использование более продолжительного теплового демаскирования антигена в течение 25 мин вместо 22 и повышение в 2 раза концентрации первичных антител позволили получить хорошо детектируемую реакцию микроглии головного мозга крысы и суслика при стандартных настройках конфокального микроскопа. Микроглия головного мозга мыши выявлялась только при двукратном увеличении мощности лазера, используемого для возбуждения флуоресценции (рис. 4). Таким образом, только при использовании приемов, усиливающих чувствительность методики, появлялась возможность анализировать микроглию на препаратах головного мозга крысы, суслика и мыши. Фоновая флуоресценция на препаратах мозга мыши была выше, чем на срезах мозга крысы и суслика (рис. 4). Ее уровень может быть откорректирован при помощи настроек микроскопа, в частности, увеличением параметра "Pixel Time", который характеризует продолжительность экспозиции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных иммунопероксидазной реакции показал, что в одинаковых условиях (см. рис. 1), наиболее яркая окраска микроглии при использовании антител к рецептору P2Y₁₂ наблюдалась в коре большого мозга человека, что вполне ожидаемо, поскольку для получения антител был использован пептид, полностью соответствующий фрагменту последовательности белка P2Y₁₂ человека. Для получения более точной информации об аффинности связывания антител было проведено иммунофлуоресцентное исследование, поскольку оптическая плотность DAB-продукта не всегда может быть оценена количественно [34]. Визуальный анализ и построение графиков интенсивности иммунофлуоресцентной реакции в отростках микроглиоцитов (рис. 3 с, d) подтвердили предположение о пониженной степени связывания данных

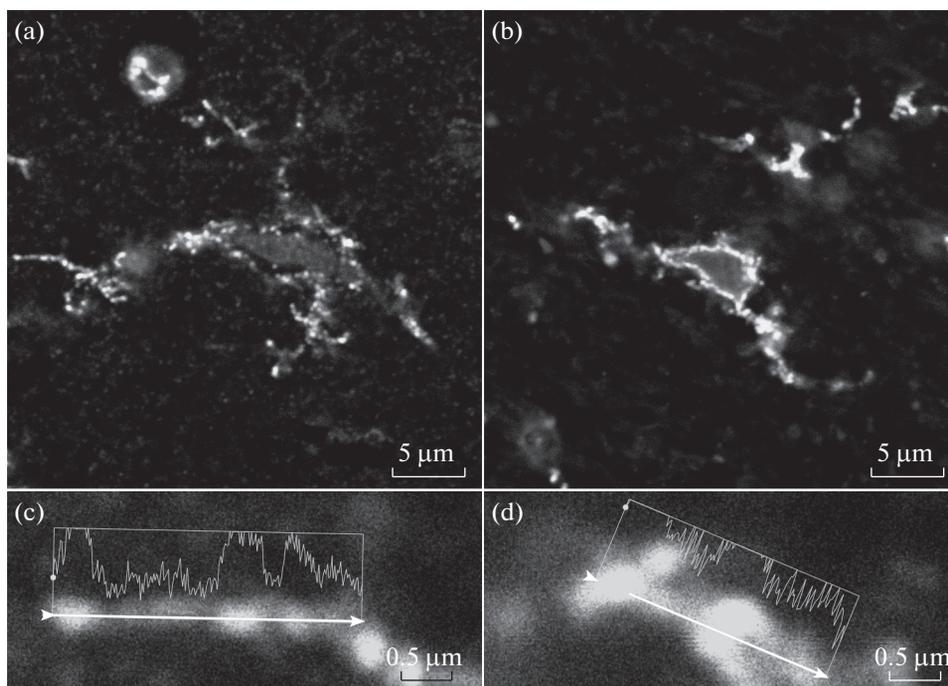


Рис. 3. Неокортекс кролика (а, с) и человека (b, d). На рисунках (с, d) приведены графики интенсивности флуоресценции в отростках микроглиоцитов. Конфокальная лазерная микроскопия. Иммуноцитохимическая реакция на P2Y₁₂, визуализация с помощью флуорохрома RRX.

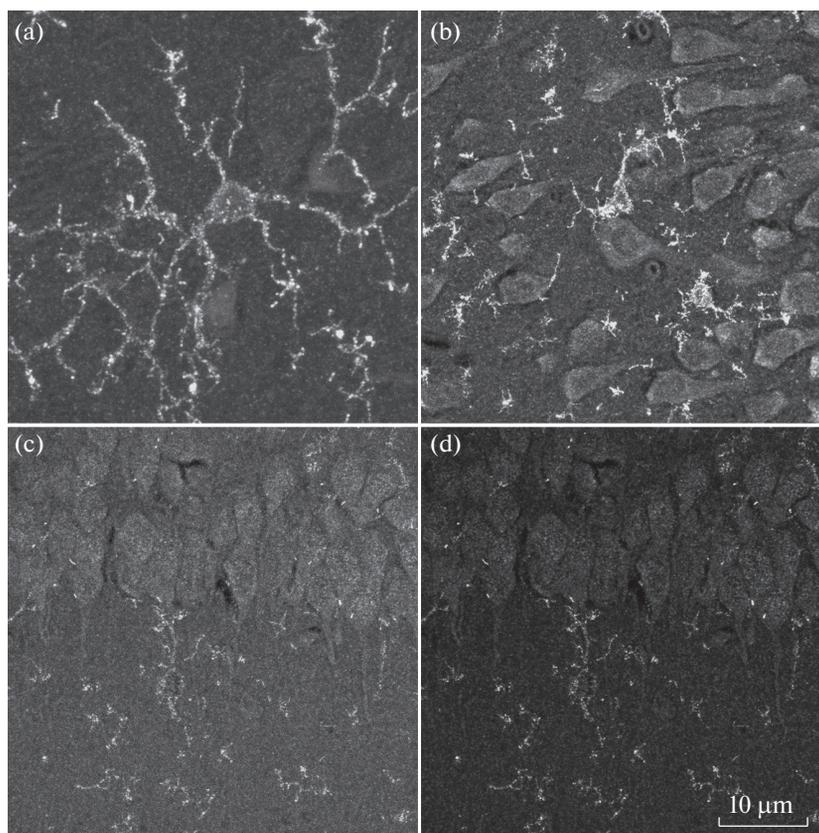


Рис. 4. Стриатум крысы (а), гиппокамп суслика (b) и мышцы (с, d). Конфокальная лазерная микроскопия. Иммуноцитохимическая реакция на P2Y₁₂, визуализация с помощью флуорохрома RRX. Области объекта в случае (с) и (d) идентичны. Для (d) параметр захвата изображения “Pixel Time” в 8 раз больше, чем для (с).

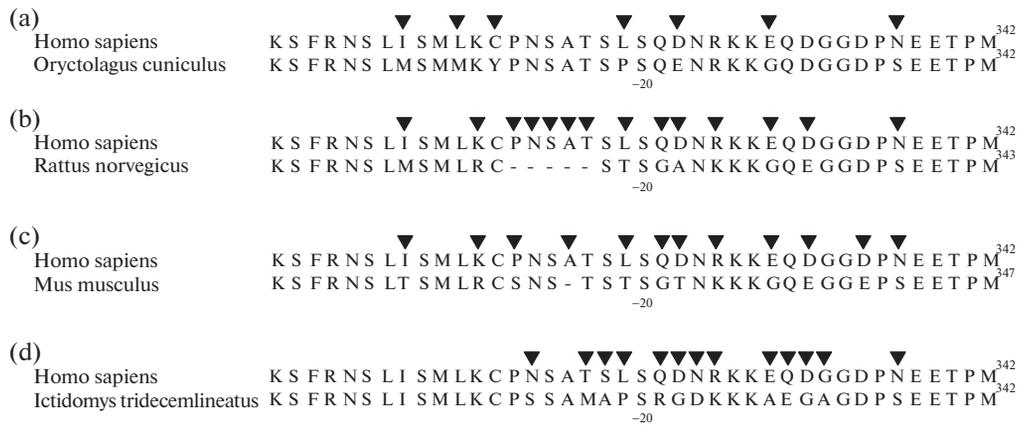


Рис. 5. Аминокислотные последовательности С-концевого (иммуногенного) фрагмента пуринергического рецептора P2Y12 человека, исследуемых млекопитающих и родственных им видов, попарное сравнение: а — человек и кролик, б — человек и крыса, с — человек и мышь, д — человек и суслик. Треугольниками показаны позиции с отличающимися аминокислотами. Однобуквенные обозначения аминокислот соответствуют общепринятым.

первичных антител с белком P2Y12 у всех исследуемых животных в сравнении с человеком (см. рис. 3, 4). Использование стандартных иммунофлуоресцентных методик дало возможность выявить P2Y12-иммунопозитивную микроглию только у человека и кролика (см. рис. 3). У крысы, мыши и суслика микроглия в этих условиях не визуализировалась. Усиление чувствительности реакции и повышение мощности возбуждающего лазера конфокального микроскопа позволили выявить микроглию у суслика, мыши и крысы (см. рис. 4). В результате данных экспериментов было установлено, что высокая интенсивность иммуногистохимической реакции у человека позволяет эффективно использовать антитела к P2Y12 в большем разведении (1 : 2000), чем при использовании их для визуализации микроглии у исследованных животных (1 : 500–1 : 1000).

Для оценки гомологии белка P2Y12 в ряду исследуемых объектов было произведено выравнивание аминокислотных последовательностей белка P2Y12 человека и исследуемых животных либо близкородственных видов, доступных в базе данных RefSeq [30]. В международных базах отсутствуют данные о белке P2Y12 исследованного нами малого суслика (*Spermophilus pygmaeus*), но имеются сведения о последовательности белка у родственного ему тринадцатиполосого суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*). Анализ полученного выравнивания показал, что данный белок обладает достаточно высокой консервативностью среди исследуемых млекопитающих и человека. Тем не менее наблюдаются отличия в аминокислотных последовательностях, в том числе, затрагивающие иммуногенный участок. Наиболее близким по аминокислотному составу белком P2Y12 по сравнению с человеческим обладает кролик, наименее

сходным — суслик, в то время как крыса и мышь занимают промежуточное положение (рис. 5).

Сопоставление аминокислотной последовательности фрагментов белка, соответствующих иммуногенному пептиду, демонстрируют несколько иные результаты. При попарном сравнении аминокислотных последовательностей концевых фрагментов пуринергического рецептора P2Y12, соответствующих иммуногенному участку, схожесть для человека и кролика (*Oryctolagus cuniculus*) составила 82.5%, для человека и мыши (*Mus musculus*) — 70%, для человека и суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) — 67.5%, для человека и крысы (*Rattus norvegicus*) — 65%.

Попарный анализ аминокислотных замен позволил выделить участок из 4 аминокислот (рис. 5), в пределах которого наблюдается высокая схожесть между последовательностями, принадлежащими человеку и кролику. Причем в последовательности кролика в 18-й позиции от конца молекулы аспарагиновая кислота (D) заменена на схожую по физико-химическим свойствам отрицательно заряженную глутаминовую кислоту (E), в то время как у других млекопитающих в этой позиции находятся незаряженные аминокислоты: аланин (A), треонин (T) и глицин (G). Вероятно, наличие в 18-й от конца позиции отрицательно заряженной аминокислоты может быть существенным для формирования соответствующих антигенных эпитопов, распознаваемых исследуемыми поликлональными антителами [35].

Исходя из степени схожести последовательностей и анализа результатов иммуногистохимических реакций, можно предположить, что на связывание данных антител с P2Y12-рецепторами влияет

не только сходство с иммуногенным пептидом, но и качественный характер аминокислотных замен.

Результаты анализа аминокислотных последовательностей в целом соотносятся с данными иммуноцитохимического исследования. Исключение составляет белок P2Y₁₂ у мыши, который, исходя из аминокислотного состава, должен бы реагировать с использованными антителами не хуже, чем аналогичный белок у крысы. Существенно более слабая иммунореактивность исследуемого белка у данного вида лабораторных животных может быть связана с наличием других белков со сходными антигенными эпитопами, которые содержатся в нейронах головного мозга и конкурируют с белком P2Y₁₂ за связывание с первичными антителами. Положительная реакция со стороны ядер нервных клеток у мыши (см. рис. 2) может указывать на существование подобных белков, поскольку присутствие в кариоплазме пуриnergических рецепторов, для которых типична мембранная локализация, маловероятно. Идентификация локализованного в ядре белка, который отсутствует у человека, крысы и кролика, требует дальнейших исследований.

Обращает на себя внимание факт положительной реакции содержимого кровеносных сосудов у одного из исследованных видов животных – кролика. Данную реакцию нельзя считать специфической, поскольку она присутствует и в контрольных препаратах (негативный контроль без первичных антител). Выявление компонентов сыворотки в кровеносных сосудах у кролика объясняется используемыми вторичными реагентами. Поскольку первичные антитела являются по своему происхождению кроличьими, то при их выявлении собственные иммуноглобулины кролика, которые в интактном головном мозге можно обнаружить только в составе сыворотки крови в кровеносных сосудах, связываются со вторичными антителами и способствуют неспецифической окраске содержимого кровеносных сосудов. Аналогичные проблемы отмечаются и в других случаях, когда объект исследования и антитела имеют одну видовую принадлежность [17, 36].

Важным фактом, который был установлен в рамках проведенного исследования, является отсутствие метки в периваскулярных макрофагах и клетках, подобных амебоидной микроглии. Это наблюдение подтверждает имеющуюся информацию о том, что рецептор P2Y₁₂, в отличие от белка Iba-1, являющегося неселективным маркером микроглии и макрофагов, присутствует только в клетках неактивированной (отростчатой) микроглии и не характерен для макрофагов [21, 23, 37].

Таким образом, реакция на P2Y₁₂ с использованием поликлональных антител против рекомбинантного пептида, соответствующего 303–

342 аминокислотам P2Y₁₂ человека, может успешно применяться при сравнительном изучении микроглии у таких неродственных видов, как человек, кролик и крыса. Использование методов конфокальной лазерной микроскопии позволяет решить ряд проблем, связанных со слабой иммунореактивностью микроглии и присутствием неспецифической фоновой реакции при изучении препаратов головного мозга суслика и мыши. Отсутствие иммунопозитивных макрофагов и клеток амебоидной микроглии как у изученных животных, так и у человека свидетельствует о перспективности использования P2Y₁₂ как высокоселективного маркера покоящейся микроглии. В рамках настоящего исследования впервые была проведена визуализация микроглии головного мозга кролика и суслика с использованием антител против пуриnergического рецептора P2Y₁₂. Полученные результаты являются основой для проведения сравнительных исследований реакций микроглии при моделировании заболеваний человека с использованием различных видов лабораторных животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят д.б.н., проф. Н.К. Кличханова, профессора кафедры биохимии и биофизики Дагестанского государственного университета и Ш.И. Чалабова, аспиранта Дагестанского государственного университета за предоставленных животных (*сусликов *Spermophilus pygmaeus**).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины” и государственного задания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (Д.Э.К.), сбор данных (Д.Л.Ц., О.С.А.), обработка данных (О.В.К., Д.Л.Ц.), написание и редактирование текста (Д.Э.К., О.В.К., Д.Л.Ц., О.С.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greer K, Basso EKG, Kelly C, Cash A, Kowalski E, Cerna S, Ocampo CT, Wang X, Theus MH (2020) Abrogation of atypical neurogenesis and vascular-derived EphA4 prevents repeated mild TBI-induced learning and memory impairments. *Sci Rep* 10 (1): 15374. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72380-1>
2. Nazarian S, Abdolmaleki Z, Torfeh A, Shirazi Beheshtiha SH (2020) Mesenchymal stem cells with modafinil (gold nanoparticles) significantly improves neurological deficits in rats after middle cerebral artery occlusion. *Exp Brain Res* 238 (11): 2589–2601. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05913-9>
3. Deb BK, Chakraborty P, Gopurappilly R, Hasan G (2020) SEPT7 regulates Ca²⁺ entry through Orai channels in human neural progenitor cells and neurons. *Cell Calcium* 90: 102252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102252>
4. Bielefeld P, Abbink MR, Davidson AR, Reijner N, Abiega O, Lucassen PJ, Korosi A, Fitzsimons CP (2021) Early life stress decreases cell proliferation and the number of putative adult neural stem cells in the adult hypothalamus. *Stress* 24 (2): 189–195. <https://doi.org/10.1080/10253890.2021.1879787>
5. Lorenzen K, Mathy NW, Whiteford ER, Eischeid A, Chen J, Behrens M, Chen XM, Shibata A (2021) Microglia induce neurogenic protein expression in primary cortical cells by stimulating PI3K/AKT intracellular signaling in vitro. *Mol Biol Rep* 48 (1): 563–584. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06092-0>
6. Ping S, Qiu X, Kyle M, Zhao LR (2021) Brain-derived CCR5 Contributes to Neuroprotection and Brain Repair after Experimental Stroke. *Aging Dis* 12 (1): 72–92. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0406>
7. Wei H, Zhou W, Hu G, Shi C (2021) Induction of mesenchymal stem cell-like transformation in rat primary glial cells using hypoxia, mild hypothermia and growth factors. *Mol Med Rep* 23 (2): 1. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11760>
8. Sibarov DA, Bolshakov AE, Abushik PA, Krivoi II, Antonov SM (2012) Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J Pharmacol Exp Ther* 343 (3): 596–607. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.198341>
9. Samoilov M, Churilova A, Gluschenko T, Vetrovoy O, Dyuzhikova N, Rybnikova E (2016) Acetylation of histones in neocortex and hippocampus of rats exposed to different modes of hypobaric hypoxia: Implications for brain hypoxic injury and tolerance. *Acta Histochem* 118 (2): 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.11.008>
10. Daneshlatab N, Doré JJ, Smeda JS (2010) Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61(2): 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.12.002>
11. Weller MG (2016) Quality Issues of Research Antibodies. *Analytical chemistry insights* 11: 21–27. <https://doi.org/10.4137/ACI.S31614>
12. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V, Rimm D (2010) Antibody validation. *BioTechniques* 48 (3): 197–209. <https://doi.org/10.2144/000113382>
13. Gown AM (2016) Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent. *Archives of pathology & laboratory medicine* 140 (9): 893–898. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0119-RA>
14. Holmseth S, Zhou Y, Follin-Arbelet VV, Lehre KP, Bergles DE, Danbolt NC (2012) Specificity controls for immunocytochemistry: the antigen preadsorption test can lead to inaccurate assessment of antibody specificity. *J Histochem Cytochem* 60 (3): 174–187. <https://doi.org/10.1369/0022155411434828>
15. Nuovo G (2016) False-positive results in diagnostic immunohistochemistry are related to horseradish peroxidase conjugates in commercially available assays. *Ann Diagn Pathol* 25: 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2016.09.010>
16. Korzhevskii DE, Otellin VA, Grigorev IP, Petrova ES, Gilerovich EG, Zinkova NN (2008) Immunocytochemical detection of neuronal NO synthase in rat brain cells. *Neurosci Behav Physiol* 38 (8): 835–838. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-9063-9>
17. Ward JM, Rehg JE (2014) Rodent Immunohistochemistry: Pitfalls and Troubleshooting. *Veterinary Pathology* 51 (1): 88–101. <https://doi.org/10.1177/0300985813503571>
18. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224 (3): 855–862. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112>
19. Korzhevskii DE, Kirik OV, Sukhorukova EG (2015) Immunocytochemistry of Microglial Cells. In: Merighi A., Lossi L. (eds) *Immunocytochemistry and Related Techniques*. Neuromethods. Humana Press. New York. 101: 209–224. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2313-7_12
20. Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, Kohsaka S (2003) Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia* 44 (3): 242–250. <https://doi.org/10.1002/glia.10293>
21. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017) P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is

- sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65 (2): 375–387.
<https://doi.org/10.1002/glia.23097>
22. Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K, Kohsaka S (2013) Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61 (1): 47–54.
<https://doi.org/10.1002/glia.22358>
 23. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9 (12): 1512–1519.
<https://doi.org/10.1038/nn1805>
 24. Yu T, Zhang X, Shi H, Tian J, Sun L, Hu X, Cui W, Du D (2019) P2Y12 regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents. *Cell Death Dis* 10 (3): 165.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1425-4>
 25. Chen Z, Zhong D, Li G (2019) The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation* 16 (1): 76.
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1443-2>
 26. Cserép C, Pósfai B, Lénárt N, Fekete R, László ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnár G, Heindl S, Schwarcz AD, Ujvári K, Környei Z, Tóth K, Szabadits E, Sperlágh B, Baranyi M, Csiba L, Hortobágyi T, Maglóczky Z, Martinecz B, Szabó G, Erdélyi F, Szjópócs R, Tamkun MM, Gesierich B, Duerling M, Katona I, Liesz A, Tamás G, Dénes Á (2020) Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* 367 (6477): 528–537.
<https://doi.org/10.1126/science.aax6752>
 27. Tuan LH, Lee LJ (2019) Microglia-mediated synaptic pruning is impaired in sleep-deprived adolescent mice. *Neurobiol Dis* 130: 104517.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104517>
 28. Peng J, Liu Y, Umpierre AD, Xie M, Tian DS, Richardson JR, Wu LJ (2019) Microglial P2Y12 receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice. *Mol Brain* 12 (1): 71.
<https://doi.org/10.1186/s13041-019-0492-x>
 29. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP (2015) Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J Histochem* 59 (3): 233–237.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
 30. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B et al. (2015) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 44 (D1): D733–D745.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
 31. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
 32. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32 (5): 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340.29>
 33. Kumar S, Stecher G, Li M, Niyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35 (6): 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 34. Bishop DP, Cole N, Zhang T, Doble PA, Hare DJ (2018) A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging. *Chem Soc Rev* 47 (11): 3770–3787.
<https://doi.org/10.1039/c7cs00610a>
 35. Ladner RC (2007) Mapping the epitopes of antibodies. *Biotechnol. Genet Eng Rev* 24: 1–30.
<https://doi.org/10.1080/02648725.2007.10648092>
 36. Fritschy JM (2008) Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 28 (12): 2365–2370.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x>
 37. Ramírez AI, de Hoz R, Fernández-Albarral JA, Salobarra-García E, Rojas B, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ (2020) Time course of bilateral microglial activation in a mouse model of laser-induced glaucoma. *Sci Rep* 10 (1): 4890.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-61848-9>

A COMPARISON OF MICROGLIA DETECTION IN MAMMALS AND HUMANS USING PURINERGIC RECEPTOR P2Y12 LABELING

D. E. Korzhevskii^a, D. L. Tsyba^a, O. V. Kirik^a and , and O. S. Alekseeva^{a, b, #}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

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

[#]e-mail: osa72@inbox.ru

The problem of choosing an adequate method for detecting microglia is relevant for modern neurophysiological and interdisciplinary research due to the lack of universal approaches that allow visualization of this cell population in the brain of humans and laboratory animals. In the present study, the possibility of using the purinergic P2Y12 receptor as a marker for the comparative analysis of microglia in humans and some unallied animals (rabbit, rat, mouse, ground squirrel) was investigated. For the study, antibodies to a recombinant peptide correspond-

ing to 303–342 amino acids of the human P2Y₁₂ receptor were used. The best results for microglia detection were obtained in humans, rabbit, and rat. A nonspecific reaction of cells other than microglia was found in a ground squirrel and mouse, the negative impact of which on the quality of resulting images can be reduced by the means confocal microscopy. In all cases, the absence of immunopositive macrophages and amoeboid microglial cells was noted, indicating the promising use of P2Y₁₂ as a highly selective marker of resting microglia. The present study provides the first visualization of microglia in the brain of a rabbit and ground squirrel using antibodies against the P2Y₁₂ receptor.

Keywords: microglia, purinergic receptors, immunohistochemistry, confocal microscopy, humans, mammals

ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ НЕЙРОНОВ НАРУЖНОГО КОЛЕНЧАТОГО ТЕЛА КОШКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФРОНТАЛЬНЫХ И САГИТТАЛЬНЫХ СРЕЗОВ

© 2021 г. А. А. Михалкин^{1,*}, Н. С. Меркульева¹

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

*e-mail: mikhalkin@infran.ru

Поступила в редакцию 27.03.2021 г.

После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 18.05.2021 г.

Проведен сравнительный анализ возрастной динамики морфометрических показателей нейронов дорсального наружного коленчатого тела (НКТд) кошки (*Felis catus*) на срезах, изготовленных во фронтальной и сагиттальной плоскостях. Исследована возрастная динамика площади, округлости и ориентации сомы геникулятных нейронов, иммунопозитивных к нефосфорилированным доменам тяжелых нейрофиламентов (антитела SMI-32). Анализ проведен на животных в возрасте 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62 и 123 дней и на взрослых животных. Между пулами данных, полученными с использованием фронтальных и сагиттальных срезов, выявлены достоверные отличия: 1) площадь сомы на фронтальных срезах меньше, чем на сагиттальных срезах во всех возрастных группах, с возрастом разница в площади сомы увеличивается; 2) сома нейронов ориентирована под разными углами в двух плоскостях резки, с возрастом происходит достоверное изменение ориентации сомы на сагиттальных, но не фронтальных срезах. Было предположено, что различия в площади сомы являются следствием пространственной организации SMI-32(+) клеток в пределах НКТд, ввиду чего резка в сагиттальной плоскости, в отличие от фронтальной, проходила через длинную ось их сомы. В свою очередь, возрастные изменения в ориентации сомы могут отражать внутреннюю перестройку ретинопической организации НКТд с возрастом.

Ключевые слова: морфометрия, плоскость резки, наружное коленчатое тело, SMI-32, онтогенез

DOI: 10.31857/S0044452921050053

Анализ морфологических параметров нервных клеток — одна из основ изучения нервной системы [1]. На основании этих параметров строят не только фундаментальные умозаключения [2, 3], но и выводы о действии фармакологических препаратов [4, 5], последствий экспериментальных манипуляций [6, 7], течения заболеваний [8–10], эти результаты также закладывают в основу математических моделей [11]. На практике широко используют такие клеточные параметры, как размер [3–6, 8], вытянутость и ориентацию [12] клеточной сомы, организацию отростков нейрона [2, 13], количество и плотность залегания нейронов [3, 8, 10, 14], кластеризация [15–17] клеток в исследуемой структуре.

Современные экспериментальные методики дают возможность анализа интересующих клеточных параметров на основе трехмерных реконструкций исследуемых популяций [13, 18, 19]. Однако изготовление и анализ двумерных препаратов не теряют своей актуальности ввиду скорости, доступности и относительной простоты анализа большого

количества клеток, что особенно важно, например, в клинических исследованиях [14]. Очевидно, что в силу разнообразных причин: особенностей анатомии и морфологии живого объекта, особенностей гистологического метода, используемого при его изучении, допустимы определенные вариации в морфометрических величинах на двумерных гистологических препаратах. Для сокращения вариабельности исследуемых показателей критически важны верный выбор плоскости резки и позиционирование гистологического образца перед изготовлением гистологических срезов, особенно для структур, имеющих сложную форму [14]. В качестве примера можно представить клеточные популяции серого вещества спинного мозга, где, ввиду пространственной ориентации клеточной сомы и дендритов, достоверное определение различных типов нейронов возможно только при комбинировании разных плоскостей резки [20, 21].

При изучении постнатального развития популяций нейронов дорсального таламуса — а именно площади сомы клеток дорсального наружного ко-

ленчатого тела (НКТд), иммунопозитивных к нефосфорилированным доменам тяжелых нейрофиламентов — были получены неожиданные различия в данных при анализе срезов, изготовленных в сагиттальной и фронтальной плоскостях. В соответствии с этим целью работы был сравнительный анализ возрастной динамики морфометрических показателей нейронов дорсального наружного колленчатого тела (НКТд) на срезах, изготовленных во фронтальной и сагиттальной плоскостях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) и с одобрения Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение № 28/04 от 28.04.2021 г). В работе использована 31 кошка обоего пола: в возрасте 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62 и 123 дней (в каждой группе $n = 2-4$) и взрослые животные ($n = 3$). Протокол перфузии, взятия материала и иммуногистохимической реакции подробно рассмотрены в работе [21]. С помощью антител SMI-32 [22] выявляли нефосфорилированные домены тяжелых цепей нейрофиламентов непрямым иммуногистохимическим методом на свободно плавающих срезах толщиной 50 мкм. Оцифровку срезов проводили с помощью светлопольного микроскопа Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония) и камеры Nikon D3400 (Nikon corporation, Япония).

Морфометрический анализ нейронов, иммунопозитивных к SMI-32 (SMI-32(+)), проводили в программе CAS (“Cell annotation software”) по ранее описанной методике [23]. Для выделения SMI-32(+) клеток на изображении применяли “Statistical dominance algorithm” [24] с последующей коррекцией неточностей автоматического выделения оператором. В анализ морфометрических параметров взяты только клетки с отсутствием иммуногистохимической реакции в центральной части сомы (что соответствовало положению неокрашенного клеточного ядра) с целью исключения из анализа малых фрагментов SMI-32(+) клеток [25]. Для замера параметров сомы нейрона выделенные отростки SMI-32(+) клеток отсекали, используя последовательные процедуры удаления и добавления одинакового числа пикселей по периметру выделенных объектов, количество пикселей было выбрано эмпирически и применено для всей экспериментальной выборки.

Исследовали следующие морфометрические параметры:

1) площадь поперечного сечения сомы SMI-32(+) клеток (мкм²);

2) округлость клеточной сомы с использованием параметра “близость формы сомы к кругу”, вычисленному по формуле: $4 \frac{[\text{Площадь сомы}]}{\pi * [\text{Длинная ось сомы}]^2}$. Итоговые значения варьируют от 0 до 1, где 0, 1 — крайне вытянутый овал, 1 — круг.

3) ориентация длинной оси сомы (для определения этого параметра брали длинную ось наиболее подходящего к выделенной области эллипса). Угол длинной оси сомы вычисляли относительно границы между слоями А и А1, где 0° — сома ориентирована перпендикулярно межслойной границе, отрицательные значения — ростральный (на сагиттальных срезах) или медиальный (на фронтальных срезах) наклон сомы, положительные значения — каудальный (на сагиттальных срезах) и латеральный (на фронтальных срезах) наклон сомы.

НКТд имеет сложную форму; в первом приближении напоминает эллипсоид, ростральный и каудальный полюса которого утончены и отогнуты в противоположных направлениях. Как итог, на фронтальных срезах форма ядра варьирует от шарообразной — на ростральном и каудальном полюсах, до клиновидной — в центральной части. Соответственно, на сагиттальных срезах ядро имеет S-образную форму (рис. 1а). Иммунопозитивную реакцию оценивали в двух наиболее широких слоях НКТд — А и А1. Для анализа взяты SMI-32(+) клетки центральных участков слоев НКТд в обеих плоскостях резки (окрашены серым на рис. 1а), где возможно проведение прямой линии по межслойной границе слоев А и А1, относительно которой оценивали ориентацию клеточной сомы.

Всего было проанализировано 26711 и 22495 SMI-32(+) клеток на фронтальных и сагиттальных срезах соответственно, в отдельных группах сравнения рассмотрено от 1113 до 4915 SMI-32(+) клеток в зависимости от возраста и плоскости резки. Для сравнения выборок использованы Nested ANOVA и post-hoc Tukey-тест (для множественных сравнений) и Nested t-test (для парных сравнений), разработанные специально для малых выборок [26], где N — количество животных определенной группы, n — количество срезов у животного. Для большинства животных было проанализировано по 3 среза в каждой плоскости, от некоторых животных использовали только фронтальные или только сагиттальные срезы. Данные по динамике площади и ориентации сомы SMI-32(+) нейронов на сагиттальных срезах были опубликованы ранее [27]. Числовые данные на рисунках представлены в виде среднее \pm ст. откл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Площадь сомы SMI-32(+) клеток

Первое, что обращает на себя внимание при сравнении двух плоскостей резки, — большая пло-

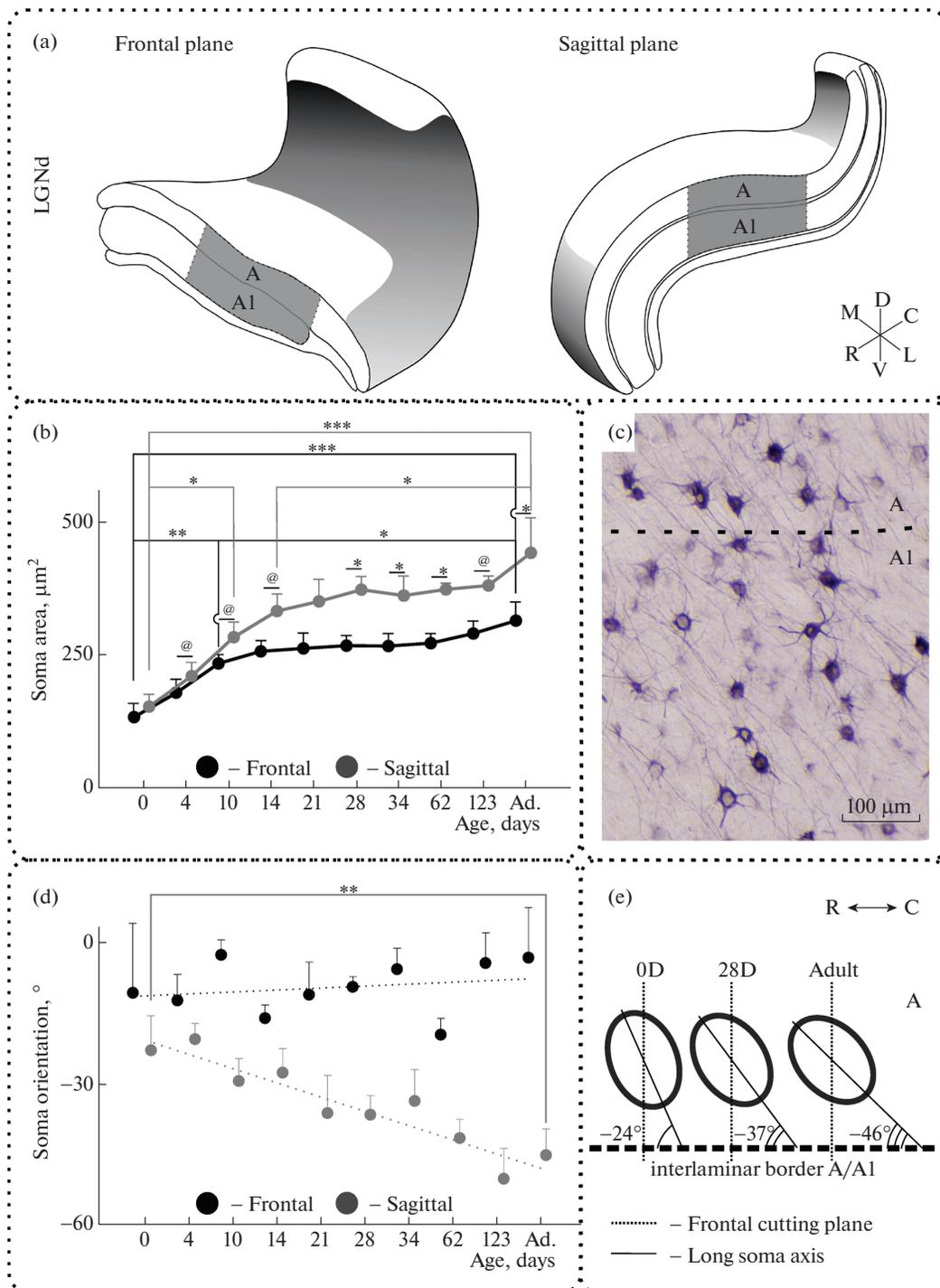


Рис. 1. Морфометрические параметры дорсального наружного коленчатого тела (НКТд). (a) – фронтальный (слева, Frontal plane) и сагиттальный (справа, Sagittal plane) разрезы НКТд (LGNd). A/A1 – анализируемые слои, серым выделена зона анализа ориентации сомы на срезах. (b) – возрастная динамика площади сомы SMI-32 иммунопозитивных (SMI-32(+)) клеток: показаны достоверные различия новорожденных (0) и взрослых (Ad.) от ближайших групп и от максимального значения, а также различия между значениями для фронтальных и сагиттальных срезов внутри возрастных групп. (c) – внешний вид SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на сагиттальном срезе. (d) – угол наклона сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных и сагиттальных срезах: пунктиром указана линия тренда, показаны достоверные различия крайних возрастных групп (0 и Ad.). (e) – схема поворота сомы SMI-32(+) клеток в сагиттальной плоскости относительно межслойной границы A/A1 (interlaminar border A/A1). Frontal cutting plane – фронтальная плоскость резки; long soma axis – длинная ось сомы. *Общие обозначения:* 0-123, Ad. – возраст экспериментальных групп; Frontal – фронтальные срезы; Sagittal – сагиттальные срезы; R – роstralное; C – каудальное; M – медиальное; L – латеральное; D – дорсальное; V – ventральное направления; на графиках указаны ср. знач. \pm ст. откл.; @ – $p < 0.1$, * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$. Парные сравнения – post-hoc Tukey тест или Nested t -тест.

Таблица 1. Отличие (ОТЛ) между площадью сомы SMI-32 иммунопозитивных нейронов (абсолютное отличие – ОТЛа, и процентное отличие – ОТЛп) между сагиттальной и фронтальной плоскостями резки у животных разных возрастов (0–123 дня и взрослые животные – Взр.). * $p < 0.05$

Возраст	ОТЛа, мкм ²	ОТЛп, %	Nested <i>t</i> -тест
0Д	19.49	15.1	$p = 0.22$
4Д	30.9	17.7	$p = 0.05$
10Д	50.38	22.1	$p = 0.09$
14Д	75.43	30	$p = 0.07$
21Д	87.63	34.1	$p = 0.15$
28Д	103.47*	39.5	$p = 0.05$
34Д	95.13*	36.5	$p = 0.02$
62Д	100.12*	37.3	$p = 0.01$
123Д	91.07	32.1	$p = 0.06$
Взр.	127.06*	41	$p = 0.04$

щадь сомы нейронов на сагиттальных срезах, чем на фронтальных независимо от возраста животных (рис. 1b). При этом с возрастом разница между площадью сомы в различных плоскостях резки увеличивается: от 19 мкм² (15%) – у новорожденных животных, до 127 мкм² (41%) – у взрослых животных (табл. 1).

Анализ возрастной динамики в пределах плоскости резки показывает значительный рост площади сомы с возрастом (Фр.: $F_{(9,17)} = 18.75$, $p < 0.001$; Саг.: $F_{(9,15)} = 19.18$, $p < 0.001$). Значительный рывок в росте площади сомы: как на фронтальных, так и на сагиттальных срезах происходит к 10-му дню (Фр.: 0Д vs 10Д, $p < 0.01$; Саг.: 0Д vs 10Д, $p < 0.05$). После этого возраста рост сомы замедляется; разница в размере сомы теряет статистическую значимость на фронтальных срезах – к 14 дням (Фр.: 14Д vs Взр., $p > 0.05$), а на сагиттальных – неделей позже, к 21 дню (Саг.: 21Д vs Взр., $p > 0.05$) (рис. 1b).

Округлость сомы SMI-32(+) клеток

В ходе анализа других морфометрических характеристик изучаемой популяции клеток было отмечено, что их сома имеет в среднем не круглую, но овальную форму (рис. 1c) со средним значением округлости, равным 0.69 ± 0.04 , идентичным для фронтальных и сагиттальных срезов (данный показатель использован для обозначения сомы на рис. 1e).

Попарные сравнения значений округлости на фронтальных и сагиттальных срезах внутри возрастных групп показали достоверные отличия лишь в группе новорожденных животных (0Д: Фр. vs Саг.; $F_{(1,6)} = 94.58$; $p < 0.001$), когда на фронталь-

ных срезах клетки несколько более округлые (0.72 ± 0.02), чем на сагиттальных (0.66 ± 0.03).

Ориентация сомы SMI-32(+) клеток

Исходя из овальной формы сомы нейронов НКТд и наблюдаемых различий в площади сомы, представилось необходимым определить ориентацию исследуемой популяции клеток в пространстве. В качестве референтной плоскости выбрана граница между слоями А и А1. Показано, что на фронтальных срезах сома SMI-32(+) клеток ориентирована в целом перпендикулярно межслойной границе с небольшим медиальным уклоном (до -20° в группе 62Д), не демонстрируя какого-либо возрастного тренда ($F_{(9,18)} = 1.170$; $p > 0.05$) (рис. 1d, черные кружки). В то же время сома SMI-32(+) клеток на сагиттальных срезах ориентирована с роstralным уклоном, который значительно усиливается с возрастом ($F_{(9,15)} = 6.653$; $p < 0.001$) (рис. 1d, серые кружки): от -24° у новорожденных до -46° у взрослых животных (0Д vs Взр., $p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате было определено, что: 1) сома SMI-32(+) клеток имеет вытянутую форму; 2) по мере постнатального развития происходит разворот длинной оси сомы по отношению к межслойной границе на сагиттальных, но не фронтальных срезах; 3) площадь сомы на сагиттальных срезах больше, чем на фронтальных, и с возрастом это различие увеличивается.

Возможна следующая интерпретация наблюдаемых зависимостей (рис. 1e). Фронтальная плоскость резки в целом проходит перпендикулярно межслойной границе слоев А и А1, в то же время сома SMI-32(+) клеток имеет некоторый роstralный уклон относительно этой границы. Для регистрации максимальной площади сомы необходимо произвести резку по длинной оси клетки. По всей видимости, это условие выполнено в большей степени при резке в сагиттальной плоскости, нежели во фронтальной. В результате получается, что регистрируемая площадь сомы на фронтальных срезах меньше таковой на сагиттальных. Происходящий с возрастом роstralный поворот сомы усиливает наблюдаемую разницу в ее площади на фронтальных и сагиттальных срезах. Кроме того, наблюдаемый поворот может объяснить недельную разницу в окончании роста сомы SMI-32(+) клеток (в две недели – на фронтальных срезах и три недели – на сагиттальных срезах): на фоне перманентного роста сомы нейронов НКТд происходит ее поворот в сагиттальной плоскости, что уменьшает захватываемую в процессе резки площадь сечения клеточной сомы на фронтальных срезах; таким образом оба параметра компенсируют друг друга на фронтальных, но не сагиттальных срезах. Поскольку первый

месяц жизни крайне важен для развития зрительного анализатора кошки [28], недельная разница в определении временных границ роста сомы представляется существенной.

Ориентация сомы SMI-32(+) нейронов, выявленная в данной работе, близка к направлению изолиний ретинопической карты зрительного пространства, представленной в НКТд [29–31]. В свою очередь другие наблюдения показывают, что вытянутость сомы нейронов НКТд зачастую совпадает с общей ориентацией их дендритного дерева [32, 33]. Несмотря на то что антитела SMI-32 выявляют сому и лишь проксимальные отростки крупных клеток НКТд [34, 35], можно предположить, что дендритное дерево описанных в данной работе SMI-32(+) клеток, как и их сома, в целом вытянуто параллельно изолиниям ретинопического представительства вне зависимости от возраста. Изменение угла наклона сомы в сагиттальной плоскости говорит о ранее неизвестных изменениях внутренней структуры НКТд кошки (в частности, смещении изолиний ретинопического представительства), происходящих наряду с общим увеличением его объема [36, 37]. Также постнатальный рост клеток НКТд сопровождается увеличением диаметра и реорганизацией их дендритного дерева [38–40], морфометрические показатели дендритного дерева, в связи с вышеизложенными предположениями, вероятно, так же, как и размер сомы, могут отличаться в зависимости от анализируемой плоскости резки.

Таким образом, наблюдаемая в работе разница в размере сомы SMI-32(+) клеток на фронтальных и сагиттальных срезах определяется роstralным уклоном их сомы по отношению к межслойной границе слоев А и А1. С возрастом роstralный уклон сомы становится более выраженным, увеличивая регистрируемую разницу в размере сомы на фронтальных и сагиттальных срезах и, возможно, отражая смещение структур, отвечающих за общую архитектуру НКТд.

Данные результаты указывают на важность учета особенностей залегания анализируемых клеток в исследуемой структуре при анализе временного паттерна развития их морфометрических характеристик.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0006 (теоретическая часть) и гранта РНФ № 21-15-00235 (экспериментальная часть).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

Сбор и обработка материала: А.А. Михалкин.

Статистическая обработка данных: А.А. Михалкин.

Анализ и интерпретация данных: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

Написание текста: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Никитиной Н.И. за помощь в микроскопическом анализе данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oberlaender M (2019) Neuronal Morphology and Its Significance. In: Singer W., Sejnowski T.J., Rakic P (eds) *The Neocortex*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 124–138.
2. Hendry SHC, Jones EG (1983) The organization of pyramidal and non-pyramidal cell dendrites in relation to thalamic afferent terminations in the monkey somatic sensory cortex. *J Neurocytol* 12: 277–298. <https://doi.org/10.1007/BF01148465>
3. Herculano-Houzel S, Manger PR, Kaas JH (2014) Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Front Neuroanat* 8: 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00077>
4. Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon CH, Zhang W, Sinton C, Powell CM, Parada LF (2009) Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific PTEN knock-out mice. *J Neurosci* 29: 1773–1783. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009>
5. Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11202–11207. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11202>
6. Loopuijt LD, Villablanca JR, Sharifi P (2001) Soma size of substantia nigra neurons increases after a prenatal neocortical lesion in cats. *Dev Brain Res* 130: 143–147. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(01\)00223-1](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00223-1)
7. Duffy KR, Slusar JE (2009) Monocular deprivation provokes alteration of the neuronal cytoskeleton in developing cat lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci* 26: 319–28. <https://doi.org/10.1017/S0952523809090130>
8. Flood DG, Coleman PD (1988) Neuron numbers and sizes in aging brain: Comparisons of human, monkey, and rodent data. *Neurobiol Aging* 9: 453–463. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(88\)80098-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(88)80098-8)
9. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118: 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
10. Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HBM, Friedman L, Raj-

- kowska G* (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56: 640–650.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.022>
11. *Rajković K, Marić DL, Milošević NT, Jeremic S, Arsenijević VA, Rajković N* (2016) Mathematical modeling of the neuron morphology using two dimensional images. *J Theor Biol* 390: 80–85.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.019>
 12. *FitzGibbon T* (2006) Does the development of the perigeniculate nucleus support the notion of a hierarchical progression within the visual pathway? *Neuroscience* 140: 529–546.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.038>
 13. *Acciai L, Soda P, Iannello G* (2016) Automated Neuron Tracing Methods: An Updated Account. *Neuroinformatics* 14: 353–367.
<https://doi.org/10.1007/s12021-016-9310-0>
 14. *Garman RH, Li AA, Kaufmann W, Auer RN, Bolon B* (2016) Recommended Methods for Brain Processing and Quantitative Analysis in Rodent Developmental Neurotoxicity Studies. *Toxicol Pathol* 44: 14–42.
<https://doi.org/10.1177/0192623315596858>
 15. *Burnat K, Van Der Gucht E, Waleszczyk WJ, Kossut M, Arckens L* (2012) Lack of early pattern stimulation prevents normal development of the alpha (Y) retinal ganglion cell population in the cat. *J Comp Neurol* 520: 2414–2429.
<https://doi.org/10.1002/cne.23045>
 16. *Merkulyeva NS, Mikhalkin AAA, Veshchitskii AAA, Merkul'eva NS, Mikhalkin AAA, Veshchitskii AAA* (2016) Characteristics of the Distribution of Acetylcholinesterase in the Posterolateral Nucleus of the Thalamus in Cats. *Neurosci Behav Physiol* 46: 507–509.
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0267-0>
 17. *Mooser F, Bosking WH, Fitzpatrick D* (2004) A morphological basis for orientation tuning in primary visual cortex. *Nat Neurosci* 7: 872–879.
<https://doi.org/10.1038/nn1287>
 18. *Yan C, Li A, Zhang B, Ding W, Luo Q, Gong H* (2013) Automated and Accurate Detection of Soma Location and Surface Morphology in Large-Scale 3D Neuron Images. *PLoS One* 8: 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062579>
 19. *Radojević M, Meijering E* (2019) Automated Neuron Reconstruction from 3D Fluorescence Microscopy Images Using Sequential Monte Carlo Estimation. *Neuroinformatics* 17: 423–442.
<https://doi.org/10.1007/s12021-018-9407-8>
 20. *Lima D, Coimbra A* (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 244: 53–71.
<https://doi.org/10.1002/cne.902440105>
 21. *Merkulyeva N, Veshchitskii A, Makarov F, Gerasimenko Y, Musienko P* (2016) Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord. *Front Neuroanat* 9: 166.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00166>
 22. *Sternberger LA, Sternberger NH* (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 6126–6130.
<https://doi.org/10.1073/pnas.80.19.6126>
 23. *Nurzynska K, Mikhalkin A, Piorkowski A* (2017) CAS: Cell Annotation Software – Research on Neuronal Tissue Has Never Been so Transparent. *Neuroinformatics* 15: 365–382.
<https://doi.org/10.1007/s12021-017-9340-2>
 24. *Piorkowski A, Piorkowski A* (2016) A statistical dominance algorithm for edge detection and segmentation of medical images. *Adv Intell Syst Comput* 471: 3–14.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-39796-2_1
 25. *Kutcher MR, Duffy KR* (2007) Cytoskeleton alteration correlates with gross structural plasticity in the cat lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci* 24: 775–785.
<https://doi.org/10.1017/S095252380707068X>
 26. *Quené H, Van Den Bergh H* (2004) On multi-level modeling of data from repeated measures designs: A tutorial. *Speech Commun* 43: 103–121.
<https://doi.org/10.1016/j.specom.2004.02.004>
 27. *Mikhalkin A, Nikitina N, Merkul'yeva N* (2020) Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 1–12.
<https://doi.org/10.1002/cne.25028>
 28. *Feller MB, Scanziani M* (2005) A precritical period for plasticity in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 15: 94–100.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.012>
 29. *Eysel UT, Wolfhard U* (1983) Morphological fine tuning of retinotopy within the cat lateral geniculate nucleus. *Neurosci Lett* 39: 15–20.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90158-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90158-1)
 30. *Bishop PO, Kozak W, Levick WR, Vakkur GJ* (1962) The determination of the projection of the visual field on to the lateral geniculate nucleus in the cat. *J Physiol* 163: 503–539.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006991>
 31. *Sanderson KJ* (1971) The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 143: 101–117.
<https://doi.org/10.1002/cne.901430107>
 32. *Stanford LR, Friedlander MJ, Sherman SM* (1983) Morphological and physiological properties of geniculate W-cells of the cat: a comparison with X- and Y-cells. *J Neurophysiol* 50: 582–608.
<https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.3.582>
 33. *Friedlander MJ, Lin CS, Stanford LR, Sherman SM* (1981) Morphology of functionally identified neurons in lateral geniculate nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 46: 80–129.
<https://doi.org/10.1152/jn.1981.46.1.80>
 34. *Bickford ME, Guido W, Godwin DW* (1998) Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nucleus: Normal expression and alteration with visual deprivation. *J Neurosci* 18: 6549–6557.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06549.1998>
 35. *Duffy KR, Crowder NA, LeDue EE* (2012) Investigation of cytoskeleton proteins in neurons of the cat lateral geniculate nucleus.

- late nucleus. *J Comp Neurol* 520: 186–199.
<https://doi.org/10.1002/cne.22727>
36. *Kalil R* (1978) Development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 182: 265–291.
<https://doi.org/10.1002/cne.901820206>
37. *Elgeti H, Elgeti R, Fleischhauer K* (1976) Postnatal growth of the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Anat Embryol (Berl)* 149: 1–13.
<https://doi.org/10.1007/BF00315081>
38. *Coleman LA, Friedlander MJ* (2002) Postnatal dendritic development of Y-like geniculocortical relay neurons. *Int J Dev Neurosci* 20: 137–159.
[https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(02\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(02)00018-7)
39. *Coleman LA, Friedlander MJ* (1992) Intracellular injections of permanent tracers in the fixed slice: a comparison of HRP and biocytin. *J Neurosci Methods* 44: 167–177
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(92\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(92)90009-3)
40. *Friedlander MJ* (1982) Structure of physiologically classified neurones in the kitten dorsal lateral geniculate nucleus. *Nature* 300: 180–183.
<https://doi.org/10.1038/300180a0>

FEATURES OF THE AGE-RELATED DYNAMICS OF CAT LATERAL GENICULATE NUCLEUS NEURONS AS REVEALED IN FRONTAL VERSUS SAGITTAL SLICES

A. A. Mikhalkin^{a, #} and N. S. Merkulyeva^a

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

[#] *e-mail: mikhalkin@infran.ru*

We carried out a comparative morphometric analysis of neurons in the cat dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) in frontal vs. sagittal slices. Using the SMI-32 antibody to non-phosphorylated domains of heavy-chain neurofilaments, the postnatal dynamic of soma parameters (area, roundness, orientation) of dLGN neurons was studied. Measurements were performed in kittens aged 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62, 123 days, and in adult cats. A comparison of data obtained in frontal vs. sagittal slices revealed the following significant differences: 1) the soma area of the immunopositive neurons was smaller in frontal vs. sagittal slices in all age groups, and this difference increased with age; 2) the soma orientation was also different in two cutting planes, and a significant age-related change in the soma orientation occurred only in the sagittal, but not frontal, plane. We assume that the difference in the soma area is due to the spatial arrangement of SMI-32-immunopositive neurons in the dLGN, because of which, in the sagittal plane, in contrast to the frontal, neuronal somas were cut parallel to their long axis. In turn, age-related changes in the soma orientation may reflect an internal rearrangement of the dLGN retinotopic organization with age.

Keywords: morphometry, cutting plane, lateral geniculate nucleus, SMI-32, ontogenesis

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ АЗИДА, ФТОРИДА, ОРТОВАНАДАТА И ЭДТА НАТРИЯ НА ЭКТО-АТФАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ СКОРПЕНЫ (*SCORPAENA PORCUS* L.) И МОРСКОЙ ЛИСИЦЫ (*RAJA CLAVATA* L.)

© 2021 г. Ю. А. Силкин^{1,*}, Е. Н. Силкина¹, М. Ю. Силкин¹

¹ Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН”, Феодосия, Россия

*e-mail: ysilkin@mail.ru

Поступила в редакцию 15.04.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 29.05.2021 г.

Исследовали влияние солей азидата, фторида, ортованадата и ЭДТА натрия на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.). Показано, что в ответ на воздействие миллимолярных (мМ) концентраций выбранных биохимических агентов выявлены значительные различия гидролитической активности экто-АТФаз плазматической мембраны эритроцитов хрящевых и костистых рыб. Так, экто-АТФаза эритроцитов морской лисицы была практически нечувствительна к действию азидата натрия. Напротив, экто-АТФаза эритроцитов скорпены была чувствительна к действию азидата натрия, который при 20 мМ концентрации на 65% блокировал активность фермента. Фермент эритроцитов ската сохранял значительную активность (37%) при высоких (60 мМ) концентрациях фторида натрия, а экто-АТФаза эритроцитов скорпены при этой концентрации блокировалась почти полностью. ЭДТА выступал как модификатор активности экто-АТФазы морской лисицы: при концентрации его до 6 мМ активно блокировался гидролиз АТФ (на 58%), а при более высоких концентрациях происходила стимуляция (до 20%) активности экто-АТФазы. Увеличение концентрации ЭДТА (до 12 мМ) в суспензиях эритроцитов скорпены постоянно стимулировало ингибиторный эффект комплексона (до 52% от контроля). Ортованадат слабо блокировал активность экто-АТФаз эритроцитов исследованных рыб. Указанные различия отражают большую толерантность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы, к действию взятых в опыты химических реагентов по сравнению со скорпеной. Отсутствие ингибирующего эффекта азидата натрия на экто-АТФазу эритроцитов морской лисицы позволяет предположительно отнести эту экто-НТФДазу к семейству экто-НТФДаз 2-го типа, тогда как экто-НТФДазу эритроцитов скорпены к экто-НТФДазам 1-го типа,

Ключевые слова: рыбы, эритроциты, экто-АТФазы, натриевые соли азидата, фторида, ортованадата, ЭДТА

DOI: 10.31857/S0044452921050077

Хорошо известно, что эритроциты позвоночных выделяют АТФ во внеклеточное пространство либо в виде патологического или физиологического ответа на деформацию и стресс [1]. Установлено, что АТФ и другие макроэргические фосфаты пурин-пиримидиновой природы, взаимодействуя с P2X и P2Y рецепторами, являются важными регуляторами межклеточных коммуникаций. Выделенная, внеклеточная АТФ и другие макроэргические фосфаты разрушаются в крови рыб за счет активности экто-нуклеотидазы эритроцитов и других экто-ферментов клеток кровеносной системы. Поэтому экто-нуклеотидазы являются основными регуляторами уровня выделенных эритроцитами в плазму крови межклеточных медиаторов и обеспечивают «выключение» сигнала, вызванного взаи-

модействием сигнальной молекулы и рецептора [2]. Наши ранние исследования свойств экто-нуклеотидазы эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и ската – морской лисицы (*Raja clavata* L.) показали, что фермент имел высокую ферментативную активность (6.4 и 3.0 ммоль Φ_n /мин/мл эритроцитов соответственно). Экто-АТФаза была наделена широкой субстратной специфичностью, имела широкий диапазон pH оптимума, требовала для проявления своей максимальной активности присутствия двухвалентных катионов Ca^{2+} или Mg^{2+} [3, 4]. Все найденные ранее свойства указывали на то, что экто-нуклеотидаза эритроцитов рыб относится к ферментам семейства E-типа, которые часто в литературе называют экто-АТФазами, экто-апиразами, нуклеозидтрифосфат-дифосфо-гидролаза-

ми (НТФДазы). Ингибиторный анализ является важным инструментом исследования свойств ферментов. В отношении экто-нуклеотидаз это особенно актуально, так как поиск специфических ингибиторов позволит упорядочить классификацию энзимов, выявить особенности их строения. В прикладном аспекте, как показали недавние исследования, это может иметь выходы на полезные терапевтические эффекты. Так, НТФДазы эритроцитов и других форменных элементов отвечают за уровень нуклеозиддифосфатов в плазме крови и тем самым регулируют тромбoreгуляторную функцию крови и функцию сосудистого тонуса. Изменение внеклеточных нуклеотидов и аденозина может увеличивать или уменьшать активность P1 и P2 рецепторов и тем самым открывает перспективу использования различных веществ в качестве иммунномоделирующих, противораковых агентов, а также лечения расстройств сердечно-сосудистой и нервной системы. Многие патогенные организмы содержат экто-АТФазы, которые за счет влияния на внеклеточную концентрацию АТФ способны нарушать иммунные ответы хозяина. Поэтому экто-АТФазы патогенных организмов являются привлекательными мишенями для воздействия на них лекарственных средств [5]. Е-АТФазы по способности подвергаться воздействию миллимолярных концентраций азидата натрия (NaN_3) были разделены на два подсемейства: чувствительные и нечувствительные к действию ингибитора [6]. Азид является хорошо известным ингибитором митохондриальной АТФазы и цитохром с оксидазы [7]. В связи с этим важно было понять наличие влияния NaN_3 на активность экто-нуклеотидаз эритроцитов рыб и действие выбранных реагентов на другие энергетические пути в клетке. В этих исследованиях мы попытались оценить влияние на активность экто-АТФазы эритроцитов рыб фторида (NaF) и ортованадата (Na_3VO_4) натрия, которые, как известно, являются ингибиторами гликолиза. Важной характеристикой фермента является изучение воздействия на его активность ЭДТА динатриевой соли, которая осуществляет связывание двухвалентных катионов, необходимых для процесса ферментативного гидролиза АТФ. Таким образом, в задачи настоящего исследования входило изучение влияния на активность экто-АТФаз эритроцитов рыб азидата, фторида, ортованадата и ЭДТА натрия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали два вида рыб – скат, морская лисица (*Raja clavata* L.) и скорпена (*Scorpaena porcus* L.). Рыб отлавливали в прибрежной акватории Карадагской бухты (Юго-восточный Крым), используя для поимки скатов донные снасти с крючками, а для скорпены – донные сети. Отловленных рыб помещали в бассейны с морской

водой с искусственной аэрацией. Скаты содержались в бассейне объемом 25000 л, а скорпена – в бассейнах 1000 л. Забор крови проводили после недельной акклимации рыб в бассейнах. У ската кровь отбирали пункцией сердца, а у скорпены – пункцией хвостовой вены. Условия содержания рыб и все процедуры по отбору образцов соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, международным, национальным и/или институциональным принципам. Отобранную кровь сразу помещали в охлажденный физиологический раствор в соотношении 1:20. Состав физиологического раствора для ската (мМ): 220 NaCl + 400 мочевины + 10 Трис HCl + 5 Ед/мл гепарин (pH = 7.3–7.4); для скорпены (мМ): 180 NaCl + 10 Трис HCl + 5 Ед/мл гепарин (pH = 7.3–7.4). Эритроциты от надосадочной жидкости отделяли путем центрифугирования на центрифуге К-23 (Германия) в течение 10 мин при относительном центробежном ускорении ротора (RCF – relative centrifugal field) 377–671 g и температуре +4°C. Надосадочную жидкость отсасывали, а полученные клетки разводили до гематокрита (Ht) = 0.05–0.07, полученную суспензию клеток использовали в экспериментах.

Для изучения воздействия биохимических агентов инкубацию подготовленных суспензий эритроцитов скорпены и ската проводили в средах с конечной концентрацией (мМ): азидата натрия (NaN_3) – 2.5, 5, 10, 15, 20; фторида натрия (NaF) – 10, 20, 30, 40, 50, 60; ЭДТА – 2, 4, 6, 8, 10; ортованадата натрия (Na_3VO_4) – 1, 2, 3, 4, 5.

Для определения активности экто-АТФазы в цельных эритроцитах использовали методику А. Казеннова и соавт. [8]. Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы эритроцитов скорпены содержала в конечной концентрации (мМ) следующие ингредиенты: 125 NaCl + 5 KCl + 6 MgCl₂ + 50 Трис-HCl, pH 7,4; для эритроцитов ската: 400 мочевины + 135 NaCl + 5 KCl + 6 MgCl₂ + 50 Трис-HCl, pH 7, 4. В инкубационных пробирках смешивали 0.1 мл инкубационной среды, 0.1 мл H₂O (контроль) или 0.1 мл раствора ингибитора, 0.1 мл раствора АТФ-Na₂ до концентрации 0.5 мМ. Реакцию запускали добавлением 0.1 мл суспензии эритроцитов. Температура инкубации в стандартных условиях и при определении кинетических констант составляла +20°C. Реакцию останавливали добавлением 0.2 мл 20%-ной ТХУ. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при RCF = 1958 g. В надосадочной жидкости по модифицированному А. Казенновым и М. Масловой [9] методу Чена и соавт. [10] определяли содержание неорганического фосфата, по накоплению которого судили об активности фермента. Активность экто-АТФазы выражали в нмоль Φ_{H} /мин/мкл упакованных клеток. При сравнении эффективности ингибиторного воздействия для

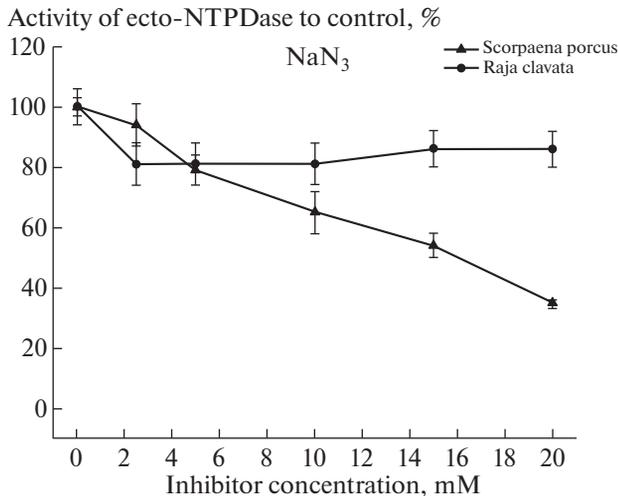


Рис. 1. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций азиды натрия (NaN_3).

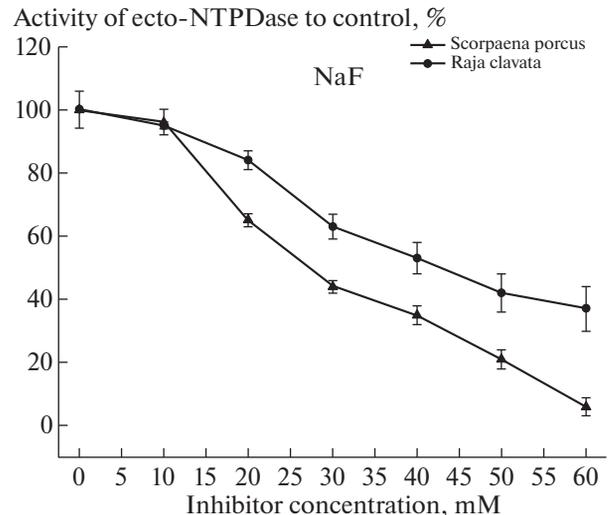


Рис. 2. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций фторида натрия (NaF).

каждого действующего вещества рассчитывали концентрацию 50% ингибирования активности экто-АТФазы эритроцитов рыб (I_{50}). Для удобства сравнительного анализа воздействия выбранных солей на экто-АТФазную активность эритроцитов рыб все графики выполнены с использованием процентного изменения активности фермента относительно активности физиологического оптимума энзима (контроль).

Во всех экспериментах использовали стандартные методы статистической обработки результатов. Все результаты представлены в виде $x \pm S_x$. Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1 и на рис. 1–4. Как видно в табл. 1 и на рис. 1 азид натрия (NaN_3) по-разному воздействовал на активность экто-АТФазы эритроцитов у скорпены и морской лисицы. У скорпены при нарастании концентрации ингибитора активность фермента падала примерно пропорционально величине действующей концентрации. На графике это падение имело вид практически прямой линии с максимумом снижения активности на 65% от исходной, при действующей концентрации азиды в 20 мМ (рис. 1). Концентрация ингибитора (NaN_3), при которой активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены составляла половину от ее контрольного уровня (I_{50}), оказалась равной 15 мМ (табл. 1).

У морской лисицы ингибирующий эффект азиды (на 19%) отмечен только на фоне добавления начальной концентрации (2.5 мМ) агента. Дальней-

шее увеличение концентрации NaN_3 не приводило к изменению активности экто-АТФазы эритроцитов ската (рис. 1), что свидетельствовало об отсутствии чувствительности фермента к этому реагенту.

Ингибирующий эффект фторида натрия (NaF) на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены имел нелинейный характер (рис. 2). Незначительное снижение (на 4%) активности фермента при 10 мМ концентрации фторида сменялось его стремительным падением при увеличении его концентрации. Наиболее значительное снижение уровня активности фермента наблюдалось при концентрации фторида в 20 и 30 мМ (65% и 44% от исходного уровня соответственно). Дальнейшее увеличение концентрации реагента приводило к замедлению падения активности фермента. При 40 мМ концентрации NaF уровень активности фермента составлял 35% от контрольного уровня, а при 50 мМ концентрации активность экто-АТФазы не превышала 21%. При 60 мМ концентрации фторида натрия активность энзима составляла всего 6% от исходного уровня, что свидетельствовало о высокой эффективности ингибирующего воздействия NaF (рис. 2).

Влияние NaF на активность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы имело сходные черты с его воздействием на активность экто-фермента эритроцитов скорпены. Однако в эритроцитах ската падение активности фермента под действием фторида было менее стремительным. Так, при 30 мМ концентрации фторида снижение активности экто-АТФазы составляло 37% от контрольного уровня, а при 60 мМ концентрации реагента активность фермента снижалась на 63%. Остаточная ак-

Таблица 1. Влияние различных ингибиторов на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены и морской лисицы

Вид	Ингибитор	Концентрация ингибитора (мМ)	Активность (нмольФн/мин/мкл)	Активность в (%) к контролю	Число опытов	I ₅₀ (мМ)
СКОРПЕНА (SCORPAENA PORCUS L.)	NaN ₃ (азид натрия)	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	15
		2.5	4.5 ± 0.3	94 ± 7	7	
		5	3.8 ± 0.2	79 ± 5	7	
		10	3.1 ± 0.2*	65 ± 7	7	
		15	2.6 ± 0.1*	54 ± 4	7	
		20	1.7 ± 0.02*	35 ± 1	7	
	NaF (фторид натрия)	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	37
		10	4.6 ± 0.2	96 ± 4	5	
		20	3.1 ± 0.2	65 ± 6	6	
		30	2.1 ± 0.05*	44 ± 2	6	
		40	1.7 ± 0.04*	35 ± 2	6	
		50	1.0 ± 0.03*	21 ± 3	6	
	ЭДТА	0 (контроль)	4.8 ± 0.3	100 ± 6	7	12
		2	4.7 ± 0.3	98 ± 4	7	
		4	3.8 ± 0.2	79 ± 3	7	
		6	3.2 ± 0.2	67 ± 6	7	
		8	2.9 ± 0.1*	60 ± 3	7	
		10	2.7 ± 0.1*	56 ± 4	7	
	Na ₃ VO ₄ (ортованадат натрия)	0 (контроль)	5.0 ± 0.2	100 ± 4	7	
		1	4.9 ± 0.3	98 ± 6	7	
		2	4.8 ± 0.1	96 ± 2	7	
3		4.3 ± 0.1	86 ± 2	7		
4		4.4 ± 0.2	88 ± 5	7		
5		4.7 ± 0.1	94 ± 2	7		
МОРСКАЯ ЛИСИЦА (RAJA SLAVATA L.)	NaN ₃ (азид натрия)	0 (контроль)	3.7 ± 0.1	100 ± 3	7	—
		2.5	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		5	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		10	3.0 ± 0.2	81 ± 7	7	
		15	3.2 ± 0.2	86 ± 6	7	
		20	3.2 ± 0.2	86 ± 6	7	
	NaF (фторид натрия)	0 (контроль)	3.8 ± 0.2	100 ± 6	7	51
		10	3.6 ± 0.05	95 ± 1	7	
		20	3.2 ± 0.1	84 ± 3	7	
		30	2.4 ± 0.1	63 ± 4	7	
		40	2.0 ± 0.1*	53 ± 5	7	
		50	1.6 ± 0.1*	42 ± 6	7	
60	1.4 ± 0.1*	37 ± 7	7			

Таблица 1. Окончание

Вид	Ингибитор	Концентрация ингибитора (мМ)	Активность (нмольФн/мин/мкл)	Активность в (%) к контролю	Число опытов	I ₅₀ (мМ)
ЭДТА		0 (контроль)	3.9 ± 0.2	100 ± 5	7	4
		2	3.6 ± 0.2	92 ± 6	5	
		4	1.95 ± 0.1*	50 ± 5	5	
		6	1.65 ± 0.1*	42 ± 6	5	
		8	1.9 ± 0.1*	49 ± 5	5	
		10	2.1 ± 0.1*	54 ± 5	5	
		12	2.4 ± 0.1	62 ± 4	5	
Na ₃ VO ₄ (ортованадат натрия)		0 (контроль)	3.4 ± 0.2	100 ± 6	5	
		1	2.9 ± 0.1	85 ± 3	5	
		2	2.6 ± 0.1	77 ± 4	5	
		3	2.5 ± 0.1	74 ± 4	5	
		4	2.5 ± 0.1	74 ± 4	5	
		5	2.4 ± 0.1	71 ± 4	5	

Примечание: достоверность различий по сравнению с контролем $p < 0.05$.

тивность экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы при 60 мМ концентрации NF была в 6 раз выше, чем у скорпены и составляла 37% от контрольного уровня (рис. 2, табл. 1). На более высокую ингибирующую активность фторида натрия в отношении экто-АТФазы эритроцитов скорпены указывает его I₅₀ (37 мМ), что почти в 1.4 раза меньше, чем I₅₀ для эритроцитов морской лисицы (51 мМ) (табл. 1).

Воздействие ЭДТА на активность экто-ферментов у исследованных костистых и хрящевых рыб также имело свои особенности. При возрастании концентрации ЭДТА до 6 мМ комплексон вызывал торможение активности экто-АТФазы эритроцитов как у скорпены, так и у морской лисицы (табл. 1, рис. 3). Однако ингибирующий эффект ЭДТА у эритроцитов морской лисицы был более выражен и, уже при 4 мМ концентрации ЭДТА, активность фермента снижалась на 50% от контрольного уровня. В эритроцитах скорпены при нарастании концентрации ингибитора от 2 до 12 мМ снижение активности происходило медленнее и 50% ингибирование (I₅₀) наступало при концентрации ингибитора в 12 мМ. В отличие от скорпены у морской лисицы, начиная с 8 мМ концентрации ЭДТА, происходило увеличение активности фермента, который к 12 мМ уровню реагента составлял 62% от контроля (рис. 3). Таким образом, у морской лисицы ЭДТА в зависимости от действующей концентрации вызывал как ингибирование, так и стимулирование активности экто-АТФазы плазматической мембраны ее эритроцитов. У скорпены подобный эффект не наблюдался.

Результаты действия ортованадата натрия представлены в табл. 1 и на рис. 4. Как видно из представленных данных действие ортованадата на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены подобно действию ЭДТА на экто-фермент красных клеток крови морской лисицы (рис. 3). При низких концентрациях (1–3 мМ) ортованадат вызывал слабое ингибирование фермента, максимум активности которого составлял 86% при 3 мМ концентрации этого реагента. При дальнейшем увеличении концентрации Na₃VO₄ (4 и 5 мМ) наблюдалась

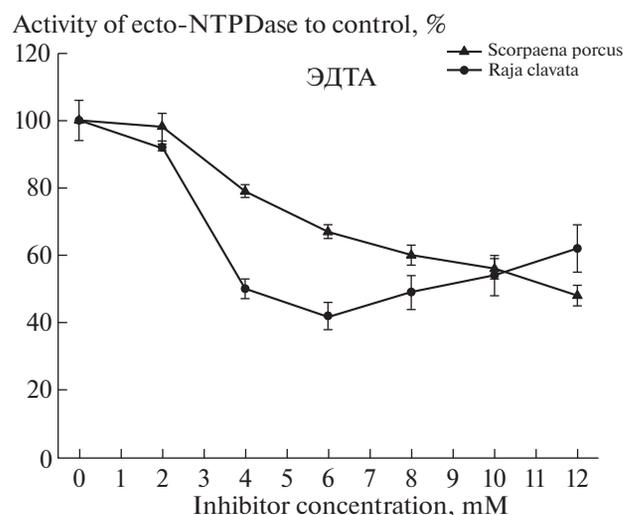


Рис. 3. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций ЭДТА.

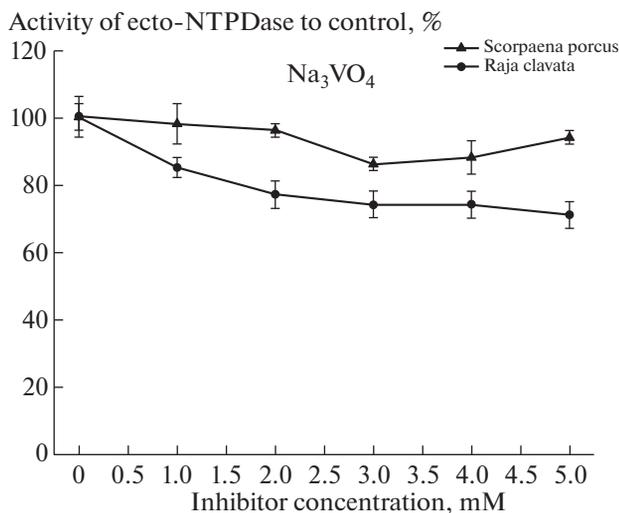


Рис. 4. Динамика изменения активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб (%) при воздействии мМ концентраций ортованадата натрия (Na_3VO_4).

стимуляция активности экто-АТФазы, которая на фоне 5 мМ концентрации ортованадата натрия составляла 94% от исходного уровня.

Ортованадат в эритроцитах морской лисицы, по мере возрастания его концентрации, также как и у скорпены, слабо ингибировал экто-АТФазную активность. Максимум ингибиторного эффекта при 5 мМ концентрации ортованадата составлял 29% и был несколько выше у морской лисицы, чем у скорпены (24%). Ортованадат натрия у морской лисицы не вызывал повышения активности при высоких концентрациях в среде инкубации и не выступал как модификатор экто-нуклеотидазы ската (рис. 4, табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Азид натрия является хорошо известным ингибитором митохондриальной АТФазы ($F_1 F_0$) типа с $I_{50} \approx 0.04$ мкМ [7]. Так как NaN_3 ингибирует и водорастворимую АТФазу (F_1), был сделан вывод о том, что местом связывания ингибитора является F_1 субъединица фермента, часто называемая фактором сопряжения. Точный механизм взаимодействия ингибитора с фактором сопряжения неизвестен, однако считается, что азид действует через механизм стабилизации неактивной формы фермента — $F_1^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{Mg}$ [11]. Для определения в гомогенатах тканей активности АТФаз V- и P- типа, в реакционную смесь включают азид натрия (1–5 мМ) для подавления митохондриальной активности в препаратах. В 1962 г. Джонесу и Эрнстеру при исследовании микросомальных препаратов печени крыс удалось выявить еще одну азидингибируемую АТФазу, не связанную с митохондри-

альным комплексом гепатоцитов [12]. Эта АТФаза отличалась по своим биохимическим свойствам от АТФазы ($F_1 F_0$), она была наделена широкой субстратной специфичностью и, кроме АТФ, могла гидролизовать и другие нуклеозидтрифосфаты (НТФ) и некоторые нуклеозиддифосфаты (НДФ), поэтому получила название НТФДифосфогидролаза (НТФДаза). Важным отличием найденной НТФДазы было то, что концентрация азид натрия, необходимая для полумаксимального ингибирования активности фермента, была в мМ диапазоне, что на порядок было больше концентрации NaN_3 , необходимой для I_{50} АТФазы ($F_1 F_0$). Доказательства того, что ингибированная азидом АТФаза встроена в плазматическую мембрану с наружной ее стороны, были получены в 90-х годах прошлого века [13]. В настоящее время известно, что АТФазы, активный центр которых, находится на поверхности мембраны, составляют одно семейство E-АТФаз (E — обозначает экто). Эти АТФазы характеризуются широкой субстратной специфичностью, необходимостью присутствия, для проявления активности ионов двухвалентных катионов Ca^{2+} или Mg^{2+} и практически полным отсутствием чувствительности к действию специфических ингибиторов АТФаз V и F — типа [14]. Трудности исследования экто-АТФаз обусловлены их высокой чувствительностью к инактивации детергентами. Поэтому попытки выделения экто-НТФДаз из мембран клеток часто заканчивались неудачами и только в 1992 г. гликопротеин фермента, из поперечных канальцев мышечных волокон кролика, был успешно очищен в чистом виде [15]. Дальнейшие исследования позволили выявить четыре экто-нуклеозид-трифосфат/дифосфогидролазы (НТФДаз), которые были разделены на подсемейства с порядковыми номерами 1, 2, 3 и 8 (НТФДаза 1, НТФДаза 2, НТФДаза 3, НТФДаза 8) [16]. В литературе нами не найдено примеров выделения чистых препаратов экто-НТФДаз из эритроцитов рыб, других позвоночных животных и человека.

Экто-НТФДазы хрящевых и костистых рыб демонстрировали разную чувствительность к действию мМ концентраций азид натрия (рис. 1). Экто-НТФДаза морской лисицы была малочувствительна к действию азид, в то время как экто-АТФаза скорпены ингибировалась под действием азид, демонстрируя довольно высокие значения $I_{50} = 15$ мМ (табл. 1). Исходя из полученных данных, ввиду того что НТФДазы — 2-го типа других клеток вообще были нечувствительны к действию мМ концентраций азид натрия [17], экто-НТФДазы скорпены и морской лисицы могут быть отнесены к разным подсемействам. Экто-НТФДаза скорпены к экто-НТФДазам — 1-го типа, а морской лисицы — к экто-НТФДазам — 2-го типа. Линейный ход кривой ингибирования экто-НТФДазы эритроцитов скорпены азидом натрия свидетель-

ствовал о том, что ингибирование фермента носит дозозависимый характер. Возрастающая концентрация ингибитора пропорционально тормозила ферментативную активность экто-АТФазы, что свидетельствовало о достаточно высокой ингибирующей активности азидата в отношении экто-НТФДазы скорпены. Экто-НТФДазы эритроцитов ската проявляла высокую устойчивость к действию ингибитора и при возрастании его концентрации до 20 мМ, фермент стабильно сохранял активность на уровне 86% (см. табл. 1 и рис. 1). Причины такой стабильности неизвестны, но можно предположить, что активный центр экто-НТФДазы эритроцитов морской лисицы отличается от экто-фермента скорпены и возможно его устройство обеспечивает толерантность к присутствию высоких концентраций азидата натрия.

Фторид натрия достаточно эффективно ингибировал работу экто-АТФаз эритроцитов рыб при $I_{50} = 37$ мМ – для скорпены и $I_{50} = 51$ мМ – для морской лисицы (табл. 1). Поэтому фторид натрия можно отнести к высокоактивным ингибиторам [18], способным при мМ концентрациях блокировать работу экто-НТФДаз в эритроцитах рыб. Ход кривых ингибирования экто-НТФДаз у морской лисицы и скорпены имеют сходный характер. Тем не менее, ингибирование фермента у скорпены, при аналогичных условиях, было более значимым и при 60 мМ концентрации NaF активность энзима, блокировалась полностью (на 94%) (см. рис. 2).

Фторид натрия в мМ концентрациях является эффективным блокатором многих ферментов, включая и АТФазы [19]. Специальных исследований по определению механизма ингибирования фторидом натрия экто-НТФДаз нами в литературе найдено не было. Однако известно, что соединения фтора обладают высоким сродством к ионам ряда металлов и в частности к иону Ca^{2+} . Известно, что все экто-АТФазы функционируют в присутствии двухвалентных катионов Mg^{2+} или Ca^{2+} . Можно предположить, что хотя магний и не образует стабильных комплексов с фторид-ионом, но он может взаимодействовать с ним [20], вызывая изменение фермент-субстратного комплекса в виде ингибиторного эффекта. Кроме того, ионы фтора способны связываться с функциональными группами аминокислотных остатков в активном центре ферментов, что также вызывает их ингибирование. Таким же путем ингибируются активность $Na^+ K^+ - АТФазы$ и ряда других фосфатаз [19]. Как показали исследования Н.И. Агалаковой и Г.П. Гусева [20], воздействие фторида натрия индуцирует апоптоз эритроцитов крыс. Как полагают исследователи, активация гибели эритроцитов происходит за счет увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , которую провоцирует фторид в результате активации неселективных Ca^{2+} -проницаемых каналов и ингибирования активности

мембранной Ca^{2+} -АТФазы. Кроме того, цитозольный Ca^{2+} вызывал, за счет активации Ca^{2+} активируемых- K^+ -каналов, резкое падение внутриклеточной концентрации ионов K^+ . Вместе с потерей K^+ происходил выход, осмотически связанной воды и сморщивание клеток, что в конечном счете приводило к гибели эритроцитов крыс.

Ингибиторный эффект *in vitro* высоких концентраций фторида натрия антиоксидантных (супероксиддисмутазы, каталаза, глутатионпероксидаза) ферментов показан на эритроцитах человека [21]. Отмечено дозозависимое ингибирование активностей указанных выше антиоксидантных ферментов, что вызывало рост активных форм кислорода (АФК) и формирование реакции окислительного стресса на мембранах и во внутриклеточном пространстве эритроцитов. Как полагают J. Gutierrez-Salinas и соавт. [22], это приводит к перекиному окислению липидов мембран, повреждению белковых макромолекул на поверхности и внутри клеток, падению энергетического метаболизма. Доказательством падения энергетического обмена в эритроцитах является наблюдаемое снижение внутриклеточной концентрации АТФ и АДФ под воздействием NaF [23]. Падение энергетического заряда эритроцитов обусловлено блокированием NaF-енолазы – одного из ключевых ферментов гликолиза. [24]. Однако в настоящее время получены данные о том, что енолаза не всегда является мишенью фторида [25]. Согласно современной гипотезе, гликолиз тормозится в результате внутриклеточного подкисления, которое возникает в процессе окислительного стресса индуцированного высокими концентрациями фторида натрия [26]. Кроме этого, фторид натрия дезорганизует работу митохондрий, вызывая падение мембранного потенциала и образования гигантской поры в их наружной мембране [27]. Это приводит к набуханию матрикса, разрыву наружной мембраны и выходу из митохондрий цитохрома c. Все это тормозит работу дыхательной цепи, подавляет синтез АТФ и, в конечном счете, ведет к развитию апоптоза и гибели клеток [28]. Таким образом, воздействие фторида натрия на эритроциты рыб носит многовекторный характер, следствие которого выражается в необратимом падении активности экто-НТФДаз на фоне оксидативного стресса, внутриклеточного энергетического коллапса и, в конечном счете – гибели клеток.

Ортованадат натрия (Na_3VO_4) относится к соединению с широким спектром действия на различные ферменты живой клетки. Считается, что среди многочисленных неорганических солей пентавалентный ванадий является наиболее токсичным [29]. Показано, что ортованадат (VO_4^{3-}) в эритроцитах снижал скорость гликолиза, ингибируя активность глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназы [30]. Ванадат проявлял нейротоксичные

свойства, блокируя в нейронах работу холинэстеразы и Ca^{2+} , Mg^{2+} АТФазы [31]. В почечных канальцах ванадат ингибировал Na^+ , K^+ -АТФазу, что приводило к отеку и натрийурии [32]. Также ванадат является эффективным ингибитором экто-АТФаз эпителия куриного яйцевода [6] и поэтому использование его в настоящем исследовании можно считать вполне обоснованным. В наших исследованиях действие ортованадата на экто-НТФДазу эритроцитов рыб выражалось в значительном снижении активности фермента (рис. 3, табл. 1). Ферментативный ответ экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы был более выражен и его активность, после воздействия в 2 мМ концентрации, падала на 25%, оставаясь на этом уровне вне зависимости от последующего увеличения действующей концентрации ортованадата. Максимальный ингибиторный эффект на активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены наблюдался при 3 мМ концентрации реагента, а дальнейшее увеличение действующей концентрации ортованадата приводило к стимуляции активности фермента. Такое действие ортованадата можно рассматривать как модификацию активности фермента, а сам ортованадат следует рассматривать как модификатор активности экто-АТФазы, а не только как ее ингибитор. Эффекты, которые показывает ванадий, при воздействии на ферменты многообразны и зависят от типа ткани, собственных свойств фермента и даже концентрации ванадата [33]. Механизм действия ванадата на активность АТФаз до конца не расшифрован. Полагают, что тетраэдрический анион ванадата подобен фосфатному аниону и поэтому ванадат может взаимодействовать с различными физиологическими субстратами, с которыми функционирует анион фосфата. В общих чертах, ванадатная и фосфатная группы по своей тетраэдрической морфологии очень похожи сферическим распределением заряда во внешней сфере. Однако чистый ионный заряд этих ионов при рН, близкому к 7,0, отличается, что может приводить к различным взаимодействиям с электрофильными группами в активном центре АТФаз. Существуют и другие различия, основным из которых является восприимчивость ванадата к (одно-электронному) восстановлению, вследствие наличия низколежащих d орбиталей и координационных чисел больше 4, обычно 5 или 6. Следствием этого является генерация пяти- или шестикоординатных анионов, фиксации ванадата координацией к функциональным группам, обеспечиваемым аминокислотными боковыми цепями белков [34]. Таким образом, ванадат структурно может выступать конкурентом в занимаемых фосфором местах, в активных центрах ферментов и других местах. Кроме того, ванадат может связываться с АДФ и другими макроэргическими соединениями и тем самым влиять на активность АТФаз через модификацию захватываемых ими субстратов [35].

ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота и ее динатриевая соль) относится к малотоксичным анионитам и ее главное свойство — образование устойчивых водорастворимых комплексов с ионами металлов. Экто-НТФДазы в качестве субстрата используют двухкомпонентный $\text{Mg}^{2+}(\text{Ca}^{2+})$ -АТФ [11]. ЭДТА- Na_2 препятствует формированию металл-нуклеозид-трифосфатного комплекса и тем самым является ингибирующим фактором, способным блокировать гидролиз экто-ферментами макроэргических фосфатов. ЭДТА была использована в качестве мощного ингибитора поверхностных НТФДаз еще в самом раннем периоде изучения экто-энзимов. Так, в 1957 г. Т.В. Венкстерну и В.А. Энгельгардту [36] при помощи 1 мМ ЭДТА удалось полностью блокировать экто-АТФазу эритроцитов голубя и доказать, что взрывной характер гидролиза гомогенатов эритроцитов птицы, обусловлен активностью именно этого фермента. Ими было подчеркнuto, что действие ЭДТА носит обратимый характер и добавление Mg^{2+} или Ca^{2+} на фоне блокатора полностью восстанавливало активность экто-АТФазы.

В наших экспериментах ЭДТА был малоэффективным ингибитором и вызывал частичное блокирование (40–50%) активности фермента в эритроцитах рыб даже при 12 мМ концентрации. Эта концентрация на порядок превышала концентрацию комплекса, использованного в опытах на эритроцитах голубя (рис. 4, табл. 1). В экспериментах с эритроцитами скорпены для ЭДТА константа ингибирования (I_{50}) составляла 12 мМ, что совпало с максимальной концентрацией реагента использованной в этих экспериментах. В отношении экто-НТФДазы эритроцитов морской лисицы ингибиторный эффект ЭДТА наблюдался только при низких концентрациях блокатора (2, 4, 6 мМ). При 6 мМ концентрации ЭДТА активность фермента снижалась максимально (на 58%). Константа ингибирования (I_{50}) для этой части кривой составляла 4 мМ (рис. 4). При более высоких концентрациях (8, 10, 12 мМ) наблюдалась реверсивная активация активности экто-НТФДазы, которая постепенно возрастала на 20% (табл. 1) и I_{50} для этой части кривой составляла 9 мМ. В данном случае ЭДТА выступал как модифицирующий агент. Причины активации активности экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы неизвестны. Однако присутствие ЭДТА способно вызывать активацию Ca^{2+} АТФазы мембран эритроцитов человека. По мнению Вольфа [37] эти изменения могут происходить в результате «частичной денатурации» фермента под действием комплекса. Ингибиторный эффект ЭДТА у морской лисицы заканчивался, когда концентрация ингибитора и концентрация присутствующего в среде инкубации Mg^{2+} выравнялись до эквимолекулярных значений. У скорпены последующее наращивание концентрации ингибито-

ра вызывало лишь незначительное понижение активности фермента. При таких концентрациях ЭДТА в среде инкубации уже не должно было бы быть свободных двухвалентных катионов. Тем не менее экто-НТФДаза исследованных рыб продолжала сохранять активность на уровне 50–60%. Эти результаты свидетельствовали в пользу особых способностей экто-НТФДаз эритроцитов рыб. Можно полагать, что экто-НТФДазы эритроцитов рыб способны функционировать в условиях дефицита двухвалентных катионов, что маловероятно, или иметь их внутриклеточные резервы, при выходе которых из эритроцитов в окружающее пространство они способны поддерживать активность поверхностных АТФаз. Такие возможности у эритроцитов есть. Еще в 1969 г. при изучении движения Ca^{2+} через мембрану эритроцитов человека было установлено наличие активной экстрюзии Ca^{2+} из эритроцитов, что может поддерживать или даже активировать активность Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы [38]. Согласно современным исследованиям, механизм экстрюзии опосредован мощным трансмембранным кальциевым насосом, который способен быстро удалять кальций из цитозольного пространства эритроцитов [39]. Нельзя не отметить важность и мембранного Ca^{2+} . Высокие концентрации ЭДТА могут удалить все двухвалентные катионы из инкубационной среды суспензии эритроцитов, но не могут удалить мембраносвязанный кальций [40], что может обеспечивать поддержание активности экто-АТФаз.

Полученные в наших исследованиях эффекты необходимо рассматривать как интегральный ответ активности экто-НТФДазы эритроцитов рыб ввиду многовекторности действий выбранных реагентов. С этим связаны трудности интерпретаций полученных результатов при работе с суспензиями цельных эритроцитов. Как уже указывалось выше, в доступной нам литературе ссылок на выделение из плазматических мембран эритроцитов позвоночных и получение чистых препаратов экто-НТФДаз нами не найдено. При выделении экто-НТФДаз из других клеток исследователи сталкиваются с трудностями, связанными с очень большой чувствительностью экто-АТФаз к действию детергентов и других агентов, применяемых для дезинтеграции мембраны. Под действием этих веществ поверхностно-локализованные АТФазы распадаются на фрагменты с потерей активности [41]. Местом приложения для выбранных ингибиторов являются не только активный центр и белковая молекула экто-фермента, не только катионы металлов, но и энергетика эритроцитов в целом. Блокирование гликолиза и дыхания митохондриального комплекса эритроцитов посредством ингибирования ключевых ферментов и дезинтеграции функционирования митохондриального матрикса приводит к существенному снижению энергетического по-

тенциала эритроцитов и может оказывать влияние на работу экто-НТФДаз.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что экто-НТФДазы эритроцитов хрящевых и костистых рыб существенно различаются по резистентности к действию выбранных биохимических агентов. Экто-НТФДаза эритроцитов морской лисицы обладает большей устойчивостью к выбранным нами реагентам. Возможно, причины такой устойчивости обусловлены наличием особой толерантности эритроцитов хрящевых рыб к высоким концентрациям мочевины (у морской лисицы около 400 мМ), которую они накапливают в плазме крови для поддержания осмотического равновесия с окружающей средой. Во всяком случае, это требует особых конструктивных решений на молекулярном уровне ввиду того, что мочевина для остальных эритроцитов позвоночных является сильнейшим ядом, и даже небольшие сбои в фильтрующей системе почек ведут к катастрофическим последствиям. Отсутствие ингибирующего эффекта азидата натрия на экто-АТФазу эритроцитов морской лисицы позволяет предположительно отнести эту экто-НТФДазу к семейству экто-НТФДаз 2-го типа, тогда как экто-НТФДаза эритроцитов скорпены к экто-НТФДазам 1-го типа. Функциональное назначение экто-АТФаз плазматических мембран эритроцитов рыб не установлено, но присутствие постоянно высоких концентраций АТФ [42] в плазме крови рыб и высокие значения удельной активности экто-ферментов рыб [3, 4] свидетельствуют о значимой роли этих АТФаз в физиологии эритроцитов и кровотока в целом.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания КНС–ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации 121032300019-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.А. Силкин и Е.Н. Силкина, осуществили планирование, сбор данных, написание и редактирование манускрипта. М.Ю. Силкин осуществлял техническую поддержку при проведении экспериментальных исследований, участвовал в обработке и обсуждении экспериментальных данных, оформлении иллюстраций и редактировании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barnstock G* (2015) Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signaling. *Purinergic Signalling* 11: 411–434. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9462-7>
- Yegutkin GG* (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 49 (6): 473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
- Silkin YuA, Silkina EN, Silkin MYu* (2017) The dynamics of heat production in erythrocytes of the scorpion fish (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758). *In vitro* 43(2):164–170. <https://doi.org/10.1134/S1063074017020092>
- Silkin YA, Silkina EN* (2017) The study of bioenergetic characteristics of the red blood cells of Black Sea fish the common stingray (*Dasyatis pastinaca* L.) and Black scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) *Biophysics* 62 (3): 434–439. <https://doi.org/10.1134/S0006350917030204>
- al-Rashida M, Iqbal J* (2014) Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* 34(4):703–743. <https://doi.org/10.1002/med.21302>
- Knowles A, Nagy AK* (1999) Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur. J. Biochem* 262: 349–357. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00389.x>
- Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E* (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235: 3322–329.
- Казеннов АМ, Маслова МН, Савина ГВ* (1984) Сравнительная характеристика свойств Na^+ , K^+ - АТФаза эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 20 (2): 167–173. [*Kazennov AM, Maslova MN, Savina GV* (1984) Sravnitel'naya harakteristika svojstv Na^+ , K^+ - АТФаза эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *J Evol Biochem Physiol* 20 (2): 167–173. (in Russ)].
- Казеннов АМ, Маслова МН* (1980) Особенности активации детергентами Na , K -аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 16 (50): 430–436. [*Kazennov A.M., Maslova M.N.* (1980) Osobennosti aktivacii detergentami Na , K -аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *J Evol Biochem Physiol* 16 (50): 430–436. (in Russ)].
- Chen PS, Jr, Toribara TY, Warner H* (1956) Microdetermination of phosphorus *Anal. Chem.* 28: 1756–1758.
- Vasilyeva E.V., Minkov I.B., Fitin A.F., Vinogradov A.D.* (1982) Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. *Biochem. J.* 202: 15–23. <https://doi.org/10.1042/bj2020009>
- Ernster L, Jones LC* (1962) Study of the nucleoside tri- and diphosphatase activities of rat liver microsomes. *J. Cell Biol.* 15: 563–577. <https://doi.org/10.1083/jcb.15.3.563>
- Strobel RS, Nagy AK, Knowles AF, Buegel J, Rosenberg MO* (1996) Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 271: 16232–16331. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16323>
- Plesner L* (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158:141–214. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62487-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62487-0)
- Treuheit MJ, Vaghy PL, Kirley TL* (1992) Mg^{2+} -ATPase from rabbit skeletal muscle transverse tubules is a 67-kilodalton glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267:11777–11782.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bi-gonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sevigny J* (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 1: 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>
- Knowles AF, Li C* (2006) Molecular cloning and characterization of expressed human ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and its soluble extracellular domain. *Biochemistry* 45:7323–7333. <https://doi.org/10.1021/bi052268e>
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo ML* (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 188: 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>
- Adamek E, Pawiowska-Gyral K, Bober K* (2005) In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann. Acad. Med. Stetin* 51 (2): 69–85.
- Agalakova NI, Gusev GP* (2011) Fluoride-induced death of rat erythrocytes *in vitro*. *Toxicology In Vitro* 25: 1609–1618. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.06.006>
- Antonny B, Bigay J, Chabre M* (1990) A novel magnesium-dependent mechanism for the activation of transducin by fluoride. *FEBS Letters* 268 (1): 277–280. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81027-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81027-1)
- Gutiérrez-Salinas J, García-Ortiz L, Morales González JA, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S, Núñez-Ramos NR, Madrigal-Santillán E* (2013) In vitro effect of sodium fluoride on malondialdehyde concentration and on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in human erythrocytes. *Scientific World Journal* 2013: 864–718. <https://doi.org/10.1155/2013/864718>
- Suska M* (2001) The effect of sodium fluoride on the adenosine nucleotide pool in erythrocytes of Wistar rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 14 (4): 369–373. PMID: 11885920
- Qin J, Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Lebioda L* (2006) Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics. *Biochem.* 45: 793–800. <https://doi.org/10.1021/bi051>
- Liao Y, Chen J, Brandt BW et al.* (2015) Identification and functional analysis of genome mutations in a fluoride-resistant *Streptococcus mutans* strain. *PLOS ONE* 10.: e0122630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122630>

26. *Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA et al.* (2009) Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. *Clin. Chem.* 55: 1019–1021. <https://doi.org/hem.2008.12170> <https://doi.org/10.1373/clinc>
27. *Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, Del Razo ML* (2008) Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230 (3): 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.008>
28. *Anuradha CD, Kanno S, Hirano S* 2001) Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biol. Med.* 31 (3): 367–373. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00591-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00591-3)
29. *Sugiyama H, Matsugo S, Misu H et al.* (2013) Regulation of the physiological effects of peroxidovanadium (V) complexes by the electronic nature of ligands. *J. Inorg. Biochem.* 121: 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.014>
30. *Benabe JE, Echegoyen LA, Pastrana B, Martínez-Maldonado M* (1987) Mechanism of inhibition of glycolysis by vanadate. *J. Biol. Chem.* 262 (20): 9555–9560. PMID: 3036865
31. *Robinson JD* (1981) Vanadate inhibition of brain (Ca²⁺Mg²⁺)-ATPase. *Neurochem. Res.* 6 (3): 225–232. <https://doi.org/10.1007/BF00964038>
32. *Barceloux DG* (1999) Vanadium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37 (2): 265–278. <https://doi.org/10.1081/clt-100102425>
33. *Treviño S, Díaz A, Sánchez-Lara E, Sanchez-Gaytan BL, Perez-Aguilar JM, González-Vergara E* (2019) Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research* 188: 68–98. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1540-6>
34. *Turner TL, Nguyen VH, McLaughlan CC, Dymon Z, Dorsey BM, Hooker JD, Jones MA* (2012) Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. *J. Inorg. Biochem.* 108: 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.201109.009>
35. *Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D* (2012) Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim. Pol.* 59 (2): 195–200. PMID: 22693688
36. *ВенкстERN ТВ, Энгельгардт ВА* (1957) Аспространение экто-аденозилполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. *Биохимия* 22 (5): 911–916. [*Venkstern TV, Engelhardt VA* (1957) Distribution of ecto-adenosinopolyphosphatase and characteristics of certain of its properties. *Biochim.* 22 (5): 911–916 (in Russ)].
37. *Wolf HU* (1972) Effects of Ethylenediaminetetra-acetate and Deoxycholate on Kinetic Constants of the Calcium Ion-Dependent Adenosine Triphosphatase of Human Erythrocyte Membranes. *Biochem. J.* 130: 311–314. <https://doi.org/10.1042/bj1300311>
38. *Schatzman HJ, Vincenzi FF* (1969) Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.* 201 (2): 369–395. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1969.sp008761>
39. *Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L* (2013) Calcium in red blood cells – a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (5): 9848–9872. <https://doi.org/10.3390/ijms14059848>
40. *Durriti-Cubria M, Seifen E, Schmidt HL* (1967) Calcium content and uptake by erythrocyte stomata. *Hoppe Seiler Z. Physiol. Chem.* 348 (8): 1043–1046. PMID: 4233216
41. *Christoforidis S, Papamarcaki T, Galaris D, Kellner R, Tsolas O* (1995) Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 234: 66–74. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.066_c.x
42. *Jensen FB, Agnisola C, Novak I* (2009) ATP release and extracellular nucleotidase activity in erythrocytes and coronary circulation of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 152: 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.007>

THE EFFECT OF AZIDE, FLUORIDE, ORTHOVANADATE, AND EDTA SODIUM SALTS ON ECTO-ATPASE ACTIVITY OF RED BLOOD CELLS IN A SCORPIONFISH (*SCORPAENA PORCUS* L.) AND THORNBAC RAY (*RAJA CLAVATA* L.)

Yu. A. Silkin^{a, #}, E. N. Silkina^a, and M. Yu. Silkin^a

^a T. I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences – Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Feodosiya, Russia

[#]e-mail: ysilkin@mail.ru

The effect of azide, fluoride, orthovanadate and EDTA sodium salts on the ecto-ATPase activity in red blood cells (RBCs) of a scorpionfish (*Scorpaena porcus* L.) and thornback ray (*Raja clavata* L.) was studied. It was shown that under the influence of millimolar (mM) concentrations of the selected biochemical agents, significant differences in the hydrolytic activity of RBC plasma membrane ecto-ATPases were revealed in cartilaginous vs. teleost fish. For example, thornback ray RBC ecto-ATPase was practically insensitive to sodium azide. In contrast, scorpionfish RBC ecto-ATPase was sensitive to sodium azide, which blocked the enzyme activity by 65% at a concentration of 20 mM. Thornback ray RBC ecto-ATPase retained a significant activity (37%) at high (60 mM) concentrations of sodium fluoride, while scorpionfish RBC ecto-ATPase was almost completely blocked at this concentration. EDTA acted as a modifier of thornback ray ecto-ATPase activity: at concentrations

of up to 6 mM, ATP hydrolysis was actively blocked (by 58%), and at higher concentrations, ecto-ATPase activity was stimulated (up to 20%). An increase in the EDTA concentration (up to 12 mM) in suspensions of scorpionfish RBCs constantly stimulated the inhibitory effect of the chelator (up to 52% vs. control). The activity of ecto-ATPases in RBCs of the studied fish species was weakly blocked by sodium orthovanadate. These differences may reflect a higher tolerance of thornback ray RBC ecto-ATPase to the effect of the above chemical reagents compared to a scorpionfish. The absence of the sodium azide inhibitory effect on thornback ray RBC ecto-ATPase suggests that this ecto-ATPase may be referred to a family of type 2 ecto-NTPDases (ENTPD2), while scorpionfish ecto-ATPase may belong to type 1 ecto-NTPDases (ENTPD1).

Keywords: fish, erythrocytes, ecto-ATPases, sodium salts of azide, fluoride, orthovanadate, EDTA

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА СИСТЕМЫ КРАСНОЙ КРОВИ МАЛОЙ ЛЕСНОЙ МЫШИ (*APODEMUS URALENSIS*) В ГОРАХ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАВКАЗА

© 2021 г. М. М. Емжуева^{1,*}, Ф. А. Темботова¹, З. А. Берсекова¹,
З. Х. Ботгаева¹, А. Х. Чапаев¹

¹ Институт экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН, Нальчик, Россия

*e-mail: emkugeva_m@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2020 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 18.03.2021 г.

Исследован комплекс показателей системы крови широко распространенного вида – малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall.) в горах Кавказа (1800 м над ур. м.) с охватом всех сезонов года. Исследование было проведено на взрослых животных, отловленных зимой, весной, летом и осенью в сосновом лесу (Национальный парк Приэльбрусье, КБР). При действии хронической гипоксии у вида показана сезонная динамика эритропоеза костного мозга, поступления молодых эритроцитов (ретикулоцитов) в периферическую кровь и особенности поддержания кислородной емкости крови в разные сезоны года. Кровотворная функция костного мозга *A. uralensis* в среднегорьях сохраняется на высоком уровне в течение всего годового цикла, при этом наиболее активное кроветворение наблюдается в зимний и летний периоды, и менее активное – в весенний и осенний. Обитание в условиях хронической гипоксии обуславливает необходимость высокого оснащения организма *A. uralensis* кислородом независимо от сезона года. В способах поддержания кислородной емкости крови в разные сезоны года имеются существенные различия: в холодный осенне-зимний период она обеспечивается увеличением общей поглотительной поверхности для кислорода, в весенне-летний – поступлением в кровотоки эритроцитов с качественно иными свойствами. Выявленная сезонная изменчивость в показателях эритрона малой лесной мыши обеспечивает поддержание как оптимальной кислородной емкости крови, так и гомеостаза всего организма в горах Центрального Кавказа.

Ключевые слова: *Apodemus uralensis*, Кавказ, сезонная изменчивость, адаптация, система крови, эритропоез, эритроциты

DOI: 10.31857/S0044452921040033

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, гипоксия является одним из главных факторов эволюционной адаптации, которая приводит к появлению большого разнообразия адаптивных стратегий [1]. Исследование физиологических, а в последние десятилетия и молекулярно-генетических основ адаптаций к гипоксии у разных видов, остается одним из актуальных вопросов современной биологии [2–6]. Эти адаптации направлены на увеличение подачи кислорода к тканям и/или снижение потребности в кислороде на клеточном уровне [5, 7]. Адаптивные реакции малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall.) к условиям гор относятся к первому типу. Увеличение пропускной способности кислорода в крови у вида обеспечивается изменениями в эритропоэтической активности костного мозга и соответствующим поступлением в периферическую кровь большого числа молодых эритроцитов – ретикулоцитов – и качественными особенностями этих клеток: более высокое содержание гемоглобина при меньших

размерах [8]. В результате высокой кислородной емкости крови увеличивается нагрузка на сердце, что выражается в относительно больших размерах сердца [8].

Горные условия характеризуются комбинированным воздействием гипоксии и холода, что создает серьезные физиологические проблемы для млекопитающих, поскольку реакция метаболизма на эти два фактора противоположна [5, 9]. Эти стрессовые факторы накладываются на сезонную цикличность сдвигов условий существования (как климатических, так и кормовых). При значительном объеме исследований по различным аспектам адаптации к гипоксии нет четкого понимания того, каким образом в разные сезоны года обеспечивается поддержание кислородного запроса организма в экстремальных условиях гор.

Цель работы состояла в исследовании особенностей обеспечения кислородного запроса организма широко распространенного вида – *Apodemus*

uralensis, в разные сезоны года в горах Центрального Кавказа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования, согласно типизации А.К. Тембова [10], проводились в условиях среднегорий субальпийского пояса эльбрусского варианта Центрального Кавказа. Эльбрусский вариант относится к континентальному подтипу восточно-северокавказского (полупустынного) типа поясности. Здесь Главный и Боковой хребты состоят из больших вершин, в силу чего влажные средиземно-черноморские ветры задерживаются, их влияние здесь отсутствует. Климат континентальный, за счет свободного проникновения сухих воздушных потоков с Прикаспийской низменности в горы. Отлов животных проводили в сосновом лесу с примесью березы на территории Национального парка “Приэльбрусье”, окр. пос. Эльбрус, высота местности – 1800 м над ур. м., GPS координаты – 43°15' с.ш., 42°38' в.д.

Объект исследования (*Apodemus uralensis* Pall.) – доминирующий вид в сообществе мелких млекопитающих субальпийского пояса эльбрусского варианта. Ареал вида на Кавказе в высотном направлении простирается до 3000 м над ур. м. [11]. Молекулярно-генетическими исследованиями на Центральном Кавказе, в пределах КБР, установлено обитание генетически однородных животных, которые идентифицируются как *Apodemus uralensis* [12].

В работе использовано 170 особей малой лесной мыши с охватом всех сезонов года: зима (январь) – 11 самцов, 10 самок; весна (апрель) – 22 самца, 12 самок; лето (июль) – 32 самца, 33 самки; осень (октябрь) – 20 самцов, 30 самок. Животных отлавливали стандартным методом ловушко-линий [13]. Изучались взрослые особи, возраст которых определяли на основании комплекса признаков стертости зубов, массы тела, состояния генеративных органов. Работа выполнена с соблюдением этических стандартов, утвержденных правовыми актами РФ, международных принципов Базельской декларации о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Костный мозг получали из бедренной кости. Препараты костного мозга готовили на предметных стеклах и окрашивали комбинированным методом (по Май-Грюнвальд и Романовскому-Гимза, MiniMed, Россия). Морфологический анализ клеток костного мозга (соотношение клеток лейкоцитарного и эритробластного ряда, эритробластограмма) проводился с помощью микроскопа Axio Imager, (Carl Zeiss, Германия), окуляр – 10, объектив – 100 с масляной иммерсией. Ретикулоциты крови (RET) и их парциальный состав исследовали на микропрепаратах, окрашенных 1% раствором красителя бриллиант-крезилблау. Расчет

проводили на 10 тыс. эритроцитов. По степени зрелости различали 5 групп ретикулоцитов (0, I, II, III, IV). Концентрацию гемоглобина (HGB, г/л) определяли унифицированным гемоглобинцианидным методом на гемоглобинометре фотометрическом МиниГЕМ-540 (Техномедика, Россия), гематокритное число – соотношение плазмы и форменных элементов (HCT, об.%) – микрометодом на гематокритной центрифуге СМ-70 (ELMI, Латвия), подсчет количества эритроцитов (RBC, млн в 1 мкл) проводился в камере Горяева. Диаметр эритроцитов (микрометры) измерялся прямым микрометрическим методом с помощью винтового окуляр-микрометра МАВ 1-16х на сухих окрашенных препаратах крови. Измеряли диаметр 100 различных эритроцитов, результаты распределяли по группам (по величине диаметра эритроцитов). Рассчитывали среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) в пикограммах (пг), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC) в г/л, средний объем эритроцита (MCV) в кубических микрометрах (мкм³) [14, 15].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ “Statistica-10 for Windows”. Влияние факторов проанализировано двухфакторным дисперсионным анализом (Factorial ANOVA). При оценке различий (половых, сезонных) использовали Tukey-тест. Кластерный анализ проводили на основе матрицы дистанций Махаланобиса методом Варда (Ward's method, 1 – Pearson –r). Для всех статистических тестов принят 5% уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что система крови малой лесной мыши в условиях среднегорья Центрального Кавказа претерпевает значительные сезонные изменения ($F = 3.6$, $p = 0.000$), не зависит от пола животных ($F = 0.6$, $p = 0.867$) и совместного действия рассматриваемых факторов ($F = 1.3$, $p = 0.104$).

Согласно результатам дискриминантного анализа 82% животных соответствуют классификационной матрице, однородность зимней, весенней и осенней выборок составляет 80–88%, летней – 77%.

Система крови A. uralensis в зимний период (январь). Активная часть паренхимы костного мозга у всех изученных особей в зимний период была густо заполнена кроветворными клетками. Эритроидные клетки на препаратах равномерно располагались между другими кроветворными элементами лейкоцитарного ряда и эритроцитами. На каждое поле зрения их приходилось от 15 до 35. Среди этих клеток эритроидного ряда в стадии митоза были 1–3. Жировые клетки встречались в небольшом количестве и не в каждом поле зрения. В парциальном соотношении клеточных групп костного мозга

Таблица 1. Сезонная динамика параметров костного мозга малой лесной мыши (*A. uralensis*) в условиях среднегорий Центрального Кавказа

Параметры	пол	M ± SE				p < 0.05
		Зима (1)	Весна (2)	Лето (3)	Осень (4)	
Эритробластный ряд в % ко всем ядерным клеткам костного мозга	♂	21.65 ± 0.82	18.18 ± 0.63	22.59 ± 0.60	18.88 ± 0.70	1–2, 2–3, 3–4
	♀	21.45 ± 0.22	18.81 ± 1.34	23.47 ± 0.60	20.22 ± 1.02	2–3, 3–4
Соотношение лейкопоез эритропоез	♂	3.61 : 1	4.60 : 1	3.50 : 1	4.43 : 1	
	♀	3.82 : 1	4.49 : 1	3.34 : 1	4.15 : 1	

Таблица 2. Сезонная динамика параметров периферической крови малой лесной мыши (*A. uralensis*) в условиях среднегорий Центрального Кавказа

Параметры	пол	M ± SE				p < 0.05
		Зима (1)	Весна (2)	Лето (3)	Осень (4)	
HGB (г/л)	♂	165.09 ± 3.0	164.90 ± 3.9	158.41 ± 1.8	157.21 ± 2.6	
	♀	161.30 ± 3.1	158.82 ± 4.6	161.90 ± 2.0	154.71 ± 1.9	
RBC (млн в 1 мкл)	♂	11.002 ± 0.3	9.380 ± 0.3	9.220 ± 0.1	9.930 ± 0.2	1–2, 1–3
	♀	10.762 ± 0.4	9.898 ± 0.3	9.166 ± 0.2	10.203 ± 0.2	1–3, 3–4
HCT (об/%)	♂	51.25 ± 1.4	51.65 ± 1.1	49.71 ± 0.6	49.50 ± 0.7	
	♀	52.00 ± 1.1	50.83 ± 1.1	50.32 ± 0.8	49.31 ± 0.6	
Диаметр эритроцитов (мкм)	♂	5.15 ± 0.05	5.50 ± 0.03	5.43 ± 0.04	5.39 ± 0.03	1–2, 1–3
	♀	5.16 ± 0.04	5.41 ± 0.05	5.51 ± 0.04	5.35 ± 0.02	1–2, 1–3, 3–4
MCH (пг)	♂	15.09 ± 0.4	17.87 ±	17.22 ± 0.6	15.84 ± 0.2	1–2, 1–3, 3–4
	♀	15.17 ± 0.6	15.88 ±	17.82 ± 0.5	15.22 ± 0.3	1–3, 2–3, 3–4,
MCV (мкм ³)	♂	47.83 ± 1.5	53.07 ±	53.96 ± 1.8	50.18 ± 0.6	1–3, 3–4
	♀	48.90 ± 1.9	51.62 ±	55.20 ± 1.3	48.76 ± 0.7	1–3, 3–4,
MCHC (г/л)	♂	31.63 ± 0.05	31.49 ±	31.90 ± 0.4	31.39 ± 0.2	
	♀	31.06 ± 0.04	30.77 ±	32.18 ± 0.5	31.25 ± 0.2	1–3

Примечание: HGB – концентрация гемоглобина, HCT – гематокритное число, RBC – количество эритроцитов, MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, MCV – средний объем эритроцита.

эритроидные клетки составили 21.65% у самцов и 21.45% у самок, оставшиеся около 80% приходятся на лейкоцитарный ряд (табл. 1). В эритрограмме выявлен сдвиг в левую сторону за счет молодых клеток (эритробластов и базофильных нормобластов).

В периферической крови содержание молодых эритроцитов (ретикулоцитов) высокое и составляет 35.47% у самцов и 35.67% у самок. В парциальном их составе преимущественное содержание ретикулоцитов третьей стадии (около 20% у животных обоих полов). Число эритроцитов в 1 мкл крови также высоко, причем как у самок, так и у самцов малой лесной мыши (около 11 млн), при этом они небольших размеров (5.15 и 5.16 мкм соответственно). Концентрация гемоглобина в крови в среднем высокая, у особей обоих полов (табл. 2). По системе крови в зимний период по полу различия не отмечены.

Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные, и процесс их поступления не нарушен, о чем свидетельствует наличие 3–9 полихроматофильных эритроцитов в каждом поле зрения (рис. 1).

В эритроцитах обнаружены включения телец Хауэлла-Жолли (у 60% изученных животных). Все это свидетельствует о высокой активности эритропоеза в зимний период.

Система крови A. uralensis в весенний период (апрель). В весенний период эритроидные элементы на препаратах костного мозга встречались в каждом поле зрения в количестве до 30. В стадии митоза клеткам красного ряда (2–3) отмечались не во всех полях зрения. Жировых клеток больше, чем зимой. Полученные результаты свидетельствуют о некотором снижении активности эритропоеза в весенний период, в сравнении с зимним (табл. 1). В парциальной эритрограмме (рис. 2) более низкое

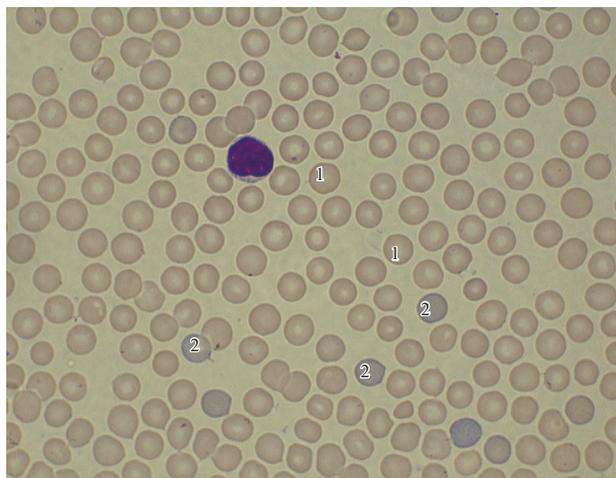


Рис. 1. Микрофотография препарата крови *A. uralensis*: нормохромные (1) и полихроматофильные эритроциты (2).

мок меньше зрелых клеток (III ($p = 0.008$) и IV ($p = 0.029$) стадий) и больше молодых (II стадии ($p = 0.050$)), что связано с ускоренным выходом ретикулоцитов в периферическую кровь и способствует повышению дыхательной функции крови.

В периферической крови содержание эритроцитов весной снижается, по отношению к зиме. Размеры этих клеток весной увеличиваются (диаметр – у обоих полов, объем – MCV – достоверно у самцов). Содержание гемоглобина в 1 мкл крови и его средняя концентрация в эритроците остаются на уровне зимних показателей (табл. 2). Насыщенность эритроцитов гемоглобином (MCH) повышается у самцов, у самок остается на уровне зимних значений. Морфологический анализ препаратов крови показал, что поступающие клетки (эритроциты) из костного мозга в весенний период нормохромные. Полихроматофильные эритроциты, которые встречались в каждом поле зрения, свидетельствуют о нормальном процессе обновления эритроцитов. В эритроцитах, как и зимой, обнаружены тельца Хауэлла-Жолли, у 71.6% особей. Половые различия по параметрам периферической крови в данном сезоне выражены по среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах ($p = 0.001$).

Система крови A. uralensis в летний период (июль). Эритроидные клетки на препаратах костного мозга летом встречались в количестве до 45 в каждом поле зрения. Отмечены 1–3 клетки в стадии митоза не во всех полях зрения. Летом активизируется эритропоэз костного мозга: значительно повышается общее количество эритроидных клеток у обоих полов. Их количество составило 22.59% у самцов и 23.47% – у самок. В эритрограмме меняется соотношение эритроидных клеток. Повышается количество эритробластов ($3.21 \pm 0.2\%$ у сам-

содержание эритробластов, статистически значимое в случае сравнения самок ($p = 0.000$).

Средние значения содержания этих клеток весной составляют для самцов $2.59 \pm 0.2\%$ и $2.64 \pm 0.50\%$ для самок. Также ниже относительное количество оксифильных нормобластов – $47.93 \pm 1.39\%$ и $47.61 \pm 3.25\%$ ($p = 0.000$ и $p = 0.009$) соответственно.

Несмотря на это, содержание ретикулоцитов в периферической крови остается на уровне зимних значений, что свидетельствует об активном поступлении красных кровяных телец и в весенний период. Снижение показателей (рис. 3) отмечено лишь для третьей стадии (у самцов – $11.18 \pm 0.8\%$, у самок – $8.29 \pm 0.4\%$). Половые различия выражены в парциальном составе ретикулоцитов: у са-

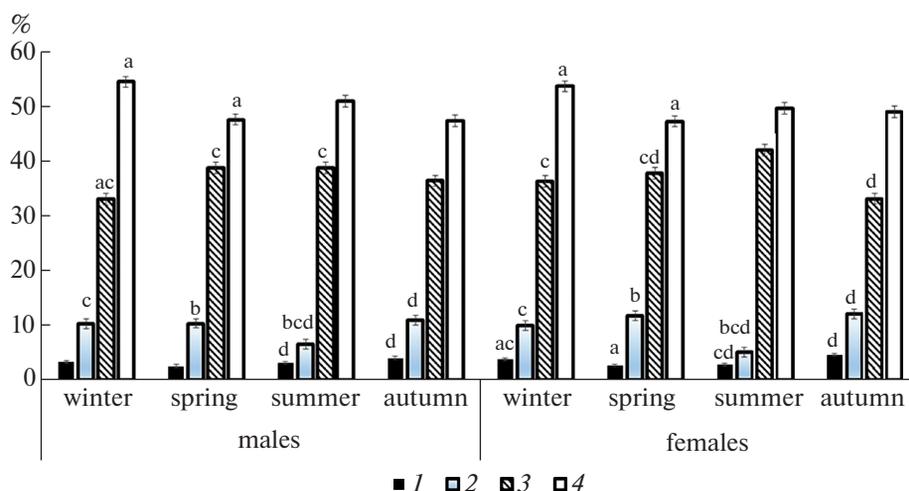


Рис. 2. Сезонная динамика содержания эритроидных клеток в костном мозге у малой лесной мыши (*A. uralensis*) в условиях среднегорий Центрального Кавказа.

1 – эритробласты, 2 – базофильные, 3 – полихроматофильные, 4 – оксифильные нормобласты.

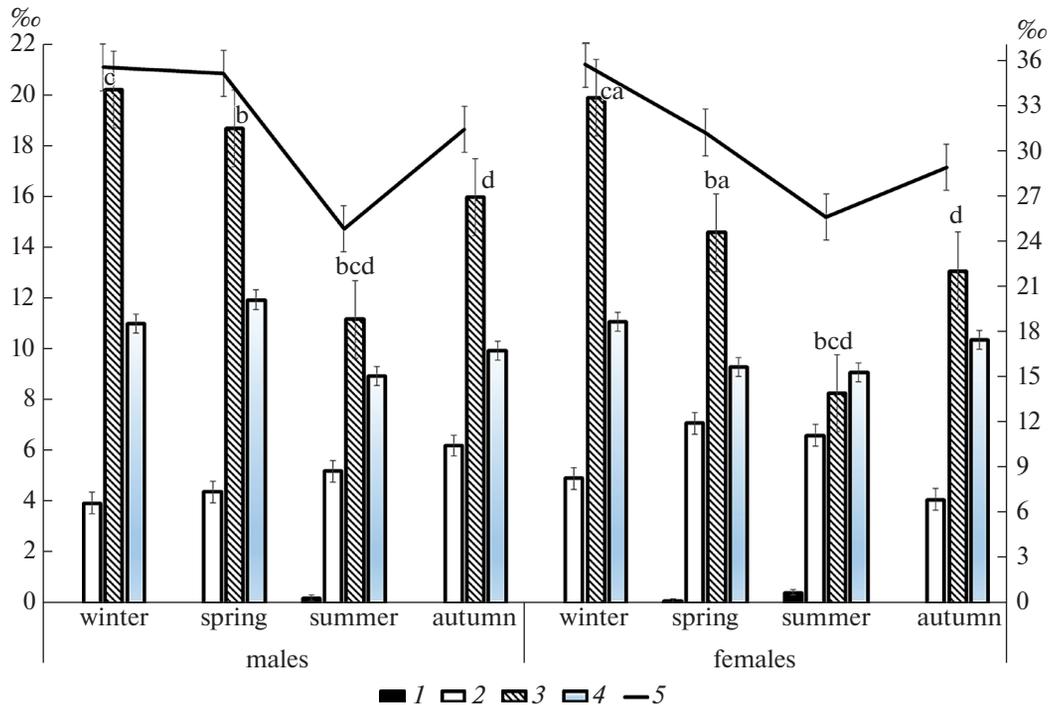


Рис. 3. Сезонная динамика содержания ретикулоцитов в периферической крови *Apodemus uralensis* Pall.) в условиях Центрального Кавказа (пос. Эльбрус, 1800 м над ур. м.)

I – I стадия, II – стадия, III – стадия, IV – стадия, 5 – общее количество ретикулоцитов.

цов и $2.86 \pm 0.2\%$ у самок), значительно снижается (рис. 2) количество базофильных нормобластов (6.57 ± 0.5 и $5.09 \pm 0.4\%$ соответственно). Численные данные по полихроматофильным и оксифильным нормобластам – близки с весенними показателями. Летом в периферической крови по результатам дисперсионного анализа наблюдается снижение поступления ретикулоцитов, по сравнению с весной (рис. 3), за счет более зрелых клеток (в основном III стадии). При этом возрастает (рис. 3) доля молодых стадий (отмечены клетки первой стадии и несколько увеличивается количество второй). Число эритроцитов в периферической крови летом проявляет тенденцию к снижению. У самцов *A. uralensis* среднее содержание гемоглобина в эритроците сохраняется на уровне весенних значений, а у самок наблюдается его рост (до уровня самцов). Содержание гемоглобина в крови, гематокритный показатель остаются близкими с весенними данными (табл. 2). У самцов близки также летние и весенние показатели по средней концентрации гемоглобина и среднему объему эритроцитов. Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные, как и в предыдущие сезоны, процесс поступления молодых эритроцитов (полихроматофильных) увеличен. В эритроцитах 83.3% изученных животных обнаружены тельца Хауэлла-Жолли. Половые различия по изученным параметрам системы крови в данном сезоне выра-

жены (по полихроматофильным нормобластам, ретикулоцитам III стадии).

Система крови A. uralensis в осенний период (октябрь). Кроветворные клетки костного мозга осенью на препаратах размешались равномерно. Эритроидные клетки встречались в каждом поле зрения в количестве до 40, отмечены клетки в стадии митоза (1–2 не в каждом поле зрения). Дисперсионный анализ показал, что осенью количество клеток эритроидного ряда в костном мозге малой лесной мыши значительно снижается (у самцов и самок $p = 0.01$), по сравнению с летним периодом. При этом в парциальной эритрограмме у особей обоих полов повышается содержание эритробластов (у самцов – $4.07 \pm 0.3\%$, у самок – $4.61\% \pm 0.2\%$) и базофильных нормобластов (11.10 ± 0.5 и $12.13 \pm 0.7\%$ соответственно). Доля более зрелых клеток – полихроматофильных (достоверно у самок) снижается. Процесс поступления молодых эритроцитов (ретикулоцитов) в кровь осенью у *Apodemus uralensis* более интенсивен по сравнению с летним периодом, однако различия у самок не достигают уровня достоверных различий (у самцов $p = 0.01$, у самок $p = 0.264$). Изменения наблюдаются в парциальном составе ретикулоцитов: увеличивается число клеток третьей стадии (у самцов 11.18 ± 0.8 , $p = 0.03$, у самок 8.29 ± 0.4 , $p = 0.01$).

Данные, полученные по ретикулоцитам, вполне согласуются с увеличением содержания эритроци-

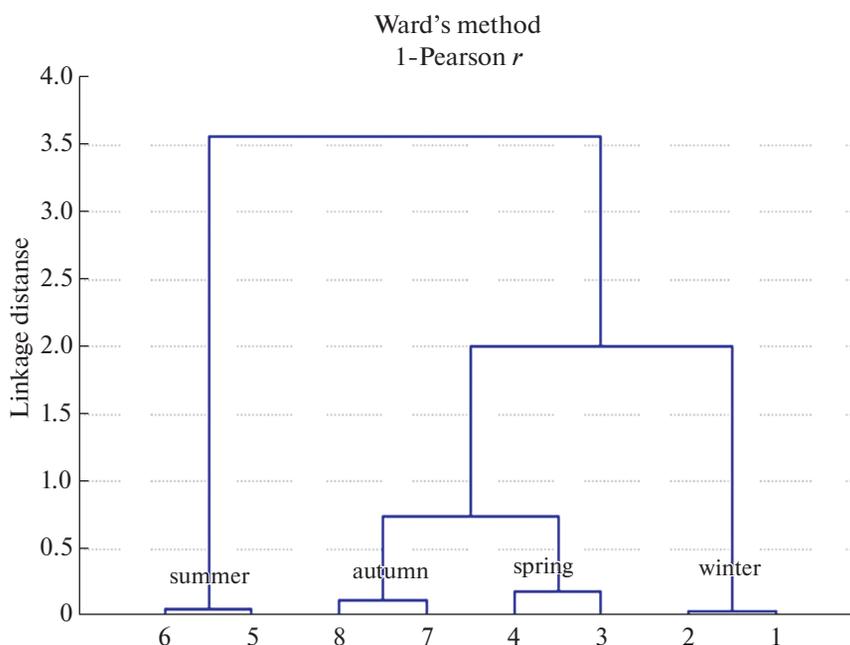


Рис. 4. Кластерный анализ по системе крови (20 параметров костного мозга, периферической крови) малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall.) в условиях Центрального Кавказа (пос. Эльбрус, 1800 м над ур. м.).

тов в периферической крови. Осенью изменяются не только количественные, но и качественные характеристики этих клеток: они меньшего диаметра и объема и менее насыщены гемоглобином, по сравнению с летними (табл. 2). Морфологический анализ эритроцитов на препаратах крови показал, что они нормохромные и процесс поступления молодых эритроцитов (полихроматофильных) не нарушен. Тельца Хауэлла-Жолли в эритроцитах встречаются, но меньше, чем летом – 60%.

В крови осенью содержание гемоглобина, гематокритный показатель близки к летним значениям.

Как видно из рис. 4, кластерный анализ по расстоянию Махаланобиса (Ward's method, 1 Pearson r) на основе показателей эритропоэза, ретикулоцитов периферической крови показал разделение выборок на 3 кластера. Выборки весны и осени наиболее сходны и образуют один кластер, который обладает большим сходством с зимними выборками, чем с летними.

Летние выборки отличаются от выборок других сезонов и образуют отдельный кластер. По изученным параметрам системы крови выявлена параллельная изменчивость самцов и самок малой лесной мыши.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ сезонной изменчивости эритропоэза свидетельствует о том, что у *A. uralensis* в среднегорьях эльбрусского варианта Центрального Кавказа кроветворная функция костного мозга сохраняется

на высоком уровне в течение всего годового цикла, и подвержена сезонной изменчивости. Наиболее активное обновление крови наблюдается в зимний и летний периоды, и менее активное – в весенний и осенний. Процесс поступления молодых эритроцитов (ретикулоцитов) из костного мозга в периферическую кровь наиболее интенсивен зимой, сохраняется на высоком уровне в весенний период, а минимален – летом. Концентрация гемоглобина в крови *A. uralensis* в среднегорьях Центрального Кавказа стабильно поддерживается на высоком уровне в течение всего годового цикла. По всей вероятности, обитание в условиях хронической гипоксии обуславливает необходимость высокого оснащения организма *A. uralensis* кислородом независимо от сезона года. В способах поддержания необходимой кислородной емкости крови в разные сезоны года имеются существенные различия, что подтверждается результатами кластерного анализа.

Так, в летний период в периферическую кровь, при активном эритропоэзе, из костного мозга поступает относительно небольшое количество молодых эритроцитов (ретикулоцитов). Есть мнение [16], что ретикулоцит, который не прошел барьер, образованный стенкой сосудистого эндотелия, созревает в паренхиме, утрачивает способность диапедеза, остается блокированным и фагоцитируется макрофагами. Эти эритроциты входят в состав неэффективного эритропоэза.

Эритроциты *A. uralensis* в среднегорьях Центрального Кавказа в летний период имеют качественные особенности: они более крупные по сво-

им размерам (диаметр, объем), с большим содержанием гемоглобина. При этом их количество летом падает до минимальных значений в годовом цикле. Высокая эритропоэтическая активность костного мозга при одновременном разжижении крови может способствовать увеличению кислородной емкости крови, при расчете на единицу массы тела [17].

Лесные мыши характеризуются относительным несовершенством физической терморегуляции и энергетические затраты их организма весьма значительны [18]. В зимний сезон, с низкими температурами внешней среды, который предполагает более высокий уровень метаболизма для поддержания постоянной температуры тела, эритропоэтическая активность костного мозга *A. uralensis* также высока, но с выходом большого количества ретикулоцитов (молодых эритроцитов) в периферическую кровь. Число эритроцитов в крови достигает максимальных значений в годовом цикле, причем размеры (диаметр и объем) этих клеток — минимальны. Все это обусловлено увеличением общей поглотительной поверхности для кислорода, а соответственно, более эффективным обеспечением организма кислородом. Известно [19], что меньшие по размеру эритроциты имеют более эффективный обмен кислорода. Увеличение доли “мелких” эритроцитов в период значительного снижения температуры среды [20, 21] объяснимо и с физико-химических позиций: чем более мелкодисперсная среда, тем больше площадь соприкосновения двух фаз, выше скорость диффузии. Большое число мелких эритроцитов в крови зимой обнаружено у ряда грызунов [11, 22–24]. Существует мнение, что уменьшение размеров эритроцитов зимой может быть генетически детерминированным [25]. Так, у высокогорных *Phyllotis xanthopygus rupestris*, выдерживающих сезонный перепад температур по меньшей мере 20°C, потомство рожденное и выросшее в условиях постоянной температуры, сохраняет сезонную изменчивость размеров эритроцитов [25]. Все выше сказанное позволяет предположить, что изменение размеров эритроцитов в первую очередь обусловлено изменением температуры среды.

В весенний период кроветворная функция костного мозга *Apodemus uralensis* снижается. Однако содержание ретикулоцитов, причем и более молодых стадий, в крови высокое, при довольно значительном снижении количества эритроцитов в периферической крови. Можно полагать, что это обусловлено увеличением эритродиереза, т.е. наблюдается усиленный распад красных клеток крови. В этот период года, по нашему мнению, и происходит замещение “мелких” зимних эритроцитов на крупные клетки.

В осенний сезон изученные показатели периферической крови, за исключением диаметра эритроцитов, ближе в основном к зимним значениям, при более низкой кроветворной активности костного

мозга и соответствующих более низких показателях содержания ретикулоцитов в крови.

В эритроцитах малой лесной мыши (у более 70% особей летом, около 60% в другие сезоны) в условиях гор Центрального Кавказа отмечены тельца Хауэлла-Жолли, которые являются мелкими остатками ядерного материала. У желтогорлой мыши в Словакии [26] этих включений в эритроцитах зимой меньше, чем в другие сезоны. Присутствие их, возможно, объясняется повышенной скоростью продуцирования эритроцитов в момент регенеративного ответа [16, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ комплекса гематологических показателей широко распространенного вида — *A. uralensis* в условиях среднегорий Центрального Кавказа позволил выявить сезонную динамику как в кроветворении, так и в показателях периферической крови.

Эритропоэтическая функция костного мозга вида в течение всего года поддерживается на высоком уровне, с выделением двух пиков: зимнего и летнего. При этом сезонные тренды поступления молодых эритроцитов (ретикулоцитов) отличны (максимальное — зимой, минимальное — летом). Динамика поступивших в кровь эритроцитов и содержания в них гемоглобина сходны: высокие показатели в холодный зимний сезон и низкие — в теплый летний. Изменчивость размеров эритроцитов — диаметра и объема — в противоположном направлении: максимальные значения — в весенне-летний период, минимальные — осенне-зимний. Наиболее изменчивыми в системе красной крови в сезонном аспекте являются эти показатели. В течение года стабильны — показатели содержания гемоглобина в крови и его концентрация в эритроцитах, гематокритный показатель. Относительно постоянные значения гематокритного числа *A. uralensis* обусловлены разнонаправленной сезонной динамикой размера и количества эритроцитов. Так, количество эритроцитов увеличивается в зимний период (что дает рост гематокритного числа), но одновременно средний диаметр эритроцита уменьшается. Соответственно, гематокритное число сохраняет относительно стабильные значения. Постоянство гематокрита позволяет избежать увеличения вязкости крови [27] при увеличении транспорта кислорода, что особенно важно в условиях действия хронической гипоксии.

Полученные нами данные свидетельствуют о высокой кислородной емкости крови *A. uralensis* в условиях гор Центрального Кавказа (1800 м над ур. м.) в течение всего годового цикла. При этом обеспечение высокого кислородного запаса вида в горах в разные сезоны года осуществляется разными способами. В осенне-зимний период — увеличением общей поглотительной поверхности для кисло-

рода, обусловленное увеличением количества эритроцитов и уменьшением их размеров. В весенне-летний – поступлением в кровотоки эритроцитов с качественно иными свойствами: более “крупных” с повышенным содержанием связывающего кислород гемоглобина (при относительно небольшом их количестве). Обнаруженные качественные изменения эритроцитов обуславливаются сезонными перестройками в эритропоэзе костного мозга.

У самцов и самок *A. uralensis* сезонная изменчивость по большинству изученных показателей синхронна. Половые различия по показателям системы красной крови у вида в условиях среднегорий Центрального Кавказа выражены слабо, вероятной причиной чего могут являться суровые климатические условия [28]. В отдельных случаях на сезонные изменения климатических факторов самцы реагируют быстрее самок, что согласуется с эволюционной теорией пола [29]. Так, объем эритроцитов и насыщение их гемоглобином достигают максимальных значений у самок летом, тогда как у самцов уже весной. В целом половые различия по показателям системы крови более выражены в весенне-летний период. Вероятнее всего это связано с процессами размножения и соответствующими изменениями гормонального фона.

Выявленная сезонная изменчивость в показателях костномозгового кроветворения и периферической крови малой лесной мыши обеспечивает поддержание, как оптимальной кислородной емкости крови, так и гомеостаза всего организма в горах Центрального Кавказа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института экологии горных территорий им. А.К. Темботова РАН по теме № 021-2019-0001.АН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (М.М. Емкужева, Ф.А. Темботова), сбор данных (М.М. Емкужева, З.Х. Боттаева, А.Х. Чапаев), обработка материала (З.Х. Боттаева, З.А. Берсекова, М.М. Емкужева), напи-

сание и редактирование статьи (М.М. Емкужева, Ф.А. Темботова).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность к.б.н. Э.Ж. Темботова, заведующей лабораторией экологии и эволюции позвоночных животных Института экологии горных территорий РАН к.б.н. с Е.П., Кононенко заведующему лабораторией по мониторингу лесных экосистем Института экологии горных территорий РАН к.б.н. Р.Х. Пшегусову за консультации и поддержку при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pamenter ME, Hall JE, Tanabe Y, Simonson TS* (2020) Cross-Species Insights Into Genomic Adaptations to Hypoxia. *Frontiers in Genetics* 11: 743. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00743>
2. *Storz JF* (2007) Hemoglobin function and physiological adaptation to hypoxia in high-altitude mammals. *J Mammal* 88: 24–31. <https://doi.org/10.1644/06-MAMM-S-199R1.1>
3. *Storz JF, Runck AM, Sabatino SJ, Kelly JK, Nuno F, Hideaki M, Weber RE, Angela F* (2009) Evolutionary and functional insights into the mechanism underlying high-altitude adaptation of deer mouse hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14450–14455. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905224106>
4. *Dzal YA, Sprenger RJ, Milsom WK* (2020) Postnatal changes in O₂ and CO₂ sensitivity in rodents. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 103313. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.103313>
5. *Dzal YA, Jenkin SEM, Lague SL, Reichert MN, York JM, Pamenter ME* (2015) Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology* 186: 4–26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.10.029>
6. *Pamenter ME, Powell FL* (2016) Time domains of the hypoxic ventilatory response and their molecular basis. *Comprehensive Physiology* 6 (3): 1345–1385. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150026>
7. *Dzal YA, Milsom WK* (2019) Hypoxia alters the thermogenic response to cold in adult homeothermic and heterothermic rodents. *J Physiology*. 597. 4809–4829. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.10.029>
8. *Темботов АК, Темботова ЭЖ, Берсекова ЗА, Емкужева ММ* (2005) Влияние градиента высоты местности на гематологические показатели одного из широко распространенных видов грызунов – малой лесной мыши (Muridae, Rodentia) на Центральном Кавказе. В кн.: Млекопитающие горных территорий М: КМК. 169–174. [*Темботов АК, Темботова ЭЖ, Берсекова ЗА, Емкужева ММ* (2005) Vliyanie gradienta vysoty mestnosti na gematologicheskie pokazateli odnogo iz shirokorasprostranennykh vidov gryzunov – maloi lesnoi myshi (Muridae, Rodentia) na Central'nom Kavkaze [Effect of the altitudinal gradient on hematological indexes of the wide-spread rodent – small common field mouse (Muridae, Rodentia) from the Caucasus]. In: Mle-

- kopitayushchie gornyh territorii. Moscow: KMK. 169–174. (In Russ)].
9. *Cadena V, Tattersall GJ* (2014) Body temperature regulation during acclimation to cold and hypoxia in rats. *J Thermal Biol* 46: 56–64. <https://doi.org/10.1113/j.p277183>
 10. *Соколов ВЕ, Темботов АК* (1989) Млекопитающие Кавказа: Насекомоядные. М.: Наука. [*Sokolov V.E., Tembotov A.K.* (1989) Mlekopitayushchie Kavkaza: Nasekomoyadnye [Mammals of the Caucasus: Insectivores]. Moscow: Nauka (In Russ)].
 11. *Темботов АК, Темботова ЭЖ, Темботова ФА, Емкужева ММ* (2009) Изменчивость гематологических параметров домашней мыши (*Mus musculus* L.) в предгорьях Центрального Кавказа. Усп. совр. биол. 129 (4): 370–378. [*Tembotov AK, Tembotova EZh, Tembotova FA, Emkuzheva MM* (2009) Variation of hematological parameters in the house mouse (*Mus musculus*) in the Central Caucasus piedmont. *Usp. sovr. biol.* 129: 370–378. (In Russ)].
 12. *Amshokova AKh, Tembotova FA* (2016) Differentiation of cryptic wood mice species of the subgenus *Sylvaemus* under different ecogeographic conditions in the Northern Caucasus. *Russ J of Ecol* 47: 376–382. <https://doi.org/10.1134/S1067413616040044>
 13. *Карасева ЕВ, Телицина АВ, Жигальский ОА* (2008) Методы изучения грызунов в полевых условиях. М.: ЛКИ. [*Karaseva E.V., Telitsyna A.Yu., Zhigal'ski O.A.* (2008) Metody izucheniya gryzunov v polevykh usloviyakh [Methods of study of rodents in natural habitats] Moscow: LKI. (In Russ)].
 14. *Меньшиков ВВ* (ред.) (2012) Стандартизация аналитических технологий лабораторной медицины. М.: Лабора. [*Men'shikov V.V.* (ed) (2012) Standartizaciya analiticheskikh tekhnologij laboratornoj mediciny [Standardization of analytical technologies in laboratory medicine] Moscow: Labora. (In Russ)].
 15. *Риган В, Сандерс Т, Деникола Д* (2000) Атлас ветеринарной гематологии. М.: Аквариум ЛТД. [*Reagan WJ, Sanders TG, DeNicola DB* (1998) Veterinary hematology atlas of common domestic species. Iowa State University Press].
 16. *Липунова ЕА, Скоркина МЮ* (2004) Система красной крови: Сравнительная физиология: монография. Белгород: БелГУ. [*Lipunova E.A., Skorkina M.Yu.* (2004) Sistema krasnoj krovi: Sravnitel'naya fiziologiya: monografiya [Red blood system: Comparative physiology]. Belgorod: BelGU. (In Russ)].
 17. *Барбашова ЗИ* (1981) Дыхательная функция крови. В кн.: Слоним А.Д. (ред) Экологическая физиология животных. Ч. II. Физиологические системы в процессе адаптации и факторы среды обитания: Руководство по физиологии. Л.: Наука [*Barbashova ZI* (1981) Dyhatel'naya funkciya krovi. In: Slonim A.D. (ed) Ekologicheskaya fiziologiya zhivotnyh. CH. II. Fiziologicheskie sistemy v processe adaptacii i faktory sredy obitaniya: Rukovodstvo po fiziologii. Leningrad: Nauka. (In Russ)].
 18. *Калабухов НИ* (1969) Периодические (сезонные и годовичные) изменения в организме грызунов, их причины и последствия. Л.: Наука, Ленингр. отд. [*Kalabuhov NI* (1969) Periodic changes in the body of rodents (seasons and consequences) Leningrad: Nauka (In Russ)].
 19. *Holland RA, Forster RE* (1966) The effect of size of red cells on the kinetics of their oxygen uptake. *J Gen Physiol* 49 (4): 727–742. <https://doi.org/10.1085/jgp.49.4.727>
 20. *Таракhtий ЭА, Сумин МН, Давыдова ЮА* (2009) Изменчивость показателей “красной” крови рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) в зависимости от сезона и репродуктивного состояния. Усп. соврем биол 129 (2): 191–197. [*Tarakhitii E.A., Sumin M.N., Davydova Yu.A.* (2009) Variability of red blood characteristics in bank vole (*Clethrionomys glareolus*) related to season and reproductive status of its individuals. *Usp sovrem biol* 129 (2): 191–197. (In Russ)].
 21. *Таракhtий ЭА, Мухачева СВ* (2018) Химическое и радиационное загрязнение природной среды: эффекты в клетках системы крови мелких млекопитающих. Радиационная биология. Радиоэкология. 58 (3): 293–304. [*Tarakhitii EA, Muxacheva SV* (2018) Chemical contamination and radiation environment: effects in the cells of the blood system of small mammals. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya.* 58. (3): 293–304. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803118030098>
 22. *Tarakhitii EA, Davydova YuA* (2007) Seasonal variation in hematological indices in bank vole (*Clethrionomys glareolus*) in different reproductive states. *Biol Bull Russ Acad Sci* 34: 9–19. <https://doi.org/10.1134/S1062359007010025>
 23. *Rewkieweir-Dziarska A* (1975) Seasonal changes in hemoglobin and erythrocyte indexes in *Microtus arvalis* (Pallas, 1779). *Bull Acad Polon Sci. Ser Sci Biol* 23: 481–486.
 24. *Perez-Suarei G, Arevalo F, Upez-Caballero, Lopez-Luna EP* (1990) Seasonal variations in hematological values and heart weight in two small mammals, a mouse: *Apodemus sylvaticus*, and a vole: *Pitymys duodecimcostatus*. *Acta teriologica* 35: 33–40.
 25. *Ruiz G, Rosenmann M, Cortes A* (2004) Thermal acclimation and seasonal variations of erythrocyte size in the Andean mouse *Phyllotis xanthopygus rupestris*. *Comparative biochemistry and physiology a-molecular & integrative physiology.* 139. 405–409. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.03.003>
 26. *Husáriková M, Janiga M, Kufelová M* (2015) Howell-Jolly bodies in peripheral blood of Yellownecked mouse (*Apodemus flavicollis*) living in the vicinity of pulp mill industrial complex. *Oecologia Montana* 24: 9–20.
 27. *Birchard GF* (1997) Optimal hematocrit: theory, regulation and implications. *Amer Zool* 37: 65–72. <https://doi.org/10.1093/icb/37.1.65>
 28. *De Lisle SP, Goedert D, Reedy AM, Svensson EI* (2018) Climatic factors and species range position predict sexually antagonistic selection across taxa. *Phil Trans R Soc B* 373: 20170415. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0415>
 29. *Geodakian VA* (2000) Evolutionary chromosomes and sex dimorphism. *Biol Bull.* 27: 99–113.

SEASONAL DYNAMICS OF ERYTHROPOIESIS IN THE PYGMY WOOD MOUSE (*APODEMUS URALENSIS*) OF THE CENTRAL CAUCASUS MOUNTAINS

**M. M. Emkuzheva^a, F. A. Tembotova^a, Z. A. Bersekova^a,
Z. Kh. Bottaeva^a, and A. Kh. Чапаев^a**

^a *Tembotov Institute of Ecology of Mountain Territories, Russian Academy of Sciences,
Nalchik, Russia*

A complex of erythropoietic parameters has been studied for the first time in a pygmy wood mouse *Apodemus uralensis* Pall., which is widespread in the Caucasus Mountains. Studies were carried out on adult animals captured in winter, spring, summer and fall in a pine forest (Elbrus National Park, KBR) at the height of about 1800 m above sea level. The seasonal dynamics of bone marrow erythropoiesis, the release of young erythrocytes (reticulocytes) into the peripheral blood, and the peculiarities of maintaining optimal blood oxygen capacity (BOC) during different seasons of the year under conditions of chronic oxygen deficiency were studied. Bone marrow erythropoiesis in *A. uralensis* is maintained at a high level throughout the annual cycle, while being most active in winter and summer compared to spring and fall. Living under conditions of chronic hypoxia necessitates a high oxygen supply to the organism of *A. uralensis* regardless of the season. However, in different seasons, BOC is maintained in different ways. During a cold fall–winter period, this is provided by an increase in the total cell surface area for oxygen absorption, whereas in a spring–summer period, this is achieved by the release of erythrocytes with qualitatively different properties into the bloodstream. The revealed seasonal variability in the parameters of the *A. uralensis* erythron ensures the maintenance of both the optimal BOC and whole-organism homeostasis in the middle mountains of the Central Caucasus.

Keywords: *Apodemus uralensis*, blood, erythrocyte, erythropoiesis, adaptation, seasonal variability

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕОНАТАЛЬНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ БОЛИ НА КОГНИТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ И РЕАКТИВНОСТЬ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС ПРЕПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА

© 2021 г. В. А. Михайленко^{1,*}, И. П. Буткевич¹, Е. А. Вершинина¹

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

*e-mail: viktormikhailenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.04.2021 г.

После доработки 27.05.2021 г.

Принята к публикации 29.05.2021 г.

Исследовали влияние воспалительной боли у новорожденных крысят на динамику содержания кортикостерона в плазме крови, а в поздний препубертатный период развития (45–53 дня) – на процессы пространственного обучения, кратковременной и долговременной памяти и реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС) к стрессу принудительного плавания у крыс обоего пола. Впервые обнаружено продолжительное усиление реактивности ГГАКС в ответ на периферический очаг воспалительной боли, вызванный инъекцией формалина, у новорожденных крысят, что дало возможность предполагать о модификации в развитии ГГАКС и возможном ее участии в регуляции когнитивных способностей. Обнаружено, что неонатальная боль вызывала дефицит пространственного обучения и памяти, проявив половой диморфизм в реализации процессов пространственного обучения и памяти. После регистрации долговременной памяти у 53-дневных крыс в ответ на принудительное плавание обнаружено повышенное содержание кортикостерона по сравнению с базальным уровнем, но различий в уровне гормона между крысами с неонатальной болью и контрольными животными, как и половых различий, не было выявлено. Таким образом, у крыс в поздний препубертатный период развития не обнаружено прямой взаимосвязи между активацией ГГАКС неонатальной болью и показателями пространственного обучения и памяти, что, вероятно, указывает на вовлечение других нейробиологических систем на влияние неонатальной боли на когнитивные способности.

Ключевые слова: неонатальная воспалительная боль, кортикостерон, поздний препубертатный период, когнитивные процессы, крыса

DOI: 10.31857/S0044452921050041

ВВЕДЕНИЕ

Неонатальный и препубертатный (подростковый) периоды относятся к критическим периодам развития, которые характеризуются реорганизацией нейробиологических систем, включая ГГАКС, репродуктивную систему и различные нейротрансмиттерные системы [1–5]. Интенсивно протекающее структурно-функциональное созревание головного мозга в критические периоды определяют повышенную реактивность нервной системы к болевым раздражителям [6, 7]. Боль в раннем возрасте модифицирует в постнатальном онтогенезе не только ноцицепцию [8], но и функциональную активность ГГАКС [9], что в дальнейшем вызывает изменения разных типов поведения [6]. Ранее нами было обнаружено, что очаг воспалительной боли на периферии у новорожденных крысят являет-

ся фактором риска формирования тревожно-депрессивного состояния, усиления болевого ответа и ухудшения процесса обучения при достижении животными раннего препубертатного периода развития (25–35 дней) [10]. В многочисленных исследованиях показано, что стресс, не связанный с болью, модифицирует развитие ГГАКС, что в дальнейшем проявляется в ухудшении процессов обучения и памяти у взрослых [11, 12], но не известно, на каком этапе развития становятся очевидными последствия именно болевого стресса, нередко встречающегося в неонатальной клинике. Данные литературы позволяют сопоставлять уровень развития головного мозга новорожденного крысенка с уровнем развития головного мозга недоношенного ребенка [13], поэтому в настоящей работе мы использовали одно- и двухсуточных крыс в качестве

модели для исследования влияний повторной воспалительной боли у рожденного раньше срока ребенка (модель недоношенной беременности). На основании разных критериев развития нервной системы и поведения у крысы были установлены границы препубертатного периода развития с 21-го по 59-й постнатальный день [14]. Использование разнополых особей способствует изучению механизмов исследуемых явлений. Однако работы преимущественно проводятся только на самцах [15, 16]. Известно, что половое созревание у самок начинается с 35 ± 2 -го дня, а у самцов с 42 ± 2 -го дня [2], поэтому мы использовали 45–53-дневных крыс (поздний препубертатный период), у которых уже могут проявиться половые различия в когнитивных процессах. В подростковом периоде начинают проявляться последствия негативных воздействий, которые испытал организм в раннем возрасте. Изучение этих последствий на разнополых особях именно на этом этапе индивидуального развития является важным направлением в исследовании механизмов неврологических и когнитивных нарушений с целью их возможной коррекции и восстановления нормальной жизнедеятельности.

В настоящей работе мы исследовали ранее не изученное влияние воспалительной боли у новорожденных крысят на реактивность ГГКС, а в позднем препубертатном периоде (45–53 дней) — на процессы пространственного обучения, памяти и на реактивность ГГКС к стрессу принудительного плавания у самцов и самок крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на потомстве крыс линии Вистар, полученных из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург) и доставленных в виварий лаборатории. Все процедуры работы с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации; протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. В виварии лаборатории взрослые самки и самцы, как и их потомство, содержались в стандартных условиях (свободный доступ к стандартизированной пище и воде, 12:00–12:00 включение и выключение света в 8 ч, $22\text{--}23^\circ\text{C}$). Беременность определяли по мазку из влагалища на следующий день после подсадки. После рождения крысят (P0, постнатальный день) в каждом помете оставляли не более восьми животных. Для определения реактивности ГГКС у новорожденных крысят в ответ на создание очага воспалительной боли были использованы самки и самцы (по два самца и две самки от каждой мате-

ри), рожденные от пятнадцати матерей (эксперимент 1). Крысята в первый день после рождения были подвергнуты подкожной инъекции воспалительного агента формалина (2.5%, 0.5 мкл) в подошву задней конечности (контроль — инъекция физиологического раствора). Через 30 мин после этой процедуры декапитацией собирали кровь у одной группы крысят, у крысят второй группы — через сутки, третьей группы — через семь суток для дальнейшего определения содержания кортикостерона в плазме крови (в каждой экспериментальной и контрольной группе 6–8 крысят). Кровь у новорожденных собирали в одну пробирку от одного самца и одной самки.

Для изучения влияния неонатального болевого воздействия на когнитивные способности и реактивность ГГКС у крыс, рожденных от 16 матерей, в препубертатный период развития очаг воспалительной боли создавали аналогично вышеописанному в одно- и повторно двухдневном возрасте инъекцией формалина в подошву задней конечности, спинку этих подопытных крысят маркировали (эксперимент 2). Контрольным крысятам инъецировали физиологический раствор в подошву задней конечности в то же место, в том же объеме. Каждая группа состояла из 12–16 животных. Крысят возвращали в гнезда к своим матерям, где они находились до 30-дневного возраста, затем разнополых крыс рассаживали в разные клетки.

С 45-дневного возраста оценивали способность к пространственному обучению нахождения платформы в водном лабиринте Морриса [17, 18]; тренировочные пробы продолжались в течение пяти дней. План обучения каждый день был одинаков для каждого животного: по четыре попытки в первой пробе, перерыв четыре минуты, и четыре попытки во второй пробе; местоположение платформы в бассейне было постоянным. Бассейн был условно разделен на четыре квадранта. В первую попытку крысу помещали в 1-й квадрант бассейна, во вторую — во 2-й, в третью — в 3-й и, наконец, в четвертую попытку — в 4-й квадрант бассейна. В бассейне (диаметр 120 см, высота 72 см), наполненном до 40 см водой (24°C), замутненной мелом, в одном из квадрантов ниже воды на 2 см находилась платформа, которую крыса должна была найти в течение 60 с. На платформе крыса находилась 20 с, во время которых она могла свободно ориентироваться в пространстве по окружающим предметам, затем ее помещали на 15 с в сухую клетку для отдыха. В каждой попытке регистрировали латентный период достижения платформы. На пятый день после первой пробы крыс оставляли в сухой клетке на 1 ч в другом помещении. Затем у этих животных регистрировали кратковременную память, для чего

крысу помещали в бассейн без платформы и регистрировали латентный период достижения целевого квадранта, места, где в тренировочных пробах находилась платформа. После регистрации кратковременной памяти крыс вытирали и возвращали в свои клетки. Через 96 ч после регистрации кратковременной памяти регистрировали долговременную память в тех же условиях, что и кратковременную память. Кроме латентного периода нахождения целевого квадранта регистрировали время, в течение которого крыса находилась в целевом квадранте за период времени, равный 60 с. Регистрацию в водном лабиринте Морриса проводили как визуально, так и с помощью вебкамеры и регистрации на компьютере с использованием специальной компьютерной программы.

Определение реактивности ГАКС у крыс в ответ на принудительное плавание осуществляли через 30 мин после завершения регистрации долговременной памяти. Кровь собирали декапитацией у самцов и самок в разные пробирки, центрифугировали плазму и хранили при -20°C до проведения иммуноферментного анализа (ИФА) на содержание кортикостерона.

Статистический анализ для первой (а) и второй (б) проб, статистические сравнения влияния воздействия, пола и дня тестирования проведены с помощью многофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Факторы: пол (самцы, самки), воздействие (формалин, физиологический раствор) и дни (1, 2, 3, 4, 5) для первой пробы и дни (1, 2, 3, 4) для второй пробы. Влияние воздействия, пола и дня тестирования на пространственную кратковременную и долговременную память проверяли с использованием смешанного дисперсионного анализа ANOVA, факторы: пол (самцы, самки), воздействие (формалин, контроль), латентность (кратковременная/долговременная память), время пребывания в целевом квадранте (кратковременная/долговременная память). Для кортикостерона новорожденных и 53-дневных крыс статистический анализ проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа. Факторы для новорожденных: время после инъекции формалина: 30 мин, 1 сутки, 7 суток, и воздействие: базальный уровень, физиологический раствор и формалин; факторы для 53-дневных: пол и воздействие: базальный уровень, физиологический раствор и формалин. Парные сравнения между группами проведены с помощью теста Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пространственное обучение. В препубертатный период развития, как у контрольных, так и у под-

опытных крыс, обнаружена способность к пространственному обучению: латентный период достижения платформы уменьшился к пятому тренировочному дню. Для первой пробы (а) получены значимые главные эффекты для факторов день: $F(2.6\ 152.7) = 122$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.678$ (Greenhouse-Geisser тест) и воздействие: $F(1, 58) = 8$, $p = 0.007$, $\eta^2 = 0.120$. Хотя взаимодействие пола и воздействия не было получено, различия между формалином и контролем проводились отдельно для самцов и самок в целях единообразия представления результатов в первой и второй пробе. Post-hoc анализ показал, что неонатальная воспалительная боль нарушила процесс обучения у самцов, увеличив у них латентность в первой пробе в первый ($p = 0.017$) и пятый ($p = 0.002$) тренировочные дни, у самок в третий и четвертый день ($p < 0.05$, в обоих случаях (рис. 1а).

Для второй пробы (б) получены главные эффекты для факторов день: $F(1.9\ 109.7) = 19.4$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.250$ (Greenhouse-Geisser тест), воздействие: $F(1, 58) = 14.7$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.202$, пол: $F(1, 58) = 12$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.172$, а также взаимодействие пола и воздействия: $F(1, 58) = 4$, $p = 0.05$, $\eta^2 = 0.062$. Post-hoc анализ показал, что неонатальная боль увеличила латентный период у самцов (в первый, третий и четвертый день $p = 0.011$, $p = 0.003$ и $p = 0.04$ соответственно) (рис. 1б). Половые различия выявлены во второй пробе у крыс с неонатальной болью с более высокой латентностью у самцов (в 1, 3 и 4 день, $p = 0.024$, $p = 0.01$ и $p = 0.04$ соответственно) (рис. 1б).

Пространственная кратковременная и долговременная память. Смешанный дисперсионный анализ ANOVA обнаружил значимый главный эффект только для воздействия во времени пребывания в целевом квадранте (кратковременная/долговременная память) $F(1.56) = 6.5$, $p = 0.013$, $\eta^2 = 0.105$. Неонатальная боль не изменила кратковременную память у крыс обоего пола, о чем свидетельствовало отсутствие изменений в латентном периоде достижения целевого квадранта, в котором находилась платформа во время обучения. Парные сравнения по Бонферрони показали, что неонатальная боль вызвала дефицит долговременной памяти только у самцов, у которых латентность увеличилась ($p < 0.01$) по сравнению с латентностью у контрольных самцов, тогда как у особей женского пола неонатальная боль нивелировала различия в латентности между долговременной и кратковременной памятью, которые были обнаружены у контрольных самок с большей эффективностью осуществления задачи в долговременной памяти ($p < 0.05$) (рис. 2а).

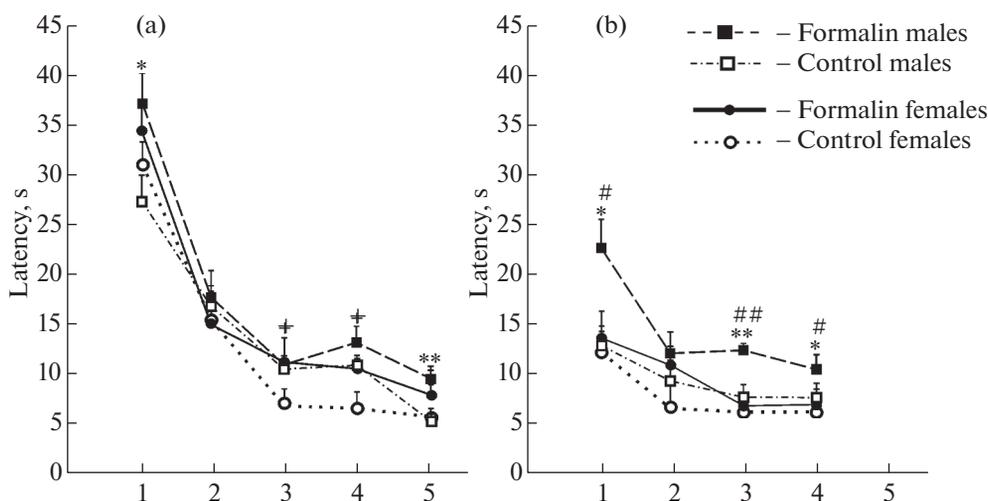


Рис. 1. Латентный период достижения платформы в водном лабиринте Морриса в первую пробу – в течение пяти дней (а), и вторую пробу – в течение четырех дней (б), у самцов и самок крыс препубертатного возраста, подвергнутых в новорожденном состоянии воспалительной боли.

По вертикали: латентный период (с), по горизонтали: номера тренировочных дней. В первой пробе уровень значимости: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, различия между формалином и контролем у самцов; + $p < 0.05$, различия между формалином и контролем у самок. Во второй пробе уровень значимости: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, различия между формалином и контролем у самцов; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ половые различия.

При оценке памяти по другому показателю, времени пребывания в целевом квадранте неонатальная боль вызвала дефицит в кратковременной и долговременной памяти у самцов: уменьшение показателя в обоих случаях ($p < 0.05$) по сравнению с временем пребывания в целевом квадранте у контрольных самцов. Различия в эффективности между кратковременной и долговременной памятью отсутствовали как у контрольных, так и у подопытных крыс (рис. 2b).

Кортикостерон в плазме крови у новорожденных в ответ на боль, вызванную формалином. Здесь получены значимые главные эффекты для обоих факторов и значимо взаимодействие времени и воздействия, $F(2.47) = 75.6$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.763$, $F(2.47) = 26.3$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.528$ и $F(4.47) = 9.7$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.451$, время и воздействие соответственно. Post-hoc анализ показал, что содержание кортикостерона в плазме крови в ответ на воспалительную боль в новорожденном возрасте увеличилось через 30 мин по сравнению с уровнем гормона у контрольных крыс и базальным уровнем. Через сутки эти различия сохранялись, исключая различия между базальным кортикостероном и уровнем гормона у контрольных крыс; через семь дней подобные соотношения наблюдались на уровне тенденции (табл. 1).

Кортикостерон в плазме крови у 53-дневных самцов и самок крыс после регистрации долговременной памяти в ответ на принудительное плавание. Здесь

значим главный эффект воздействия: $F(2.36) = 13.1$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.421$. Post-hoc анализ показал, что содержание кортикостерона в плазме крови у подопытных и контрольных крыс было выше по сравнению с базальным уровнем гормона, но различий в уровне гормона между подопытными и контрольными крысами, как и между полами, не было выявлено (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Приоритетные данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что воспалительная неонатальная боль, вызванная инъекцией формалина в подошву задней конечности, увеличивает у новорожденных крысят содержание кортикостерона в плазме крови по сравнению с контролем. Повышенный уровень стрессорного гормона сохраняется через сутки после инъекции. Периферический очаг воспаления в новорожденном состоянии повышает уязвимость когнитивных процессов у этих животных в поздний препубертатный период развития, притом четко проявляется половой диморфизм в протекании процессов пространственного обучения и кратковременной, и долговременной памяти. Однако не было выявлено прямой взаимосвязи между активацией ГГКС неонатальной болью у новорожденных и показателями пространственного обучения и памяти у крыс в позднем препубертатном возрасте.

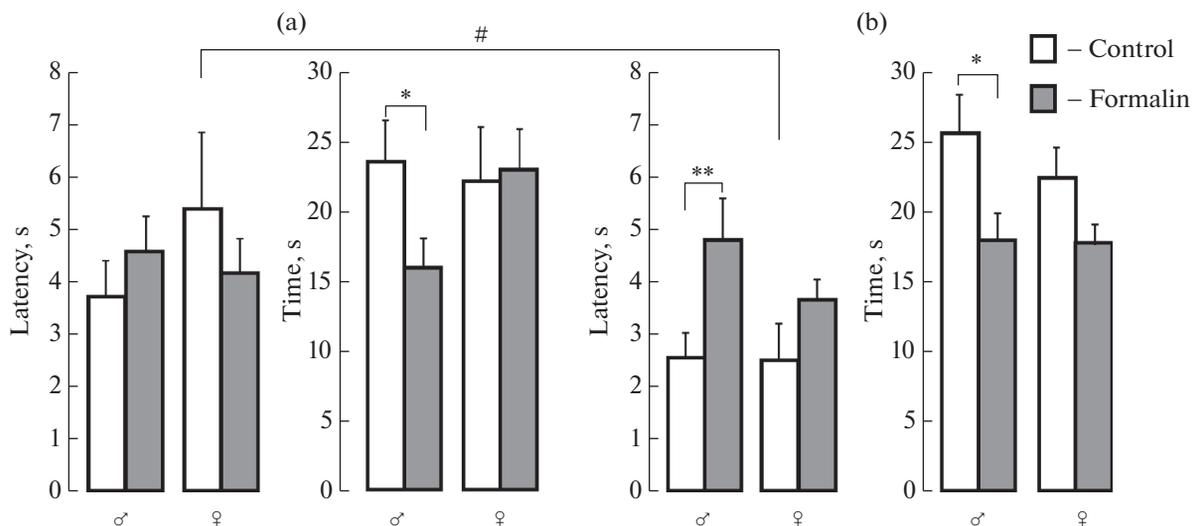


Рис. 2. Регистрация кратковременной (а) и долговременной (б) памяти в водном лабиринте Морриса у самцов и самок крыс препубертатного возраста, подвергнутых в новорожденном состоянии воспалительной боли.

По вертикали: латентный период достижения целевого квадранта (с) и время нахождения в целевом квадранте (с). Белые столбики – контроль, темные столбики – формалин. Уровень значимости: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, различия между формалином и контролем у самцов; # $p < 0.05$, различия в латентном периоде достижения целевого квадранта между кратковременной и долговременной памятью у контрольных самок.

Полученные данные указывают на то, что неонатальная боль вызывает дефицит пространственного обучения у самцов в первой и второй тренировочных пробах, а у самок – только в первой; даже в последний пятый день латентный период достиже-

ния платформы был значительно больше по сравнению с контролем у самцов. Вторая за день тренировочная проба наглядно продемонстрировала ухудшение способности повторить выполнение задачи (спустя 4 мин после отдыха)

Таблица 1. Влияние инъекции формалина или физиологического раствора в подошву задней конечности у новорожденных крысят на уровень кортикостерона в плазме крови через разные интервалы времени и у 53-дневных самцов и самок крыс в ответ на принудительное плавание после тестирования долговременной памяти

Возраст животных	Уровень кортикостерона (нмоль/л)								
	Базальный уровень			Время после введения веществ					
				Физиологический раствор (Контроль)			Формалин		
	Новорожденные	Одно-суточные	Семи-суточные	30 мин	24 ч	7 сут	30 мин	24 ч	7 сут
С 1-го по 7-й день	248.2 ± 67.3	184.9 ± 79.6	77.3 ± 28.3	449.3 ± 190.1**	211.9 ± 62.1	97.5 ± 31.2	721.6 ± 144.1 ⁺⁺ ***	331.6 ± 45.8 ⁺ *	110.7 ± 39.3
53-дневные	После теста Морриса + принудительное плавание								
Самцы	166.5 ± 131.1			618.5 ± 233.6**			552.8 ± 108.0*		
Самки	172.4 ± 79.2			610.3 ± 107**			577.2 ± 107.0**		

Уровень значимости: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ между контролем, формалином и базальным уровнем кортикостерона; ⁺ $p < 0.05$; ⁺⁺ $p < 0.01$, между формалином и контролем.

у самцов. Именно во второй пробе обнаружены половые различия в латентном периоде достижения целевого квадранта.

При исследовании пространственной кратковременной и долговременной памяти более яркое влияние неонатальной боли проявилось в показателе продолжительности пребывания в целевом квадранте, чем в показателе латентности достижения платформы. У самцов неонатальная боль вызвала дефицит как кратковременной, так и долговременной памяти. Следует подчеркнуть, что в позднем препубертатном возрасте отсутствовали различия в эффективности выполнения задачи между кратковременной и долговременной памятью, как у контрольных, так и у подопытных крыс.

Нам известно лишь о нескольких исследованиях, выполненных на грызунах, по изучению влияния неонатальной воспалительной боли, вызванной каррагеном или адьювантом Фрейнда, на память. Например, воспалительная боль, вызванная внутриплантарной инъекцией каррагена (1%) в первый день жизни (P0), привела к дефициту пространственной памяти у взрослых крыс [19], а также изменила регуляцию ГГКС [20]. Инъекция адьюванта Фрейнда на P1 не оказала влияния на кратковременную или долговременную память у крыс на P60, но привела к пространственному дефициту обучения у самцов крыс [21]. Боль, вызванная у новорожденных крыс инъекцией формалина, который производит менее длительную боль, чем воспалительная боль, вызванная каррагеном или адьювантом Фрейнда, нарушила пространственное обучение и память в радиальном лабиринте, в котором используется пищевое подкрепление, у взрослых крыс [22]. Не обнаруженная нами взаимосвязь между активацией ГГКС неонатальной болью у новорожденных и показателями пространственного обучения и памяти у крыс в позднем препубертатном возрасте может быть обусловлена использованием разной интенсивности действия воспалительных агентов и разным их стрессорном влиянии на ГГКС.

Ранее мы показали, что воспалительная боль на P1 и P2 не изменила пространственное обучение у 33-дневных самок-подростков в течение только одного тренировочного дня [23]. Более детальное и продолжительное изучение последствий воспалительного болевого воздействия на когнитивные способности и стресс-гормональную систему в подростковом возрасте особенно важно, так как нейробиологические и поведенческие изменения существенно различаются на разных стадиях под-

росткового возраста, и эти изменения, вызванные стрессовыми раздражителями в раннем возрасте, могут проявляться неодинаково на каждой из этих стадий.

Гиппокамп, медиальная префронтальная кора и миндалина, структуры мозга, вовлеченные в регуляцию ГГКС [24] и когнитивных способностей [25], могут влиять на чувствительность ГГКС к половым гормонам и изменять процессы обучения и памяти. Поэтому не исключено, что половые гормоны могут быть одной из причин обнаруженных нами различий в процессах обучения и памяти между самцами и самками в этот критический период развития крысы.

Полученное нами впервые продолжительное усиление реактивности ГГКС в ответ на воспалительную боль, вызванную инъекцией формалина в подошву задней конечности, у новорожденных крысят, позволило предполагать о модификации в развитии ГГКС и возможном ее участии в изменении когнитивных способностей. Ноцицептивная система и ГГКС тесно связаны благодаря восходящим проекциям от дорсального ядра шва, к паравентрикулярному ядру гипоталамуса, а также нисходящим проекциям из гипоталамуса к центру серотонинергических нейронов головного мозга. Однако наши эксперименты показали, что активация ГГКС неонатальной болью не имеет прямой взаимосвязи с пространственным обучением и памятью у крыс позднего препубертатного возраста. Во влияние боли у новорожденных могут быть включены и другие физиологические системы, такие как иммунная система, которая находится в тесном взаимодействии с ГГКС, реагирует на воспаление и стресс и поэтому может влиять на нейроны мозга и когнитивные функции. Половые различия в микроглии, нейроиммунных клетках, начинают проявляться в пренатальный период организации половой дифференциации мозга [26], и иммунная система начинает функционировать как регулятор половых различий в развитии мозга и поведения [27, 28]. Современные данные указывают на взаимодействие иммунной и половой систем с ГГКС системой [29]. Взаимосвязь между вышеперечисленными системами может обуславливать наблюдаемые нами и половые различия во влиянии неонатальной боли на пространственное обучение и память. Можно предположить, что неонатальная боль, нарушая процессы торможения и возбуждения в центральной нервной системе, изменяет синхронизацию развития ГГКС, гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГГС) и иммунной системы, которые тесно взаимодейству-

ют друг с другом и влияют на нейропластичность структур, вовлеченных в процессы обучения и памяти.

Надо отметить, что границы препубертатного периода развития с 21-го по 59-й постнатальный день [14] варьируют в зависимости от применяемых критериев (морфогенетические, поведенческие и нейрогормональные). Использование разнополюх особей способствует изучению механизмов исследуемых явлений [30]. Вопрос о влиянии неонатальной воспалительной боли на когнитивные процессы и об участии в этом процессе ГТАКС в ходе постнатального онтогенеза требует дальнейших исследований [31]. Полученные нами в настоящей работе результаты на крысах позднего препубертатного возраста, подвергнутых в новорожденном состоянии воспалительной боли, могут быть полезны педиатрам при лечении когнитивных отклонений у подростков с учетом полового диморфизма. Работы, проводимые на животных с использованием модели недоношенной беременности человека, должны осуществляться в тесной связи с исследованиями педиатров с целью фармакологической коррекции нарушений, вызванных неонатальной болью, у подростков с учетом полового диморфизма.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-04-00214а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.А. Михайленко, И.П. Буткевич), сбор данных (И.П. Буткевич, В.А. Михайленко), обработка данных (Е.А. Вершинина), написание и редактирование манускрипта (И.П. Буткевич, В.А. Михайленко, Е.А. Вершинина).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность старшим лаборантам-ассистентам лаборатории онтогенеза нервной системы Е.Н. Лавровой и Н.А. Улановой, за помощь в проведении экспериментов, а также д.б.н. Е.И. Тюлькову (лаб. регуляции функций нейронов мозга, зав. д.б.н. Е.А. Рыбникова) за проведение количественного анализа кортикостерона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Romeo RD* (2010) Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol* 31: 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.02.004>
2. *McCormick CM, Mathews IZ* (2010) Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmac. Biol. Psychiatry*. 34: 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.09.019>
3. *Novak CM, Ozen M, Burd I* (2018) Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. *Clin. Perinatol*. 45: 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2018.01.015>
4. *Renz H, Adkins BD, Bartfeld S, Blumberg RS, Farber DL, Garssen J, Ghazal P, Hackam DJ, Marsland BJ, McCoy KD, Penders J, Prinz I, Verhasselt V, von Mu-tius E, Weiser JN, Wesemann DR, Hornef MW* (2018) The neonatal window of opportunity-early priming for life. *J. Allergy Clin. Immunol*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.019>
5. *Rulli SB, Cambiasso MJ, Ratner LD* (2018) Programming of the reproductive axis by hormonal and genetic manipulation in mice. *Reproduction*. 156: 101–109. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0054>
6. *Williams MD, Lascelles BDX* (2020) Early Neonatal Pain-A Review of Clinical and Experimental Implications on Painful Conditions Later in Life. *Front. Pediatr*. 7: 8–30. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00030>
7. *Melchior M, Kuhn P, Poisbeau P* (2021) The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur. J. Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.15153>
8. *Walker SM* (2019) Long-term effects of neonatal pain. *Semin. Fetal Neonatal. Med*. 24: 101005. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.04.005>
9. *Mooney-Leber SM, Brummelte S* (2017) Neonatal pain and reduced maternal care: Early-life stressors interacting to impact brain and behavioral development. *Neuroscience*. 7: 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.001>
10. *Butkevich IP, Mikhailenko VA, Vershinina EA, Ulanova NA* (2015) Differences in adaptive behaviors of adolescent male and female rats exposed at birth to inflammatory pain or stress. *J. Evolutionary Biochem. Physiology*. 51: 305–315. <https://doi.org/10.1134/S0022093015040067>
11. *Schroeder A, Notaras M, Du X, Hill RA* (2018) On the developmental timing of stress: delineating sex-specific effects of stress across development on adult behavior. *Brain Sci*. 8: 121. <https://doi.org/10.3390/brainsci8070121>
12. *Cordier JM, Aguggia JP, Danelon V, Mir FR, Rivarola MA, Mascó D* (2021) Postweaning Enriched Environment Enhances Cognitive Function and Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Hippocampus in Maternally Separated Rats. *Neuroscience*. 453: 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.058>

13. *Dobbing J* (1981) Nutritional growth restriction and the nervous system. In: The molecular basis of neuropathology. Eds: *AN Davidson, RHS Thompson*. London: Edward Arnold Co 221–233.
14. *Tirelli E, Laviola G, Adriani W* (2003) Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 163–178.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(03)00018-6)
15. *Chen M, Xia D, Min C, Zhao X, Chen Y, Liu L, Li X* (2016) Neonatal repetitive pain in rats leads to impaired spatial learning and dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in later life. *Sci. Rep.* 14: 39159.
<https://doi.org/10.1038/srep39159>
16. *Xia D, Min C, Chen Y, Ling R, Chen M, Li X* (2020) Repetitive Pain in Neonatal Male Rats Impairs Hippocampus-Dependent Fear Memory Later in Life. *Front. Neurosci.* 14: 722.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00722>
17. *Morris RGM* (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12: 239–260.
[https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
18. *Vorhees CV, Williams MT* (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 55, 310–332.
<https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
19. *Henderson YO, Victoria NC, Inoue K, Murphy AZ, Parent MB* (2015) Early life inflammatory pain induces long-lasting deficits in hippocampal-dependent spatial memory in male and female rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 118: 30–41.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.010>
20. *Victoria NC, Inoue K, Young LJ, Murphy AZ* (2013) Long-term dysregulation of brain corticotrophin and glucocorticoid receptors and stress reactivity by single early-life pain experience in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 38: 3015–3028.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.08.013>
21. *Amaral C, Antonio B, Oliveira MG, Hamani C, Guinsburg R, Covolan L* (2015) Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 125: 120–125.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.012>
22. *Anand KJ, Garg S, Rovnaghi CR, Narsinghani U, Bhutta AT, Hall RW* (2007) Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. *Pediatr. Res.* 62: 283–290.
<https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180986d2f>
23. *Butkevich IP, Mikhailenko VA, Vershinina EA* (2020) The Influence of Perinatal Stress and Antidepressants on Different Types of Adaptive Behavior and Cognitive Abilities of Prepubertal Female Rats. *J. Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 56: 133–144.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0307>
24. *Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Osttrander MM, Choi DC, Cullinan WE* (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24: 151–80.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>
25. *Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL* (2012) The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron.* 76: 1057–1070.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
26. *Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD* (2012) Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J Neurochem.* 120. 948–963.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x>
27. *Nelson LH, Lenz KH* (2017) The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development. *J. Neurosci. Res.* 95. 447–461.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23821>
28. *Van Ryzin JW, Pickett LA, McCarthy MM* (2018) Microglia: driving critical periods and sexual differentiation of the brain. *Dev. Neurobiol.* 78. 580–592.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22569>
29. *Bereschenko O, Bruscoli S, Riccardi C* (2018) Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front. Immunol.* 9. 1332.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01332>
30. *McCarthy MM, Nugent BM, Lenz KM* (2017) Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 18: 471–484.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.61>
31. *Mooney-Leber SM, Brummelte S* (2020) Neonatal pain and reduced maternal care alter adult behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a sex-specific manner. *Dev. Psychobiol.* 62: 631–643.
<https://doi.org/10.1002/dev.21941>

THE EFFECT OF NEONATAL INFLAMMATORY PAIN ON COGNITIVE PROCESSES AND REACTIVITY OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS IN PREPUBERTAL RATS

V. A. Mikhailenko^{a, #}, I. P. Butkevich^a and , and E. A. Vershinina^a

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

[#] *e-mail: viktormikhailenko@yandex.ru*

We investigated the effect of neonatal inflammatory pain on the plasma corticosterone level dynamics in newborn rat pups, as well as on the processes of spatial learning, short- and long-term memory, and the hypothalam-

ic–pituitary–adrenal (HPA) axis reactivity to forced swim stress in prepubertal (45–53 days) rats of both sexes. We found a prolonged increase in the HPA axis reactivity in response to peripheral inflammatory pain induced by formalin injection to newborn rat pups, suggesting the developmental modification of the HPA axis and its possible involvement in the regulation of cognitive abilities. Neonatal pain caused deficits in spatial learning and memory, disclosing a sexual dimorphism in the implementation of spatial learning and memory. After long-term memory recording in 53-day-old rats in the forced swim test, the plasma corticosterone level was found to be increased compared to the basal level, but no differences in the hormone level between rats with neonatal pain and control animals, as well as no sex-related differences, were revealed. Thus, in the late prepubertal period, rats showed no straightforward relationship between neonatal pain-induced activation of the HPA axis and the indicators of spatial learning and memory, which may indicate the involvement of other neurobiological systems in the effect of neonatal pain on cognitive abilities.

Keywords: neonatal pain, corticosterone, prepubertal period, cognitive processes, rat

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И АПОПТОЗА В ВИСОЧНОЙ ДОЛЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ

© 2021 г. А. В. Литовченко^{1,2,*}, Ю. М. Забродская^{2,3}, Д. А. Ситовская³,
Л. К. Хужахметова⁴, В. Г. Нездоровина³, Е. Д. Бажанова^{1,2,5}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова

Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

³ Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал ФГБУ
“НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Астраханский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Астрахань, Россия

⁵ Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

*e-mail: anastasiya_litovchenkos@list.ru

Поступила в редакцию 29.03.2021 г.

После доработки 03.06.2021 г.

Принята к публикации 04.06.2021 г.

Современные стратегии лечения эпилепсии основаны главным образом на нормализации взаимодействия возбуждающей и тормозной системы, что оказывается не эффективным у пациентов с фармакорезистентной формой эпилепсии. Нейровоспалительные процессы в эпилептическом очаге и в его перифокальной зоне могут быть причиной развития апоптоза, а также могут играть роль в формировании лекарственной устойчивости. В биоптатах серого и белого вещества височной доли головного мозга пациентов с фармакорезистентной эпилепсией, полученных интраоперационно, с помощью иммуноблоттинга было проанализировано содержание про- и антиапоптотических белков (*p*-NF- κ B, TNF-, p53, α FAS, caspase-3, caspase-9). В коре и белом веществе перифокальной зоны выявлено повышенное содержание проапоптотических белков на фоне дисбаланса белков путей выживания. При этом, вероятно, активация апоптоза по внешнему пути происходит в перифокальной зоне, тогда как в эпилептическом очаге присутствуют белки, характерные для активации протективных путей. Активное нейровоспаление в эпилептическом очаге и перифокальной зоне височной доли может способствовать развитию резистентности к противоэпилептическим препаратам и прогрессированию нейродегенерации у таких пациентов.

Ключевые слова: фармакорезистентность, височная эпилепсия, апоптоз, нейровоспаление, цитокины, иммуноблоттинг

DOI: 10.31857/S004445292105003X

ВВЕДЕНИЕ

Каждый год в мире выявляется около 2 млн. новых случаев эпилепсии. При этом Международной противэпилептической лигой (International League Against Epilepsy-ILAE) установлено, что риск смерти молодого пациента с эпилепсией выше в 4 раза по сравнению со среднепопуляционными показателями в этой же возрастной группе [1]. Частота встречаемости фармакорезистентной эпилепсии (ФРЭ), требующей хирургического лечения, составляет 30% от общего числа больных. По данным исследователей, доля фармакорезистентных форм оставалась неизменной на протяжении последних 30 лет, несмотря на появление новых противэпилептических препаратов с принципно

ально различными механизмами действия [2]. Устойчивые к медикаментозному лечению формы эпилепсии характеризуются быстрым прогрессированием и существенно снижают как качество жизни пациента, так и его работоспособность [3]. При очаговой ФРЭ показано хирургическое лечение, которое кроме того, что является травматичным, только в 60% случаев приводит к положительному результату, из которых еще в 20% снижается количество приступов, в – 20% наблюдается повторная манифестация заболевания [4]. Эти данные подтверждают острую необходимость в поиске новых патогенетических механизмов эпилепсии.

Эпилептогенез – это динамический процесс, который постепенно изменяет возбудимость ней-

ронов, устанавливает критические взаимосвязи и требует сложных структурных изменений до того, как произойдет первый спонтанный припадок [5]. Эти изменения могут включать нейродегенерацию, нейрогенез, глиоз, аксональное повреждение, дендритную пластичность, повреждение гематоэнцефалического барьера, рекрутирование воспалительных клеток в мозговую ткань, реорганизацию внеклеточного матрикса и реорганизацию молекулярного функционирования отдельных нейрональных клеток [6].

Молекулярные механизмы, приводящие к изменению фармакочувствительности нейронов к современным препаратам, до сих пор неизвестны. Предполагается, что снижение числа потенциалзависимых каналов, выявленное как при экспериментальной эпилепсии, так и у пациентов, может быть клеточным механизмом фармакорезистентности при хронической эпилепсии [7]. Ключевым механизмом повреждения потенциалзависимых каналов, а также гибели нейронов в контексте развития фармакоустойчивых форм эпилепсии может оказаться нейровоспаление, наличие которого показано у больных с другими нейродегенеративными заболеваниями (болезнью Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, Пика и т.д.) [8]. Использование в доклинических испытаниях нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) в качестве средств, способствующих уменьшению конвульсионной активности, не уменьшало долю крыс, у которых развилась эпилепсия, но лечение НПВП уменьшало частоту и продолжительность приступов, снижало активацию микроглии и инфильтрацию лейкоцитами, подавляло окислительный стресс и высвобождение цитокинов, а также способствовало снижению нейродегенерации [9].

Нейровоспаление и апоптоз нервных клеток могут играть существенную роль в патогенезе эпилепсии. Последние данные подтверждают активный процесс гибели нейронов головного мозга при височной форме этого заболевания [10]. Например, у грызунов была показана повышенная экспрессия в мозге провоспалительных цитокинов интерлейкина ($IL-1\beta$) и фактора некроза опухоли ($TNF-\alpha$), приводящая к нейровоспалительному процессу в модели фокальной церебральной ишемии [11]. В мозге в состав клеточных постоянных структур входят сразу несколько так называемых рецепторов смерти, таких как $TNFR1$, FAS и $DR4$, которые, при взаимодействии с $TNF-\alpha$ и $FAS-L$, активируют внешнерецепторный путь апоптоза [12]. Рецепторный механизм апоптоза при эпилепсии ранее был подтвержден косвенно введением нейтрализующих $TNF-\alpha$ антител, оказавшим нейрорепрессивный эффект *in vitro* [13].

Некоторые исследования сообщают о связи нуклеарного фактора $NF-\kappa B$, основного регулятора воспаления, с эпилепсией у животных [14].

$NF-\kappa B$ состоит из двух субъединиц, его наиболее распространенной формой является гетеродимер $p65$ и $p50$, который обычно существует в цитоплазме в ингибированной белком $I\kappa B$ форме. Стимуляция поверхностных клеточных рецепторов такими факторами, как окислительный стресс, цитокинами или патогенами вызывает активацию комплекса $I\kappa B$. Протеасомная деградация $I\kappa B$ приводит к высвобождению и транслокации димеров $NF-\kappa B$ в ядро, где он способствует транскрипции генов-мишеней для противодействия окислительному стрессу и повреждению клеток [15]. Недавние исследования подтвердили активацию $NF-\kappa B$ в большинстве типов клеток, включая нейроны, астроциты, микроглию и олигодендроциты [16]. *In vitro* в культивируемых нейронах была обнаружена активация $NF-\kappa B$ под воздействием глутамата и β -амилоида. *In vivo* подобную картину наблюдали в условиях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, ишемии головного мозга, а также болезни Альцгеймера [17]. Таким образом, $NF-\kappa B$ играет важную роль сигнального пути в центральной нервной системе, выполняющего функцию активации каскадов выживания в ответ на повреждение нейронов.

В противовес активации путей выживания нервные клетки могут подвергаться апоптозу в ответ на внешние воздействия. Активация апоптоза может происходить по внешнему (рецепторному) и митохондриальному пути. И если протекание апоптоза по митохондриальному пути часто связано с окислительным стрессом клетки, то внешний путь активируется в результате повреждения или клеточного иммунного ответа [18]. В качестве субстрата клеточного иммунитета в головном мозге может выступать микроглия, активация которой приводит к секреции провоспалительных факторов в нервной ткани и вызывает нейровоспаление и апоптоз [19].

Цель работы – выявление молекулярных механизмов патогенеза фармакорезистентной эпилепсии (ФРЭ) у человека. В задачи работы входило выявление возможной роли $TNF-\alpha$ и $NF-\kappa B$ -зависимых сигнальных путей в экспрессии апоптоз-ассоциированных молекул ($p53$, $caspase-9$ и -3) в нервной ткани височной доли пациентов с ФРЭ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все пациенты, включенные в данное исследование, наблюдались в клинике Российского научно-исследовательского нейрохирургического института им. проф. А.Л. Поленова – филиала НМИЦ им. В.А. Алмазова города Санкт-Петербург в 2013–2020 г. В течение этого периода были проведены обследование и хирургическое лечение 24 пациентов (средний возраст 27.75 ± 2.46 ; 9 женщин, 15 мужчин) с установленным диагнозом по МКБ10 “G40.2 Височно-долевая фокальная эпилепсия

структурной этиологии с частыми полиморфными приступами, фармакорезистентное течение”. Добавление этих пациентов в наше исследование происходило последовательно, критериями включения для них являлись эпилептическая активность преимущественно в височной доле головного мозга, подтвержденная при проведении инвазивного ЭЭГ-мониторинга, а также достаточность материала, полученного при оперативном вмешательстве (например, выполненная блок-резекция височной доли головного мозга) при имеющемся от пациента информированном согласии на взятие, транспортировку, хранение и исследование биоптатов. В случае недостаточного количества биологического материала (при выполнении стереотаксического вмешательства или выраженной фрагментации материала), при наличии новообразований или инфекции головного мозга, а также при выявленных аутоиммунных заболеваниях или иммунодефицитных состояниях в анамнезе, данные пациенты не включались в наше исследование. У этих пациентов согласно поставленному диагнозу и данным ЭЭГ была проведена переднемедиальная темпоральная резекция под электрофизиологическим контролем. Зона эпилептического очага определялась с использованием МРТ по программе “Эпилепсия”, ПЭТ-КТ и инвазивного ЭЭГ-мониторинга. При проведении инвазивного ЭЭГ-мониторинга устанавливается вовлеченность извилины в эпилептический процесс. При проведении хирургического вмешательства под контролем электрокортикографии уточняется зона эпилептиформной активности, фиксируется в протоколе оперативного вмешательства, выполняется блок-резекция передних отделов височной доли. После поступления нефиксированного материала в патологоанатомическое отделение производятся анатомическая ориентировка удаленного фрагмента вещества головного мозга, его измерение и фотофиксация. Согласно протоколу оперативного вмешательства, устанавливается зона эпилептического очага, по которой производится перпендикулярный столу разрез, формируется пластинка толщиной 0.2 см. Из зоны пораженной извилины головного мозга для исследования берутся фрагменты коры и подлежащего белого вещества непосредственно из эпилептического очага, а также из перифокальной зоны этого очага, маркируются, замораживаются.

В качестве группы сравнения выступали 6 пациентов, сопоставимые с исследуемой группой по полу и возрасту, прооперированные в связи с черепно-мозговой травмой (средний возраст 28.75 ± 3.73 ; 2 женщины, 4 мужчины) и включенные в эту группу при условии отсутствия эпилептического синдрома в анамнезе, патологии нервной системы (опухолей, инфарктов мозга, кровоизлияний, инфекций) и аутоиммунных заболеваний или иммунодефицитных состояний. Пациенты данной группы поступали в стационар для проведения ре-

конструктивных вмешательств (пластика дефекта костей свода черепа, иссечение спаек в зоне глиомезодермального рубца) в отдаленном периоде перенесенной травмы (0.5–1 год). Пациенты с острой черепно-мозговой травмой в исследование не входили. Все полученные образцы коры и белого вещества, полученные при оперативном вмешательстве, хранились при температуре -80°C .

Из исследуемых биоптатов максимально быстро и при низких температурах отбирался фрагмент массой от 0.03 г до 0.05 г, к фрагменту добавлялся лизатный буфер в соотношении 1:10, смешанный *ex tempore* с ингибиторами протеаз (ProteaseInhibitorCocktail, Sigma-Aldrich) и фосфатаз (PhosSTOP, Sigma-Aldrich), затем образец гомогенизировали. Полученный гомогенат отстаивали на холоде в течение 30 мин, затем центрифугировали 15 мин при температуре 4°C с относительным центробежным ускорением 12 000 g. По окончании центрифугирования отбирали полученный супернатант, смешивали с буферным раствором Лэммли и инкубировали в течение 5 мин при 95°C .

Исследовали уровень белков NF- κB p65 (phospho S536) (1:500); FAS (1 : 1000); p53 (1 : 250); TNF alpha (1 : 1000); STAT1 (1 : 1000); caspase-9 (1 : 1000) (Abcam, USA); caspase-3 (1 : 1000), tubulin (1 : 1000) (CellSignalling, USA) с помощью иммуноблоттинга. Инкубацию в первичных антителах проводили при температуре 4°C в течение 8–12 ч при постоянном перемешивании. Для проведения реакции хемилюминесценции после инкубации во вторичных антителах использовали ECL (SuperSignal WestDura Extended Duration Substrate, ThermoScientific). Реакцию оценивали с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc (BioRad) с последующей денситометрией полученных блотов в программе “ImageJ”. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ “GraphPad Prism 8.0.1”. Значимость различий для количественных переменных между несвязанными группами оценивалась по критерию Краскела–Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Для проведения иммуногистохимического (ИГХ) анализа экспрессии белков апоптоза дополнительно после операции височной блок-резекции извлеченный биоптат височной доли фиксировали в забуференном нейтральном формалине 10% (pH 7.4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили фронтальные срезы мозга толщиной 6–7 мкм. В качестве группы сравнения использовался аутопсийный материал от 5 умерших (3 мужчин, 2 женщин) без эпилепсии в возрасте от 40 до 67 лет (средний возраст 54 ± 7.25), умерших в результате травмы и не имеющих в анамнезе неврологических данных. Посмертная задержка до вскрытия составляла от 7 до 12 часов (в среднем 8.65 ± 2.2).

Демаскировку белков проводили в цитратном буфере при 95° в течение 20 мин, ИГХ реакцию проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к caspase-3 (1 : 250) (Cell Signalling, USA), срезы инкубировали в первичных антителах в течение 12 ч при комнатной температуре. Инкубацию срезов во вторичных антителах осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре, затем выдерживали в Streptavidin–Peroxidase Polymer, Ultrasensitive (Sigma–Aldrich, USA). Для визуализации использовали хромоген DAB (Sigma–Aldrich, USA). После проведения ИГХ реакции срезы докрашивали гематоксилином Гилла, заключали в синтетическую заливочную среду Bio Mount HM (BIO–OPTICA Milano, Италия). Оценка результата реакции проводилась путем подсчета количества окрашенных ядер (%) на 100 клеток в 10 полях зрения в каждом случае.

Работа проведена на основе принципов добровольности и конфиденциальности, все процедуры выполнены в соответствии с Федеральным законом “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации” от 21.11.2011 № 323-ФЗ. Проведение исследования соответствует этическим стандартам, получены разрешение этического комитета института и информированное согласие от каждого пациента (Выписка из протокола заседания № 0305–2016 ЛЭК от 16.05.2016). Исследование проводилось в рамках оказания высокотехнологической помощи и одобрено этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши результаты показали наличие нейровоспаления и апоптоза в тканях головного мозга. A. Rana и A.E. Musto [20] описывают, что у пациентов, госпитализированных с судорожным синдромом, выявлено повышение уровня провоспалительного фактора TNF- α в спинномозговой жидкости и крови, кроме того, показано, что экспрессия TNF- α повышается в гиппокампе у крыс после судорог. Однако сравнение содержания этого белка непосредственно в коре и белом веществе эпилептического очага и перифокальной зоны височной доли у человека с содержанием TNF- α в коре и в белом веществе здоровых живых людей ранее не было изучено. Известно, что провоспалительный цитокин TNF- α высвобождается в мозге из активированных микроглии и астроцитов [21]. Во взятых нами образцах выявлено повышенное содержание TNF- α в эпилептическом очаге и в перифокальной зоне коры и белого вещества височной доли головного мозга (рис. 1). Аналогично наблюдалась усиленная экспрессия рецептора FAS в эпилептическом очаге серого и белого вещества височной доли по сравнению со значениями контрольной группы. В перифокальной зоне экспрес-

сия FAS была увеличена только в коре, в белом веществе наблюдалась тенденция к росту. В исследованиях других авторов у пациентов с височной эпилепсией отмечено повышение уровня рецептора к TNF- α - TNFR1, а также FAS-ассоциированного белка с доменом смерти (FADD) [22]. Обнаруженное нами высокое содержание TNF- α в биоптатах коры и белого вещества височной доли на фоне повышенной экспрессии рецептора к FAS-L может свидетельствовать об активации иммунных клеток в мозге больных ФРЭ, а также о протекании апоптоза по внешнему пути непосредственно в очаге в коре и в белом веществе. В перифокальной зоне, вероятно, данные процессы тоже протекают, но менее интенсивно. TNF- α , связываясь с соответствующим рецептором (TNFR1), активирует TNFR-ассоциированный домен белка TRADD, тогда как FAS-L взаимодействуют с FAS-ассоциированным доменом белка FADD [23]. В результате включения TNF- α адаптера TRADD возможна активация конкурентных параллельных путей подавления клеточной гибели, вызванных фосфорилированием белка-ингибитора, с которым связан NF- κ B. Это явление может объяснять данные о различном влиянии TNF- α на апоптоз. При этом система FAS/FAS-L не инициирует иных параллельных путей, кроме апоптоза [24].

Транскрипционный фактор NF- κ B регулирует экспрессию антиапоптотических белков [14]. Деградация комплекса NF- κ B с I κ B под влиянием TRADD позволяет изоформе NF- κ B p65 транслироваться в ядро, где она регулирует транскрипцию широкого спектра генов, отвечающих за синтез таких белков, как Bcl-2, IL-6, IL-8 и VEGF, участвующих в выживании клеток [25]. Строение p65 включает в себя C-концевой домен, состоящий из 30 аминокислот, которые составляют наиболее важный участок трансактивации NF- κ B, фосфорилирование сайта S536 ведет к ускорению транскрипции генов выживания, либо может быть путем альтернативной активации NF- κ B пути вне регуляции I κ B [26].

В наших образцах в эпилептическом очаге в коре и в белом веществе наблюдался рост содержания фосфорилированной по S536 формы NF- κ B, при этом в перифокальной зоне содержание этого белка оставалось на том же уровне, что и у пациентов без эпилепсии. Существенное содержание фосфорилированной формы NF- κ B непосредственно в эпилептическом очаге может говорить об активации транскрипции провоспалительных и антиапоптотических генов в клетках под воздействием TNF- α , что, как следствие, часто приводит по большей части не к гибели клеток, а к их выживанию. Однако выявленное нами высокое содержание TNF- α в очаге может указывать на наличие предполагаемого нами нейровоспаления при ФРЭ. В перифокальной зоне при такой же относительной концентрации TNF- α можно предположить,

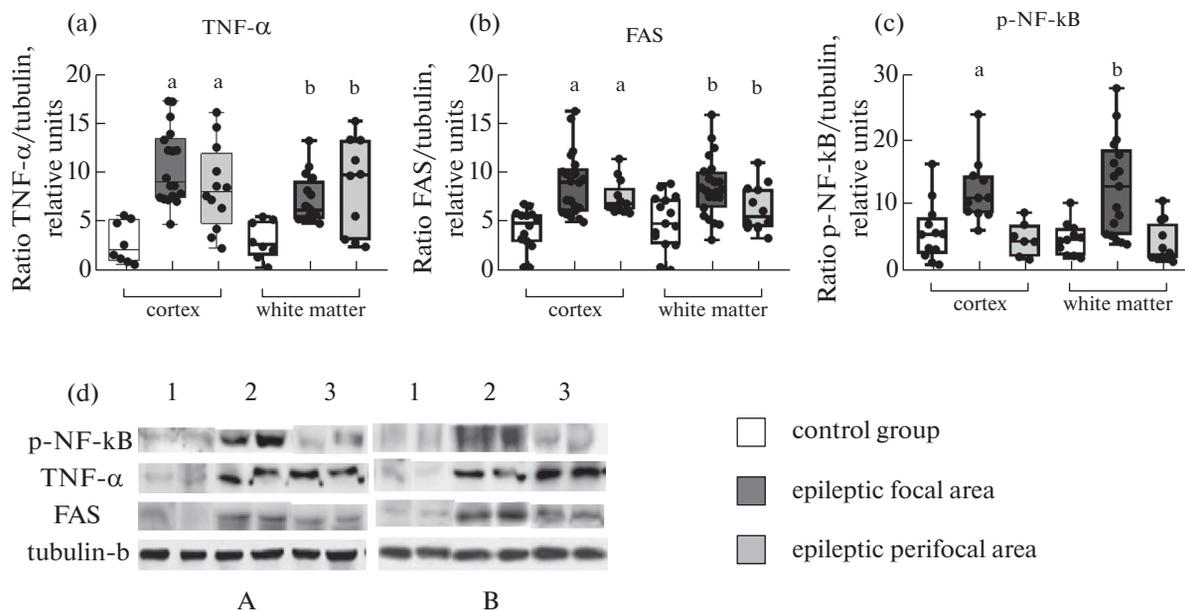


Рис. 1. Содержание TNF- α (a), FAS (b), p-NF- κ B (c) в коре и в белом веществе височной коры головного мозга. Лизаты биоптатов коры и белого вещества височной доли человека, исследованные на 10% полиакриламидном геле методом иммуноблоттинга (d). а – различия в содержании белка в коре по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при $p < 0.05$; б – различия в содержании белка в белом веществе по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при $p < 0.05$; с – различия в содержании белка в коре перифокальной зоны по сравнению с epileptic focus, статистически значимы при $p < 0.05$; d – различия в содержании белка в белом веществе перифокальной зоны по сравнению с epileptic focus, статистически значимы при $p < 0.05$.

что не происходит запуска параллельного пути выживания, так как различия в содержании фосфорилированной формы NF- κ B между контрольной группой и группой с ФРЭ не выявлено, из чего мы можем сделать вывод, что в перифокальной зоне на фоне имеющегося нейровоспаления развитие процесса апоптоза не сдерживается протективными путями.

Выявленная нами повышенная экспрессия рецептора FAS в очаге коры и белого вещества и в перифокальной зоне коры может быть вызвана транскрипцией гена p53. Запускающий транскрипцию этого гена белок p53 в цитоплазме находится в латентном состоянии и может быть активирован не только в ответ на повреждение ДНК, но и в результате действия окислительного стресса, патогенных или цитотоксических агентов [27]. Инициация апоптоза через активацию p53 происходит несколькими путями, один из которых индуцирует мРНК FAS и перемещение синтезированного FAS на поверхность клетки [28]. Кроме того, p53 действует непосредственно на внешнюю мембрану митохондрий, проникая внутрь, где взаимодействует с Bcl-2 или Bax, что приводит к высвобождению цитохрома C и активации caspase-3 [18]. В нашем исследовании при эпилепсии отмечено увеличение содержания белка p53 в области epileptic focus и в перифокальной зоне в височной коре и в белом веществе (рис. 2), что мо-

жет быть одной из причин роста FAS на мембране клеток, тем самым стимулируя развитие апоптоза под действием внешних факторов. При этом воздействие p53 на митохондрии выступает дополнительным фактором активации каспаз и гибели клеток.

В результате воздействия p53 с мембраной поврежденной митохондрии и высвобождения цитохрома C происходит формирование специфического комплекса – апоптосомы, в состав которой входит белок ARAF-1 (апоптотический протеоактивирующий фактор), сам цитохром C и procaspase-9. Слияние этих белков в апоптосому приводит к активации caspase-9. Caspase-9, в свою очередь, вызывает активацию эффекторных каспаз, в том числе caspase-3, которая высвобождает связанную ДНКазу, разрушающую хроматин [23].

В исследуемых образцах серого вещества из epileptic focus выявлено высокое содержание инициаторной caspase-9 по сравнению с образцами, взятыми от группы контроля, при этом содержание caspase-3 у тех же пациентов снижено (рис. 2). В перифокальной зоне серого вещества содержание caspase-9 и caspase-3 подчиняется той же тенденции, но менее выражено. В очаге и в перифокальной зоне белого вещества наблюдается та же картина. Сниженное содержание эффекторной caspase-3 в сочетании с одновременным повышением caspase-9 может быть вызвано возможным

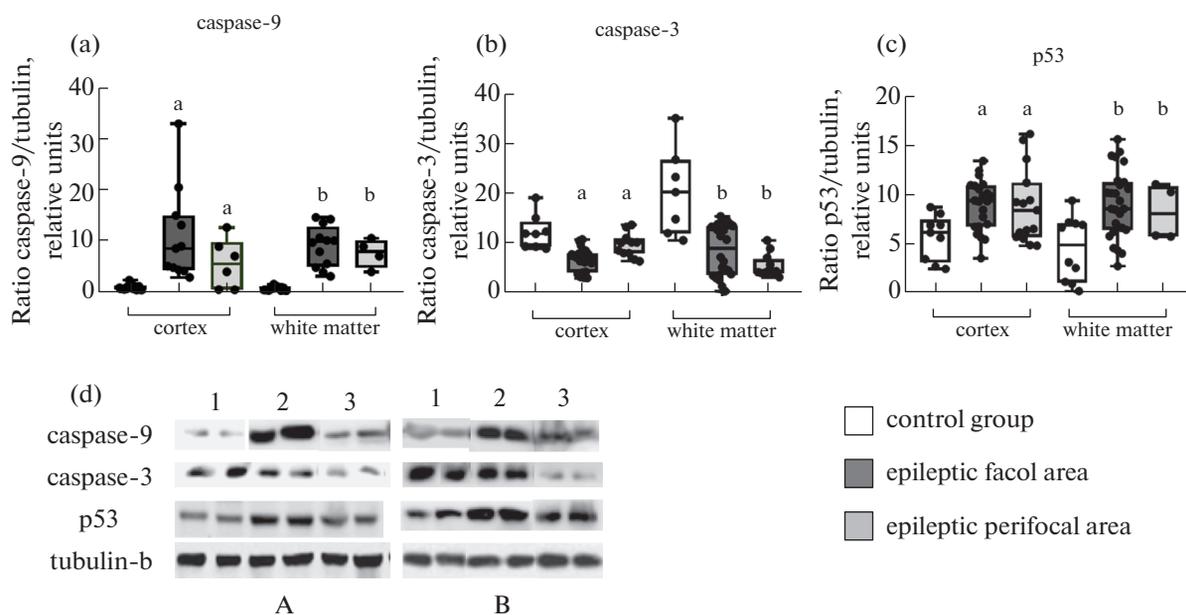


Рис. 2. Содержание caspase-9 (a), caspase-3 (b), p53 (c) в коре и в белом веществе височной коры головного мозга. Лизаты биоптатов коры и белого вещества височной доли человека, исследованные на 10% полиакриламидном геле методом иммуноблоттинга (d). a – различия в содержании белка в коре по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при $p < 0.05$; b – различия в содержании белка в белом веществе по сравнению с контрольной группой, статистически значимы при $p < 0.05$; c – различия в содержании белка в коре перифокальной зоны по сравнению с epileptическим очагом, статистически значимы при $p < 0.05$; d – различия в содержании белка в белом веществе перифокальной зоны по сравнению с epileptическим очагом, статистически значимы при $p < 0.05$.

появлением расщепленной формы с-caspase-3, что косвенно может говорить об активации апоптоза по митохондриальному пути [10]. В ранее проведенном нами исследовании теми же методами мы выявили повышенное содержание caspase-8 в epileptическом очаге и в перифокальной зоне коры пациентов с ФРЭ [29], что свидетельствует об активации апоптотических сигнальных путей. В эксперименте на крысах было показано, что ингибиторы caspase-8 редуцируют протеазную активность caspase-3 и -9, в то время как применение ингибиторов caspase-9 при височной epilepsии незначительно влияет на активность эффекторной caspase-3 [22]. Таким образом, можно заключить, что при височной epilepsии преобладает внешнересепторный путь апоптоза. На активацию митохондриального пути при височной epilepsии указывают другие эксперименты, в которых показано наличие в наружной мембране митохондрий проапоптотического белка Вах после начала припадка [10, 20]. В свою очередь, митохондриальная дисфункция является одним из ключевых механизмов патогенеза нейродегенерации [22].

Исходя из полученных нами данных, можно выдвинуть предположение, что процессы апоптоза в перифокальной зоне возбуждения протекают более интенсивно, так как повышенного содержания белков протективного NF- κ B-каскада в перифокальной зоне не было замечено, следовательно,

предполагается, что активации путей выживания не произошло в достаточной степени. При этом перифокальная зона также подвержена действию воспалительных факторов, как и очаг. Вовлеченность перифокальных участков в воспалительные процессы, а также недостаточность протективных механизмов могут являться одними из факторов развития резистентности epilepsии.

Для установления клеточной специфичности экспрессии проапоптотических белков было проведено ИГХ исследование биоптатов, полученных после височной блок-резекции. При ИГХ во всех случаях у больных с ФРЭ наблюдается положительная ядерная экспрессия caspase-3 не только в нейронах, но и в глиальных клетках коры и белого вещества головного мозга. В коре глиоциты имеют высокую интенсивность ядерного окрашивания, их распределение носит диффузный характер во всех слоях коры, преимущественно в молекулярном слое (рис. 3a). Среднее относительное количество позитивных глиальных клеток с положительной реакцией на мечение антителами к caspase-3 в коре у пациентов с ФРЭ составило $23.65 \pm 0.82\%$. В белом веществе ядерная экспрессия caspase-3 выражена умеренно, среднее относительное количество окрашенных ядер глиальных клеток в белом веществе несколько ниже, чем в коре, и составило $17.45 \pm 0.54\%$ (рис. 3c). В контрольной группе экспрессия caspase-3 в белом веществе не была выяв-

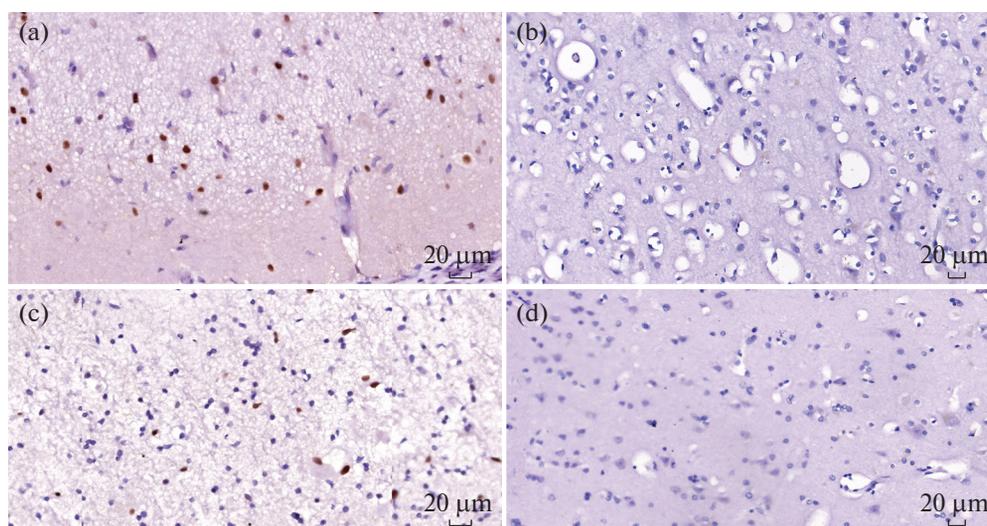


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция на выявление caspase-3 в коре эпилептического очага височной доли пациента с ФРЭ (а) и в коре пациента без эпилепсии (б); в прилежащем к эпилептическому очагу белом веществе пациента с ФРЭ (с) по сравнению с контрольным образцом белого вещества (д). Визуализация с помощью DAB (коричневое окрашивание), докраска гематоксилином Гилла. Увеличение $\times 400$.

лена (рис. 3д), в коре наблюдались единичные окрашенные клетки, чаще всего в области цитоплазмы, ядерной экспрессии caspase-3 выявлено не было (рис. 3б). Таким образом, обнаруженная экспрессия caspase-3 в глиоцитах коры и белого вещества в эпилептическом очаге височной доли может быть показателем вовлеченности глии в апоптотические процессы.

Ранее проведенные исследования пациентов с ФРЭ и эксперименты на животных свидетельствуют о повышении экспрессии проапоптотических белков в гиппокампе [18, 20]. В нашей работе мы провели разделение изучаемой области на эпилептический очаг и перифокальную зону. Результаты показали, что в эпиочаге у пациентов с височной ФРЭ наблюдаются повышенная экспрессия протективного p -NF- κ B в очаге возбуждения, значительный рост содержания caspase-9 на фоне высокого содержания провоспалительного TNF- α и экспрессии рецептора FAS под влиянием p53. Можно сделать вывод, что в этой зоне протекает процесс нейровоспаления, приводящий к апоптозу по внешнему (рецепторному) и митохондриальному пути, среди которых внешний преобладает. В перифокальной зоне также наблюдалась экспрессия проапоптотических белков, но менее интенсивно, при этом в данной области не отмечена активация протекторных механизмов по NF- κ B пути. Таким образом, активное нейровоспаление в эпилептическом очаге и перифокальной зоне височной доли, а также дисбаланс антиапоптотической системы в перифокальной области способствуют прогрессированию дегенерации в очаге гипервозбудимости и прогрессированию эпилептической

энцефалопатии, и могут быть причиной развития терапевтической резистентности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00127), государственного задания по теме № 056-00109-21-01(19) и государственного задания ИЭФБ РАН, выполнена на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Д. Бажанова, Ю.М. Забродская), ведение пациентов, хирургическое лечение и сбор биологического материала (В.Г. Нездоровина, Д.А. Ситовская), сбор и обработка данных (А.В. Литовченко, Л.К. Хужахметова), написание и редактирование манускрипта (А.В. Литовченко, Е.Д. Бажанова и Ю.М. Забродская).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громов СА, Сивакова НА (2019) Современные аспекты разрешения эпилепсии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния 11: 21–26. [Gromov S.A., Sivakova N.A. (2019) Resolved epilepsy: an updated insight. Epileptsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions 11: 21–26 (In Russ)]. <https://doi.org/10.17749/2077-8333.2019.11.1.21-26>

2. *Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P* (2018) Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs: A 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurology* 75: 279–286.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>
3. *Lotfinia M, Maloumeh EN, Asaadi S, Omidbeigi M, Sharifi G, Asadi B* (2019) Health-related quality of life after epilepsy surgery: A prospective, controlled follow-up on the Iranian population. *Scientific reports* 9: 7875.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44442-6>
4. *Hader WJ, Tellez-Zenteno J, Metcalfe A, Hernandez-Ronquillo L, Wiebe S, Kwon C-S, Jette N* (2013) Complications of epilepsy surgery: A systematic review of focal surgical resections and invasive EEG monitoring. *Epilepsia* 54: 840–847.
<https://doi.org/10.1111/epi.12161>
5. *Younus I, Reddy DS* (2017) Epigenetic interventions for epileptogenesis: A new frontier for curing epilepsy. *Pharmacology & Therapeutics* 177: 108–122.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.002>
6. *Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T* (2019) Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: A target for disease modification in epilepsy. *Journal of neuroscience research* 97: 1363–1377.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24205>
7. *Zavala-Tecuapetla C, Cuellar-Herrera M, Luna-Munguia H* (2020) Insights into Potential Targets for Therapeutic Intervention in Epilepsy. *International journal of molecular sciences* 21: 8573.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228573>
8. *Löscher W, Friedman A* (2020) Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *International journal of molecular sciences* 21: 591.
<https://doi.org/10.3390/ijms21020591>
9. *Aronica E, Bauer S, Bozzi Y, Caleo M, Dingledine R, Gorter JA, Henshall DC, Kaufer D, Koh S, Löscher W, Louboutin JP, Mishto M, Norwood BA, Palma E, Poulter MO, Terzone G, Vezzani A, Kaminski RM* (2017) Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. *Epilepsia* 58: 27–38.
<https://doi.org/10.1111/epi.13783>
10. *Соколова ТВ, Забродская ЮМ, Парамонова НМ, Доброгорская ЛН, Куралбаев АК, Касумов ВР, Ситовская ДА* (2017) Апоптоз клеток головного мозга в эпилептических очагах при фармакорезистентной височной эпилепсии. *Трансляционная медицина* 4: 22–33. [Sokolova TV, Zabrodskaya YM, Paramonova NM, Dobrogorskaya LN, Kuralbaev AK, Kasumov VR, Sitovskaya DA (2017) Apoptosis of brain cells in epileptic focus at pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Translational Medicine* 4: 22–33. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2017-4-6-22-33>
11. *Fuller OK, Whitham M, Mathivanan S, Febbraio MA* (2020) The Protective Effect of Exercise in Neurodegenerative Diseases: The Potential Role of Extracellular Vesicles. *Cells* 9: 2182.
<https://doi.org/10.3390/cells9102182>
12. *Yamanaka G, Morichi S, Takamatsu T, Watanabe Y, Suzuki S, Ishida Y, Oana S, Yamazaki T, Takata F, Kawashima H* (2021) Links between Immune Cells from the Periphery and the Brain in the Pathogenesis of Epilepsy: A Narrative Review. *International journal of molecular sciences* 22: 4395.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094395>
13. *Sah E, Krishnamurthy S, Ahmidouch MY, Gillispie GJ, Milligan C, Orr ME* (2021) The Cellular Senescence Stress Response in Post-Mitotic Brain Cells: Cell Survival at the Expense of Tissue Degeneration. *Life* 11: 229.
<https://doi.org/10.3390/life11030229>
14. *Spanoghe J, Larsen LE, Craey E, Manzella S, Van Dycke A, Boon P, Raedt R* (2020) The Signaling Pathways Involved in the Anticonvulsive Effects of the Adenosine A1 Receptor. *International journal of molecular sciences* 22: 320.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010320>
15. *Bacher S, Meier-Soelch J, Kracht M, Schmitz ML* (2021) Regulation of Transcription Factor NF-κB in Its Natural Habitat: The Nucleus. *Cells* 10: 753.
<https://doi.org/10.3390/cells10040753>
16. *Jung YJ, Tweedie D, Scerba MT, Kim DS, Palmas MF, Pisanu A, Carta A.R., Greig N.H.* (2021) Repurposing Immunomodulatory Imide Drugs (IMiDs) in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 15: 656921.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.656921>
17. *Li G, Yamasaki R, Fang M, Masaki K, Ochi H, Matsu-shita T, Kira JI* (2018) Novel disease-modifying anti-rheumatic drug iguratimod suppresses chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating activation of macrophages/microglia through an NF-κB pathway. *Sci Rep.* 8: 1933.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20390-5>
18. *Mao X-Y, Zhou H-H, Jin W-L* (2019) Redox-Related Neuronal Death and Crosstalk as Drug Targets: Focus on Epilepsy. *Frontiers in Neuroscience* 13: 512.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00512>
19. *Benusa SD, Lafrenaye AD* (2020) Microglial process convergence on axonal segments in health and disease. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 7: 23–39.
<https://doi.org/10.20517/2347-8659.2019.28>
20. *Rana A, Musto AE* (2018) The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of Neuroinflammation* 15: 144.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
21. *Mancini A, Ghiglieri V, Parnetti L, Calabresi P, Di Filippo M* (2021) Neuro-Immune Cross-Talk in the Striatum: From Basal Ganglia Physiology to Circuit Dysfunction. *Front Immunology* 12: 644294.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.644294>
22. *Rocha NKR, Themoteo R, Brentani H, Forlenza OV, De Paula VJR* (2020) Neuronal-Glial Interaction in a Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease: Gene Ontology and Lithium Pathways. *Front Neurosci.* 14: 579984.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.579984>
23. *Zheng P, Chen Q, Tian X, Qian N, Chai P, Liu B, Hu J, Blackstone C, Zhu D, Teng J, Chen, J* (2018) DNA damage triggers tubular endoplasmic reticulum extension to promote apoptosis by facilitating ER-mitochondria signaling. *Cell Research* 28: 833–854.
<https://doi.org/10.1038/s41422-018-0065-z>

24. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C (2021) Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunology* 12: 631821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631821>
25. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H (2020) Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Therapy* 5: 209. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
26. Liang J, Luan Y, Lu B, Zhang H, Luo YN, Ge P (2014) Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF- κ B/p65 activation. *PLoS One* 9: e96734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096734>
27. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A (2017) How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation* 25: 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
28. Simabuco FM, Morale MG, Pavan ICB, Morelli AP, Silva FR, Tamura RE (2018) p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget* 9: 23780–23823. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25267>
29. Sazhina TA, Sitovskaya DA, Zabrodskaya YM, Bazhanova ED (2020) Functional Imbalance of Glutamate- and GABAergic Neuronal Systems in the Pathogenesis of Focal Drug-Resistant Epilepsy in Humans. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 168: 519–522. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04747-3>

MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND APOPTOSIS IN THE TEMPORAL LOBE OF PATIENTS WITH DRUG-RESISTANT EPILEPSY

A. V. Litovchenko^{a,b,#}, Yu. M. Zabrodskaya^{b,c}, D. A. Sitovskaya^c, L. K. Khuzhakhmetova^d,
V. G. Nezdorovina^c, and E. D. Bazhanova^{a,b,e}

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

^b Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

^c Polenov Neurosurgical Institute, Branch of the Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health, St. Petersburg, Russia

^d Astrakhan State University, Astrakhan, Russia

^e Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

[#]e-mail: anastasiya_litovchenkos@list.ru

Modern antiepileptic strategies aim to normalize the interaction of the excitatory and inhibitory systems, which turns out to be ineffective in treating patients with drug-resistant epilepsy. Neuroinflammatory processes in the epileptic focus and in its perifocal area can trigger apoptosis and also contribute to the development of drug resistance. The level of pro- and anti-apoptotic proteins (p-NF- κ B, TNF- α , p53, FAS, caspase-3, caspase-9) was analyzed in intraoperative biopsies of the temporal lobe gray and white matter in the brain of patients with drug-resistant epilepsy. An increased level of pro-apoptotic proteins was revealed in the cortex and perifocal area white matter against the background of an imbalance of protective anti-apoptotic proteins. It appears that the activation of the extrinsic pathway of apoptosis occurs in the perifocal area, while in the epileptic focus, there are proteins responsible for the activation of the anti-apoptotic survival pathways. Active neuroinflammation in the epileptic focus and perifocal zone of the temporal lobe may contribute to the development of the resistance to anticonvulsant drugs and the progression of neurodegeneration in such patients.

Keywords: drug resistance, temporal lobe epilepsy, apoptosis, neuroinflammation, cytokines, immunoblotting

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И АДЕНИЛАТНАЯ СИСТЕМА КАМЕР СЕРДЦА ЧЕРНОМОРСКОЙ СКОРПЕНЫ (*SCORPAENA PORCUS* L.) ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

© 2021 г. Е. Э. Колесникова^{1,*}, А. А. Солдатов¹, И. В. Головина¹,
И. В. Сысоева¹, А. А. Сысоев¹, Т. А. Кухарева¹

¹ ФГБУН ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН”, Севастополь, Россия

*e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.

После доработки 15.06.2021 г.

Принята к публикации 17.06.2021 г.

Сердце рыб представляет собой уникальную модель для сравнения устойчивости к гипоксии двух камер сердца (предсердие, желудочек), различающихся по строению и функциональной нагрузке. В условиях острой гипоксии ($0.9\text{--}1.2$ мг O_2 л⁻¹, 90 мин) изучали активность оксидоредуктаз (МДГ, 1.1.1.37; ЛДГ, 1.1.1.27) и параметры аденилатной системы в камерах сердца черноморской скорпены. Несмотря на главенствующую функциональную роль желудочка, активность МДГ в нем имела тенденцию к понижению по сравнению с предсердием при отсутствии различий в активности ЛДГ. Вместе с тем разница в содержании аденилатов (АТФ, АДФ, АМФ), суммарном аденилатном пуле (АП) и аденилатном энергетическом заряде (АЭЗ) между предсердием и желудочком была статистически незначимой, хотя абсолютное значение АП желудочка было практически в два раза больше АП предсердия. Величина АЭЗ перфузируемых венозной кровью предсердия и желудочка не превышала ~ 0.7 (против максимальных значений этого показателя $\sim 0.9\text{--}1.0$), что, по-видимому, отображает энергетический статус тканей, исходно адаптированных к условиям гипоксии. При острой гипоксии отмечалось две стратегии преобразования метаболизма относительно камер сердца в виде падения активности МДГ в 2.4 раза ($p < 0.05$) в предсердии и прироста активности ЛДГ в 2.2 раза ($p < 0.05$) в желудочке. Вероятно, снижение активности МДГ в ткани предсердия детерминировано более пассивной функцией этой камеры сердца в обеспечении кровотока. Острая гипоксия приводила к уменьшению количества адениловых нуклеотидов и убыванию АЭЗ в камерах сердца, что было наиболее явно выражено в миокарде желудочка. При снижении PO_2 сдвиги АЭЗ камер сердца происходили в достаточно узком диапазоне (от 0.7 до 0.6), что указывало на сохранение определенного стационарного энергетического состояния, достигаемого путем торможения потребления или потребности в АТФ. Предполагаемый нами механизм удержания величины АЭЗ может базироваться на отрицательном хронотропном эффекте гипоксии.

Ключевые слова: рыбы, гипоксия, камеры сердца, малатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, аденилатная система

DOI: 10.31857/S0044452921050089

ВВЕДЕНИЕ

Главный орган сердечно-сосудистой системы позвоночных животных — сердце — является аэробным органом, нуждающимся в постоянном снабжении АТФ. Высвобождающаяся в результате гидролиза АТФ энергия используется клетками сердца — кардиомиоцитами — для осуществления сокращений и поддержания внутриклеточного баланса ионов [1]; запас АТФ кардиомиоцитов ограничен настолько, что может обеспечить лишь незначительное количество сокращений в течение нескольких секунд.

Адаптивные возможности живых организмов в водной среде с постоянно варьирующим уровнем O_2 ($P_w\text{O}_2$) в значительной степени зависят от эффективности взаимодействия аэробного и анаэробного путей энергетического метаболизма и баланса между энергетическим обменом и запросом на макроэнергетические соединения. Реакции, которые обеспечивают оксидоредуктазы — малатдегидрогеназа (L-малат: НАД-оксидоредуктаза; МДГ, 1.1.1.37) и лактатдегидрогеназа (лактат: НАД-оксидоредуктаза; ЛДГ, 1.1.1.27), являются неотъемлемой частью нормального метаболизма и адаптации к изменяющимся условиям водной среды обита-

ния. Цитозольная форма МДГ принимает участие в аэробном гликолизе и малат-аспартатном шунте, окисляя поступающий из митохондрий малат в оксалоацетат с образованием НАДН, в то время как ЛДГ катализирует заключительный этап анаэробного гликолиза. Оба фермента обеспечивают производство макроэргов и регуляцию окислительно-восстановительного потенциала клеток; в качестве показателя интенсивности и направленности окислительных процессов в тканях используют соотношение их активности [2]. Изменение гидрохимических характеристик среды, прежде всего содержания O_2 , вызывает сдвиги между аэробным и анаэробным метаболизмом, включающие активность оксидоредуктаз.

Центральное место в энергообмене клеток всех типов принадлежит аденилатной системе, включающей АТФ, АДФ и АМФ [3]. Причем энергетический статус клеток в каждый определенный момент зависит от относительных концентраций всех трех компонентов. Для оценки энергетического состояния клеток используют показатель энергетического заряда аденилатной системы (АЭЗ), которая осуществляет регуляцию внутриклеточных процессов, ответственных за поставку и утилизацию энергии, поддерживает оптимальный уровень функционирования с наименьшими затратами энергии.

Недостаточное поступление O_2 (гипоксия) приводит к переключению аэробного энергетического метаболизма на анаэробный путь, что ведет к уменьшению количества производимого АТФ (вырабатывается только 2 молекулы АТФ вместо 38), нарастанием внутриклеточного ацидоза и неконтролируемым распадом АТФ на АДФ и АМФ [3].

Черноморская скорпена *Scorpaena porcus* является объектом многочисленных исследований, обладает значительной устойчивостью к действию ряда стрессорных факторов, включая гипоксию/аноксию [4, 5]. Как известно, сердце рыб гомологично сердцу человека [6]. Раскрытие сущности адаптивных процессов миокарда скорпены, способной длительно находиться в среде с крайне низкой концентрацией кислорода (менее $0.5 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$ vs. норма — $7-8 \text{ мг } O_2 \text{ л}^{-1}$), представляет не только теоретический, но и практический интерес, который опирается на представление о существовании базовых, повторяющихся в разных таксономических группах позвоночных механизмах функционирования сердечной мышцы [7]. Вместе с тем считают, что сердце рыб обладает поразительной морфофункциональной пластичностью, проявляющейся при онтогенетических метаморфозах и экологической физиологической трансформации [8]. Оценка энергетической пластичности миокарда рыб, относящегося к разным отделам сердца с разной функциональной нагрузкой, также способна расширить границы представлений об

эталоне сердечной деятельности с максимальным анаэробным потенциалом.

Целью нашей работы было изучение активности ферментов энергетического обмена и параметров аденилатной системы в тканях камер сердца *Scorpaena porcus* в условиях острой гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили половозрелые особи *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в летней период (16 экз., длина тела — 13–17 см, вес — 100–190 г, стадия зрелости гонад VI–II) при температуре воды в море 21–23°C. Рыбу отлавливали в июле 2020 г. ставным неводом в прибрежной зоне на внешнем рейде Севастопольской бухты (44°36'50"N 33°30'00"E) и доставляли в лабораторию в пластиковых баках объемом 60 л с принудительной аэрацией. Для снятия стресса после отлова и транспортировки скорпену содержали одну неделю в проточном аквариуме, кормили рыбным фаршем, в работе использовали только подвижных и активно питающихся особей.

Экспериментальная часть выполнена с применением специально разработанного стенда, который позволяет стабилизировать температуру и концентрацию кислорода в воде на протяжении необходимого времени. Температура воды в рабочей камере поддерживалась на уровне 21–22°C, контрольная группа рыб содержалась при 5.6–6.7 мг $O_2 \text{ л}^{-1}$ (нормоксия). После адаптации к этим условиям (24 ч) концентрацию кислорода в воде снижали в течение 15–20 мин до 0.9–1.2 мг $O_2 \text{ л}^{-1}$ путем прокачивания азота. Экспозиция особей в эксперименте составляла 90 мин. Содержание кислорода в воде контролировали потенциометрически с помощью оксиметра DO Meter ST300D RU ("Ohaus", США).

Препарирование тканей, гомогенизацию и центрифугирование проводили при охлаждении ($0 \pm 4^\circ\text{C}$). Сердце для исследования брали сразу после декапитации рыб и разделяли на предсердие и желудочек (рис. 1), ткани до анализа активности ферментов и содержания аденилатов хранили при температуре -80°C в морозильной камере (Farma 900 Series, TermoScientific, США).

Активность цитоплазматической МДГ и ЛДГ измеряли спектрофотометрически (СФ-2000 ОКБ "Спектр", Россия) в кварцевой кювете с ходом луча 10 мм, объемом 3 мл при длине волны 340 нм по скорости окисления восстановленной формы кофермента НАДН, используя в качестве среды выделения 0.2 М Трис-НСI буфер, рН 7.5, как описано ранее [5]. Реакцию начинали внесением экстракта и снимали отсчеты через 30 с в течение 2–3 мин. Субстратом для определения активности ЛДГ служил пируват, для МДГ — оксалоацетат. Активность МДГ, ЛДГ определяли при температуре

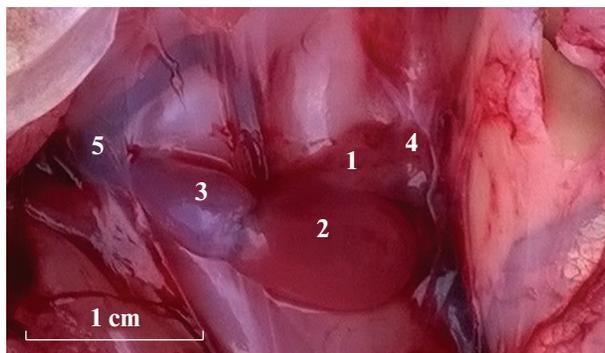


Рис. 1. Сердце *Scorpaena porcus*. 1 – предсердие; 2 – желудочек; 3 – луковича аорты; 4 – венозный синус, 5 – брюшная аорта.

инкубации реакционной смеси 25°C. Удельную активность ферментов выражали в мкмольх НАДН мин⁻¹ мг⁻¹ белка супернатанта. Содержание белка определяли микробиуретовым методом, экстинкцию измеряли при длине волны 330 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали препарат кристаллического сывороточного альбумина.

Содержание адениловых нуклеотидов миокарда скорпены регистрировали хемилюминесцентным методом [9]. Результаты выражали в мкмольх г⁻¹ сырой массы ткани. Средняя масса навески предсердия составляла 4.81 мг, желудочка сердца – 6.89 мг. Исследуемые ткани гомогенизировали в 0.1 М трис-ацетатном буфере, рН 7.75, на холоде. Аденилатный комплекс экстрагировали в кипящем буфере на водяной бане в течение 5 мин. Полученные экстракты замораживали до дальнейшего анализа. Определение АТФ проводили по стандартной методике, по световой эмиссии с добавлением люциферин-люциферазы на приборе

АТФ-Luminometer 1250 (ЛКВ, Швеция). АДФ и АМФ восстанавливали до АТФ с применением энзимов пируваткиназы и аденилаткиназы. Аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) рассчитывали, используя концентрацию (С) нуклеотидов по формуле [10]:

$$АЭЗ = \frac{C_{АТФ} + 1/2C_{АДФ}}{C_{АТФ} + C_{АДФ} + C_{АМФ}}$$

Результаты представлены как $M \pm m$. Нормальность распределения проверена при помощи критерия Пирсона. Статистические сравнения выполнены на основе двустороннего t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Парный линейный коэффициент корреляции Пирсона (r) рассчитывали между активностью МДГ, ЛДГ и содержанием АТФ в камерах сердца. Статистическая обработка и графическое оформление полученной информации проводили при помощи стандартного программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные нами значения исследованных параметров – активности МДГ, ЛДГ, содержания адениловых нуклеотидов и величина АЭЗ – свидетельствуют о существовании различий в энергетическом обмене отделов миокарда *Scorpaena porcus* в условиях нормоксии и острой гипоксии (рис. 2 и 3).

Нормоксия. В предсердии скорпены зарегистрирована самая высокая активность МДГ (6.39 ± 0.92 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), что на 28% выше, чем в желудочке сердца (4.59 ± 0.87 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка), однако различия не были статистически значимы ($p > 0.05$) (рис. 2а). Так же не выявлено существенных различий между отделами миокарда по активности ЛДГ

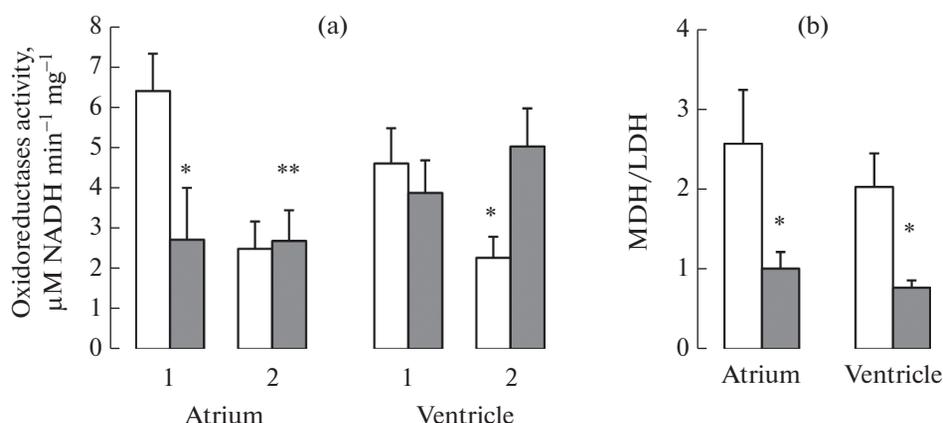


Рис. 2. Активность оксидоредуктаз (а) и индекс МДГ/ЛДГ (б) в камерах сердца *Scorpaena porcus*. Светлые столбики – нормоксия, темные – острая гипоксия; 1 – МДГ; 2 – ЛДГ; * – достоверно по сравнению с нормоксией, $p < 0.05$; ** – достоверно при сравнении камер сердца, $p < 0.05$.

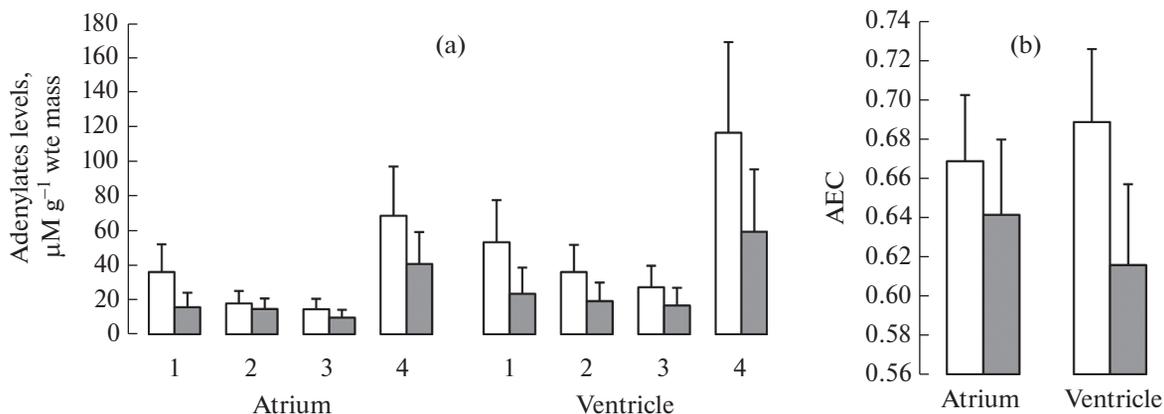


Рис. 3. Содержание аденилатов (а) и аденилатный энергетический заряд (б) в камерах сердца *Scorpaena porcus*. Светлые столбики – нормоксия, темные – острая гипоксия; 1 – АТФ; 2 – АДФ; 3 – АМФ; 4 – аденилатный пул.

(2.48 vs 2.26 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка) и величине индекса МДГ/ЛДГ (2.57 vs 2.03) (рис. 2а и 2b). В желудочке величина коэффициента корреляции (*r*) в системе МДГ↔ЛДГ достигала 0.85 (*p* < 0.05) (табл. 1).

Содержание каждого аденилата (АТФ, АДФ, АМФ), их общий пул (АП) и АЭЗ были незначительно выше в желудочке сердца (*p* > 0.05) (рис. 3). Величина *r* для АЭЗ между предсердием и желудочком составила 0.68 (*p* = 0.05). Корреляция между активностью ферментов и содержанием АТФ достигала 0.90–0.99 (*p* < 0.05–0.001) (табл. 1).

Острая гипоксия вызвала снижение активности МДГ в предсердии в 2.4 раза (*p* < 0.05), активность ЛДГ сохранилась на прежнем уровне, в результате индекс МДГ/ЛДГ уменьшился в 2.5 раза (*p* < 0.05) и составил 1.01 (рис. 2b). По сравнению с нормок-

сией корреляция в системе МДГ↔ЛДГ предсердия увеличилась вдвое (*r* = 0.86, *p* < 0.05) (табл. 1).

Напротив, в желудочке сердца активность МДГ незначительно снизилась, в то время как активность ЛДГ достоверно увеличилась в 2.2 раза до 5.01 мкмоль НАДН₂ мин⁻¹ мг⁻¹ белка (*p* < 0.05) (рис. 2а). Таким образом, активность ЛДГ в желудочке вдвое превысила таковую в предсердии (*p* < 0.05). Величина индекса МДГ/ЛДГ уменьшилась в 2.6 раза и составила 0.77 (*p* < 0.05) (рис. 2b). Корреляция в системе МДГ↔ЛДГ желудочка сердца еще более увеличилась (*r* = 0.98, *p* < 0.05) (табл. 1).

В условиях острой гипоксии содержание АТФ, АДФ, АМФ и величина АП в камерах сердца уменьшались в 1.5–2.3 раза, наибольшие изменения происходили с АТФ, но различия не были статистически значимы (*p* > 0.05) (рис. 3а). Корреляция между активностью ферментов и содержанием АТФ в желудочке составляла 0.96–0.99 (*p* < 0.001) (табл. 1). АЭЗ незначительно понизился в предсердии с 0.67 до 0.64, в желудочке – с 0.69 до 0.62 (рис. 3b). Величина *r* для АЭЗ между отделами миокарда возросла до 0.82 (*p* < 0.05).

Таблица 1. Коэффициент корреляции (*r*) между активностью МДГ, ЛДГ и содержанием АТФ при нормоксии и острой гипоксии в камерах сердца *Scorpaena porcus*

Ткани Tissues	Концентрация кислорода, мг О ₂ л ⁻¹ Concentration of O ₂ , mg L ⁻¹	
	5.6–6.7	0.9–1.2
Предсердие/Heart atrium		
МДГ ↔ ЛДГ	0.42	0.86*
МДГ ↔ АТФ	0.66	0.78*
ЛДГ ↔ АТФ	0.77*	0.80*
Желудочек/Heart ventricle		
МДГ ↔ ЛДГ	0.85*	0.98**
МДГ ↔ АТФ	0.90*	0.99**
ЛДГ ↔ АТФ	0.99**	0.96**

Примечание. * – *p* < 0.05; ** – *p* < 0.001.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для понимания механизмов устойчивости сердца к гипоксии решающее значение имеют фундаментальные знания о сердечном метаболизме [11]. “Пойкилотермное” сердце рыб представляет собой уникальную модель для сравнения толерантности к кислородному голоданию двух камер сердца, которые различаются по строению, функциональной нагрузке и характеру кровоснабжения.

Как известно, заключенное в перикардиальный мешок (перикардиальную мембрану) сердце костистых рыб находится вблизи жаберного аппарата в небольшой околосердечной полости и состоит

только из двух камер – предсердия и желудочка (двухкамерное сердце). Предсердие имеет вид мышечной камеры неправильной формы с тонкой трабекулированной стенкой [12]. По сравнению с предсердием желудочек, обеспечивающий сердечный выброс и генерирующий высокое давление в кровеносной системе, может отличаться относительным разнообразием массы, морфологии, гистологии и васкуляризации у разных видов рыб [12]. Вместе с тем типичное сердце рыб (“венозное сердце”, сердце I типа) построено из губчатого (трабекулированного) миокарда и снабжается только венозной кровью из межтрабекулярных пространств (трабекулярных полостей, лакун) при полном отсутствии коронарного кровообращения [14].

По сравнению с сердцем гомойотермных животных (птиц, млекопитающих) сердце рыб обычно функционирует, сталкиваясь с относительно низкими и переменными уровнями парциального давления кислорода (P_{O_2}) [12, 13]. Среди позвоночных животных костистые рыбы демонстрируют самые высокие межвидовые различия в паттернах морфодинамических механических характеристик [12, 13] и способе снабжения кислородом структур сердца [11], что определяет рабочий потенциал миокарда камер сердца.

Активность оксидоредуктаз миокарда скорпены при нормоксии. Малоподвижный образ жизни придонных видов рыб (включая скорпену) предполагает наличие у них “аваскулированной/венозной” разновидности сердца без коронарного кровоснабжения [14]. Одновременно не вызывает сомнения тот факт, что сердце скорпены является оксифильным органом, имеющим высокие энергетические потребности, интенсивность метаболизма которого сопоставима с ее мозгом [15, 5], что позволяет синхронизировать высокую интенсивность аэробного и анаэробного метаболизма обеспечивающих выживание организма структур. Вместе с тем нами было установлено, что производство энергии в камерах сердца скорпены характеризуется следующими отличительными чертами. При условии кровоснабжения камер сердца скорпены исключительно венозной кровью с характерным для рыб низким напряжением кислорода (P_{vO_2}) [16], предсердие и желудочек демонстрировали сопоставимо высокие показатели активности МДГ по сравнению со снабжаемым исключительно артериальной кровью O_2 -зависимым мозгом [5].

Одновременно, несмотря на условно главенствующую функциональную роль желудочка, активность МДГ данной структуры имела тенденцию к понижению по сравнению с предсердием. Доминирующим фактором, влияющим на снабжение O_2 структур сердца, являются тип и общая емкость сердечного кровоснабжения [11], что, по-видимому, может определять особенности энергетическо-

го метаболизма ткани. Для сердечной ткани рыб некоторое снижение кровообращения может сопровождаться понижением уровня ее метаболизма, что проявляется на фоне вялой двигательной функции донных рыб [15]. Сложная лакунарная организация миокарда рыб по принципу “много маленьких сердец” в границах “большого” желудочка [17] позволяет предполагать высокую вариабельность P_{vO_2} [14] либо наличие отрицательного градиента P_{vO_2} по мере удаления от основного просвета камеры до конечных участков лакун на фоне замедленного кровотока, что, по-видимому, может детерминировать флуктуации в работе оксидоредуктаз энергетического метаболизма.

При нормоксии активность ЛДГ в обеих камерах сердца скорпены имела сопоставимые значения. Считают, что более низкие значения активности ЛДГ, в частности, по сравнению с разновидностью мышечной ткани – белыми мышцами, являются характерной особенностью сердечной мышцы, определяемой преимущественно аэробным метаболизмом данного органа [15].

Кроме того, в сердце скорпены было отмечено достаточно высокое соотношение МДГ/ЛДГ как в предсердии, так и желудочке относительно аналогичных показателей упоминавшихся выше тканей мозга [5]. Предполагают, что такого рода высокие значения индекса МДГ/ЛДГ могут свидетельствовать об ослабленном преобразовании пирувата в лактат, что, как следствие, направляет метаболизм углеводов в сторону их наиболее полного окисления [18]. Установленный нами характер отношения МДГ/ЛДГ является дополнительным свидетельством “приверженности” миокарда скорпены к аэробному метаболизму, его оксифильности.

Несмотря на характерные для рыб низкие значения P_{vO_2} [16] перфузирующей сердце венозной крови, вероятно, существует ряд механизмов, позволяющих оксифильным кардиомиоцитам (в частности, желудочка) увеличивать экстракцию O_2 . Факторами, способствующими увеличению экстракции O_2 , являются большая площадь поверхности губчатого миокарда, расположение трабекул губчатого миокарда тонкими слоями для уменьшения диффузионного расстояния, минимизация внутреннего диффузионного расстояния за счет веретенообразной формы мышечных клеток. Также активность оксидоредуктаз может коррелировать с некоторыми чертами тканевой морфологии, такими как соотношение миофибриллярных и периферических митохондриальных популяций внутри кардиомиоцитов, объемная плотность митохондрий или разделение миокарда на типы клеток, “предпочитающих” аэробный или анаэробный метаболизм [19, 20]. Дополнительным фактором, поддерживающим высокую эффективность энергетического метаболизма желудочка, может быть повышенное содержание миоглобина в кар-

диомиоцитах (*myoglobin-rich hearts*), которое позволяет сердцу рыб экстрагировать постоянное количество кислорода даже при снижении его содержания в перфузате [21] независимо от скорости перфузии [22].

Аденилатная система миокарда скорпены при нормоксии. Разница в содержании аденилатного пула (АП) между предсердием и желудочком была статистически незначимой, хотя абсолютные значения АП между камерами сердца отличались практически двукратно. Закономерность неравномерного распределения аденилатов относительно камер сердца ранее была зафиксирована у млекопитающих [23], у которых наибольшее количество адениловых нуклеотидов приходится на желудочки сердца. У скорпены абсолютная величина АП и уровень АЭЗ миокарда желудочка как основной нагнетающей камеры отражают его специфические потребности в макроэргах и потенциальные возможности для осуществления синтеза/ресинтеза АТФ, которые определяют большие способности к напряжению мышечной ткани [24]. Вероятно, величина АЭЗ предсердия и желудочка, не превышающая ~ 0.7 (против максимальных значений показателя $\sim 0.9-1.0$), также отображает энергетический статус тканей, адаптированных к условиям гипоксемии.

Очевидно, что при кровоснабжении миокарда венозной кровью уровень активности ферментов цикла Кребса и гликолитических ферментов (включая изучаемые нами МДГ, ЛДГ) на фоне сравнительно невысоких показателей АЭЗ скорпены позволяет ей существовать за счет характерной для пойкилотермных животных высокой аэробной и гликолитической емкостей тканей сердца, определяемых соотношением активности креатинкиназы к цитохром *c*-оксидазе и пируваткиназы к цитохром *c*-оксидазе [25, 11], которые поддерживают производство АТФ, и в полной мере удовлетворяет энергетические запросы миокарда малоактивного хищника-засадчика (“sit-and-wait” or ambush predator) с низкой ЧСС (11–14 ударов/мин).

Активность оксидоредуктаз миокарда при острой гипоксии. В условиях резкого ограничения доступности O_2 (гипоксии) анаэробный метаболизм становится основным источником продукции АТФ для кардиомиоцитов. Гипоксия сопровождается увеличением удельной активности ЛДГ, что характерно для многих тканей (печень, мозг, мышцы), включая сердце, и указывает на их переход к анаэробному дыханию и снижению потребления энергии [26]. Так, в частности, подобное воздействие гипоксии на активность ЛДГ было зафиксировано в миокарде ряда видов рыб – ангольского клариуса *Clarias batrachus* [26], астронотуса *Astronotus crassipinnis* и дискуса *Symphysodon aequifasciatus* [27].

У скорпены, подвергшейся экспозиции к гипоксии, изменения активности оксидоредуктаз относительно камер сердца носили разнонаправленный характер. Существенное падение активности МДГ было найдено только в предсердии. Напротив, в ткани желудочка заметно возросла активность ЛДГ. Вместе с тем соотношение МДГ/ЛДГ в обеих камерах сердца уменьшалось пропорционально, что указывало на снижение выработки АТФ (метаболическая депрессия).

Как известно, основная роль МДГ заключается в обеспечении промежуточных метаболитов (оксалоацетата) для цикла Кребса, используемых в качестве источника углерода в окислительном метаболизме [26]. По-видимому, менее выраженное снижение активности МДГ в желудочке скорпены под воздействием гипоксии было сопряжено с двойственной функцией этого фермента в аэробном и анаэробном метаболизме [28], хотя следует признать, что при включении резервных механизмов анаэробного пути вклад МДГ не является определяющим. С другой стороны, достоверное падение активности МДГ в ткани предсердия может детерминироваться более пассивной функцией этой камеры сердца в обеспечении кровотока.

Предполагают, что в направленности и “объеме” метаболической реакции миокарда рыб на воздействие гипоксии существенное значение отводится экспрессии изоформ ЛДГ [27]. Так, при снижении PO_2 в сердце *Astronotus ocellatus* происходит снижение экспрессии ЛДГ сердечного типа с сопутствующим замещением этого типа фермента на ЛДГ мышечного типа. Показано, что преобладание ЛДГ мышечного типа в миокарде *Astronotus crassipinnis* связано с активацией анаэробного гликолиза на фоне накопления пирувата, которое возникает при снижении окислительного метаболизма. Фактически, в условиях кислородного голодания в миокарде наблюдается увеличение активности ЛДГ одновременно со снижением активности катализирующей реакцию конденсации ацетата (ацетил-CoA) и оксалоацетата цитратсинтазы (CS, *citrate synthase*), лимитирующей первый этап цикла Кребса [27]. Таким образом, в сердце таких животных происходит подавление окислительного метаболизма с последующей активацией анаэробного гликолиза, что обычно наблюдается у так называемых “хороших анаэробов”, таких, как водные черепахи и некоторые виды рыб [28]. Очевидно, что при острой гипоксии миокард желудочка скорпены проявляет “хорошие” анаэробные качества с высокой активностью ЛДГ.

Анализ корреляционных связей между изучаемыми показателями сердца скорпены показывает наличие очень тесной взаимосвязи между активностью оксидоредуктаз энергетического метаболизма и продукцией макроэргов, которая максимально проявляется в его желудочке. При гипоксии уста-

новленные связи подобного рода усиливаются во всех камерах сердца, отражая высокую степень сопряжения и координации путей производства АТФ, которые обеспечивают устойчивость миокарда к дефициту O_2 . Следует отметить определенное постоянство проявления взаимосвязи активности ЛДГ и количества АТФ в камерах сердца при разных значениях PwO_2 , “гарантирующее” резервные возможности миокарда.

Аденилатная система миокарда при гипоксии. Экспозиция к гипоксии сопровождалась снижением содержания адениловых нуклеотидов в камерах сердца скорпены. Данный факт согласуется с перераспределением топографии аденилатов в сердце млекопитающих при снижении PO_2 в виде резкого уменьшения содержания АТФ в тканях желудочков [23], что перекликается с распределением аденилатов и АП *per se* в миокарде скорпены. По-видимому, выраженный характер изменения содержания АТФ, АДФ, АМФ на фоне убывания АЭЗ в миокарде желудочка служит признаком физиологического напряжения данной камеры, опирающегося на гликолиз в условиях гипоксии.

Вместе с тем при снижении PwO_2 изменения суммарного АП камер сердца сопровождалось такими сдвигами АЭЗ, которые, не будучи статистически достоверными, предполагают либо слабую тенденцию к снижению АЭЗ, либо могут быть истолкованы как удержание данного показателя в определенных пределах (стационарное энергетическое состояние). Величина АЭЗ определяет скорости реакций цикла Кребса и других процессов, связанных с преобразованием энергии, поскольку заполнение системы АТФ—АДФ—АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями лежит в основе аллостерической регуляции активности ферментов, которые контролируют скорость протекания упомянутых процессов. Уменьшение АЭЗ расценивается как явный маркер ухудшения энергообеспечения ткани. Поскольку в условиях гипоксии в камерах сердца скорпены удалось избежать критического падения относительной величины данного показателя, очевидно, что при сниженном производстве макроэргов такая условная стабилизация, в частности, может достигаться путем торможения потребления или потребности в АТФ.

Упомянутое снижение потребления/потребности в АТФ при гипоксии у рыб может быть связано с замедлением работы сердца (брадикардией) [29], приспособительным механизмом, обеспечивающим оптимальное перфузионно-вентиляционное соотношение для жаберного аппарата. Причем сердце рыб обладает способностью значительно увеличивать ударный объем крови, что позволяет поддерживать сердечный выброс при гипоксической брадикардии [30].

Кроме внутриклеточной роли макроэргического соединения, АТФ принимает участие в межкле-

точной передаче сигналов, где выступает в качестве трансмиттера или котрансмиттера [31]. Закономерный вопрос о возможном привлечении части аденилатов в механизмы регуляции функциональной активности миокарда при гипоксии требует дальнейшего изучения. В настоящее время известно, что анионные каналы могут позволить АТФ проходить через мембрану кардиомиоцитов; в частности, показано, что митохондриальные потенциал-зависимые анионные каналы [32] и хлоридные каналы 116-pS сердечного саркоплазматического ретикулума [33] способны проводить как АТФ, так и адениновые нуклеотиды. Существуют доказательства прямого действия АТФ на сократимость миокарда [34]. На поверхности кардиомиоцитов АТФ под действием эктонуклеотидаз быстро распадается до АДФ, АМФ и аденозина [31]. В свою очередь, АМФ и аденозин способны активировать пуриnergические P1-рецепторы, что сопровождается уменьшением частоты и силы сокращения миокарда. Аденозин, связываясь с P1-рецепторами клеток синусно-предсердного узла, подавляет его автоматию и вызывает отрицательный хронотропный эффект [35], проявляющийся урежением сердечного ритма.

Полученные результаты свидетельствуют, что реакция камер сердца скорпены на острую гипоксию, исходно имевших статистически незначительные различия в своем метаболизме, по-видимому, детерминирована широким спектром “стартовых” характеристик этих структур, включающих архитектуру миокарда, особенности его кровоснабжения, степень функциональной нагрузки, аэробную и анаэробную емкости, которые определяют манифестацию двух метаболических стратегий при снижении PwO_2 . Так, на недостаток кислорода предсердие реагирует резким уменьшением O_2 -зависимого производства макроэргов, в то время как желудочек активизирует гликолиз, позволяющий сохранить соответствующий моменту уровень рабочего потенциала данной камеры. Вероятно, подобные изменения энергетического метаболизма разворачиваются на фоне перехода к брадикардии и устранения необходимости активного расходования производимой/ресинтезируемой АТФ, что позволяет удержать энергетический статус (АЭЗ) миокарда в определенном диапазоне. Кроме того, очевидно, что в условиях снижения PO_2 сердце скорпены успешно разрешает основную парадигму современных сердечно-сосудистых заболеваний, безусловно включающих элемент гипоксических состояний как результат дефицита подавляемого и необходимого клеткам O_2 [11]. В частности, исходя из гомологичности сердца рыб и человека паттерны “поведения” оксидоредуктаз и аденилатной системы “венозного”/аваскулированного сердца скорпены при кислородном голодании могут представлять определенный интерес

при разработке терапии окклюзии коронарных артерий у людей с сопутствующей заболеванию ишемией, что может сочетаться с необходимостью обеспечения трансмиокардиального кровотока из полости левого желудочка подобно лакунарному кровоснабжению миокарда “венозного” сердца рыб.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания № 0556-2021-0003 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и при поддержке проекта РФФИ № 20-44-920001.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Э. Колесникова – постановка задач, препарирование камер сердца, написание текста статьи и его редактирование. А.А. Солдатов – идея работы, постановка задач, планирование эксперимента, написание текста статьи и его редактирование. И.В. Головина – определение активности ферментов и статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи и его редактирование. И.В. Сысоева и А.А. Сысоев – определение содержания адениловых нуклеотидов и статистическая обработка данных. Т.А. Кухарева – участие в проведении эксперимента.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Driedzic WR* (1992) Cardiac energy metabolism. *Fish Physiology*. 12:219–266. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60335-0](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60335-0)
2. *Hochachka PW, Somero GN* (2002) *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford: Oxford University Press. 356 p.
3. *Волосовец АП* (2012) Оптимизация фармакотерапии астении в практике современной педиатрии. *Практика педиатра* 2: 23–28. [Volosovets AP (2012) Optimization of astenia pharmacotherapy in the practice of modern pediatricians. *The pediatrician practice*. 2: 23–28 (in Russ.)]
4. *Soldatov AA, Golovina IV, Kolesnikova EE, Sysoeva IV, Sysoev AA, Kukhareva TA, Kladchenko ES* (2020) Activity of Energy Metabolism Enzymes and ATP Content in the Brain and Gills of the Black Sea Scorpionfish *Scorpaena porcus* under Short-Term Hypoxia. *J Evol Biochem Physiol* 56(3):224–234. <https://doi.org/10.31857/S0044452920010143>
5. *Kolesnikova EE, Golovina IV* (2020) Oxidoreductase Activities in Oxyphilic Tissues of the Black Sea Ruff *Scorpaena porcus* under Short-term Hydrogen Sulfide Loading. *J Evol Biochem Physiol* 56(5):459–470. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
6. *Yamauchi A* (1980) *Fine Structure of Fish Heart. The Hearts and Heart-like Organs/ eds. G.H. Bourne*. New York: Academic Press. 119–148.
7. *Grimes AC, Kirby ML* (2009) The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *Fish Biol*. 74(5): 983–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>
8. *Garofalo F, Imbrogno S, Tota B, Amelio D* (2012) Morpho-functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) heart. *Comp Biochem Physiol* 163(2): 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.206>
9. *Holm-Hansen O, Booth CR* (1966) The measurement of adenosine triphosphate in the Ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr* 11(4):510–519. <https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.4.0510>
10. *Atkinson DE* (1968) The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7(11):4030–4034. <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>
11. *Ostadal B* (2014) Hypoxia and the heart of poikilotherms. *Curr Res Cardiol* 1(1): 28–32.
12. *Farrell AP, Jones DR* (1992) *The heart. Fish Physiology. XIIA/ eds. W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell*. Academic Press: San Diego. 1–73.
13. *Tota B, Cerra MC, Gattuso A* (2010) Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a “whip-brake” system of the endocrine heart. *J Exp Biol* 213: 3081–3103. <https://doi.org/10.1242/jeb.027391>
14. *Tota B, Cimini V, Salvatore G, Zummo G*. (1983) Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranchs and teleost fishes. *Am J Anat* 167(1):15–32. <https://doi.org/10.1002/aja.1001670103>
15. *Childress JJ, Somero GN* (1979) Depth-Related Enzymic Activities in Muscle, Brain and Heart of Deep-Living Pelagic Marine Teleosts. *Mar Biol* 52:273–283.
16. *Eddy FB* (1974) Blood gases of the tench (*Tinca tinca*) in well aerated and oxygen-deficient waters. *J Exp Biol* 60:71–83.
17. *Tessadori F, van Weerd JH, Burkhard SB, Verkerk AO, de Pater E, Boukens BJ, Vink A, Christoffels VM, Bakkens J* (2012) Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One* 7(10): e47644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047644>
18. *Almeida-Val VMF, Hochachka PW* (1995) Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology of*

- Fishes 5:45–55.
[https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80029-9](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80029-9)
19. Ewart HS, Driedzic WR (1987) Enzymes of energy metabolism in salmonid hearts: spongy versus cortical myocardia. *Can J Zool* 65(3):623–627.
<https://doi.org/10.1139/z87-097>
 20. Filho DW (2007) Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Fish Mitochondria. *Front Biosci* 12:1229–37.
<https://doi.org/10.2741/2141>
 21. Bailey JR, Sephton DH, Driedzic WR (1990) Oxygen uptake by isolated perfused fish hearts with differing myoglobin concentrations under hypoxic conditions. *J Mol Cell Cardiol* 22(10):1125–34.
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)90076-e](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)90076-e)
 22. Bailey JR, Driedzic WR (1988) Perfusion-independent oxygen extraction in myoglobin-rich hearts. *J Exp Biol* 135(1):301–315.
 23. Лызлова СН, Пантелеева НС, Южакова ГА (1967) Биохимическая топография адениновых нуклеотидов в сердце. Украинский биохим журн 39(2):156–161. [Lyzlova SN, Panteleeva NS, Yuzhakova GA (1967) Biochemical topography of adenine nucleotides in the heart. *Ukrainian Biochem J* 39(2):156–161 (in Russ)].
 24. Лав ПМ (1976) Химическая биология рыб. М: Пищевая промышленность. 349с. [Love RM (1976) *Chemical Biology of Fish*. М: Food industry. 349с. (in Russ.)]
 25. Christensen M, Hartmund T, Gesser H (1994) Creatine kinase, energyrich phosphates and energy metabolism in heart muscle of different vertebrates. *J Comp Physiol* 164:118–23.
<https://doi.org/10.1007/bf00301652>
 26. Kumar A, Gopesh A (2015) Effect of Hypoxia and Energy Conservation Strategies in the Air-Breathing Indian Catfish, *Clarias batrachus*. *Natl Acad Sci Lett* 38(2):135–137.
<https://doi.org/10.1007/s40009-014-0332-6>
 27. Chippari-Gomes AR, Gomes LC, Lopes NP, Val AL, Almeida-Val VMF (2005) Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp Biochem Physiol* 141:347–355.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.04.006>
 28. Hochachka PW, Somero GN (1984) *Biochemical Adaptation*. New Jersey: Princeton Univ. Press, 560 P.
 29. Sollid J, Nilsson GE (2006) Plasticity of respiratory structures—adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Resp Physiol Neurobiol* 154:241–251.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.006>
 30. Farrell AP (2007) Tribute to P.L. Lutz: A Message From the Heart - Why Hypoxic Bradycardia in Fishes? *J Exp Biol* 210(Pt 10):1715–25.
<https://doi.org/10.1242/jeb.0278>
 31. Зверев АА, Аникина ТА, Исаков НГ, Леонов НВ, Зефирова ТЛ (2018) АТФ ингибирует спонтанную сократимость предсердий крыс Ученые записки Казанского университета 160(4):558–567 [Zverev AA, Anikina TA, Isakov NG, Leonov NV, Zefirov TL (2018) ATF inhibits spontaneous atrial contraction in rats. *Scientific notes of Kazan University*. 160(4):558–567 (in Russ.)]
 32. Rostovtseva TK, Bezrukov SM (1998) ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J* 74:2365–2373.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77945-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77945-7)
 33. Kawano S, Kuruma A, Hirayama Y, Hiraoka M (1999) Anion permeability and conduction of adenine nucleotides through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274:2085–2092.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2085>
 34. Anikina TA, Bilalova GA, Zverev AA, Sitdikov FG (2007) Effect of ATP and its analogs on contractility of rat myocardium during ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 144(1):4–7.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0239-z>
 35. Gessi S, Merighi S, Varani K, Borea PA (2011) Adenosine receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61:41–75.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00002-3>

ACTIVITY OF ENERGY METABOLISM ENZYMES AND THE ADENYLATE SYSTEM IN HEART CHAMBERS OF A BLACK SEA (*SCORPAENA PORCUS* L.) UNDER ACUTE HYPOXIA

E. E. Kolesnikova^{a, #}, A. A. Soldatov^a, I. V. Golovina^a, I. V. Sysoeva^a,
 A. A. Sysoev^a, and T. A. Kukhareva^a

^a A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

[#] e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

The fish heart is a unique model to compare the resistance to hypoxia of its two chambers (atrium and ventricle), which are different in the structure and functional loading. The activity of oxydoreductases malate dehydrogenase (MDH, 1.1.1.37) and lactate dehydrogenase (LDH, 1.1.1.27), as well as the parameters of the adenylate system in the heart chambers of a Black Sea scorpaena, were studied under acute hypoxia (0.9–1.2 mg O₂ L⁻¹, 90 min). Despite the leading functional role of the ventricle, MDH activity in this heart compartment tended to decrease compared to the atrium in the absence of differences in LDH activity. At the same time, the difference in the level of adenylates (ATP, ADP, AMP), total adenylate pool (AP), and adenylate energy charge (AEC) between the atrium and ventricle was statistically nonsignificant, although the absolute value of the ventricular AP was almost twice as large as the atrial AP. The AEC values of the atrium and ventricle perfused only with venous blood did not exceed ~0.7 (vs. the maximum of this parameter ~0.9–1.0), apparently reflecting the energy status of tissues initially adapted to hypoxia. Under acute hypoxia, there were found two strategies for energy metabo-

lism transformation in the heart chambers in the form of a 2.4-fold drop in MDH activity ($p < 0.05$) in the atrium and a 2.2-fold increment in LDH activity ($p < 0.05$) in the ventricle. Probably, the decline in MDH activity in the atrial tissue was determined by a more passive function of this heart chamber in providing the blood flow. The exposure to acute hypoxia led to a decrease in the level of adenylate nucleotides and an AEC decline in the heart chambers, as pronounced most distinctly in the ventricular myocardium. When decreasing PO_2 , the AEC in the heart chambers shifted within quite a narrow range (from 0.7 to 0.6), indicating the retention of a certain stationary energy status achieved by inhibition of ATP consumption or demand. The putative mechanism for retaining the AEC may be based on the negative chronotropic effect of hypoxia.

Keywords: fish, hypoxia, heart chambers, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, adenylate system

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ВВЕДЕНИЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 ОСЛАБЛЯЕТ ЛИХОРАДОЧНУЮ РЕАКЦИЮ ПРИ ЭНДОТОКСЕМИИ У ГОЛУБЕЙ (*COLUMBA LIVIA*) И КРЫС

© 2021 г. К. В. Лапшина^{1,*}, И. В. Гужова², И. В. Екимова¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail : ksenia.lapshina@gmail.com

Поступила в редакцию 28.04.2021 г.

После доработки 17.06.2021 г.

Принята к публикации 23.06.2021 г.

Известно, что стресс-индуцибельный белок теплового шока 70 кДа (Heat shock protein 70, Hsp70) способен оказывать защитный эффект при эндотоксемии и сепсисе благодаря способности взаимодействовать с рецепторами иммунокомпетентных клеток и модулировать иммунный ответ. Однако остается не известным, способен ли Hsp70 ослабить лихорадочную реакцию, характерную для эндотоксемии. Нами было выполнено сравнительно-физиологическое исследование, в ходе которого у голубей и крыс с предварительно вживленными электродами и термисторами для регистрации показателей терморегуляции (температуры мозга, периферической вазомоторной реакции, сократительной активности мышц) были изучены эффекты профилактического введения рекомбинантного Hsp70 человека (HSPA1A) при эндотоксемии, вызванной введением липополисахарида (ЛПС), а также проанализировано изменение числа лейкоцитов у крыс в тех же условиях. Установлено, что профилактическое введение Hsp70 уменьшает величину ЛПС-индуцированного лихорадочного ответа у голубей и крыс и ускоряет нормализацию числа лейкоцитов в крови у крыс. Полученные данные свидетельствуют об универсальности физиологических механизмов реализации защитных свойств Hsp70 у данных представителей теплокровных животных.

Ключевые слова: белок теплового шока 70 кДа, эндотоксемия, температура мозга, лейкоциты, голубь, крыса

Список сокращений: Hsp70 – heat shock protein 70 kDa, белок теплового шока 70 кДа, IL-1 β – interleukin-1 β , интерлейкин-1 β , IL-6 – interleukin-6, интерлейкин-6, PGE₂ – prostaglandine E₂, простагландин E₂, TLR – Toll-like receptors, Toll-подобные рецепторы, TNF- α – tumor necrosis factor α , фактор некроза опухолей α , ЛПС – липополисахарид, САМ – сократительная активность мышц, T_м – температура мозга, T_{кп} – температура кожных покровов, ЭМГ – электромиограмма

DOI: 10.31857/S0044452921050090

Эндотоксемия – состояние, вызываемое увеличением уровня эндотоксина грамотрицательных бактерий липополисахарида (ЛПС) в крови. В первую очередь ЛПС влияет на функции иммунокомпетентных клеток и клеток эндотелия сосудов, приводя к активации иммунной системы, усилению синтеза провоспалительных цитокинов, развитию фебрильной реакции (лихорадки), изменениям в функционировании нервной, эндокринной и др. систем организма [1–3]. Лихорадка является древним защитно-приспособительным механизмом, характерным для эктотермных и эндотермных позвоночных, и направленным на обеспечение оптимальных условий для функционирования иммунной системы и элиминации патогена [2, 4]. У эктотермных животных при развитии иммунного

ответа наблюдается поведенческая лихорадка – для повышения температуры тела они стараются выбрать более теплое место [2, 4]. У эндотермных животных (млекопитающих и птиц) регулируемое повышение температуры тела при действии ЛПС или других патогенов происходит благодаря ограничению теплоотдачи за счет периферической вазоконстрикции и усилению сократительного и несократительного термогенеза [5–8]. Следует отметить, что при изучении изменений терморегуляции при эндотоксемии и других состояниях, сопровождаемых лихорадкой, основное внимание уделяется оценке температуры тела, тогда как изучению температуры мозга (T_м) посвящено существенно меньше исследований. Ряд данных литературы свиде-

тельствует о том, что повышение T_m при гипертермии и ЛПС-индуцированной эндотоксемии может усиливать проницаемость гемато-энцефалического барьера, влиять на активность нейронов и метаболизм головного мозга, способствовать усилению продукции бета-амилоида [9–13]. Предполагается, что повышение T_m является особенно критичным для пациентов с черепно-мозговыми травмами, ишемическими и геморрагическими инсультами, маленьких детей со склонностью к фебрильным судорогам [14, 15]. Такой сценарий может быть опасен и для септических пациентов при развитии хронической фебрильной реакции, например, при повышении в крови количества ЛПС и наличии бактериемии, или при развитии “цитокинового шторма” и вирусного сепсиса, наблюдающегося в тяжелых случаях при заражении SARS-coV-2 [16, 17].

Имеющиеся данные литературы свидетельствуют о том, что ЛПС-индуцированная эндотоксемия вызывает у представителей различных групп животных (млекопитающих, птиц, рыб, иглокожих) усиление экспрессии стресс-индуцируемого белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (Heat shock proteins, HSP70) в различных тканях [18–22]. Hsp70 относится к эволюционно-древней системе шаперонов, оказывающей защитный эффект на клеточном и организменном уровнях при действии различных стрессорных факторов и характеризующейся чрезвычайно консервативной структурой [23]. Известно, что Hsp70 способен выходить в системный кровоток и модулировать активность иммунокомпетентных клеток, однако механизмы его взаимодействия с различными типами клеток до сих пор окончательно не изучены. Считалось, что внеклеточный Hsp70, получивший название “шаперокин”, может выполнять функцию “сигнала опасности” за счет взаимодействия с различными рецепторами моноцитов/макрофагов, дендритных клеток и нейтрофилов (Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors, TLR 2,4), CD91, CD40, Lox-1 и др.), вызывая выработку провоспалительных цитокинов и NO, а также участвуя в презентации антигена [24–27]. Внутривенное введение экзогенного Hsp70 способствует уменьшению смертности при сепсисе, корректирует некоторые показатели гемодинамики и свертываемости, нормализует уровень билирубина и креатинина, в экспериментах *in vitro* снижает продукцию NO макрофагами, уменьшает продукцию активных форм кислорода и частично нормализует апоптоз нейтрофилов в модели эндотоксинового сепсиса [28–31]. Приведенные выше данные свидетельствуют о способности экзогенного Hsp70 влиять на показатели иммунного ответа и оказывать защит-

ный эффект в моделях сепсиса, однако не позволяют сделать вывод о том, происходит ли при этом коррекция характерных для действия ЛПС изменений температуры тела, периферической вазомоторной реакции, сократительного термогенеза. Исследований, направленных на изучение влияния экзогенного Hsp70 на показатели терморегуляции при лихорадочной реакции, до сих пор не проводилось. Ранее было показано, что экзогенный Hsp70, введенный в ликворную систему головного мозга, способен вызывать снижение T_m , сократительного термогенеза и частоты сердечных сокращений у голубей в контрольных условиях [32, 33]. Эти изменения были сопряжены с увеличением длительности эпизодов и общего времени медленного сна, обладающего антистрессовой функцией. Эти данные явились обоснованием для исследования эффектов экзогенного Hsp70 на терморегуляторные показатели лихорадочного ответа и показатели системного воспаления (лейкоцитоз) в модели эндотоксемии у представителей животных класса птиц (голуби *Columba Livia*) и млекопитающих (крысы популяции Вистар).

Проведение сравнительно-физиологического исследования эффектов Hsp70 при эндотоксемии позволит выяснить вклад стресс-индуцируемого белка Hsp70 в механизмы регуляции лихорадочного ответа при эндотоксемии, а также выявить общие и специфические закономерности в проявлении возможных защитных эффектов Hsp70 при действии бактериальных эндотоксинов.

Задачей данного исследования явилось проведение сравнительного анализа эффектов экзогенного Hsp70 на показатели лихорадочной реакции (T_m , периферическую вазомоторную реакцию, сократительную активность мышц (САМ), и число лейкоцитов) при ЛПС-индуцированной эндотоксемии у голубей *Columba Livia* и крыс популяции Вистар.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Электрофизиологические опыты выполнены на взрослых голубях *Columba livia* обоего пола и массой 350–420 г и самцах крыс популяции Вистар массой 280–320 г. Исследование числа лейкоцитов выполнено на самцах крыс популяции Вистар той же массы и возраста. Животных, предназначенных для проведения электрофизиологических экспериментов, за 7–10 дней до хирургической операции помещали в изолированную от звуковых и световых раздражителей экспериментальную камеру для адаптации к условиям содержания (фотопериоду (свет–темнота 12 : 12 ч) и температурному режиму ($23 \pm 1^\circ\text{C}$)). Во время экспери-

мента животные находились в прозрачной клетке из органического стекла. Распределение голубей в экспериментальные группы происходило с помощью простой рандомизации. Распределение крыс осуществлялось на основе стратифицированной рандомизации с использованием теста “открытое поле” и оценки реакции на хэндлинг. В ходе тестирования были отобраны и распределены по экспериментальным группам животные, продемонстрировавшие высокую исследовательскую активность и низкую тревожность.

Для голубей неактивной фазой суток является темная, а для крыс – светлая. Эксперименты на голубях начинали за 4 ч до наступления темной фазы суток, на крысах – в начале светлой фазы суток. Крыс, предназначенных для изучения числа лейкоцитов, содержали в виварии при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Вода и пища были доступны без ограничений. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Базельской декларации и протокола, утвержденного этическим комитетом ИЭФБ РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Препараты. Для индукции эндотоксемии у голубей и крыс применяли эндотоксин ЛПС (*Escherichia Coli* 0111:B4, Sigma Aldrich, USA). ЛПС растворяли в апиrogenном 0.9% изотоническом физиологическом растворе (физ. р-ре) и вводили внутривенно (в/в) в дозе 100 мкг/кг и в объеме не более 0.2 мл.

Очищенный рекомбинантный белок теплового шока Hsp70 (HSPA1A) человека был получен из экстракта *E. coli*, трансформированных плазмидой pMSHsp70. Hsp70 выделяли методом ионно-обменной хроматографии с применением DEAE-Sepharose (GE Healthcare) с последующей АТФ-аффинной хроматографией с применением АТФ-агарозы (Sigma, США). Далее при помощи геля полимиксина-В (Sigma, США) удаляли примесь бактериального эндотоксина ЛПС. Оценку количества ЛПС в растворе очищенного белка проводили с помощью теста LALA E-Toxate (Sigma Aldrich, США). Конечный раствор белка Hsp70 содержал менее 0.5 ЕУ/мг ЛПС [34, 35]. Полученный препарат растворяли в физ. р-ре и вводили животным (в/в) за 15 мин до введения ЛПС или контрольного раствора в дозе 85 мкг/кг и в объеме не более 0.1 мл.

Для исключения влияния на результаты экспериментов примеси контаминантов в препарате Hsp70, основным из которых является ЛПС, была выполнена серия опытов с применением термоденатурированного Hsp70 (Hsp70ден) в той же дозе.

Для этого Hsp70 нагревали на водяной бане до 100°C в течение 5 мин.

В качестве контрольного раствора животным вводили физ. р-р, использовавшийся как растворитель для препаратов ЛПС, Hsp70 и Hsp70ден. Физ. р-р вводили в объеме 0.1 и 0.2 мл в качестве контроля к Hsp70 и ЛПС соответственно.

Дизайн эксперимента. Для того чтобы изучить и сравнить влияние Hsp70 на ЛПС-индуцированные изменения показателей терморегуляции, на голубях ($n = 6$) и крысах ($n = 6$) были выполнены следующие серии исследований с внутривенным (в/в) введением препаратов в вышеуказанных дозах:

- 1) контрольная группа, введение (в/в) физ. р-ра дважды с интервалом 15 мин;
- 2) введение физ. р-ра (в/в) за 15 мин до ЛПС (в/в);
- 3) введение Hsp70 (в/в) за 15 мин до физ. р-ра (в/в);
- 4) введение Hsp70 (в/в) за 15 мин до ЛПС (в/в).

Для того чтобы исключить влияние остаточной контаминации (ЛПС) в препарате Hsp70 на физиологические показатели при эндотоксемии, на другой группе голубей ($n = 5$) и крыс ($n = 5$) было выполнено серии экспериментов с применением Hsp70ден в той же дозе.

Для изучения числа лейкоцитов у крыс брали кровь из хвостовой вены через 1 ч и через 5 ч после введения контрольных растворов, препаратов Hsp70, ЛПС или профилактического введения препаратов Hsp70 до ЛПС. Препараты вводили в той же дозировке и в том же объеме, как и в случае изучения электрофизиологических показателей.

Данная серия экспериментов включала следующие группы:

- 1) контрольная группа, введение (в/в) физ. р-ра дважды с интервалом 15 мин ($n = 8$);
- 2) введение физ. р-ра (в/в) за 15 мин до ЛПС ($n = 8$);
- 3) введение Hsp70 (в/в) за 15 мин до физ. р-ра ($n = 8$);
- 4) введение Hsp70 (в/в) за 15 минут до ЛПС (в/в) ($n = 8$);
- 5) введение Hsp70ден (в/в) за 15 мин до физ. р-ра ($n = 6$);
- 6) введение Hsp70ден (в/в) за 15 минут до ЛПС (в/в) ($n = 6$).

Хирургические манипуляции. Хирургические операции проводили под общим наркозом с использованием золетил-100 (tiletamine hydrochloride and zolazepam; Virbac, Carros, France). Голубям вводили 55 мг/кг внутримышечно, крысам – 85 мг/кг.

Изменения T_m и температуры кожных покровов ($T_{кп}$) оценивали с помощью минитермисторов (BetaTherm cat 2K7 MCD1, диаметром 0.46 мм, сопротивлением 1.5 кОм, США). Минитермистор, предназначенный для измерения T_m , у голубей устанавливали над областью гипоталамуса согласно координатам: 9 мм роstralнее нулевой точки, 2 мм латерально от средней линии и 6 мм ниже поверхности черепа [36]. Крысам минитермистор вживляли по следующим координатам: 0.5 мм каудальнее брегмы, 2.5 мм латерально от средней линии и 5 мм ниже поверхности черепа [37]. Минитермистор для регистрации T_m и у голубей, и у крыс закрепляли на поверхности черепа с помощью самоотвердевающей пластмассы “Акродент” (Стома, Украина). Минитермисторы, регистрирующие $T_{кп}$ (для оценки периферической вазомоторной реакции), фиксировали на неоперенной части ноги у голубей и в основании хвоста у крыс. Для регистрации электромиограммы (ЭМГ) вживляли крючкообразные позолоченные электроды в грудную мышцу голубям и в шейную мышцу крысам. Провода от минитермисторов и электродов проводились под кожей до места прикрепления разъема. У голубей все провода от вживленных электродов и минитермисторов протягивались под кожей и подключались к микросхеме – “рюкзачку” (15 г), надетому на спину голубю. У крыс разъемы для подключения кабеля устанавливали на голове и фиксировали с помощью “Акродент”. Провода от электродов, регистрирующих ЭМГ и $T_{кп}$, также проводили под кожей и подключали к общему разъему. Сигналы от “рюкзачка” или разъема на голове переключались на кабель, идущий к предварительному усилителю, и затем через блок аналоговой обработки и оцифровки поступали на компьютер для архивирования и обработки. Наличие подвижного коммутатора предотвращало перекручивание проводов и позволяло животным свободно передвигаться. Эксперименты начинали после полного восстановления животных после операции (через 12–14 дней).

Обработка сигнала. Регистрацию комплекса электрофизиологических данных у голубей проводили в течение 24 ч, у крыс – в течение 12 ч. Для регистрации и анализа электрофизиологических параметров использовали оригинальную компьютерную систему SASR–8800 (США) [38]. Первичное усиление сигналов (в 100 раз) осуществлялось в предусилителе. Далее сигналы поступали в блок аналоговой обработки для дальнейшего усиления. Для этого использовался аналого-цифровой преобразователь с 8 аналоговыми входами, диапазоном входного напряжения ± 5 В, уровнем шумов –

0.01%. Микрокомпьютер отбирал каждый сигнал 120 раз в секунду с помощью моделирующей системы АЦП емкостью 12 бит. Полномасштабный диапазон для электродов был равен ± 1 мВ. Частотный диапазон для ЭМГ составлял 60–1000 Гц, сигналы ЭМГ усреднялись таким образом, чтобы выдавать 10 измерений в секунду. Все полученные средние величины сохранялись как двоичные целые числа с определенным знаком и с разрешением 0.25 мВ. [38]. Экспериментальная установка и компьютерные программы позволяли измерять температуры с точностью до 0.01 С. Повышение точности измерения температуры определялось тщательным построением калибровочной кривой. Калибровка термисторов производилась в широком диапазоне температур и каждая из температурных точек получалась путем усреднения 10 измерений за секунду.

Обработку электрофизиологических данных проводили с помощью комплекса программ, разработанных ранее сотрудником университета Таллахасси (США) D. Ross [38] и сотрудником ИЭФБ РАН А.Л. Зиминым. В наших экспериментах вычислялась средняя T_m и $T_{кп}$ за 30 мин. Для оценки уровня САМ производилась обработка ЭМГ, амплитуда которой пропорциональна степени напряжения мышцы и расстоянию между отводящими электродами. С помощью программного обеспечения вычислялась средняя интегрированная ЭМГ грудной мышцы за 1 ч.

Подсчет числа лейкоцитов. Определение суммарного пула циркулирующих в крови лейкоцитов осуществляли с использованием стандартной методики подсчета в камере Горяева. Для визуализации ядер лейкоцитов применяли 3% раствор уксусной кислоты, окрашенной метиленовым синим. Для подсчета числа лейкоцитов кровь разводили в 10 раз.

Методы статистической обработки результатов. Для статистической обработки данных и подготовки иллюстраций применяли программу GraphPad Prism 8. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Анализ изменений T_m , $T_{кп}$ и САМ проводили с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями RM (repeated measures)-ANOVA. Для обработки числа лейкоцитов применяли one-way ANOVA для независимых выборок (с использованием post-hoc анализа с помощью критерия Тьюки). Данные на рисунках представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

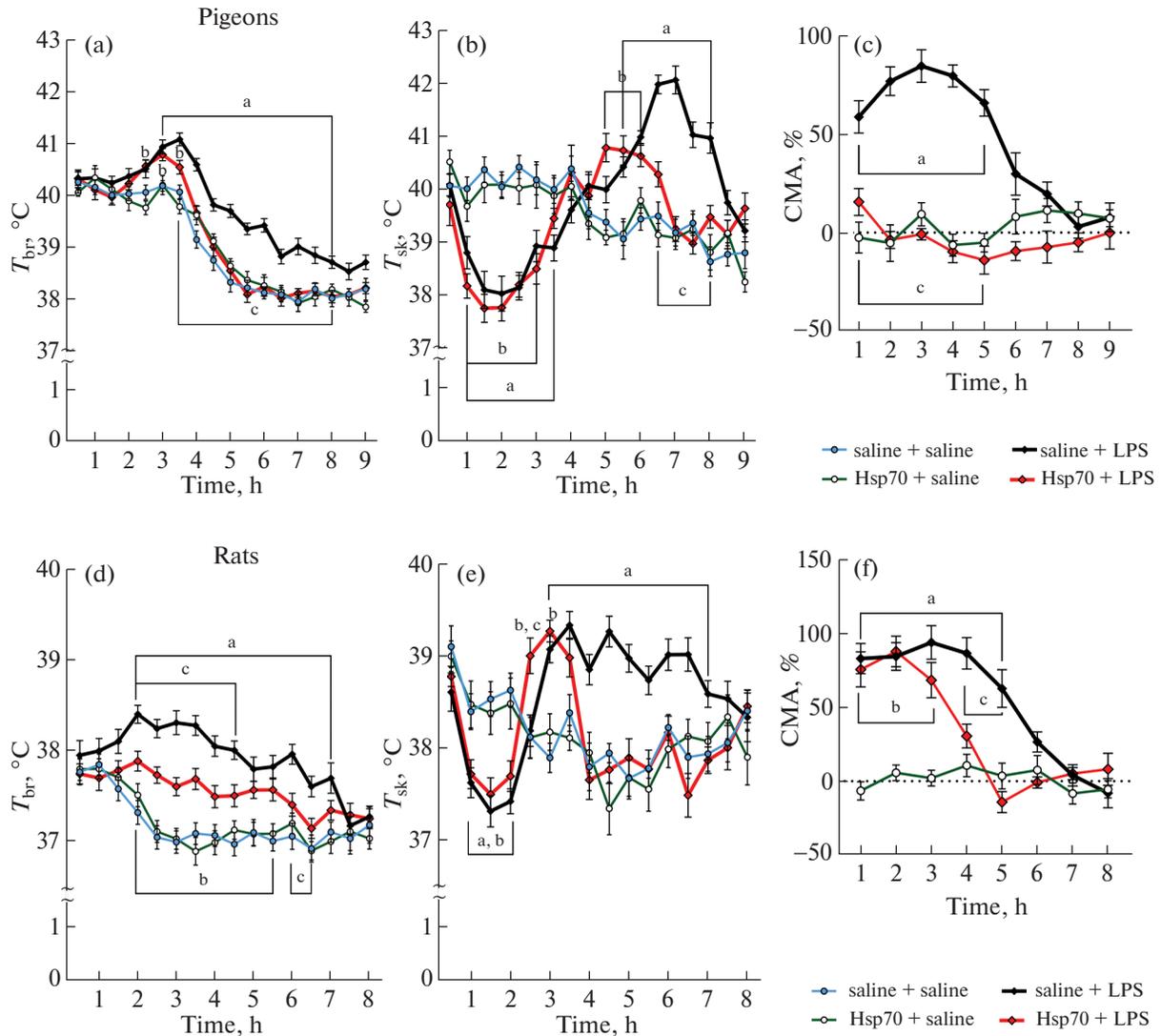


Рис. 1. Влияние препарата Hsp70 на показатели терморегуляции при эндотоксемии у голубей (а–с) и крыс (d–f). На рисунках (а), (b), (d) и (f) представлены изменения температуры мозга (T_{br}) и температуры кожных покровов (T_{sk}). По оси ординат представлены значения температур мозга и кожных покровов в контроле (saline+saline), при введении Hsp70 (Hsp70 + saline), ЛПС (saline + LPS) и при профилактическом введении Hsp70 до начала эндотоксемии (Hsp70 + + LPS), по оси абсцисс – время в часах. Для (а) $F(3,20)=19.20$, $p < 0.0001$; (b) $F(3,20) = 3.855$, $p = 0.0251$; (d) $F(3,20) = 7.398$, $p = 0.0016$; (e) $F(3,20) = 5855$, $p = 0.0026$. На рисунках (с) и (f) представлено изменение уровня сократительной активности (СМА) у голубей и крыс при тех же воздействиях относительно контрольного уровня. Для (с) $F(2,15) = 314.3$, $p < 0.0001$; для (f) $F(2,15) = 334.3$, $p < 0.0001$. ^a $p < 0.05$ достоверность отличий эффектов ЛПС по сравнению с контролем; ^b $p < 0.05$ достоверность отличий эффектов профилактического введения Hsp70 до ЛПС по сравнению с контролем; ^c $p < 0.05$ достоверность отличий эффектов ЛПС по сравнению с действием профилактического введения Hsp70 до ЛПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние Hsp70 на показатели терморегуляции при эндотоксемии у голубей и крыс

Проведенное исследование показало, что внутривенное введение препарата Hsp70 ни у голубей, ни у крыс не вызывало изменений T_m , периферической вазомоторной реакции и САМ по сравнению с контролем (рис. 1).

Введение ЛПС вызывало у голубей развитие лихорадки, что проявлялось повышением T_m по срав-

нению с контролем в период с 3-го по 8-й ч в среднем на $1.00 \pm 0.10^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$) (рис. 1a). В течение первых 3.5 ч выявлено снижение $T_{кп}$ в среднем на $1.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$), свидетельствующее о развитии вазоконстрикции, приводящей к ограничению теплоотдачи и способствующей повышению T_m (рис. 1b). Через 5.5 ч после введения ЛПС происходило повышение $T_{кп}$ в среднем на $1.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$), что свидетельствовало о том, что вазоконстрикция сменялась на вазодилатацию, способствующую усилению теплоотдачи. Кроме того,

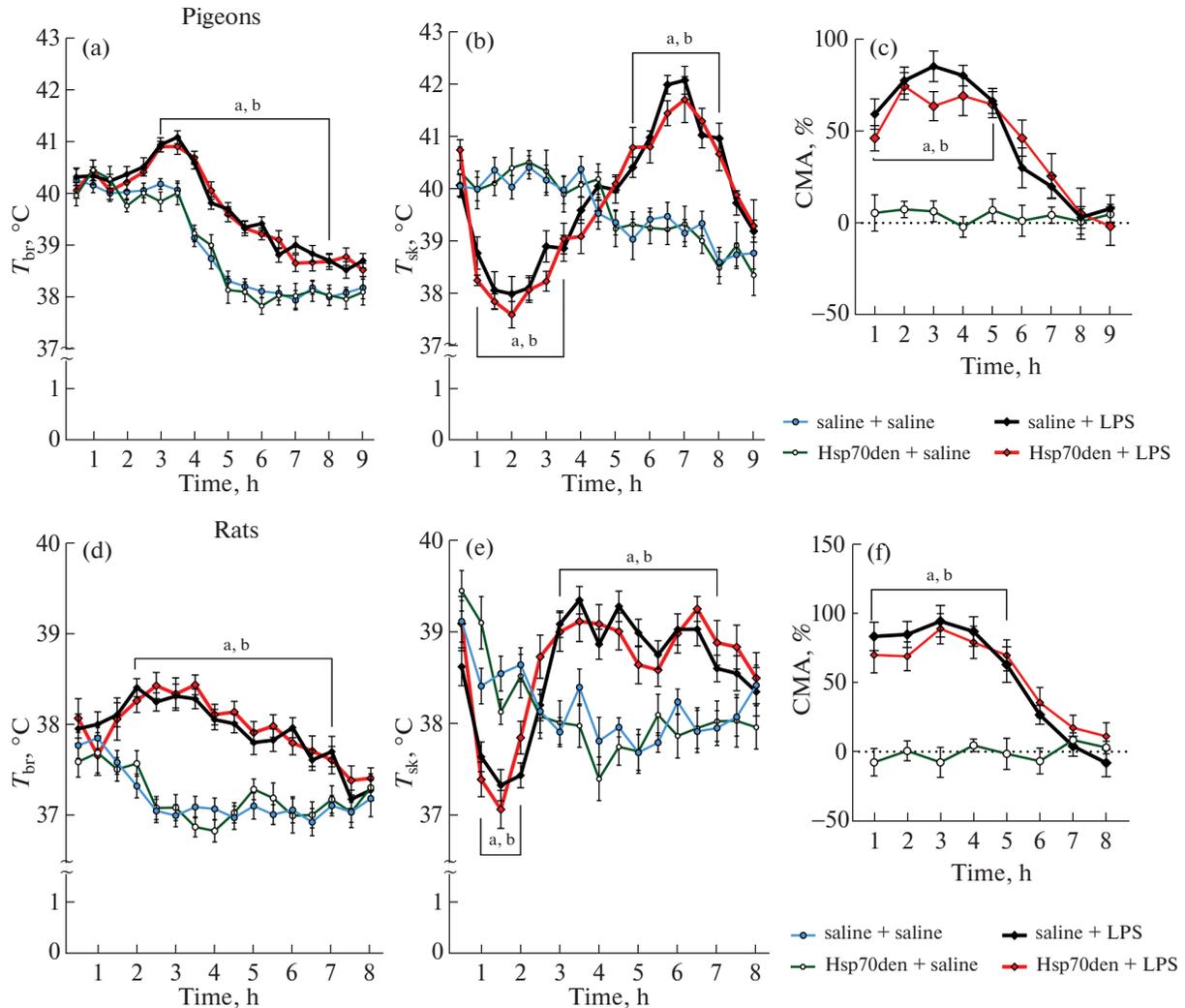


Рис. 2. Влияние Hsp70ден на показатели терморегуляции при эндотоксемии у голубей (а–с) и крыс (d–f). На рисунках (а), (b), (d) и (e) представлены изменения температуры мозга (T_{br}) и температуры кожных покровов (T_{sk}). По оси ординат представлены значения температур мозга и кожных покровов в контроле (saline+saline), при введении термоденатурированного Hsp70 (Hsp70den+saline), ЛПС (saline+LPS) и при профилактическом введении термоденатурированного Hsp70 до начала эндотоксемии (Hsp70den+LPS). По оси абсцисс – время в часах. Для (а) $F(3,16)=18.14$, $p < 0.0001$; (b) $F(3,16) = 8.42$, $p = 0.0014$; (d) $F(3,16) = 10.32$, $p = 0.0005$; (e) $F(3,16) = 8.44$, $p = 0.0014$. На рисунках (с) и (f) представлено изменение уровня сократительной активности (CMA) у голубей и крыс при тех же воздействиях относительно контрольного уровня. Для (с) $F(2,12)=210.1$, $p < 0.0001$; (f) $F(2,12)=323.9$, $p < 0.0001$. ^a $p < 0.05$ достоверность отличий эффектов ЛПС по сравнению с контролем; ^b $p < 0.05$ достоверность отличий эффектов профилактического введения термоденатурированного Hsp70 до ЛПС по сравнению с контролем.

повышение T_m при эндотоксемии сопровождалось увеличением САМ в среднем на 73% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольным уровнем, что свидетельствовало об усилении теплопродукции (рис. 1с).

В конце активной фазы суток T_m у крыс в среднем на 2 °С ниже, чем у голубей (рис. 1 d). При введении ЛПС у крыс повышение T_m (в среднем на 1.1 ± 0.08 °С ($p < 0.05$)) начиналось на 1 ч раньше, чем у голубей, и сохранялось в течение последующих 5 ч (рис. 1d). Повышение T_m сопровождалось

схожим по динамике изменением $T_{кп}$, однако период развития вазоконстрикции у крыс был менее продолжительным, чем у голубей (в течение 2-го часа), а период вазодилатации – наоборот, более длительным (с 3-го по 7-й час) (рис. 1e). Как и у голубей, у крыс при действии ЛПС наблюдалось усиление САМ на 82% ($p < 0.05$), способствовавшее повышению теплопродукции (рис. 1f).

Профилактическое введение Hsp70 голубям ослабляло ЛПС-индуцированную лихорадку – по-

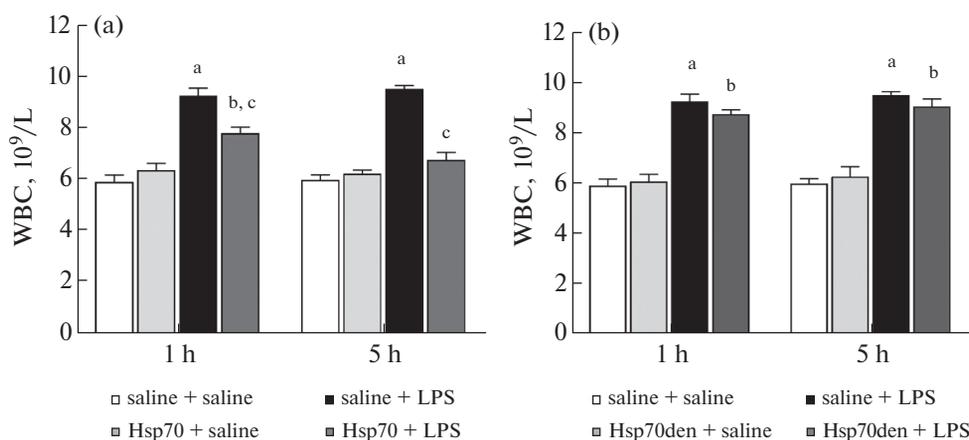


Рис. 3. Влияние Hsp70 и Hsp70ден на число лейкоцитов у крыс через 1 ч и через 5 ч после начала эндотоксемии. На рис. (a) представлены изменения числа лейкоцитов в контроле (saline+saline), при введении Hsp70 (Hsp70+saline), ЛПС (saline+LPS) и при профилактическом введении Hsp70 до начала эндотоксемии (Hsp70+LPS), на рисунке (b) – в контроле (saline+saline), при введении термоденатурированного Hsp70 (Hsp70den+saline), ЛПС (saline+LPS) и при профилактическом введении термоденатурированного Hsp70 до начала эндотоксемии (Hsp70den+LPS). На рисунке (a) $F(3,28) = 38.4$, $p < 0.0001$ (через 1 ч), $F(3,28) = 70.11$, $p < 0.0001$ (через 5 ч), на рисунке (b) $F(3,26) = 48.2$, $p < 0.0001$ (через 1 ч), $F(3,26) = 50.1$, $p < 0.0001$ (через 5 ч). ^a $p < 0.05$ – достоверность отличий эффектов ЛПС по сравнению с контролем; ^b $p < 0.05$ – достоверность отличий эффектов профилактического введения Hsp70 или Hsp70den до ЛПС по сравнению с контролем; ^c $p < 0.05$ – достоверность отличий эффектов ЛПС по сравнению с действием профилактического введения Hsp70 или Hsp70den до ЛПС.

вышение T_m в среднем $0.52 \pm 0.06^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$)) наблюдалось лишь в течение 1 ч (рис. 1a). Применение Hsp70 не предотвращало развитие периферической вазоконстрикции у голубей, но приводило к сокращению продолжительности периода вазодилатации (рис. 1b). Кроме того, Hsp70 полностью устранял ЛПС-индуцируемое усиление САМ, что могло способствовать уменьшению теплопродукции и выраженности лихорадочной реакции (рис. 1c).

У крыс профилактическое применение Hsp70 в условиях эндотоксемии приводило к уменьшению величины повышения температуры мозга с $1.1 \pm 0.08^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$) до $0.56 \pm 0.05^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$) (рис. 1d), однако период повышения T_m у крыс сохранялся на 2.5 ч дольше, чем у голубей (рис. 1d). Применение Hsp70 не устраняло развитие характерной для действия ЛПС периферической вазоконстрикции, однако продолжительность периода вазодилатации уменьшалась (рис. 1e). У крыс, в отличие от голубей, применение Hsp70 не предотвращало развитие ЛПС-индуцируемого усиления САМ, но способствовало сокращению периода повышения этого показателя по сравнению с действием одного ЛПС (рис. 1f).

Несмотря на то что препарат Hsp70 после выделения проходил очистку от эндотоксина с помощью полимиксина-В, необходимо было выполнить проверку на наличие остаточной примеси ЛПС, которая могла бы повлиять на результат экспериментов. Известно, что ЛПС устойчив к действию высоких температур, и для исключения возможности его влияния на результат исследования

была выполнена дополнительная серия опытов с применением препарата Hsp70ден. Данный препарат был подвергнут нагреванию, которое вызывало денатурацию и потерю активности Hsp70, но не влияло бы на свойства возможной примеси ЛПС. Выполненные нами эксперименты показали, что введение (в/в) Hsp70ден не оказывало влияния на характерные для эндотоксемии изменения показателей терморегуляции (рис. 2f). Эти данные свидетельствуют о том, что ослабление лихорадки у голубей и крыс при профилактическом введении Hsp70 являлось собственным эффектом препарата.

Влияние Hsp70 на число лейкоцитов при эндотоксемии у крыс

Многочисленные исследования свидетельствуют о способности Hsp70 модулировать функционирование иммунокомпетентных клеток, однако в наших экспериментах было показано, что внутривенное введение экзогенного Hsp70 не вызывает значимых изменений числа лейкоцитов ни через 1 ч, ни через 5 ч после инъекции (рис. 3a). Введение ЛПС вызывало у крыс увеличение количества лейкоцитов на 56% и 58% через 1 ч и через 5 ч соответственно (рис. 3a). При профилактическом введении Hsp70 через 1 ч наблюдалось уменьшение числа лейкоцитов по сравнению с действием одного ЛПС. Через 5 ч значения этого показателя достигали контрольного уровня (рис. 3a).

Наши эксперименты показали, что применение препарата Hsp70ден не вызывало изменения числа

лейкоцитов, а введение Hsp70 ден до индукции эндотоксемии не корректировало характерный для действия ЛПС лейкоцитоз (рис. 3b). Эти данные подтверждают, что обнаруженная нами способность Hsp70 ослаблять ЛПС-индуцированный лейкоцитоз является собственным свойством экзогенного Hsp70.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эндотоксин ЛПС является широко применяемым препаратом для создания модели эндотоксемии и изучения изменений различных показателей терморегуляции. Проведенное нами исследование показало, что введение ЛПС и у голубей, и у крыс вызывало повышение T_m , сопровождавшееся развитием вазоконстрикции и повышением уровня САМ. Вазоконстрикция является периферической сосудистой реакцией, направленной на ограничение теплоотдачи, и способствующей повышению T_m . Усиление САМ при эндотоксемии является механизмом, направленным на увеличение теплопродукции и способствует повышению температуры тела [6, 8]. Последующее развитие вазодилатации, наблюдаемое и у голубей, и у крыс, по видимому, могло являться механизмом, ограничивающим дальнейшее повышение T_m . Таким образом, в нашем исследовании развитие эндотоксемии у голубей и крыс характеризовалось схожими изменениями показателей терморегуляции, что свидетельствует об общности терморегуляторных механизмов реакции на эндотоксин у голубей и крыс. Отличия в реакции голубей и крыс на ЛПС состояли в том, что у крыс фебрильный ответ развивался раньше, чем у голубей. Кроме того, период повышения T_m , а также периоды вазоконстрикции и вазодилатации имели различную продолжительность.

В нашем исследовании впервые выполнено сравнительно-физиологическое исследование влияния экзогенного Hsp70 на развитие лихорадочной реакции у представителей двух классов позвоночных животных. Наши эксперименты показали, что у голубей введение Hsp70 уменьшало прирост T_m и значительно ускоряло возвращение температуры мозга к контрольным значениям. У крыс, в отличие от голубей, Hsp70 ослаблял величину лихорадочного ответа, но повышение T_m сохранялось дольше, чем у голубей. И у голубей, и у крыс сохранялась периферическая вазоконстрикция, однако следующая за ней фаза вазодилатации была менее выражена, что, вероятно, может быть связано с ослаблением интенсивности фебрильной реакции. О более выраженном антипиретическом эффекте применения Hsp70 у голубей свидетельствует также и отсутствие прироста САМ, вероят-

но, способствовавшее уменьшению теплопродукции. В отличие от голубей, у крыс повышение САМ сохранялось в течение 3 ч после введения ЛПС. Однако восстановление этого показателя до контрольных значений происходило раньше, чем при действии одного ЛПС, и, вероятно, могло способствовать уменьшению теплопродукции и снижению T_m . Можно предположить, что для получения более выраженного антипиретического эффекта при ЛПС-индуцированной эндотоксемии у крыс требуется применение более высокой дозы Hsp70.

В нашем исследовании было установлено, что введение ЛПС приводило к развитию лейкоцитоза у крыс. Увеличение числа лейкоцитов является одним из маркеров воспалительного процесса [39]. Уже через 1 ч после профилактического введения Hsp70 мы наблюдали снижение числа лейкоцитов, а через 5 ч – нормализацию этого показателя. Вероятно, уменьшение рекрутирования лейкоцитов при профилактическом введении Hsp70 может свидетельствовать о противовоспалительных свойствах белка Hsp70. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о способности Hsp70 корректировать терморегуляторные показатели ЛПС-индуцированной лихорадочной реакции и воспалительную реакцию у голубей и крыс.

Известно, что основными участниками запуска лихорадки при эндотоксемии являются провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α , а также основной медиатор – простагландин E₂ (PGE₂) [6, 40]. Однако вопрос о точных механизмах передачи провоспалительного сигнала ЛПС у птиц остается открытым, так как основная масса исследований, посвященных этому вопросу, выполнена на млекопитающих. Предполагается, что у птиц, в отличие от млекопитающих, более важную роль в запуске лихорадки играет IL-6, и, вероятно, менее выражено участие PGE₂ [41]. Показано, что экзогенный Hsp70 может взаимодействовать с рецепторными комплексами мембран иммунокомпетентных клеток (CD11b/CD18, TLR2 и TLR4) и модулировать их активность. Это приводит к снижению продукции активных форм кислорода, TNF- α , IL-6, экспрессии мРНК TLR4 и IL-1 β [42–45]. Есть данные, что противовоспалительный эффект Hsp70 может быть также обусловлен индукцией противовоспалительного цитокина IL-10 [46]. В опытах *in vivo* было обнаружено, что профилактическое введение Hsp70 способствует повышению выживаемости животных при введении высоких доз ЛПС, корректирует ряд гемодинамических показателей и биохимических параметров крови (концентрации билирубина, креатинина и др.) [28–31]. Совокупность этих данных позволяет предполагать, что профилактически введенный Hsp70 может конку-

рировать с ЛПС за связывание с TLR2 и TLR4, блокируя при этом активацию провоспалительного каскада с участием фактора NF-κB. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что терапевтическое (после введения высокой дозы ЛПС) применение Hsp70 не устраняло развитие тахикардии и не снижало уровень смертности [28]. Известно, что одним из ключевых участников запуска фебрильной реакции является PGE₂, продуцируемый периферическими макрофагами [6]. Вероятно, способность Hsp70 взаимодействовать с этими клетками приводит к снижению продукции PGE₂ и ослаблению лихорадочного ответа.

Следует отметить, что приведенные выше сведения о защитных эффектах экзогенного Hsp70 были получены с использованием культур клеток и лабораторных млекопитающих (мышей и крыс). У птиц были обнаружены те же типы иммунокомпетентных клеток, наличие CD11b рецепторов и основные медиаторы воспаления (IL-6, IL-1β, TNF-α, PGE₂) [47, 48]. Вероятно, антипиретический эффект Hsp70 у голубей и крыс мог реализовываться за счет схожих механизмов и являться результатом влияния на функционирование иммунокомпетентных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов. Существует мнение, что птицы более устойчивы к действию ЛПС, чем представители млекопитающих. Комплекс TLR4 обнаружен и у птиц, и у млекопитающих, однако у птиц не было обнаружено липополисахарид-связывающего белка и свободной формы рецептора CD14, участвующих в передаче сигнала у млекопитающих, а также TLR4-опосредованного сигнального каскада, обеспечивающего продукцию интерферонов [49, 50]. Возможно, с этой особенностью может быть связан и более выраженный антипиретический эффект Hsp70 у голубей.

Таким образом, проведенное исследование показало, что введение Hsp70 уменьшает величину лихорадочного ответа при действии ЛПС у голубей и крыс, а также способствует нормализации числа лейкоцитов в крови у крыс. Эти результаты свидетельствуют о способности Hsp70 ослаблять системную воспалительную реакцию. Можно предположить, что механизмы реализации противовоспалительного действия Hsp70 при эндотоксемии являются общими для представителей млекопитающих и птиц. Полученные данные могут являться фундаментальным обоснованием для дальнейших исследований в этом направлении с целью оценки терапевтического потенциала экзогенного Hsp70 при эндотоксемии и сепсисе, что будет иметь важное значение для разработки новых подходов к лечению этих состояний.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012290427-7).

ВКЛАД АВТОРОВ

К.В. Лапшина – проведение экспериментов, обработка и анализ данных, написание статьи. И.В. Гужова – получение препарата Hsp70, редактирование статьи. И.В. Екимова – концептуализация, методология исследования, анализ данных, редактирование статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roth J, Blatteis CM (2014) Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* 4:1563–604. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130033>
2. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT (2015) Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol* 15:335–349. <https://doi.org/10.1038/nri3843>
3. Dickson K, Lehmann C (2019) Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models. *Int J Mol Sci* 20:4341. <https://doi.org/10.3390/ijms20184341>
4. Kluger MJ, Kozak W, Conn C, Leon L, Soszynski D (1996) The adaptive value of fever. *Infect Dis Clin North Am* 10:1–20. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70282-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70282-8)
5. Lapshina KV, Ekimova IV (2010) Effects of sleep deprivation on measures of the febrile reaction and the recovery of somatovisceral functions and sleep in endotoxemia. *Neurosci. Behav Physiol* 40: 381–388. <https://doi.org/10.1007/s11055-010-9268-6>
6. Nakamura K (2011) Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 301: 1207–1228. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>
7. Gray DA, Marais M, Maloney SK (2013) A review of the physiology of fever in birds. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 183:297–312. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0718-z>
8. Garami A, Steiner AA, Romanovsky AA (2018) Fever and hypothermia in systemic inflammation. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B 157:565–597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3>
9. Sundgren-Andersson AK, Östlund P, Bartfai T (1998) Simultaneous measurement of brain and core temperature in the rat during fever, hyperthermia, hypothermia and sleep. *Neuroimmunomodulation* 5: 241–247. <https://doi.org/10.1159/000026344>
10. Ekimova IV (2003) Changes in the metabolic activity of neurons in the anterior hypothalamic nuclei in rats during hyperthermia, fever, and hypothermia. *Neurosci*

- Behav Physiol 33:455–460.
<https://doi.org/10.1023/A:1023459100213>
11. *Kiyatkin EA, Sharma HS* (2009) Permeability of the blood–brain barrier depends on brain temperature. *Neuroscience* 161: 926–939.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.004>
 12. *Gotoh M, Nagasaka K, Nakata M, Takashima I, Yamamoto S* (2020) Brain temperature alters contributions of excitatory and inhibitory inputs to evoked field potentials in the rat frontal cortex. *Front Cell Neurosci* 14: 593027.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.593027>
 13. *Noorani AA, Yamashita H, Gao Y, Islam S, Sun Y, Nakamura T, Enomoto H, Zou K, Michikawa M* (2020) High temperature promotes amyloid β -protein production and γ -secretase complex formation via Hsp90. *J Biol Chem* 295:18010–18022.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013845>
 14. *Dubé CM, Brewster AL, Baram TZ* (2009) Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. *Brain Dev* 31: 366–371.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.11.010>
 15. *Walter EJ, Carraretto M* (2016) The neurological and cognitive consequences of hyperthermia. *Crit Care* 20:199.
<https://doi.org/10.1186/s13054-016-1376-4>
 16. *Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, Su X, Cao B* (2020) SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet* 395:1517–1520.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30920-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30920-X)
 17. *Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, Corrigan JJ, Simons CT, Petersen SR, Musteata FM, Bakshi CS, Romanovsky AA, Sellati TJ, Steiner AA* (2012) Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 302:1372–1383.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00023.2012>
 18. *Zhang YH, Takahashi K, Jiang GZ* (1994) In vivo production of heat shock protein in mouse peritoneal macrophages by administration of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 62(10): 4140–4144.
<https://doi.org/10.1128/IAI.62.10.4140-4144.1994>
 19. *Meng X, Brown JM, AL, Nordeen SK, Franklin W, Harken AH, Banerjee A* (1996) Endotoxin induces cardiac HSP70 and resistance to endotoxemic myocardial depression in rats. *Am J Physiol* 271:1316–1324.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1316>
 20. *Sarson AJ, Read LR, Haghghi HR, Lambourne MD, Brisbin JT, Zhou H, Sharif S* (2007) Construction of a microarray specific to the chicken immune system: profiling gene expression in B cells after lipopolysaccharide stimulation. *Can J Vet Res* 71:108–118.
 21. *Zhang A, Zhou X, Wang X, Zhou H* (2011) Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-challenged peripheral blood lymphocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 159:109–114.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.009>
 22. *Chiaramonte M, Inguglia L, Vazzana M, Deidun A, Arizza V* (2019) Stress and immune response to bacterial LPS in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Fish Shellfish Immunol* 92:384–394.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.017>
 23. *Daugaard M, Rohde M, Jaattela M* (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581:3702–3710
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>
 24. *Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B* (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 665–680.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
 25. *Calderwood SK, Murshid A, Prince T* (2009) The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging—a mini-review. *Gerontology* 55:550–558.
<https://doi.org/10.1159/000225957>
 26. *Srivastava P* (2002) Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395–425.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064801>
 27. *Asea A* (2008) Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*. (183):111–127.
 28. *Kustanova GA, Murashev AN, Karpov VL, Margulis BA, Guzhova IV, Prokhorenko IR, Grachev SV, Evgen'ev MB* (2006) Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones* 11: 276–286.
<https://doi.org/10.1379/csc-195r.1>
 29. *Yurinskaya MM, Vinokurov MG, Zatsepina OG, Garbuz DG, Guzhova IV, Rozhkova EA, Suslikov AV, Karpov VL, Evgen'ev MB* (2009) Exogenous heat shock proteins (HSP70) significantly inhibit endotoxin-induced activation of human neutrophils. *Dokl Biol Sci* 426:298–301.
<https://doi.org/10.1134/s0012496609030326>
 30. *Rozhkova EA, Yurinskaya MM, Zatsepina OG, Garbuz DG, Karpov VL, Surkov S, Murashev AN, Ostrov VF, Margulis BA, Evgen'ev MB, Vinokurov MG* (2010) Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann N Y Acad Sci* 94–107.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05375.x>
 31. *Ostrov VF, Slashcheva GA, Zharmukhamedova TI, Garbuz DG, Evgen'ev MB, Murashev AN* (2010) Effect of the recombinant human heat shock protein HSP70 on the biochemical properties of blood in a model of endotoxic shock in rats. *Bioorg Khim* 36:337–342.
<https://doi.org/10.1134/s1068162010030052>
 32. *Pastukhov YF, Ekimova IV, Hudik KA, Guzhova I.V.* (2005) Lipopolysaccharide-free 70-kDa heat shock protein has hypothermic and somnogenic effects. *Dokl Biol Sci* 402:167–170.
<https://doi.org/10.1007/s10630-005-0077-y>

33. *Пастухов ЮФ, Худик КА, Екимова ИВ* (2010) Шапероны в регуляции и восстановлении физиологических функций. Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 96:708–725. [Pastuhov YuF, Hudik KA, Ekimova IV (2010) Shaperony v regulyatsii i vosstanovlenii fiziologicheskikh funktsij. Ros fiziol zh im IM Sechenova. 96:708–725. (In Russ)].
34. *Shevtsov MA, Nikolaev BP, Yakovleva LY, Dobrodumov AV, Dayneko AS, Shmonin AA, Vlasov TD, Melnikova EV, Vilisov AD, Guzhova IV, Ischenko AM, Mikhrina AL, Galibin OV, Yakovenko IV, Margulis BA* (2014) Neurotherapeutic activity of the recombinant heat shock protein Hsp70 in a model of focal cerebral ischemia in rats. *Drug Des Devel Ther* 8:639–650. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S62024>
35. *Ekimova IV, Plaksina DV, Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV, Nudler E* (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 306:199–208. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
36. *Karten HJ, Hodos W* (1967) A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Johns Hopkins Press. Baltimore. Maryland.
37. *Paxinos G, Watson C* (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. San Diego: Academic Press.
38. *Rashotte M, Pastukhov IuF, Poliakov E, Henderson R* (1998) Vigilance states and body temperature during the circadian cycle in fed and fasted pigeons (*Columba livia*). *Am J Physiol* 275:1690–1702. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.5.R1690>
39. *Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds)* (2010) *Endotoxemia and endotoxin shock: disease, diagnosis and therapy. Contrib. Nephrol. Basel. Karger. (167): 1424.*
40. *Krueger JM, Opp MR* (2016) Sleep and microbes. *Int Rev Neurobiol* 131:207–225. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2016.07.003>
41. *Grabbe N, Kaspers B, Ott D, Murgott J, Gerstberger R, Roth J* (2020) Neurons and astrocytes of the chicken hypothalamus directly respond to lipopolysaccharide and chicken interleukin-6. *J Comp Physiol B* 190:75–85. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01249-1>
42. *Antonova OY, Yurinskaya MM, Evgen'ev MB, Vinokurov MG* (2013) The role of the TLR-dependent signaling pathway in the mechanism of phagocyte protection by exogenous heat shock protein HSP70 from the endotoxin action. *Dokl Biol Sci* 452:305–309. <https://doi.org/10.1134/S0012496613050037>
43. *Vinokurov M, Ostrov V, Yurinskaya M, Garbuz D, Murashev A, Antonova O, Evgen'ev M* (2012) Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal levels. *Cell Stress Chaperones*. 17:89–101. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0288-0>
44. *Ferat-Osorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, Boscó-Gárate I, Wong-Baeza I, Pastelin-Palacios R, Pedraza-Alva G, Bonifaz LC, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, Arriaga-Pizano L, López-Macías C, Rosenstein Y, Isibasi A* (2014) Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. *Inflamm (Lond)* 11:19. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-11-19>
45. *Yurinskaya MM, Kochetkova OYu, Shabarchina LI, Antonova OYu, Suslikov AV, Evgen'ev MB* (2017) Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones* 22:163–171. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0743-z>
46. *Borges TJ, Lopes RL, Pinho NG, Machado FD, Souza AP, Bonorino C* (2013) Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBP β and C/EBP δ . *Int J Hyperthermia* 29:455–463. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.798037>
47. *Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I* (2000) Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol* 24:103–119. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00067-1](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00067-1)
48. *Rohde F., Schusser B., Hron T., Farkašová H., Plachý J., Hárte S., Hejnar J., Elleder D., Kaspers B.* (2018) Characterization of chicken tumor necrosis factor- α , a long missed cytokine in birds. *Front Immunol* 9:605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00605>
49. *Brownlie R., Allan B.* (2011) Avian toll-like receptors. *Cell Tissue Res* 343:121–130. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1026-0>
50. *Keestra A.M., de Zoete M.R., Bouwman L.I., Vaezizad M.M., van Putten J.P.* (2013) Unique features of chicken Toll-like receptors. *Dev Comp Immunol* 41:316–323. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.009>

PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF THE HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 RELIEVES ENDOTOXEMIA-INDUCED FEBRILE REACTION IN PIGEONS (*COLUMBA LIVIA*) AND RATS

K. V. Lapshina^{a, #}, I. V. Guzhova^b, and I. V. Ekimova^a

^a I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

^b Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

[#]E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com

The stress-inducible 70 kDa heat shock protein (Hsp70) can exert a protective effect on endotoxemia and sepsis due to its ability to interact with immune cells and modulate the immune response. However, it remains un-

known whether Hsp70 is able to relieve endotoxemia-induced fever. We carried out a comparative study of the effects of prophylactic administration of the human recombinant Hsp70 (HSPA1A) on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia in pigeons and rats with preliminarily implanted electrodes and thermistors for recording the thermoregulatory parameters (brain temperature, peripheral vasomotor reaction, muscular contractile activity). Additionally, we analyzed the dynamics of the white blood cell (WBC) count in rats under the same conditions. It was found that prophylactic administration of Hsp70 relieves the LPS-induced febrile reaction in pigeons and rats and accelerates the restoration of the WBC count in rats. These data suggest that these warm-blooded animals share the common physiological mechanism of the protective effect of Hsp70.

Keywords: heat shock protein 70 kDa, endotoxemia, brain temperature, white blood cells, pigeon, rat

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ АСТРОЦИТОВ МОЗГА КРЫСЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ РЕГУЛИРУЕТСЯ ИНСУЛИНОМ И ГАНГЛИОЗИДОМ GM1

© 2021 г. Т. В. Соколова^{1,*}, М. П. Рычкова¹, Н. Е. Басова¹, Д. С. Васильев¹,
Н. Ф. Аврова¹, М. Г. Ефимова^{1,**}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: sokolt1956@mail.ru

**e-mail: yefimova3@gmail.com

Поступила в редакцию 07.05.2021 г.

После доработки 23.06.2021 г.

Принята к публикации 25.06.2021 г.

Полное и своевременное удаление апоптотических клеток и их фрагментов является жизненно важным для поддержания гомеостаза во всех тканях организма в норме и при патологических состояниях. Поскольку удаление апоптотических субстратов осуществляется клетками, обладающими фагоцитарной активностью, вопрос о регуляции последней представляет значительный интерес. В настоящей работе исследовали влияние двух биологически активных молекул – инсулина и ганглиозида GM1 на фагоцитарную активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре. Показано, что инкубация клеток с 1 мкМ инсулином приводила к достоверному снижению фагоцитарной активности астроцитов (до 58.5% к контролю), а с 10 мкМ ганглиозидом GM1, напротив, вызывала повышение фагоцитарной активности клеток (133.4% к контролю). Предварительная инкубация астроцитов мозга с ганглиозидом GM1 полностью блокировала ингибиторный эффект инсулина. Результаты проведенного исследования могут быть использованы при выработке новых стратегий лечения нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся появлением субстратов апоптотического типа.

Ключевые слова: астроциты, фагоцитоз, инсулин, ганглиозид GM1

DOI: 10.31857/S0044452921050107

Апоптоз является жизненно важным процессом, который реализуется во всех тканях организма в норме и при патологических состояниях [1]. Апоптотические субстраты, формирующиеся в результате нормальной жизнедеятельности клеток разных органов, немедленно удаляются специфическими клетками, обладающими фагоцитарной активностью. Своевременное и полное удаление апоптотических субстратов необходимо для поддержания тканевого гомеостаза, а также для того, чтобы исключить возникновение аутоиммунных реакций в ответ на внутриклеточные антигены, высвобождающиеся из поврежденных и/или апоптотических клеток [2].

Фагоцитоз апоптотических субстратов является комплексным рецептор-опосредованным процессом, при котором координированное взаимодействие специфических рецепторов плазматической мембраны клетки-фагоцита запускает сигнальные механизмы, обеспечивающие поглощение и дальнейшее расщепление субстратов лизосомальным аппаратом клетки [3]. Таким образом, связывание,

поглощение и расщепление являются основными стадиями фагоцитоза, которые в дальнейшем будут именоваться 1-, 2- и 3-й стадиями соответственно. При этом реализация одной из этих стадий процесса не влечет за собой автоматическую реализацию последующей из них.

Фагоцитарная функция в ЦНС осуществляется двумя типами клеток: микроглиальными и астроглиальными клетками. Первые из них являются клетками гематопоэтического происхождения и относятся к числу профессиональных фагоцитов, тогда как вторые являются непрофессиональными фагоцитами [4]. Астроциты – это наиболее многочисленные клетки нейроглии, количество которых достигает 40% от общей популяции клеток головного мозга [5]. Эти клетки обеспечивают условия для генерации и передачи нервных импульсов, способствуя поддержанию и реализации синаптической функции, участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера, осуществляют опорную, трофическую, секреторную и фагоцитарную функции. Астроциты контролируют не только об-

разование и функции синапсов, но и их устранение в развивающемся и зрелом мозге [6]. При патологических состояниях различной этиологии (нейродегенеративные болезни, ишемия, старение, травматическое и радиационное повреждение мозга) удаление апоптотических субстратов и дегенеративного миелина астроцитами приобретает особое значение [5].

Как известно на текущий момент, фагоцитарная активность астроцитов опосредуется двумя рецепторными белками плазматической мембраны: MEGF10 (Multiple EGF-Like Domains 10) и рецепторной тирозинкиназой MERTK (Mer proto-oncogene Tyrosine Kinase) [7]. Белки MEGF10 и MERTK принимают участие в удалении синапсов, а также поврежденных и/или апоптотических нейронов, образующихся при старении и/или патологических состояниях ЦНС [5]. Кроме этого, рецептору MERTK отводят ключевую роль в процессе фагоцитоза миелиновых обломков, образующихся в ходе естественных процессов обновления миелина [8].

В предварительных исследованиях нашей лаборатории был детально изучен процесс фагоцитоза апоптотических субстратов различного типа астроцитами мозга крысы в первичной культуре, изучены кинетические характеристики этого процесса и показано, что фагоцитоз апоптотических субстратов приводит к увеличению пролиферативной активности астроцитов мозга.

Как известно, пролиферация астроглии является отягощающим фактором при развитии патологических состояний ЦНС, сопровождающихся дегенеративными изменениями и гибелью нервных клеток. Накопление астроцитов в местах локального повреждения способствует развитию астроглиоза, т.е. процессу замещения мертвых нейронов клетками астроглии. В связи с этими данными вопрос о способах оптимизации фагоцитарной активности астроцитов (как в сторону ее увеличения, так и в сторону ее уменьшения) является принципиально важным для выработки стратегий коррекции патологического процесса в зависимости от стадии его развития.

В нашей лаборатории в течение последних лет исследуются нейропротекторные эффекты ряда природных биомолекул, а именно ганглиозидов и инсулина при окислительном стрессе и ряде неблагоприятных воздействий на организм *in vivo* и *in vitro* [9]. Поскольку удаление апоптотических субстратов является жизненно важным фактором, влияющим на выживание ЦНС в неблагоприятных условиях, представлялось значимым выяснение вопроса о возможности этих соединений регулировать фагоцитарную функцию астроцитов.

Ганглиозиды — сложные гликофинголипиды клеточных мембран — являются неотъемлемым компонентом мозга, при этом в нашей лаборатории показано, что у млекопитающих их относительное количество достигает 2.5 мг на 1 г ткани мозга (GM1) [10]. При этом известно, что при дегенеративных и травматических повреждениях мозга происходит высвобождение ганглиозидов GM1 в межклеточное пространство, что позволяет полагать возможность его взаимодействия с различными клетками мозга, включая астроциты. Кроме этого, в нашей лаборатории было установлено, что ганглиозид GM1 вызывает многократную активацию фагоцитарной активности профессиональных фагоцитов макрофагов [11].

Мозг является инсулин-зависимым органом, и различные способы введения инсулина (интрацеребровентрикулярное, интраназальное, системное) способствуют изменению пищевого поведения и снижению веса у экспериментальных животных и человека [12]. Рецепторы инсулина выявлены как на нейрональных, так и на глиальных клетках мозга, включая астроциты [13, 14]. Астроциты являются активными компонентами, вовлеченными в метаболизм инсулина в ЦНС. При этом астроциты не только экспрессируют рецептор инсулина и инсулин-деградирующий фермент [13, 15], но и сами являются инсулин-секретирующими клетками мозга [16], что указывает на важность инсулинового сигналинга для обеспечения нормального функционирования этих клеток.

В то же время в доступной литературе мы не обнаружили данных о влиянии инсулина на фагоцитарную активность астроцитов мозга. Отсутствует также информация о возможном модулирующем эффекте ганглиозидов. Поэтому целью настоящего исследования явилось выяснение вопроса о том, как влияют инсулин и ганглиозид GM1 на фагоцитарную активность астроцитов мозга в культуре клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичная культура астроглии

Исследования проводили на первичной культуре клеток астроглии, которую выделяли из мозга новорожденных крыс по методу [17]. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10% инактивированной фетальной сыворотки теленка (Биолот, Россия) и антибиотики (пенициллин G 50 Ед/мл и стрептомицин 50 мкг/мл, Биолот Россия) на чашках Петри (Ø3.5 см, Orange scientific), в течение 7–9 дней при 37°C и 5% CO₂ до достижения 75% конфлюентности. О жизнеспособности клеток судили по окрашиванию Трупан Blue (Биолот, Россия), способно-

му проникать через поврежденные клеточные мембраны.

Модель индуцированного фагоцитоза

В качестве апоптотического субстрата фагоцитоза использовали фракцию наружных сегментов палочек (НСП) сетчатки крысы, которую выделяли по модифицированному методу [18]. Конъюгацию препаратов НСП с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, Merck, Германия) осуществляли, как ранее нами было описано [18]. Клетки промывали фосфатно-солевым раствором, рН 7.4 (PBS), после чего инкубировали в среде DMEM, содержащей 2% инактивированной фетальной сыворотки теленка и добавляли субстраты фагоцитоза в соотношении 1:10 (клетка/субстрат фагоцитоза; подсчет клеток и фрагментов НСП проводили с использованием камеры Фукса–Розенталя).

Обработка клеток модуляторами фагоцитарной активности

При анализе влияния инсулина на процесс фагоцитоза клетки инкубировали с 1 мкМ инсулина (Sigma) в течение 1 ч, после чего добавляли конъюгат FITC-НСП. При исследовании влияния ганглиозида GM1 на процесс фагоцитоза клетки инкубировали в течение 24 ч с препаратом GM1 в конечной концентрации 0.1 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ, после чего добавляли конъюгат FITC-НСП. Ганглиозид GM1 выделяли из полученного по методу Фолча [19] экстракта липидов мозга быка как это описано ранее [20].

При исследовании совместного действия инсулина и ганглиозида GM1 клетки инкубировали в течение 24 ч с препаратом GM1 в конечной концентрации 0.1 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ, после чего добавляли инсулин в концентрации 1 мкМ и выдерживали клетки в течение 1 часа. Далее добавляли конъюгат FITC-НСП.

Анализ фагоцитарной активности

После окончания инкубации с НСП излишки субстрата отмывали охлажденным PBS и проводили фиксацию клеток в течение 3–5 мин в 4% растворе параформальдегида, приготовленного на PBS. После промывки препаратов раствором PBS проводили окраску ядер 0.001% раствором Hoechst 33258/PBS (Serva, Германия). Результаты опытов оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Imager.A1, Axio (Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCamMRc (Zeiss, Германия). Для оценки фагоцитарной активности применяли программное обеспечение ImageJ (NIH, США); при этом производили подсчет коли-

чества ядер клеток (синее окрашивание) и относительную площадь, занимаемую субстратом фагоцитоза (зеленое окрашивание). О фагоцитарной активности клеток судили на основании оценки эффективности реализации 1-й и 2-й стадий фагоцитоза. Количественную оценку процесса распознавания и связывания субстрата с астроцитом (1-я стадия фагоцитоза) осуществляли в условных единицах, рассчитывая отношение площади флуоресцентного субстрата к количеству ядер в препарате. Морфологическим критерием для оценки поглощения субстрата астроцитами (2-я стадия фагоцитоза) служило наличие флуоресцентной метки FITC в перинуклеарной области клетки, где реализуется взаимодействие окрашенных красителем фрагментов НСП с лизосомами (рассчитывали отношение числа клеток с флуоресцентным субстратом в перинуклеарной области к количеству клеток в препарате). Для количественного анализа клетки фотографировали; при этом для каждой точки в эксперименте использовали 2 параллельных стекла. На каждом стекле проводили фотофиксацию 15 случайно выбранных полей, содержащих до 1500 клеток. Всего было проведено 3 независимых эксперимента. Статистическую обработку результатов осуществляли на основании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), применяя тест для множественных сравнений Бонферрони и используя программу GraphPad Prism (San Diego, США). Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инкубация с ганглиозидом GM1 приводит к возрастанию фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в первичной культуре

В первой серии опытов нами была проведена оценка фагоцитарной активности астроцитов в присутствии ганглиозида GM1. В качестве субстрата фагоцитоза мы использовали препараты НСП крысы, которые являются субстратом апоптотического типа [21]. В предыдущих исследованиях нами было показано, что препараты НСП эффективно распознаются и поглощаются астроцитами мозга крысы. При этом кинетические параметры фагоцитоза НСП сопоставимы с таковыми, характерными для захвата и поглощения апоптотических нейронов. Результаты опытов приведены на рис. 1 и в табл. 1. Как следует из данных рис. 1а, 1а', в контрольных пробах флуоресцентный сигнал присутствовал как на периферии клеток, так и в перинуклеарной области, что свидетельствует о реализации как 1-й, так и 2-й стадий фагоцитоза.

На рис. 1б, б' и в табл. 2 приведены результаты опытов по оценке фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в присутствии ганглиозида

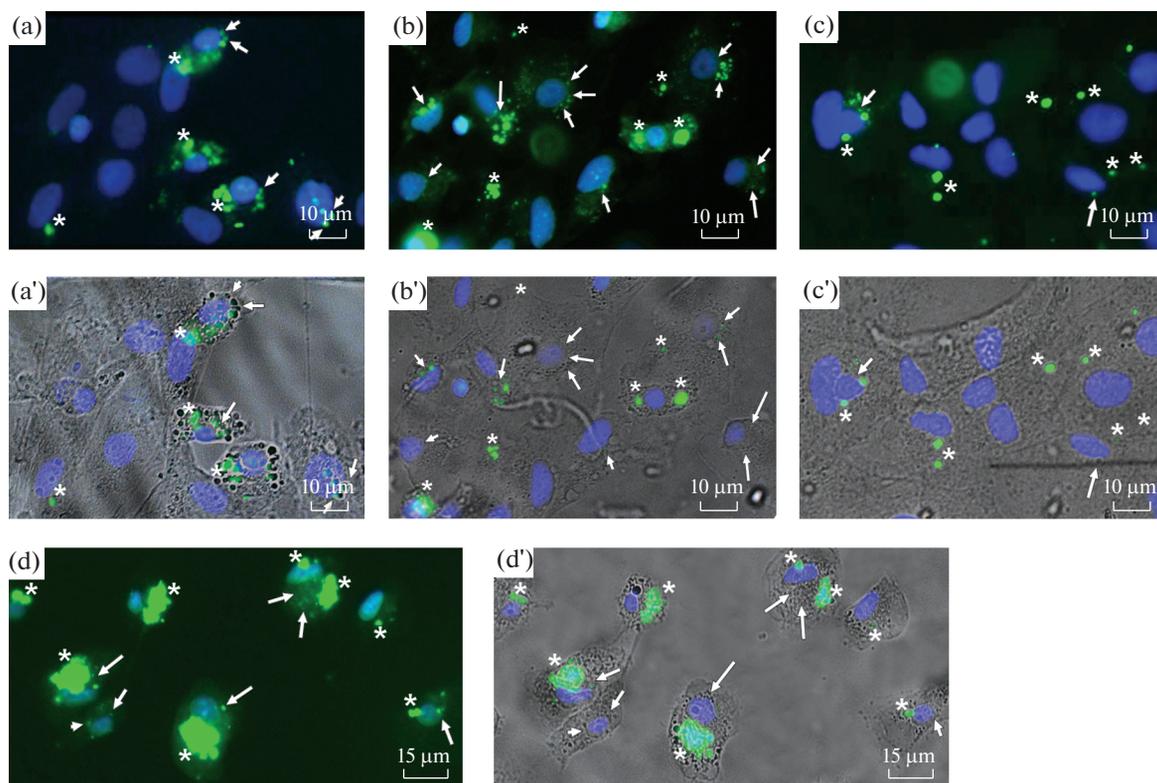


Рис. 1. Фагоцитарная активность астроцитов мозга крысы в первичной культуре при различных условиях инкубации с инсулином и/или ганглиозидом GM1. (a, a') – контрольные препараты астроцитов мозга после инкубации с конъюгатом НСП-FITC в течение 3 ч. (a') получен с помощью наслоения на панель (a) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (b, b') – препараты астроцитов мозга, прошедшие предварительную 24-часовую инкубацию с 10 мкМ ганглиозидом GM1, и далее проинкубированных с конъюгатом НСП-FITC в течение 3-х часов. (b') получен с помощью наслоения на панель (b) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (c, c') – препараты астроцитов мозга крысы, подвергнутых предварительной 1-часовой инкубации с 1 мкМ инсулина, и далее проинкубированных с конъюгатом НСП-FITC в течение 3 ч. (c') получен с помощью наслоения на панель (c) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. (d, d') – препараты астроцитов мозга крысы, подвергнутых предварительной 24-часовой инкубации с 10 мкМ ганглиозидом GM1, далее проинкубированных в течение 1 ч с 1 мкМ инсулина, после чего проинкубированных с конъюгатом НСП-FITC в течение 3 ч. (d') получен с помощью наслоения на панель (d) снимка клеток в проходящем свете для визуализации их контура. На всех рисунках стрелками отмечены субстраты в перинуклеарной области (2 стадия фагоцитоза), а звездочками отмечены субстраты, связанные с плазматической мембраной (1 стадия фагоцитоза).

GM1. Мы проанализировали эффект различных концентраций ганглиозидом GM1 в пределах от 0.1 до 10 мкМ. Из приведенных данных следует, что в результате инкубации астроцитов с ганглиозидом GM1 общее количество флуоресцентного субстрата достоверно возрастает по сравнению с контролем при концентрации GM1 от 1 до 10 мкМ (табл. 1). Количественная оценка числа астроцитов, содержащих флуоресцентный субстрат в перинуклеарной области, также выявила достоверное увеличение по сравнению с контролем (19.2 ± 2.7 и 19.5 ± 2.4 против 14.6 ± 1.5 , или 131.5% и 133.6% от контроля соответственно), (рис. 1b, b', табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие ганглиозидом GM1 стимулирует как процесс связывания (1-я стадия фагоцитоза), так и процесс поглощения субстрата астроцитом (2-я стадия фагоцитоза).

Инкубация с инсулином приводит к снижению фагоцитарной активности астроцитов мозга крысы в первичной культуре

В результате инкубации астроцитов с инсулином общее количество флуоресцентной метки достоверно не отличалось от таковой, характерной для контроля (рис. 1c, c', табл. 1, табл. 2). Однако количество флуоресцентной метки в перинуклеарной области клеток, прошедших прединкубацию с инсулином, было достоверно снижено (до 58.5% от контроля), что свидетельствует о замедлении реализации 2-й стадии фагоцитоза (рис. 1, табл. 2). Действительно, флуоресцентный субстрат преимущественно был локализован на периферии астроцитов, в ассоциации с плазматической мембраной клеток. Таким образом, в отношении непрофессиональных фагоцитов мозга инсулин явился мощ-

Таблица 1. Оценка эффективности 1-й стадии фагоцитоза (связывание субстрата) астроцитами мозга крысы в первичной культуре при различных условиях инкубации клеток с инсулином и ганглиозидом GM1

Проба	Эффективность 1-й стадии фагоцитоза (в условных единицах)	% к контролю
контроль	198.2 ± 18.4	100
Инсулин 1 мкМ	207.4 ± 25.6	104.7
GM1 0.1 мкМ	242.4 ± 33.9	122.3
GM1 1 мкМ	334.3 ± 49.4 (*)	168.7
GM1 10 мкМ	328.8 ± 34.7 (*)	165.9
GM1 0.1 мкМ + инсулин 1 мкМ	234.3 ± 30.2	118.3
GM1 1 мкМ + инсулин 1 мкМ	327.0 ± 53.6 (*)	165.0
GM1 10 мкМ + инсулин 1 мкМ	339.9 ± 51.4 (*)	171.6

Примечание: эффективность 1 стадии фагоцитоза выражена в условных единицах; методика расчета приведена в разделе Материалы и методы.

(*) – различия достоверны при $p \leq 0.05$

Таблица 2. Оценка эффективности 2-й стадии фагоцитоза (поглощения субстрата) астроцитами мозга крысы в первичной культуре при различных условиях инкубации клеток с инсулином и ганглиозидом GM1.

Проба	Эффективность 2-й стадии фагоцитоза	% к контролю
контроль	14.7 ± 1.5	100
инсулин 1 мкМ	8.6 ± 1.2 (**)	58.5
GM1 0.1 мкМ	12.6 ± 1.8	86.2
GM1 1 мкМ	19.2 ± 2.7 (**)	131.1
GM1 10 мкМ	19.5 ± 2.4(**)	133.4
GM1 0.1 мкМ + инсулин 1 мкМ	13.8 ± 2.0	93.9
GM1 1 мкМ + инсулин 1 мкМ	15.4 ± 1.7	105.1
GM1 10 мкМ + инсулин 1 мкМ	26.6 ± 2.4 (**)	181.3

Примечание: за эффективность 2 стадии фагоцитоза принимали относительное количество клеток, содержащих конъюгат НСП-FITC в перинуклеарной области/ к общему количеству клеток в препарате (%).

(**) - различия достоверны при $p \leq 0.01$

ным ингибитором фагоцитарной активности этих клеток.

Поскольку в нашей лаборатории проводятся работы по изучению комбинированного действия инсулина и ганглиозида GM1, в следующей серии опытов мы изучили вопрос о совместном влиянии этих природных биологически активных молекул на фагоцитарную активность астроцитов.

Совместная инкубация астроцитов мозга крысы с ганглиозидом GM1 и инсулином увеличивает фагоцитарную активность клеток

На рис. 1d, d' приведены результаты типичного опыта, из которого следует, что применение ганглиозида GM1 приводит к резкому возрастанию

флуоресцентного сигнала в пробах. Действительно, при концентрациях ганглиозида GM1 1 и 10 мкМ достоверно возрастало не только количество связанного субстрата (табл. 1), но также и количество поглощенного субстрата, локализованного в перинуклеарной области астроцитов (рис. 1d, табл. 2). Расчет фагоцитарной активности показал, что совместная инкубация астроцитов с ганглиозидом GM1 блокирует ингибирующий эффект инсулина на фагоцитарную активность клеток. При этом при концентрации GM1 1 мкМ ингибирующий эффект инсулина не проявлялся, а соответствующее значение количества поглощенного субстрата достигало значений, характерных для контрольных образцов (15.4 ± 1.78 против 14.6 ± 1.5). Примечательно, что при концентрации GM1

10 мкм количество поглощенного субстрата (2-я стадия фагоцитоза) астроцитами мозга двукратно превышало контрольные значения (26.6 ± 2.4 против 14.6 ± 1.5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно последним данным нашей лаборатории при экспериментальной ишемии у крыс *in vivo* совместное введение инсулина и ганглиозида GM1 давало однонаправленный нейропротекторный эффект. Эти данные хорошо согласуются с результатами настоящего исследования *in vitro*, при котором совместное действие этих биологически активных компонентов превышало стимулирующий эффект ганглиозида GM1 на фагоцитарную активность астроцитов.

Согласно данным, полученным в настоящей работе, ганглиозид GM1 в концентрации 1 и 10 мкм обладает хорошо выраженной способностью достоверно увеличивать фагоцитарную активность астроцитов при использовании в качестве апоптотического субстрата НСП сетчатки крыс. При этом GM1 увеличивал эффективность как 1-й, так и 2-й стадии фагоцитоза (связывание и поглощение, соответственно). Такого рода эффекты ганглиозида GM1 показаны нами впервые. Примечательно, что ганглиозид GM1 является наиболее стабильным из 4-х основных ганглиозидов мозга, которые обладают сходным нейропротекторным действием и, как правило, сходной функциональной активностью [22]. Поэтому можно полагать, что основные ганглиозиды мозга, по видимому, обладают способностью активировать процессы фагоцитоза клетками астроглии, что показано нами на примере GM1.

Впервые установленная нами способность ганглиозидов активировать процессы фагоцитоза апоптотических субстратов астроцитами мозга может быть очень ценной для выработки новых стратегий лечения различных патологических состояний, связанных с разрушением нейронов, и, возможно, других клеток мозга. Разрушение клеток в ЦНС характерно для ишемических, травматических и других поражений мозга, в том числе и для нейродегенеративных заболеваний. Известно, что при разрушении нейронов мозга в межклеточное пространство высвобождаются ганглиозиды, содержание которых в мозгу является значительным [10]. Ранее нами было установлено, что вещества из разрушенных клеток мозга первоначально накапливаются в сосудистом сплетении, а далее постепенно из нее выводятся через спинномозговую жидкость. Действительно, показано, что у детей с менингоэнцефалитами (исследования *post-mortem*) содержание ганглиозидов в сосудистом сплетении мозга выше, чем в ткани мозга [23]. Таким образом, если при разрушении нейронов и других клеток мозга содержание ганглиозидов в спинномозговой жид-

кости существенно возрастает, то они могли бы активировать процессы фагоцитоза апоптотических нейронов астроцитами мозга, оказывая, таким образом, нейропротекторный эффект на жизнеспособные нейроны мозга.

Хотя к настоящему времени механизм действия GM1 на фагоцитарную активность астроцитов мозга неясен, представляют особый интерес данные о влиянии ганглиозидов на рецепторные тирозинкиназы, к числу которых также относится фагоцитарный рецептор MERTK. Кроме того, известно, что ганглиозиды могут проявлять свое действие через тирозинкиназный Trk-A рецептор, активируя при этом PI3K-Akt1-mTOR сигнальный путь [24, 25]. Как известно, активация mTOR приводит к ингибированию аутофагии [26]. В случае непрофессиональных фагоцитов между процессами аутофагии и фагоцитоза имеется обратная зависимость, т.е. активация аутофагии может повлечь за собой снижение фагоцитарной активности. Полагают, что этот эффект обусловлен конкуренцией обоих процессов за использование лизосом, которые завершают процесс расщепления субстратов фагоцитоза и/или аутофагии в клетках [27–29].

Кроме этого, благоприятный эффект ганглиозидов *in vitro* на фагоцитарную активность астроцитов может быть усилен при их совместном воздействии с инсулином, что подтверждает данные нашей лаборатории, полученные в условиях *in vivo*. В наших исследованиях инсулин оказывал ингибирующее воздействие на фагоцитоз апоптотических субстратов астроцитами мозга. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого эффекта, требует дополнительного исследования, а данные, обнаруженные нами в доступной литературе, немногочисленны. Например, сходные результаты были получены на примере непрофессиональных фагоцитов эпителиальных клеток бронхоальвеолярного эпителия [30]. Для объяснения этого феномена авторы уделяют особое внимание АКТ-киназе в регуляции фагоцитарной активности непрофессиональных фагоцитов эпителиальных клеток бронхоальвеолярного эпителия [30].

С другой стороны, известно, что в большинстве случаев ганглиозиды локализуются в мембранных микродоменах, известных как липидные рафты, в сочетании с другими сфинголипидами и холестерином [31]. Взаимодействие липидных рафтов с мембранными белками играет важную роль в клеточных процессах, таких как сигнальная трансдукция цитокинов, адгезия, внутриклеточный транспорт и др. [32]. Недавно показано, что на плазматической мембране эндотелиальных клеток аорты, которые также можно рассматривать как непрофессиональные фагоциты [33], ганглиозид GM1 колокализован с рецептором инсулина, а нарушение нормального стехиометрического взаимоотношения инсулиновый рецептор/GM1 (в сторону

увеличения GM1) приводит к блокаде инсулинового сигналинга [34]. Примечательно, что в астроцитах мозга ганглиозид GM1 детектируется в незначительных количествах [35], однако экзогенно добавленный ганглиозид GM1 легко встраивается в плазматическую мембрану астроцитов, приводя к модификации мембранных микромоменов [36] и к изменению клеточного ответа на ряд стимулов [37]. В этом плане полученные нами данные об отмене ингибирующего эффекта инсулина в астроцитах, прошедших предварительную инкубацию с ганглиозидом GM1, хорошо согласуются с данными литературы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В тканях, ограниченных от общего кровотока гематическими барьерами, удаление апоптотических субстратов, образующихся в процессе их нормальной жизнедеятельности, реализуется за счет локальных клеток, проявляющих фагоцитарную активность. Благодаря этим клеткам поддерживается тканевой гомеостаз и исключается возможность развития аутоиммунных реакций, которые могут появиться в ответ на выход внутриклеточных компонентов из поврежденных или погибающих клеток. В настоящей работе мы впервые приводим данные о двух природных модуляторах, проявляющих совместный стимулирующий эффект на фагоцитарную активность непрофессиональных фагоцитов мозга — астроглиальных клеток.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по Госзаданию Министерства науки и высшего образования России — АААА-А18-118012290427-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.В. Соколова, М.П. Рычкова, Д.С. Васильев — проведение экспериментов; Т.В. Соколова, Д.С. Васильев, Н.Е. Басова, М.Г. Ефимова — анализ экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов, подготовка рукописи; М.Г. Ефимова, Н.Ф. Аврова — подготовка и корректировка рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh R, Letai A, Sarosiek K (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
2. Itoh M, Yano A, Li X, Miyamoto K, Takeuchi Y (1999) Limited uptake of foreign materials by resident macrophages in murine ovarian tissues. *J Reprod Immunol* 43:55–66. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(99)00004-2)
3. Yefimova MG, Messaddeq N, Meunier AC, Cantereau A, Jegou B, Bourmeyster N (2018) Phagocytosis by Sertoli Cells: Analysis of Main Phagocytosis Steps by Confocal and Electron Microscopy. *Methods Mol Biol* 1748: 85–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0_8
4. Rabinovitch M (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5:85–7. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)88955-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)88955-2)
5. Jung YJ, Chung WS (2018) Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol Ther (Seoul)* 26: 350–357. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.133>
6. Lee JH, Kim JY, Noh S, Lee H, Lee SY, Mun JY, Park H, Chung WS (2021) Astrocytes phagocytose adult hippocampal synapses for circuit homeostasis. *Nature* 590:612–617. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03060-3>
7. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krumpal SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
8. Healy LM, Perron G, Won SY, Michell-Robinson MA, Rezk A, Ludwin SK, Moore CS, Hall JA, Bar-Or A, Antel JP (2016) MerTK Is a Functional Regulator of Myelin Phagocytosis by Human Myeloid Cells. *J Immunol* 196:3375–3384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502562>
9. Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 168:317–320. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8>
10. Avrova NF (1971) Brain ganglioside patterns of vertebrates. *J Neurochem* 18:667–674. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb11996.x>
11. Avrova NF, Zakharova IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, Schepetkin IA (2002) Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem Res* 7-8:751–519. <https://doi.org/10.1023/a:1020296605444>
12. Florant GL, Singer L, Scheurink AJ, Park CR, Richardson RD, Woods SC (1991) Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of marmosets during the summer feeding period. *Physiol Behav* 49:335–338. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90053-q](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90053-q)
13. Gralle M (2017) The neuronal insulin receptor in its environment. *J Neurochem* 140:359–367. <https://doi.org/10.1111/jnc.13909>
14. Fernandez AM, Navarrete M, Davila JC, Garcia-Caceres C, Palenzuela R, de Martin Esteban SR, Mostany R, Tschöp M, Gutierrez A, Torres Aleman I (2019) The Insulin Receptor in Astrocytes is Involved in the Entrance of Circulating

- Insulin into the Brain. *BioRxiv* 720813.
<https://doi.org/10.1101/720813>
15. *Son SM, Cha MY, Choi H, Kang S, Choi H, Lee MS, Park SA, Mook-Jung I* (2016) Insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes is mediated by an autophagy-based unconventional secretory pathway in Alzheimer disease. *Autophagy* 12:784–800.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1159375>
 16. *Takano K, Koarashi K, Kawabe K, Itakura M, Nakajima H, Moriyama M, Nakamura Y* (2018) Insulin expression in cultured astrocytes and the decrease by amyloid β . *Neurochem Int* 19:171–18.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.017>
 17. *Hamprecht B, Löffler F* (1985) Primary glial cultures as a model for studying hormone action. *Methods Enzymol* 109:341–345.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(85\)09097-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)09097-8)
 18. *Yefimova MG, Messaddeq N, Harnois T, Meunier AC, Clarhaut J, Noblanc A, Weickert JL, Cantereau A, Philippe M, Bourmeyster N, Benzakour O* (2013) A chimerical phagocytosis model reveals the recruitment by Sertoli cells of autophagy for the degradation of ingested illegitimate substrates. *Autophagy* 9: 653–666.
<https://doi.org/10.4161/auto.23839>
 19. *Folch J, Lees M, Sloan-Stanley GH* (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497–509. PMID:13428781
 20. *Tyurin VA, Tyurina YY, Avrova NF* (1992) Ganglioside-dependent factor, inhibiting lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *Neurochem Int* 20: 401–407.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90055-v](https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90055-v)
 21. *Feng W, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, Vollrath D* (2002) Merck triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 277:17016–17022.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107876200>
 22. *Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY, Gonchar VS* (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23:945–952
<https://doi.org/10.1023/a:1021076220411>
 23. *Karpova OB, Zinserling VA, Avrova NF* (1992) Study of brain and vascular plexus gangliosides in meningoencephalitis of various etiology. *Neurochem Int* 20:365–370.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90051-r](https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90051-r)
 24. *Duchemin AM, Ren Q, Mo L, Neff NH, Hadjiconstantinou M* (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* 81:696–707.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00831.x>
 25. *Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjiconstantinou M* (2008) GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J Neurochem* 104:1466–1477.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05088.x>
 26. *Neufeld TP* (2010) TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* 22:157–168.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.005>
 27. *Muniz-Feliciano L, Doggett TA, Zhou Z, Ferguson TA* (2017) RUBCN/rubicon and EGFR regulate lysosomal degradative processes in the retinal pigment epithelium (RPE) of the eye. *Autophagy* 13:2072–2085.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1380124>
 28. *Kim JY, Zhao H, Martinez J, Doggett TA, Kolesnikov AV, Tang PH, Ablonczy Z, Chan CC, Zhou Z, Green DR, Ferguson TA* (2013) Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 154:365–376.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.012>
 29. *Yefimova MG, Lefevre C, Bashamboo A, Eozenou C, Burel A, Lavault MT, Meunier AC, Pimentel C, Veau S, Neyroud AS, Jaillard S, Jégou B, Bourmeyster N, Ravel C* (2020) Granulosa cells provide elimination of apoptotic oocytes through unconventional autophagy-assisted phagocytosis. *Hum Reprod* 35:1346–1362.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deaa097>
 30. *Chang D, Feng J, Liu H, Liu W, Sharma L, Dela Cruz CS* (2020) Differential effects of the Akt pathway on the internalization of *Klebsiella* by lung epithelium and macrophages. *Innate Immun* 26:618–626.
<https://doi.org/10.1177/1753425920942582>
 31. *Sonnino S, Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A* (2015) Membrane lipid domains in the nervous system. *Front Biosci (Landmark Ed)* 20:280–302.
<https://doi.org/10.2741/4309>
 32. *Head BP, Patel HH, Insel PA* (2014) Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1838:532–545.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.018>
 33. *Rengarajan M, Hayer A, Theriot JA* (2016) Endothelial Cells Use a Formin-Dependent Phagocytosis-Like Process to Internalize the Bacterium *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 12:e1005603.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005603>
 34. *Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M* (2017) Ganglioside GM1 contributes to extracellular/intracellular regulation of insulin resistance, impairment of insulin signaling and down-stream eNOS activation, in human aortic endothelial cells after short- or long-term exposure to TNF α . *Oncotarget* 9:5562–5577.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23726>
 35. *Asou H, Hirano S, Uyemura K* (1989) Ganglioside composition of astrocytes. *Cell Struct Funct* 14:561–568.
<https://doi.org/10.1247/csf.14.56>
 36. *Masco D, Flott B, Seifert W* (1989) Astrocytes in cell culture incorporate GM1 ganglioside. *Glia* 2:231–240.
<https://doi.org/10.1002/glia.440020404>
 37. *Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M* (2015) Ganglioside GM1 Contributes to the State of Insulin Resistance in Senescent Human Arterial Endothelial Cells. *J Biol Chem* 290:25475–25486.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684274>

**THE PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF RAT BRAIN ASTROCYTES
IN PRIMARY CULTURE IS REGULATED
BY INSULIN AND GM1 GANGLIOSIDE**

**T. V. Sokolova^{a,#}, M. P. Rychkova^a, N. E. Basova^a, D. S. Vasilev^a,
N. F. Avrova^a, and M. G. Yefimova^{a,##}**

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

[#]*e-mail: sokolt1956@mail.ru;*

^{##}*e-mail: yefimova3@gmail.com*

A timely and efficient removal of apoptotic cells and their fragments is essential to maintain tissue homeostasis in normal and pathological conditions. Since the removal of apoptotic substrates is carried out by the cells endowed with phagocytic activity, the issue on its regulation is of particular interest. In this work, we studied the effect of two biologically active substances, insulin and GM1 ganglioside, on phagocytic activity of primary rat brain astrocytes. We showed that cell incubation with 1 μ M insulin significantly decreased the phagocytic activity of astrocytes (58.5% vs. control), whereas the incubation of astrocytes with 10 μ M GM1 caused an increase in phagocytic activity (133.4% vs. control). Preincubation of brain astrocytes with GM1 completely blocked the inhibitory effect of insulin. These results can be instrumental to developing novel therapeutic strategies for the treatment of neurodegenerative diseases accompanied by the emergence of apoptotic substrates.

Keywords: astrocytes, phagocytosis, insulin, ganglioside GM1