

# СОДЕРЖАНИЕ

---

## Том 57, номер 2, 2021

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

---

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Объявление о создании нового Электронного архива научных публикаций по тематике “Химия, биология и физиология” | 93 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

---

## ОБЗОРЫ

|                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Особенности транспорта нутриентов в пищеварительном тракте рыб<br><i>В. В. Кузьмина</i>                        | 94  |
| Особенности анатомии и физиологии сердца бесчелюстных рыбообразных и челюстных рыб<br><i>Е. Э. Колесникова</i> | 103 |

---

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Влияние низкомолекулярных аллостерических агонистов рецептора лютеинизирующего гормона на его экспрессию в семенниках самцов крыс<br><i>А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, И. В. Романова, В. Н. Сорокоумов, Т. В. Соколова, А. И. Говди, И. Ю. Морина, А. А. Перминова, А. О. Шпаков</i> | 124 |
| Топография ганглиозного слоя сетчатки и ретинальное разрешение у гребнезубого дельфина <i>Steno bredanensis</i> (Cetacea: Delphinidae)<br><i>А. М. Масс, А. Я. Сунин</i>                                                                                                             | 136 |
| Возрастные особенности генерации эпилептиформной активности в 4-аминопиридиновой модели в срезах мозга крысы<br><i>Е. Ю. Смирнова, Д. С. Синяк, А. В. Чижов, А. В. Зайцев</i>                                                                                                        | 144 |
| Особенности воздействия дециметровых электромагнитных волн на активность пируваткиназы мозга крыс в онтогенезе<br><i>А. М. Рашидова</i>                                                                                                                                              | 154 |
| Адаптация к низким температурам икроножных мышц травяной лягушки <i>Rana temporaria</i> в начале анабиоза<br><i>М. В. Каранова</i>                                                                                                                                                   | 165 |
| Межсамцовые взаимодействия на нейтральной территории и последующая динамика уровня кортикостерона и тестостерона в крови у ручных и агрессивных серых крыс ( <i>Rattus norvegicus</i> )<br><i>Р. Г. Гулевич, С. Г. Шихевич, М. Ю. Коношенко, Р. В. Кожемякина</i>                    | 172 |

---

# Contents

---

Vol. 57, No. 2, 2021

---

---

|               |    |
|---------------|----|
| Advertisement | 93 |
|---------------|----|

---

## REVIEWS

|                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Specific Features of Nutrient Transport in the Digestive Tract of Fish<br><i>V. V. Kuzmina</i>                | 94  |
| Anatomical and Physiological Peculiarities of the Heart in Jawless and Jawed Fish<br><i>E. E. Kolesnikova</i> | 103 |

---

## EXPERIMENTAL ARTICLES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| The Influence of Low-Molecular-Weight Allosteric Agonists of the Luteinizing Hormone Receptor on Its Expression and Distribution in Rat Testes<br><i>A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, I. V. Romanova, V. N. Sorokoumov, T. V. Sokolova, A. I. Govdi, I. Yu. Morina, A. A. Perminova, A. O. Shpakov</i> | 124 |
| Topography of the Ganglion Retinal Layer and Retinal Resolution in the Rough-toothed Dolphin <i>Steno bredanensis</i> (Cetacea: Delphinidae)<br><i>A. M. Mass, A. Ya. Supin</i>                                                                                                                        | 136 |
| Age-Related Differences in Epileptiform Activity in Slices of the Rat Entorhinal Cortex in 4-Aminopyridine Model<br><i>E. Y. Smirnova, D. S. Sinyak, A. V. Chizhov, A. V. Zaitsev</i>                                                                                                                  | 144 |
| Differential Effects of Decimetric Electromagnetic Microwaves on Pyruvate Kinase Activity in the Rat Brain During Ontogenesis<br><i>A. M. Rashidova</i>                                                                                                                                                | 154 |
| Low-Temperature Adaptation of the <i>Rana temporaria</i> Gastrocnemius Muscle at the Onset of Anabiosis<br><i>M. V. Karanova</i>                                                                                                                                                                       | 165 |
| Inter-Male Interactions on Neutral Territory and Subsequent Dynamics of Blood Corticosterone And Testosterone Levels in Tame and Aggressive Norway Rats ( <i>Rattus norvegicus</i> )<br><i>R. G. Gulevich, S. G. Shikhevich, M. Y. Konoshenko, R. V. Kozhemyakina</i>                                  | 172 |

---

## **Объявление о создании нового Электронного архива научных публикаций по тематике “Химия, биология и физиология”**

DOI: 10.31857/S0044452921020054

В целях поддержки продвижения научных журналов в 2020 г. Министерство науки и высшего образования РФ объявило конкурсы на создание семи электронных архивов выпусков журналов по математике, медицине, химии, общественным и ряду других наук.

Конкурсы объявлены в рамках федеральной целевой программы (ФЦП) “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России” на 2014–2020 гг.

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН выиграл конкурс по созданию архива по тематическому направлению “Химия, биология и физиология”. Основой данного архива станет коллекция выпусков ведущих журналов Российской академии наук за период с 2000 по 2008 г.: “Доклады академии наук”, “Журнал физической химии”, “Физикохимия поверхности и защита материалов”, “Радиохимия”, “Электрохимия”, “Коллоидный журнал”, “Нефтехимия”, “Журнал прикладной химии”, “Высокомолекулярные соединения. Серия А”, “Высокомолекулярные соединения. Серия В”, “Высокомолекулярные соединения. Серия С”.

Основными целями создания открытого электронного архива в соответствии с заданием Министерства являются: распространение научных знаний и создание научно-популярного, информационного издания, объясняющего общественную ценность научной деятельности; вовлечение российского общества в изучение текущих и прошлых достижений российской науки; раскрытие богатства и многообразия научной жизни России; в популярном, понятном виде создание коллекций докладов на научных конференциях, учебных курсах, лекциях российских и зарубежных ученых на проходящих в России научных мероприятиях; демонстрация научных комментариев к событиям и явлениям в природе и обществе.

В рамках данного проекта будет создан архив из скан-копий российских журналов и материалов научных мероприятий по тематическим направлениям в области химии, биологии и физиологии. На основе коллекции электронных версий ведущих научных журналов будут сформированы профильные ресурсы научного и научно-популярного характера в свободном доступе.

Работа по созданию архива должна быть завершена к концу 2020 г. Каталог архива будет размещен на сайте **PhysChemBio.ru**.

## ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА НУТРИЕНТОВ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ РЫБ

© 2021 г. В. В. Кузьмина

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

e-mail: vkuzmina@ibiw.ru

Поступила в редакцию 28.09.2020 г.

После доработки 11.11.2020 г.

Принята к публикации 07.12.2020 г.

В обзоре в сжатой форме приведены сведения о механизмах транспорта белков, жиров и углеводов в кишечнике рыб. Описаны механизмы макро- и микромолекулярного транспорта. Особое внимание уделено различиям некоторых механизмов микромолекулярного транспорта пептидов, аминокислот и гексоз, а также кранио-каудальных градиентов транспорта у рыб и млекопитающих. Показано, что транспортные белки появляются на самых ранних этапах онтогенеза рыб — до перехода личинок на экзогенное питание. Анализируются причины отличий транспортных систем кишечника.

**Ключевые слова:** рыбы, кишечник, транспорт нутриентов, механизмы, особенности

**DOI:** 10.31857/S0044452921020030

### ВВЕДЕНИЕ

Всасывание, или транспорт нутриентов у рыб, как и у других позвоночных животных, осуществляется преимущественно в кишечнике. При этом у высших позвоночных существует тесная связь между мембранным гидролизом пищевых субстратов, в результате которого в зоне щеточной каймы энтероцитов образуются три-, ди- и мономеры, и транспортными системами [1, 2]. Исследование мембранного пищеварения у рыб позволило выявить принципиальное сходство структурных и функциональных основ этих процессов у рыб и млекопитающих [3–5]. Изучение транспортных процессов, напротив, выявило, наряду со сходством, ряд существенных отличий от такового у высших позвоночных [4, 6–10].

### 1. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСПОРТА НУТРИЕНТОВ

Изучение транспортных процессов подтвердило наличие у рыб двух основных механизмов транспорта нутриентов — макро- и микромолекулярного [3, 4, 6, 7, 9, 11–14].

**Макромолекулярный транспорт** обеспечивает перенос крупных молекул и надмолекулярных агрегаций по межклеточным пространствам (персорбция) и щелевым контактам [2]. По межклеточным пространствам переносится часть воды и электролитов, а также другие вещества, в том числе белки и пептиды. Помимо персорбции у рыб в отличие от высших позвоночных значительную роль

играет трансцеллюлярный перенос различных молекул через плазматические мембраны, осуществляемый с помощью эндоцитоза [15, 16]. Эндоцитоз, включающий фагоцитоз и пиноцитоз, тесно связан с внутриклеточным пищеварением. В целом ряде работ продемонстрирована возможность поглощения крупных пептидов, а также молекул белков в дистальном отделе кишечника рыб путем эндоцитоза [11–19]. Высказано предположение, что эндоцитозу белков предшествует их соединение с кишечным белком I-FABP, связывающим жирные кислоты [18]. Роль этого механизма особенно велика в проникновении интактного белка через кишечный барьер на ранних этапах развития рыб [20].

**Микромолекулярный транспорт** обеспечивает перенос во внутреннюю среду организма различных ионов, аминокислот, сахаров и жирных кислот [12], а также пептидов с небольшой молекулярной массой [21]. Различают два типа микропереноса веществ — пассивный и активный. *Пассивный транспорт*, реализующийся благодаря наличию электрохимического градиента и пор, включает в себя такие разновидности, как ультрафильтрация, конвенция и диффузия. Возможны несколько вариантов диффузии веществ через клеточные мембраны — простая, ограниченная, облегченная и обменная. Первые два механизма обеспечивают поступление в энтероцит различных низкомолекулярных субстратов (вода, мочевины, жирные кислоты) по градиенту концентрации [2]. Наличие механизма простой диффузии продемонстрировано у целого ряда морских и



пресноводных рыб при изучении всасывания углеводов [6, 22] и аминокислот [23, 24]. Обменная диффузия обеспечивает микроциркуляцию ионов между периферической областью клетки и окружающей ее средой [7].

*Облегченная диффузия*, обладающая сходством как с простой диффузией, так и с активным транспортом реализуется при помощи специальных переносчиков — белковых молекул, облегчающих проникновение дипептидов, аминокислот и сахаров через мембрану за счет концентрационного градиента без затраты энергии [2]. Наличие у рыб облегченной диффузии доказано при исследовании всасывания углеводов с использованием специфического блокатора опосредованного транспорта — флоридзина [22, 25, 26]. Так, при использовании в качестве ингибитора опосредованного транспорта глюкозы флоридзина в концентрации  $10^{-4}$  М у леща *Abramis brama* выявлен значительный флоридзин-зависимый компонент, свидетельствующий о том, что на долю облегченной диффузии приходится 51% транспорта глюкозы [26].

*Активный транспорт* у рыб, как и у млекопитающих, осуществляется против концентрационного градиента с затратой энергии при участии специальных каналов и белков-переносчиков. Последующий транспорт молекул нутриентов через базолатеральную мембрану в кровяное русло осуществляется с помощью облегченной диффузии [6, 9, 12]. Активный транспорт, как и облегченная диффузия, характеризуется порогом насыщения, обусловленным ограниченностью количества транспортеров (насосов, переносчиков, каналов и пор) в мембране кишечной клетки [6, 11, 25].

Переносчики или каналы участвуют в переносе одного или ограниченного числа типов молекул через мембрану либо по электрохимическому градиенту, либо благодаря сопряжению с транспортом другого вещества, движение которого по градиенту концентрации служит источником энергии для сопряженного с ним процесса. Используются различные ионные градиенты без непосредственного участия АТФ, в большинстве случаев электрохимический градиент  $\text{Na}^+$ , реже — градиенты  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{H}^+$  [1, 2, 9]. Транзитный перенос нутриентов создается благодаря наличию  $\text{Na}^+$ -зависимых транспортеров на апикальной мембране, а натриевых насосов — на базолатеральной. Источником энергии в большинстве случаев служит энергия макроэргических связей АТФ, а роль насосов выполняют транспортные АТФ-азы, такие как  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза и, особенно  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФаза, поддерживающая градиент  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  между вне- и внутриклеточными жидкостями. Мобильный переносчик связывает транспортируемые субстраты на одной поверхности мембраны, освобождая их на другой. Канал характеризуется наличием пост-

янной или индуцированной поры, через которую проходит транспортируемое вещество [1, 2, 9].

## 2. ОСОБЕННОСТИ ТРАНСПОРТА РАЗЛИЧНЫХ НУТРИЕНТОВ У РЫБ

Изучение механизмов переноса во внутреннюю среду организма гексоз, липидов, аминокислот и пептидов из просвета кишечника рыб интенсифицировалось во второй половине прошлого века [6, 11, 22, 23, 25, 26]. Гиперболическая кинетика насыщения, характерная для активного транспорта нутриентов, выявлена при исследовании всасывания глюкозы, галактозы и ряда аминокислот, причем константы сродства ( $K_s$ ) шеточнокаемного прямого потока сахаров и аминокислот в кишечнике рыб колеблются в пределах 0.1–20 мМ [6, 23]. Наличие активного транспорта аминокислот и гексоз в кишечнике рыб было подтверждено в опытах с использованием 2,4-динитрофенола, подавляющего процессы окислительного фосфорилирования, и фторида натрия, подавляющего процессы гликолиза [7, 22].

*Транспорт аминокислот.* В настоящее время твердо установлено, что в транспорте нейтральных аминокислот участвует транспортный белок В0 [27, 28], основных аминокислот — у- [27], ди- и трипептидов — транспортеры ПерТ. Транспорт ди- и трипептидов, образующихся в результате гидролиза белка, и аминокислот, реализуется при участии  $\text{H}^+$ -зависимого транспортного белка ПерТ1 (SLC15A1), а также транспортного белка ПерТ2 (SLC15A2). Транспортеры РЕРТ кодируются генами slc15a [10, 13, 29–37]. Первый из них обладает более низким сродством к субстрату, а второй — более высоким сродством к транспортируемым молекулам дипептидов. В энтероцитах часть пептидов гидролизует до уровня аминокислот, другая часть транспортируется через базолатеральную мембрану, очевидно, с помощью транспортного белка. В последние годы показано, что в отличие от млекопитающих, обладающих двумя транспортерами пептидов (ПерТ1 и ПерТ2), у рыб есть три транспортера с двумя паралогами ПерТ1 [14, 30, 31]. Однако механизм этого транспорта остается малоизученным [29]. Также важно отметить, что при исследовании японского угря *Anguilla japonica* транспортер РЕРТ1 выявлен в апикальной мембране энтероцитов личинок, а начало экспрессии мРНК РЕРТ1 совпадает с таковой трипсиногена, одновременно увеличиваясь на 5–7-е сутки после вылупления [37].

Вместе с тем в кишечнике рыб не выявлены такие  $\text{Na}^+$ -зависимые транспортеры аминокислот, как А, ASC,  $\text{b}^{0,+}$  и другие транспортеры, функционирующие у высших позвоночных животных [9]. Интересные данные получены при исследовании всасывания аминокислот в кишечнике европей-

ского угря *A. anguilla*, показавшие наличие четырех различных систем  $\text{Na}^+$ -зависимого транспорта аминокислот, аналогичных транспортным системам млекопитающих. Это система включает транспортеры кислых ( $\text{X}_{\text{AG}}^-$ ), основных ( $\text{y}^-$ ) и нейтральных (B0) аминокислот, а также транспортеры иминокислот (IMINO/PAT), локализованных в апикальной мембране энтероцитов [27, 38]. Транспортер иминокислот существенно отличается от аналогичной системы млекопитающих, поскольку полностью ингибируется аланином [38], и, частично, фенилаланином [27].

Наряду с  $\text{Na}^+$ -зависимым существует  $\text{Na}^+$ -независимый механизм транспорта, реализующийся благодаря специфическим олигомерным структурам — пищеварительно-транспортным комплексам [1]. У рыб обнаружен  $\text{Na}^+$ -независимый транспортер для аланина, глицина и лизина, аналогичный транспортной системе нейтральных и основных аминокислот у млекопитающих [27, 39]. При этом L-гистидин в кишечнике рыб, по-видимому, транспортируется с участием высоко специфического транспортного белка, так как другие аминокислоты, присутствующие в полости тонкой кишки, не оказывают влияние на интенсивность и кинетические характеристики его транспорта [40]. Субстратная специфичность транспортеров аминокислот может варьировать у разных видов рыб [12].

Важно отметить, что экспрессия специализированных насосов, транспортеров и каналов, ответственных за поглощение питательных веществ через апикальную мембрану микроворсинок щеточной каймы энтероцитов, отмечается на ранних этапах развития рыб. Однако исследований, посвященных экспрессии пептидных транспортеров на ранних стадиях развития рыб, мало. Возможность поглощения аминокислот на ранних стадиях онтогенеза рыб была доказана при исследовании абсорбции свободных аминокислот, меченных  $\text{C}^{14}$ , личинками атлантического палтуса *Hippoglossus hippoglossus*, перешедшими на экзогенное питание. Авторами использовались растворы, подаваемые в кишечник через зонд. Было показано, что приблизительно 71% заменимых (аланин, глутамат) и незаменимых (аргинин, лизин) аминокислот абсорбируется в течение 30 мин после их поступления в кишечник. При этом эвакуация аминокислот личинками была низкой и составляла в среднем только 6% от дозы, полученной через зонд [41].

Также при исследовании личинок значительное внимание было уделено пептидным транспортерам  $\text{PeptTs}$ . Как указывалось выше, эти транспортеры играют особую важную роль при абсорбции ди- и трипептидов. У *Danio rerio* экспрессия гена пептидного транспортера  $\text{PeptT1}$  зарегистрирована до начала экзогенного питания личинок [13]. Анализ экспрессии генов пептидных транспортеров у мо-

замбикской тилапии *Oreochromis mossambicus* на протяжении 12 сут развития (от 3 до 14 сут после оплодотворения — момента завершения абсорбции желточного мешка) позволил выявить существенные различия как во времени появления, так и в характере динамики экспрессии вариантов  $\text{PeptT1}$  и  $\text{PeptT2}$ . При этом экспрессия  $\text{slc15a1a}$  выявляется на 4-е сутки после оплодотворения, увеличивается в период от 6 до 10, уменьшается на 11-е и 12-е сутки после оплодотворения, а затем снова увеличивается. Экспрессия транспортера  $\text{slc15a1b}$  появляется на 6-е сутки после оплодотворения, резко увеличивается в период от 7 до 10 сут после оплодотворения, а затем изменяется подобно  $\text{slc15a1a}$ . Экспрессия транспортера  $\text{slc15a2}$  значительно не изменяется в период от 3 до 10 сут после оплодотворения, а затем последовательно увеличивается с максимумом на 14-е сутки после оплодотворения. При этом  $\text{PeptT1a}$  обнаружен в эзофагусе, а также в переднем и среднем отделах кишечника,  $\text{PeptT1b}$  — только в районе среднего отдела кишечника,  $\text{PeptT2}$  определяется лишь в заднем отделе кишечника [14].

При исследовании ювенильных особей атлантической трески *Gadus morhua* экспрессия мРНК  $\text{PeptT1}$  выявлена в пилорических придатках и во всех отделах кишечника. Следовательно, у молодых рыб весь кишечник участвует в абсорбции пептидов. Однако в дистальном сегменте экспрессия  $\text{PeptT1}$  была ниже по сравнению с проксимальным сегментом. При этом выявлена зависимость соотношения экспрессии мРНК  $\text{PeptT1}$  в пилорических придатках и в различных сегментах кишечника от состава корма [24].

**Транспорт углеводов.** Транспортеры сахаров ответственны за всасывание моносахаридов (глюкозы, галактозы и фруктозы) из просвета кишечника в кровь. Доказано, что транспортер  $\text{SGLT1}$ , расположенный на апикальной мембране щеточной каймы энтероцитов, переносит глюкозу и галактозу при участии  $\text{Na}^+$  из просвета кишечника внутрь энтероцитов у различающихся по таксономии млекопитающих [42–44]. Транскрипция  $\text{SGLT1}$  происходит преимущественно в криптах, причем они встраиваются в мембрану по мере миграции клеток к верхушкам ворсинок. Транспортер фруктозы  $\text{GLUT5}$  также локализуется на апикальной мембране энтероцитов. Показано, что транспортная активность  $\text{GLUT5}$ , в отличие от  $\text{SGLT1}$ , может регулироваться диетой. Предполагается, что это связано с синтезом *de novo* мРНК  $\text{GLUT5}$  в клетках, выстилающих ворсинки. Переход гексоз из энтероцитов в кровь обеспечивает расположенный на базолатеральных мембранах транспортер  $\text{GLUT2}$  [42]. Кроме того, выявлен  $\text{Na}^+$ -независимый механизм транспорта гексоз, связанный с переносом через мембрану глюкозы, образующейся при мембранном гидролизе [1].

Уже в ранних работах было показано, что D-глюкоза, D-галактоза и 6-дезоксид-D-глюкоза могут накапливаться внутриклеточно в концентрации, превышающей таковую в полости кишечника рыб. При этом эпителий кишечника рыб может реализовать трансэпителиальный транспорт D-глюкозы и D-галактозы против электрохимического градиента в условиях *in vivo* и *in vitro* [6, 25, 26, 45–48]. Растительные и всеядные виды могут адаптировать транспорт глюкозы через апикальную мембрану щеточной каймы энтероцитов в соответствии с изменениями в уровне углеводов пищи, изменяя  $V_{\max}$  [12]. Важно отметить, что конкурентный ингибитор транспорта сахаров флоридзин ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М) вызывает снижение аккумуляции и транспорта моносахаридов в кишечнике морских и пресноводных рыб [22, 25, 26].

Также доказана важность ионов  $\text{Na}^+$  для активного транспорта глюкозы у рыб. При исследовании целого ряда видов рыб установлено, что оубаин ( $10^{-2}$ – $10^{-5}$  М), блокирующий  $\text{Na}^+$ – $\text{K}^+$ –АТФ-азу и сопряженный с  $\text{Na}^+$  активный транспорт глюкозы, снижает долю активного компонента при низких концентрациях глюкозы почти до 1/3 [23, 26, 49]. Близкие эффекты вызывают ионы цианада, ингибирующего образование АТФ, а также замена ионов  $\text{Na}^+$  ионами  $\text{K}^+$  или  $\text{Li}^+$  [50]. Слабый эффект торможения или его отсутствие у рыб при действии ингибиторов в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  М, эффективных для высших позвоночных животных, позволил предположить меньшее количество переносчиков опосредованного транспорта в кишечнике рыб [7].

У рыб в транспорте глюкозы и, по-видимому, D-галактозы также наиболее важную роль играет  $\text{Na}^+$ -зависимый транспортер глюкозы SGLT1 и транспортер GLUT2 [9, 12, 47, 51, 52]. Первый локализован на апикальной мембране энтероцитов, второй — на базолатеральной мембране [12, 53]. При этом скорость базолатерального транспорта ниже, чем у млекопитающих. Так, при исследовании обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* и белого амура *Stenopharingodon idellus* показано, что мРНК *glut2* в основном экспрессируется в печени, передней и средней частях кишечника. Через 3 ч после введения глюкозы экспрессия гена *glut2* значительно повышается в переднем отделе кишечника. Поскольку изменения в уровне мРНК *glut2* в печени не обнаружены, авторы заключили, что *glut2* участвует в поглощении глюкозы только в кишечнике [54, 55]. Переносчик D-фруктозы, такой как GLUT5, у рыб не найден, но есть сведения о том, что фруктоза (10 мМ) поглощается кишечником леща *A. brama* и обыкновенного карпа *C. carpio* [46]. Предполагается, что в абсорбции фруктозы принимает участие транспортер GLUT2, локализованный на мембранах щеточной каймы энтероцитов [9].

**Всасывание липидов.** Механизмы всасывания жира в кишечнике рыб не вполне ясны, но предполагается сходство с таковыми у млекопитающих [56]. Возможность абсорбции жира энтероцитами рыб была продемонстрирована еще в начале XX века и затем подтверждена в многочисленных работах при помощи гистологических и цитологических методов [57]. В межклеточных пространствах и *lamina propria* слизистой оболочки кишечника липидные частицы появляются в виде липопротеинов очень низкой плотности и хиломикронов [58]. Предполагалось, что жир всасывается путем эндоцитоза. Однако данные ряда электронно-микроскопических и биохимических исследований свидетельствуют о преимущественном всасывании липидов путем диффузии [59, 60] в форме моноглицеридов и свободных жирных кислот, которые могут поступать в кровеносную систему рыб в свободном виде или в форме триглицеридов, ресинтезированных внутри энтероцитов и включенных в состав хиломикронов [61, 62]. Поскольку дисперсные липиды хорошо растворяются в мембранах, а их концентрация в полости высока, возможно, что липиды могут пассивно перемещаться по градиенту их концентрации из полости кишечника через апикальную мембрану энтероцитов в цитозоль [8]. Есть данные о том, что липидные капли накапливаются в надъядерном пространстве энтероцитов [63], релаксифицируются в триацилглицериды [58] и выходят из энтероцитов путем экзоцитоза [63].

При исследовании арктического гольца *Salvelinus alpinus* показано, что наибольшая скорость абсорбции характерна для насыщенных кислот с длинной цепи 12:0, скорость абсорбции кислот 14:0, 16:0 и 18:0 и мононенасыщенных с длинной цепи 22:1 ограничена скоростью липолиза [64]. Жирные кислоты с короткой и средней цепью, отличающиеся относительно высокой растворимостью в воде, быстро абсорбируются в самой проксимальной части кишечника, вероятно, не включаясь в мицеллы [65, 66]. Насыщенные жирные кислоты с длинной цепью абсорбируются труднее, чем ненасыщенные жирные кислоты с аналогичной длиной цепи. Предполагается, что свободные жирные кислоты и фосфатидилхолин усваиваются легче, чем триацилглицеролы [67]. Также предполагается, что жирные кислоты, высвобождаемые из мицелл, поглощаются при помощи облегченного транспорта. Однако участие такого рода транспортеров при исследовании рыб не подтверждено [9].

Вместе с тем при исследовании данио *D. rerio* и обыкновенного карпа *C. carpio* найден белок, связывающий жирные кислоты (FABP), транскрипты которого экспрессируются в кишечнике и могут участвовать в интернализации жирных кислот [18, 68]. При этом у личинок данио *D. rerio* сильная экспрессия гена этого выявляется до полного рассасывания желтка и первого кормления, а уровни

мРНК и белка FABP постепенно снижаются в дистальном направлении кишечника [68]. Следовательно, у личинок, как и у взрослых костистых рыб, основное место абсорбции липидов находится в проксимальном отделе кишечника. Показано, что ген, кодирующий FABP в кишечнике данио *D. rerio* появляется через 12 ч после оплодотворения [8].

Поскольку получены данные, позволяющие предположить, что жирные кислоты пищи в комплексе с FABP, связывающими внутриклеточные липиды, могут достигать ядер энтероцитов и влиять на ядерную активность, следует подробно остановиться на результатах работы, выполненной на данио *D. rerio*. Так как белки, связывающие жирные кислоты FABP1 и FABP2, высоко экспрессируются в тканях, участвующих в активном метаболизме липидов (печени, переднем отделе кишечника и головном мозге), была исследована дифференциальная экспрессия транскриптов *fabp1b.1*, *fabp1b.2* и *fabp2* в этих тканях. Было показано, что FABP локализованы в микроворсинках, цитозоле и ядрах большинства энтероцитов слизистой оболочки переднего отдела кишечника, а транскрипция *fabp1b.1* и *fabp2* активируется после кормления и регулируется в соответствии с составом корма. Важно, что в ядрах FABP локализуются большей частью в межхроматиновом пространстве. Также продемонстрировано связывание меченных жирных кислот с рекомбинантными Fabp1b.1 и Fabp2 [69].

*Роль отдельных механизмов транспорта мономеров.* Сопоставление роли отдельных механизмов транспорта мономеров свидетельствует о том, что у рыб при низких концентрациях субстрата (<0.5 мМ) наиболее значительную роль играют процессы активного транспорта и облегченной диффузии. В случае глюкозы активный транспорт может наблюдаться при концентрациях 0.05–2.5 мМ [7, 11]. При более высоких концентрациях субстрата значительно возрастает доля пассивной и облегченной диффузии [7, 22, 26]. Соотношение указанных механизмов транспорта у разных видов рыб различно и в значительной мере зависит от характера питания, функционального состояния организма, природы и силы воздействия абиотических факторов. Обязательным этапом транспорта пищевых субстратов во внутреннюю среду организма является их перенос через слой слизистых наложений кишечника, установленный при исследовании транспорта неорганических ионов [70] и сахаров [7].

### 3. ТОПОГРАФИЯ ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ У РЫБ

Для кишечника рыб, как и для других позвоночных, характерно наличие кранио-каудальных (проксимо-дистальных) градиентов всасывания пищевых веществ. Более высокая скорость всасывания зарегистрирована в проксимальных отделах

тонкой кишки, а более низкая — в дистальных [17, 46, 50, 51, 63, 66, 71–73]. Однако у некоторых видов всеядных и плотоядных рыб различия в скорости всасывания аминокислот и сахаров в различных участках кишки отсутствуют [50]. При этом системы активного транспорта характерны практически для всего кишечника [17], включая наиболее дистальные его части [16, 17, 37, 73].

Кроме того, важно отметить как сходство, так и вариабельность проксимо-дистальных градиентов транспорта одного и того же вещества у рыб разных видов. Так, липиды всасываются преимущественно в пилорических придатках и проксимальных участках кишечника [3, 4, 9, 57, 63, 66]. Проксимо-дистальные градиенты транспорта аминокислот и гексоз у рыб разных видов различны [51, 71, 72]. В условиях *in vitro* аккумуляция и транспорт аминокислот максимальны в пилорических придатках [17], средних [23] или задних участках кишечника [72, 74], моносахаридов — в пилорических придатках [17], переднем [6, 74], среднем [45] или заднем отделе кишечника [46, 74].

Вместе с тем функциональная топография кишечника рыб необычайно пластична и может изменяться в зависимости от структуры пищевых субстратов, вида рыб, их функционального состояния, а также целого ряда биотических и абиотических факторов [7]. В частности, характер проксимо-дистальных градиентов транспорта одного и того же вещества в значительной мере зависит от особенностей питания рыб [51, 74], а также интенсивности питания рыб — при переходе от голодного к сытому состоянию скорость транспорта нутриентов увеличивается на всем протяжении кишечника, что обусловлено локальной стимуляцией транспортных процессов [23, 46, 75]. Так, повторное кормление морского окуня *Dicentrarchus labrax* стимулирует экспрессию мРНК *PerT1* в проксимальном отделе кишечника [75]. При исследовании кранио-каудальных градиентов транспорта свободной глюкозы, а также глюкозы, образующейся из поли- и дисахаридов у леща *A. brama* и карпа *C. carpio* была выявлена зависимость величины абсорбции от степени полимеризации гексоз и способа расчета [46].

### 4. СОПРЯЖЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ГИДРОЛИЗА И ТРАНСПОРТА

Ранее была высказана гипотеза о существовании ферментативно-транспортных комплексов, обеспечивающих прямую передачу продуктов гидролиза олигомеров на вход в транспортные системы без рассеивания в водной фазе и независимых транспортных путей для свободных мономеров и мономеров, образующихся из олигомеров [1]. Позднее была предложена модель мультиканальных котранспортеров для  $\text{Na}^+$  и глюкозы, а также

$\text{Na}^+$  и других нутриентов [1, 2]. Сведения, касающиеся сопряжения пищеварительно-транспортных процессов у рыб, немногочисленны и довольно противоречивы. В ряде работ установлено, что скорость аккумуляции глюкозы, образующейся при гидролизе мальтозы у щуки *Esox lucius*, окуня *Perca fluviatilis* и карпа *C. carpio*, выше скорости абсорбции свободного мономера [22]. Всасывание глицина в кишечнике радужной форели *S. gairdnerii* происходит быстрее из глицилглицина, чем из раствора, с эквивалентным количеством свободной аминокислоты [23].

Сопоставление в условиях *in vitro* эффектов ингибитора опосредованного транспорта глюкозы флоридзина ( $10^{-4}$  М) на транспорт свободной глюкозы, а также глюкозы, образующейся из мальтозы и крахмала у леща *A. brama*, показало, что флоридзин-зависимый компонент в случае олигомерного транспорта (мальтоза) несколько выше, чем в случае мономерного (56 и 51% соответственно), полимерного (крахмал) — еще ниже (32%). При изучении влияния оубаина в той же концентрации на транспорт свободной глюкозы, глюкозы, образующейся из мальтозы и крахмала в эквимольной концентрации (2.5 мМ), у рыб этого же вида показано, что ингибитор  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATF}$ азы блокирует мономерный транспорт глюкозы на 30%, олигомерный — на 32%, полимерный — на 18% [27].

Однако в ряде работ, выполненных на рыбах, напротив, выявлено преобладание скорости аккумуляции свободных моносахаридов и аминокислот по сравнению с олигомерным транспортом [3, 22]. Указанные противоречия, вероятно, свидетельствуют о слабом развитии у рыб ферментативно-транспортных комплексов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизмы транспорта нутриентов у рыб и высших позвоночных достаточно близки. Однако скорость транспорта нутриентов у первых на порядок ниже, чем у вторых. У высших позвоночных доминирует активный транспорт, некоторую роль на ранних этапах онтогенеза играет облегченная диффузия, а доля простой диффузии ничтожно мала. У рыб, напротив, в случае высоких концентраций субстратов преобладают механизмы простой или облегченной диффузии. Доля активного компонента транспорта у рыб по сравнению с высшими позвоночными низка. Несмотря на эти различия, транспортные белки энтероцитов, по-видимому, достаточно консервативны и не изменяются в процессе эволюции позвоночных. Вместе с тем у рыб заметно ниже относительная площадь всасывающей поверхности кишечника и меньше число транспортных белков на единицу поверхности кишечника, по сравнению с млекопитающими. Кроме того, для рыб характерна слабая степень со-

пряженности пищеварительных и транспортных процессов, меньшая зависимость транспорта от концентрации кислорода, значительная роль дистальных отделов кишки во всасывании нутриентов по сравнению с высшими позвоночными животными. Эти особенности, по-видимому, связаны с более низкими метаболическими потребностями и энергозатратами на локомоции у рыб, обусловленные в значительной мере с их обитанием в гипогравитационной среде.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18 118012690102-9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уголев А.М. (Ред.) Мембранный гидролиз и транспорт. Новые данные и гипотезы. Л.: Наука. 1986. [Ugolev A.M. (Ed.) Membrane hydrolysis and transport. New data and hypotheses. L.: Nauka. 1986].
2. Метельский С.Т. Транспортные процессы и мембранное пищеварение в тонкой кишке. Электрофизиологическая модель. М.: Анахарсис. 2007. [Metelsky S.T. Transport processes and membrane digestion in the small intestine. Electrophysiological model. M.: Anacharsis. 2007].
3. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоздат. 1993. [Ugolev A.M., Kuzmina V.V. Digestive processes and adaptations in fish. SPb.: Gidrometeoizdat. 1993].
4. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука. 2005. [Kuzmina V.V. Physiological and biochemical bases of fish exotrophy. M.: Nauka. 2005].
5. Кузьмина В.В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы. Ярославль: Филигрань. 2018. 299 с. [Kuzmina V.V. Digestive processes in fish. New facts and hypotheses. Yaroslavl: Filigran. 2018].
6. Ferraris R.P., Ahearn G.A. Sugar and amino acid transport in fish intestine. Comp. Biochem. Physiol. 77A (3): 397–413. 1984.
7. Голованова И.Л., Кузьмина В.В. Транспорт нутриентов в кишечнике рыб. Биол. внутр. вод. 2: 62–72. 1998. [Golovanova I.L., Kuzmina V.V. Transport of nutrients in the intestines of fish. Biol. int. water. 2: 62–72. 1998].
8. Rønnestad I., Morais S.J. Digestion. In: Fish Larval Physiology (Eds. R.N. Finn, B.G. Kapoor). USA Enfield, New Hampshire: Science Publishers. 201–262. 2008.
9. Bakke A.M., Glover Ch., Krogh A. Feeding, digestion and absorption of nutrients. Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish (Eds. M. Grosell, A.P. Farrell, C.J. Brauner). Amsterdam, Boston: Acad. Press. 30: 57–110. 2011.
10. Verri T., Barca A., Pisani P., Piccinni B. Storelli C. Romano A. Di- and tripeptide transport in vertebrates: the contribution of teleost fish models. J. Comp. Physiol. 187 (3): 395–462. 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-016-1044-7>

11. Ferraris R.P. Does glucose uptake in marine fish intestines occur by active transport? *Pasif. Sci.* 36 (4): 510–522. 1982.
12. Collie N.L., Ferraris R.P. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Series* (Eds P.W. Hochachka and T.P. Mommsen). Amsterdam: Elsevier Science. 4: 221–239. 1995.
13. Verri T., Kottra G., Romano A., Tiso N., Peric M., Maffia M., Boll M., Argenton F., Daniel H., Storelli C. Molecular and functional characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) PEPT1-type peptide transporter. *FEBS Letters*. 549: 115–122. 2003.
14. Con P., Nitzan T., Slosman T., Harpaz S., Cnaani A. Peptide Transporters in the Primary Gastrointestinal Tract of Pre-Feeding Mozambique Tilapia Larva. *Front. Physiol.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00808>
15. Ash R., McLean E. Intact protein absorption in teleost: Comparative consideration. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 97 (5): 51–70. 1989.
16. Sire M.-F., Dorin D., Vernier J.-M. Intestinal absorption of macromolecular proteins in rainbow trout. *Aquacult.* 100: 234–235. 1992.
17. Bakke-McKellep A.M., Nordrum S., Krogdahl Å., Budington R. K. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 22: 33–44. 2000.
18. Concha M.I., Santander C.N., Villanueva J., Amthauer R. Specific binding of the endocytosis tracer horseradish peroxidase to intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) in apical membranes of carp enterocytes. *J. Exp. Zool.* 293: 541–550. 2002.
19. Valle A.Z., Iriti M., Faoro F., Berti C., Ciappellano S. *In vivo* prion protein intestinal uptake in fish. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* V: 173–180. 2008.
20. Deplano M., Connes R., Diaz J.P., Barnabe G. Variation in the absorption of macromolecular protein in larvae of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* 110: 29–36. 1991.
21. Thamotharan M., Gomme J., Zonno V., Maffia M., Storelli C., Ahearn G.A. Electrogenic, proton-coupled, intestinal dipeptide transport in herbivorous and carnivorous teleosts. *Amer. J. Physiol.* 270: R939–R947. 1996. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.270.5.R939.1996>.
22. Уголев А.М., Кузьмина В.В., Рощина Г.М., Смирнова Л.Ф., Голованова И.Л., Груздков А.А. Характеристика мембранного гидролиза и транспорта у рыб. *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 3: 341–349. 1989. [Ugolev A.M., Kuzmina V.V., Roshchina G.M., Smirnova L.F., Golovanova I.L., Gruzdkov A.A. Characteristics of membrane hydrolysis and transport in fish. *Izv. Academy of Sciences of the USSR. Ser. biol.* 3: 341–349. 1989. (In Russ)].
23. Boge G., Rigal A., Peres G. Rates of *in vivo* intestinal absorption of glycine and glycyglycine by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.* 69 (3): 455–459. 1981.
24. Vilella S., Ahearn G.A., Cassano G., Storelli C. Na-dependent L-proline transport by ell intestinal brush-border membrane vesicles. *Amer. J. Physiol.* 255 (4). Pt. 2: R648–R653. 1988.
25. Farmafarmaian A.A., Ross A., Mazal A. *In vivo* intestinal absorption of sugar in the toadfish (marine teleost, *Opsanus tau*). *Biol. Bull.* 142: 427–445. 1972.
26. Кузьмина В.В., Извекова Г.И. Механизмы транспорта углеводов в кишечнике пресноводных костистых рыб. *Биол. внутр. вод. Информ. бюлл.* 79: 42–44. 1988. [Kuzmina V.V., Izvekova G.I. Mechanisms of carbohydrate transport in the intestines of freshwater teleost fishes. *Biol. Internal water. Inform.bull.* 79: 42–44. 1988 (In Russ)].
27. Storelli C., Vilella S., Romano A., Maffia M., Cassano G. Brush-border amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. *Am. J. Physiol.* 257: R506–R510. 1989.
28. Boge G., Roche H., Balocco C. Amino acid transport by intestinal brush border vesicles of a marine fish, *Boops salpa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131B: 19–26. 2002.
29. Verri T., Romano A., Barca A., Kottra G., Daniel H., Storelli C. Transport of di- and tripeptides in teleost fish intestine. *Aquacult. Res.* 41: 641–653. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02270.x>
30. Romano A., Kottra G., Barca A., Tiso N., Maffia M., Argenton F., Daniel H., Storelli C., Verri T. High-affinity peptide transporter PEPT2 (SLC15A2) of the zebrafish *Danio rerio*: functional properties, genomic organization, and expression analysis. *Physiol. Genom.* 24: 207–217. 2006.
31. Gonçalves A.F., Castro L.F.C., Pereira-Wilson C., Coimbra J., Wilson J.M. Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish? *Comp. Biochem. Physiol.* 151D: 345–355. 2007.
32. Hakim Y., Harpaz S., Uni Z. Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following feed deprivation. *Aquacult.* 290: 110–115. 2009.
33. Sangaletti R., Terova G., Peres A., Bossi E., Cora S., Saroglia M. Functional expression of the oligopeptide transporter PepT1 from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*. 459: 47–54. 2009.
34. Terova G., Cora S., Verri T., Rimoldi S., Bernardini G., Saroglia M. Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquacult.* 294: 288–299. 2009.
35. Bakke S., Jordal A.-E.O., Gómez-Requeni P., Verri T., Kousoulaki K., Aksnes A., Rønnestad I. Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 156 B: 48–55. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.002>
36. Ostaszewska T., Kamaszewski M., Grochowski P., Dabrowski K., Verri T., Aksakal E., Muszynska M., Nowak Z., Dobosz S. The effect of peptide absorption on *PepT1* gene expression, and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Comp. Biochem. Physiol.* 155A: 107–114. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.017>
37. Ahn H., Yamada Y., Okamura A., Tsukamoto K., Kaneko T., Watanabe S. Intestinal expression of peptide transporter 1 (PEPT 1) at different life stages of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 166B (2):

- 157–164. 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.08.005>
38. Vilella S., Ahearn G.A., Cassano G., Storelli C. How many Na<sup>+</sup>-dependent carriers for L-alanine and L-proline in the eel intestine? Studies with brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 984: 188–192. 1989.
  39. Glover C.N., Bucking C., Wood C.M. Characterization of L-alanine and glycine absorption across the gut of an ancient vertebrate. *Comp. Biochem. Physiol.* 166B (2): 157–164. 2011.
  40. Glover C.N., Wood C.M. Histidine absorption across apical surfaces of freshwater rainbow trout intestine: mechanistic characterization and the influence of copper. *J. Membr. Biol.* 221: 87–95. 2008.
  41. Applebaum S.L., Ronnestad I. Absorption, assimilation and catabolism of individual free amino acids by larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquacult.* 230: 313–322. 2004.  
<https://doi.org/10.1016/S0044-8486>
  42. Ferraris R.P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem. J.* 360: 265–276. 2001.
  43. Bachelor D.J., Al-Rammahi M., Moran A.W., Brand J.G., Li X., Haskins M., German A.J., Shirazi-Beechey S.P. Sodium/glucose cotransporter-1, sweet receptor, and disaccharidase expression in the intestine of the domestic dog and cat: Two species of different dietary habit. *Amer. J. Physiology. Reg., Integr., Comp. Physiol.* 300: R67–R75. 2011.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00262.2010>
  44. Gruzdkov A.A., Gromova L.V., Grefner N.M., Komissarchik Yu.Y. Kinetics and mechanisms of glucose absorption in the rat small intestine under physiological conditions. *Biophys. Chem.* 3: 191–200. 2012.  
<https://doi.org/10.4236/jbpc.2012.32021>
  45. Stokes R., Fromm P. Glucose absorption and metabolism by the gut of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 13: 53–69. 1964.
  46. Голованова И.Л. Особенности транспорта углеводов в различных частях кишечника леща (*Abramis brama*) и карпа (*Cyprinus carpio*). *Вопр. ихтиол.* 32 (3): 124–132. 1992. [Golovanova I.L. Characteristics of carbohydrate transport in different parts of the intestines of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*). *J. Ichthyol.* 33: 26–35. 1993. (In Russ)].
  47. Sala-Rabanal M., Gallardo M.A., Sanchez J., Planas J.M. Na-dependent D-glucose transport by intestinal brush border membrane vesicles from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Membr. Biol.* 201: 85–96. 2004.
  48. Hall J.R., Short C.E., Driedzic W.R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2, and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J. Exp. Biol.* 209: 4490–4502. 2006.
  49. Cartier M., Buclon M., Robinson T.W.L. Preliminary studies on the characteristics of phenylalanine and methyl-glucoside transport in the tench intestine *in vitro*. *Compar. Biochem. Physiol.* 62A: 363–370. 1979.
  50. Sastry K.V., Garg V.K., Agrawal V.P. Effect of inhibitors on Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transport in the small intestine of two teleost fishes. *Indian J. Exp. Biol.* 15: 661–662. 1977.
  51. Buddington R.K., Chen J.W., Diamond J.M. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393: 261–281. 1987.
  52. Ahearn G.A., Behnke R.D., Zonno V., Storelli C. Kinetic heterogeneity of Na-D-glucose cotransport in teleost gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* 263: R1018–R1023. 1992.
  53. Hall J.R., Short C.E., Driedzic W.R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2, and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J. Exp. Biol.* 209: 4490–4502. 2006.
  54. Deng D., Yan X., Zhao W., Qin C., Yang G., Nie G. Glucose transporter 2 in common carp (*Cyprinus carpio* L.): molecular cloning, tissue expression, and the responsiveness to glucose, insulin, and glucagon. *Fish Physiol. Biochem.* 2020.  
<https://doi.org/10.1007/s10695-020-00782-z>
  55. Zhao W., Qin C., Yang G., Zhao W., Qin C., Yang G., Yan X., Meng X., Yang L., Lu R., Deng D., Niu M., Nie G. Expression of *glut2* in response to glucose load, insulin and glucagon in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 2020. 239: 110351.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.110351>
  56. Tocher D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11: 107–184. 2003.
  57. Kapoor B.C., Smit H., Verighina I.A. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in marine biology.* New York. 13: 109–239. 1975.
  58. Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjørsvik E., Montero D., Socorro J., Fernández A.J., Rosenlund G. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquacult.* 225: 325–340. 2003.
  59. Ezeasor D.N., Stokoe W.M. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *J. Fish Biol.* 18 (5): 527–544. 1981.
  60. Titus E. Short-chain fatty acid transport in intestinal brush border membrane vesicles of the african tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Pacif. Sci.* 42 (1): 134–135. 1988.
  61. Sire M.-F., Lutton C., Vernier J.-M. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J. Lipid Res.* 22: 81–94. 1981.
  62. Ostos Garrido M.V., Nunez Torres M.V., Abaurrea Equisoian M.A. Lipid absorption by enterocytes of the rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*. Diet-induced changes in the endomembranous system. *Aquacult.* 110: 156–174. 1993.
  63. Hernandez-Blazquez F.J., Guerra R.R., Kfoury J.R., Bombonato P.P., Cogliati B., da Silva J.R.M.C. Fat absorptive processes in the intestine of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). *Polar Biol.* 29: 831–836. 2006.
  64. Olsen R.E., Myklebust R., Kaino T., Ringo E. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21: 35–44. 1999.
  65. Røsjo C., Nordrum S., Olli J.J., Kroghdahl Å., Ruyter B., Holm H. Lipid digestibility and metabolism in Atlantic

- salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. *Aquacult.* 190: 65–76. 2000.
66. Denstadli V., Vegusdal A., Krogdahl Å., Bakke-McKelley A.M., Berge G.M., Holm H., Hillestad M., Ruyter B. Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult.* 240: 385–398. 2004.
  67. Oxley A., Jutfel F., Sundell K., Olsen R. E. Sn-2-monoacylglycerol, not glycerol, is preferentially utilised for triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 146B: 115–123. 2007.
  68. André M., Ando S., Ballagny C., Durlait M., Poupard G., Briançon C., Babin P.J. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Inter. J. Devel. Biol.* 44: 249–252. 2000.
  69. Esteves A., Knoll-Gellida A., Canclini L., Silvarrey M.C., André M., Babin P.J. Fatty acid-binding proteins have the potential to channel dietary fatty acids into enterocyte nuclei. *J. Lipid Res.* 57 (2): 219–332. 2016. <https://doi.org/10.1194/jlr.M062232>
  70. Shephard K.L. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fisher.* V. 4. P. 401–429. 1994.
  71. Krogdahl Å., Nordrum S., Sørensen M., Brudeseth, L., Røsjø C. Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutr.* 5: 121–133. 1999.
  72. Nordrum S., Krogdahl Å., Røsjø C., Olli J.J., Holm H. Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime. *Aquacult.* 186: 341–360. 2000.
  73. Jutfelt F., Olsen R.E., Björnsson B.T., Sundell K. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon. *Aquacult.* 273: 298–311. 2007.
  74. Buddington R.K., Doroshov S.I. Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). *Compar. Biochem. Physiol.* 83A (2): 233–238. 1986.
  75. Verri T., Rimoldi S., Bernardini G., Saroglia M. Impact of feed availability on PEPT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquacult.* 294: 288–299. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.014>

## SPECIFIC FEATURES OF NUTRIENT TRANSPORT IN THE DIGESTIVE TRACT OF FISH

V. V. Kuzmina

*I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Russia*  
*e-mail: vkuzmina@ibiw.ru*

The review briefly addresses the mechanisms underlying the micro- and macromolecular transport of proteins, fats and carbohydrates in the fish intestines. A special focus is on the specific features of some mechanisms of the micromolecular transport of peptides, amino acids and hexoses, as well as craniocaudal transport gradients, in fish compared to mammals. Transport proteins emerge at the earliest stages of fish ontogenesis, before the transition of fish larvae to exogenous feeding. The reasons behind the differences in the intestinal transport systems are analyzed.

**Key words:** fish, intestines, nutrient transport, mechanisms, features



## ОБЗОРЫ

*The heart is ... an organ that gives motion to circulatory fluid*  
(Randall, Davie, 1980)

*The word heart is used to denote chambered circulatory pumps, but is also applied to any segment of the circulation that pumps fluid*  
(Simões-Costa et al., 2005)

# ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИИ И ФИЗИОЛОГИИ СЕРДЦА БЕСЧЕЛЮСТНЫХ РЫБООБРАЗНЫХ И ЧЕЛЮСТНЫХ РЫБ

© 2021 г. Е. Э. Колесникова

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 29.10.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

Сердце бесчелюстных рыбообразных (*Cyclostomata*; миноги, миксины) и костистых рыб (*Teleostei*) гомологично сердцу высших позвоночных животных. Изучение сердца архаичных *Cyclostomata* и *Teleostei*, обладающих разным эволюционным “возрастом”, молекулярно-генетическими характеристиками и переносимостью гипоксии, представляет особый интерес при поиске факторов устойчивости миокарда к кислородной недостаточности. *Cyclostomata* и *Teleostei* объединяет жаберный тип дыхания и наличие только одного круга кровообращения. Главный сократительный орган, обеспечивающий циркуляцию крови – жаберное сердце – состоит из двух камер. Миксины составляют самый старый класс существующих позвоночных, кровообращение которых поддерживается за счет не имеющего иннервации (аневрального) жаберного сердца и трех наборов добавочных “сердец”. Миноги являются первыми позвоночными, у которых появляется иннервация сердца в виде блуждающего нерва. В свою очередь, *Teleostei* впервые получают симпатическую иннервацию сердца, которая осуществляется “вагосимпатическими стволами”. В сердце *Cyclostomata* и *Teleostei* не найдено признаков организации проводящей системы, подобной таковой у высших позвоночных, что не отменяет существования четко скоординированного механизма распространения возбуждения и сокращения миокарда. Механизм генерации сердечного ритма связывает возникающие и распространяющиеся в миокарде электрические процессы с экспрессией управляемых циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемых каналов (HCN-каналов). В сердце миксин и костистых рыб экспрессируется шесть изоформ HCN-каналов. Регулируемая плотность распределения HCN-каналов в миокарде может предшествовать проводящей системе сердца, характерной для высших позвоночных. Экспрессия HCN2, HCN3 и HCN4 в сердце миксин, как реликтового таксона, предполагает их присутствие в миокарде общего предка позвоночных до момента дивергенции с *Myxiniiformes*, что допускает особую значимость HCN2-HCN4 в формировании сердечной активности в момент возникновения камерного миогенного сердца. Предполагается, что эволюционный прогресс архаичных групп “первых” позвоночных направлен на “создание” более быстрой эффекторной системы регуляции сердечной деятельности и двойного (возбуждающего/тормозного) контроля функций миокарда.

**Ключевые слова:** цикlostомы, рыбы, сердце, гипоксия, проводящая система сердца, HCN-каналы

**DOI:** 10.31857/S0044452921020029

## ВВЕДЕНИЕ

Главный орган сердечно-сосудистой системы – сердце позвоночных животных – было и остается центром множества морфологических, функциональных и молекулярных исследований [1]. Известно, что сердце эндотермных животных (вклю-

чая человека) является аэробным органом, ухудшение поступления кислорода ( $O_2$ ) к которому приводит к серьезным нарушениям функций миокарда. Кислородная недостаточность/гипоксия является одной из основных причин и следствием развития сердечной патологии, что вызывает определенный интерес к поиску данных о механизмах,

обеспечивающих устойчивость миокарда к дефициту  $O_2$ .

В настоящее время с учетом впечатляющего вклада подобного рода исследований в медицинскую науку возрастает интерес к изучению биологии разнообразных видов костистых рыб (в частности, *Medaka Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Fundulus heteroclitus* и др.) [2]. Исходя из гомологичности сердца рыб сердцу человека [3], в эксперименте воссоздают различные формы патологии миокарда [4], что предоставляет новые механистические идеи [5] и идеальные сравнительные биологические модели для слабо изученных аспектов физиологии сердца [2]. Несмотря на принципиальные различия между костистыми рыбами и человеком, очевидным является существование высокого уровня генетической сохранности определенных базовых механизмов работы сердца, повторяющихся в разных таксономических группах позвоночных [2]. Физиологические механизмы и патологические состояния, которые присутствуют как у млекопитающих, так и у рыб, вероятно, имеют фундаментальное значение, что, в свою очередь, может быть экстраполировано на клинику и использовано в качестве патогенетически обусловленного лечения (терапии) [5].

При поиске маркеров устойчивости к кислородному голоданию практикуют филогенетический и онтогенетический подходы к изучению анатомии и физиологии в систематических группах позвоночных с разным происхождением, в частности, бесчелюстных позвоночных, как более древних, с относительно современными представителями — челюстноротыми (костистые рыбы, *Teleostei*).

Известно, что существующие ныне традиционные группы позвоночных — Бесчелюстные (надкласс *Agnatha*) и Челюстноротые (надкласс *Gnathostomata*) — разделились на самых ранних этапах эволюции хордовых около 535–462 млн. лет назад [6, 7]. Класс Круглоротые (*Cyclostomata*), который представлен миксинами (*Myxiniiformes*) и миногами (*Petromyzontiiformes*), является реликтовой группой ныне живущих бесчелюстных позвоночных (*Agnatha*) со многими примитивными чертами строения как следствия их древнего происхождения. В процессе эволюции *Cyclostomata* приобрели уникальную степень устойчивости к гипоксии/аноксии [8], изучение которой способно расширить границы современных представлений об эталоне сердечной деятельности с максимальным анаэробным потенциалом.

Вопрос филогенетического родства *Cyclostomata* (миног, миксин) и челюстноротых остается дискуссионным. На основе неонтологических и морфологических признаков была предложена классификация “парафилетических циклостом”, согласно которой миноги и челюстноротые позвоночные формируют отдельную от миксин систематиче-

скую группу; такого рода классификация сохраняется до настоящего времени наряду с гипотезой “монофилетических циклостом” как систематической группы, разделившейся с *Gnathostomata* раньше разделения самих *Agnatha* [6, 9]. Точный паттерн ветвления самих *Agnatha* не известен, однако допускают, что миксины и миноги представляют собой две разных группы бесчелюстных, которые разошлись в начале эволюции позвоночных более 400 миллионов лет назад. Хотя *Myxiniiformes* и *Petromyzontiiformes* относят к *Cyclostomata*, с точки зрения геологического времени эволюционное “расстояние” между миксинами и миногами, которое прошло с момента их расхождения, похоже на то “расстояние”, что пролегает между современными людьми и хрящевыми рыбами [6]. Исходя из приведенных доводов, миноги предоставляют возможность изучения общих с *Gnathostomata* признаков, выступая в качестве наиболее эволюционно архаичных позвоночных. С другой стороны, миног можно рассматривать в качестве “внешней” группы при изучении эволюционных инноваций *Gnathostomata* [7].

Таким образом, сравнительный анализ анатомии сердца и физиологических механизмов, обеспечивающих его работу, в группах позвоночных животных — *Agnatha* (класс *Cyclostomata*) и *Gnathostomata* (клада *Teleostei*), обладающих разным эволюционным “возрастом”, молекулярно-генетическими характеристиками (в том числе по признакам дупликации генома и экспрессии *Nox* и *ParaNox* генов, участвующих в морфогенезе, регуляции паттерна анатомического развития) [6, 7, 9] и, очевидно, степенью приспособления к условиям сниженного содержания  $O_2$ , характерного для водной среды обитания, представляет определенный интерес при поиске факторов устойчивости миокарда к острой кислородной недостаточности.

#### ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ БЕСЧЕЛЮСТНЫХ РЫБООБРАЗНЫХ И КОСТИСТЫХ РЫБ

Бесчелюстных рыбообразных и костистых рыб объединяет жаберный тип дыхания и наличие только одного круга кровообращения. Главный сократительный орган, обеспечивающий циркуляцию крови — жаберное (системное) сердце, — состоит из двух камер в виде тонкостенного предсердия и толстостенного мускулистого желудочка [3], которые всегда заполнены венозной кровью.

У миксин и миног сердце имеет S-образную форму, сопоставимую с зародышевым сердцем костистых рыб [10]. Предсердие и желудочек *Cyclostomata* поддерживают дорсокаудальное или латеральное пространственные отношения, которые контрастируют с дорсальной позицией предсердия, наблюдаемой у большинства рыб, и с краниальной позицией предсердия, характерной для

сердца высших позвоночных — птиц и млекопитающих [1]. Стенки предсердия и желудочка строятся из губчатого (трабекулярного, некомпактного, *spongiosa*) миокарда, в котором мышечные клетки не формируют компактного листа, а образуют клеточные шнуры, дающие многочисленные проекции в просвет камер сердца [3]. Трабекулы (мышечные тяжи) желудочка отчетливо крупнее и более плотно komponуются по сравнению с трабекулами стенки предсердия.

В сердце круглоротых и костистых рыб выделяют так называемые придаточные отделы в виде венозного синуса (*sinus venosus*, SV), артериальной луковицы (у *Teleostei*) или артериального конуса (у *Elasmobranchii*); последние образуют тракт оттока крови из сердца (*outflow tract*, OFT), переходящий в вентральную (брюшную) аорту. Термин “артериальная луковица” используют в том случае, когда стенка отдела OFT не содержит миоциты; при наличии мышечных элементов такое расширение между желудочком и вентральной аортой называют “артериальным конусом” [11]. Количество заключенных в полости перикарда компонентов, относящихся к структурам сердца (компарменты, компоненты, иногда называют камерами), составляет три у круглоротых, поскольку в сердце *Cyclostomata* компоненты OFT отсутствуют либо не идентифицируются, и четыре — у костистых рыб [1, 11]. Все компоненты сердца, кроме аортальной луковицы, обычно сократимы и разделены клапанами, которые также обнаруживаются между желудочком и луковицей аорты [2].

Будучи центральным органом кровеносной системы, жаберное (системное) сердце собирает венозную кровь из всех регионов тела и продвигает ее по вентральной аорте вперед к жаберному аппарату [1, 3] в приносящие (афферентные) жаберные сосуды. В органах жаберного аппарата — жабрах и жаберных мешках — кровь обогащается  $O_2$ . Артериальная кровь через выносящие (эфферентные) жаберные сосуды поступает в дорсальную (спинную) аорту, откуда разносится ко всем органам. От спинной аорты вперед отходят две сонные артерии, снабжающие кровью голову, главный же ток крови осуществляется в каудальном направлении по дорсальной (спинной) аорте. Венозная кровь из задней части тела собирается в каудальную (хвостовую) вену, которая затем разделяется на две задние кардинальные вены. Парные передние кардинальные или верхние яремные вены несут кровь от верхней части головы. Венозная кровь от органов и тканей оттекает по передним и задним кардинальным венам, которые впадают непосредственно в SV у круглоротых, а у костистых рыб кровь в SV собирается через парные Кювьеровы протоки. Отличительными особенностями схемы кровеносной системы круглоротых является наличие еще одной магистральной вены (нижней яремной), выносящей кровь из вентральной части головы, и отсут-

ствие Кювьеровых протоков. Кроме того, сердечно-сосудистая система миксин предусматривает наличие дополнительных органов, обеспечивающих кровоток.

Как упоминалось выше, сердце *Cyclostomata* и рыб считают гомологичным сердцу высших позвоночных животных [3].

## ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИИ И ФИЗИОЛОГИИ СЕРДЦА МИКСИН

### Жаберное (системное) сердце миксин

Находящиеся в основании эволюционной лестницы миксины (*Myxiniiformes*) составляют самую старую группу существующих позвоночных и обладают необыкновенно высокой толерантностью к аноксии и еще более высокой устойчивостью к  $CO_2$  [12]. Кровообращение миксин поддерживается за счет основного жаберного (системного) сердца и трех наборов так называемых добавочных “сердец” [11].

Жаберное (системное) сердце миксин включает в себя SV, предсердие и желудочек, которые разделены клапанами. SV является результатом слияния задней кардинальной и внутренней яремной вен, впадает в предсердие, открываясь с его левой стороны [13]. Данная часть сердца состоит из двух — переднего и заднего — округлых отсеков, которые разделены небольшой выемкой по левому боковому контуру [14]. Стенка SV состоит из соединительной ткани и очень тонкого слоя кардиомиоцитов толщиной менее 100  $\mu m$  [13]. Предполагают, что SV миксин аналогичен, но не гомологичен SV высших позвоночных. Наличие двух больших “рабочих” камер — предсердия и желудочка — позволяет считать жаберное (системное) сердце миксин типичным сердцем черепных (*Craniata*). Две сердечные камеры соединяются удлиненным атриовентрикулярным сегментом (AV-сегментом) и разделяются двустворчатым клапаном [1]. SV, предсердие и желудочек располагаются в перикардиальной полости, которая сообщается с брюшной полостью.

Жаберное (системное) сердце миксин выделяется своим относительно большим размером. Так, у атлантической миксины (*Myxine glutinosa*) сердечный индекс составляет порядка 0.18% [15] при относительной массе желудочка около 0.1% [16]. Масса предсердия может составлять около одной трети массы желудочка [17].

У миксин OFT отсутствует, отток крови из сердца осуществляется через расширение брюшной аорты [8, 18], не составляющей морфологически оформленной структуры [11, 19]. Отсутствие компонентов OFT является характерной чертой сердца *Cyclostomata* [11, 18]. Тем не менее в проксимальной части вентральной аорты было выделено незначительное утолщение, которое, вероятно, можно идентифицировать как артериальную луковицу [2].

У тихоокеанской миксины (*Eptatretus stoutii*) такое утолщение оснащено двухстворчатым клапаном [2, 20]. В то же время у *Eptatretus cirrhatus* место соединения желудочка с брюшной аортой ограничено парой полулунных клапанов [11, 18]. Карманоподобные листочки клапанов простираются от краиниального конца желудочка до аорты, где соединяются асимметрично и включают в себя ганглиоподобную структуру. Примечательная относительная жесткость проксимальной части вентральной аорты миксин определяет падение диастолического кровотока в самом сосуде до нуля [19].

Кардиомиоциты миксин имеют малый объем, что связывают с функциональной неспособностью сердца создавать высокое кровяное давление. Клетки миокарда наделены обширным саркоплазматическим ретикулумом (SR) и содержат в саркоплазме гранулы гликогена и атрионауретического пептида (*atrial natriuretic peptide*, ANP, предсердный натрийуретический фактор, предсердный натрийуретический гормон, атриопептин). Межклеточные контакты миоцитов обеспечиваются десмосомами [11, 22].

По разным данным частота сердечных сокращений (ЧСС) миксин составляет от  $10.4 \pm 1.3$  ударов/мин (у тихоокеанской миксины, *Eptatretus stoutii*) [21] до 20–30 ударов/мин (у атлантической миксины, *Myxine glutinosa*) [14]. Сердце миксин генерирует самое низкое кровяное давление (порядка 8–15 мм рт.ст. [23] среди позвоночных животных, что обеспечивает нормальное функционирование жаберных мешочков [24]. Низкая выходная мощность жаберного (системного) сердца миксин также может определяться большой длительностью потенциалов действия миоцитов, медленной скоростью проведения возбуждения, длительностью каждого из компонентов ЭКГ на фоне относительно редких сокращений миокарда [16]. При сокращении сердца миксин ни SV, ни предсердие не опорожняются полностью; остаточные объемы крови составляют чуть менее половины их диастолического содержимого. Сокращение желудочка также сопровождается довольно значительным, но все же не полным его опорожнением [14]. Вместе с тем сердечный выброс (*cardiac output*) миксин сопоставим с сердечным выбросом многих таксономических групп бесчелюстных рыбообразных и рыб [17, 24] и обычно составляет  $9\text{--}16 \text{ мл/мин}^{-1}/\text{кг}^{-1}$ , что соизмеримо с аналогичным показателем бентосных костистых рыб при сходной температуре [17]. Сердечный выброс обладает чрезвычайной чувствительностью к объему венозного возврата (преднагрузка) и давлению в вентральной аорте (постнагрузка). Кроме того, для миокарда миксин характерно низкое энергопотребление, которое позволяет поддерживать адекватный сердечный выброс даже во время острой гипоксии [17]. Несмотря на высокую активность гликолитических ферментов по сравнению с фер-

ментами аэробного метаболизма именно низкий уровень потребления энергии миокардом миксин определяет его высокую степень переносимости гипоксии [17, 24]. Известно, что миксины обитают в соседствующих с донными отложениями слоях воды, обедненных  $\text{O}_2$  [21], оставаясь активными даже при  $\text{PO}_2$  ниже 3 кПа. Хотя кровь миксин обладает низкой способностью к переносу  $\text{O}_2$ , метаболически активные ткани способны эффективно его экстрагировать даже при их относительно медленной перфузии [11]. Показано, что ЧСС тихоокеанской миксины (*E. stoutii*) после 1-часовой экспозиции в аноксической среде снижается с  $10.4 \pm 1.3$  до  $8.1 \pm 0.8$  ударов/мин [21]. По-видимому, *E. stoutii* может считаться самым толерантным к гипоксии позвоночным животным, поскольку в условиях длительной дефицита  $\text{O}_2$  сохраняет порядка 70% эффективности работы сердца, характерной для нормоксии [21, 25]. В пост-аноксический период ЧСС *E. stoutii* увеличивается до 17.5 ударов/минуту, что на фоне нарастающего сердечного выброса почти вдвое превышает исходные показатели. Таким образом, в течение короткого периода при переключении сердца миксины с анаэробного [8, 26] на аэробный путь метаболизма, ЧСС увеличивается практически в четыре раза (с 4 до 17 ударов/мин, пост-аноксическая тахикардия) [21].

#### Дополнительные “сердца” миксин

Показано, что объем крови миксин составляет примерно 180 мл/кг (около 18% массы тела) [17], что 5-кратно превышает показатели костистых рыб; объем крови миксин считается самым большим среди циклостом и рыб. Помимо кровеносных сосудов кровь распределяется по трем обширным подкожным пазухам (синусам) [24, 27] — самому большому каудальному (хвостовому), окружающим жаберные мешки — околожаберным и заднеглоточному.

В системе подкожных синусов миксин заключено порядка 30% общего объема крови; через синусы кровь циркулирует с гораздо меньшей скоростью, чем “центральный” объем крови в кровеносных сосудах [24], что составляет так называемый феномен экстравазации или циркуляции в лакунарных пространствах (кровяных синусах) с прямым сообщением с настоящими кровеносными сосудами [14]. Предполагают, что подкожные синусы миксин, привносящие элемент неполной замкнутости в систему кровообращения (“полузамкнутая система” [14]), являются предшественниками менее емкостной второй системы кровообращения [27], которая осуществляет сообщение между артериями и венами [14]. Содержащаяся в синусах кровь возвращается в центральное русло при сокращении специальных дополнительных органов — трех “наборов” [17] из пяти вспомо-

гательных “сердец” [2]. Дополнительные “сердца”, которые осуществляют свою функцию с помощью скелетных мышц, называют термином “пропульсоры” (*propulsors*) [27]. В отношении таких дополнительных “сердец” миксин, приводимых в действие за счет сокращения скелетных мышц при движении животного, также используют термин “нейрогенное сердце” vs. “миогенное” жаберное (системное) сердце, обладающее способностью к сокращению (автоматизм сердца) за счет собственных, встроенных в него механизмов [8]. Основная функция дополнительных “сердец” состоит в облегчении венозного возврата в системе кровообращения с низким давлением.

Первое из дополнительных “сердец” — каудальное (хвостовое) — образовано парными мешочками, которые располагаются по обе стороны хорды [3]. Эти парные мешочки собирают кровь из подкожного синуса в области хвоста и перекачивают ее в эфферентные сосуды, которые формируют срединную хвостовую вену. “Вход” и “выход” из мешочков ограничиваются клапанами. Известно, что мешочки каудального “сердца” не сокращаются сами по себе, а наполняются и опустошаются за счет слаженного действия двух соматических мышц (*musculus cordis caudalis*). Сократительные элементы упомянутых соматических мышц находятся под рефлекторным контролем, который исчезает при разрушении спинного мозга. Каудальное “сердце” перекачивает кровь в задние кардинальные вены. После того, как животное перестает двигаться, частота сокращений каудального “сердца” становится заметно меньше [27].

Второе дополнительное “сердце” миксин образовано расширением портальной вены печени; его называют портальным “сердцем”, “сердцем” воротной вены [3]. Оснащенное собственными мышечными волокнами портальное “сердце” собирает кровь из надкишечной воротной вены и правой передней кардинальной вены, перекачивая ее в печень через общую портальную вену [17]. Наличие вспомогательного портального “сердца” также связывают с формированием низкого кровяного давления миксин [3]. Отмечено, что ЭКГ портального “сердца” очень схожа с электрической активностью предсердия жаберного (системного) сердца, однако признаков синхронизации работы этих двух структур не найдено [28].

Кроме того, сходные с описанными выше “сердцами” дополнительные образования были обнаружены в парной передней кардинальной вене миксин, которые получили название кардинального “сердца” [14]. Кардинальное “сердце” перекачивает кровь из околожаберных и задненебного синусов в нижнюю яремную вену.

Дополнительные “сердца” обеспечивают ток венозной крови [14, 23]. В свою очередь в продвижении фракций артериальной крови миксин опре-

деленную роль играет работа жаберного аппарата, поскольку стенки жаберных мешочков содержат крупные поперечно-полосатые мышечные волокна [14]. После каждого сокращения таких мышечных волокон кровь, находящаяся в сосудах жабр, изгоняется в дорсальную аорту. Сокращение мышц тела в области жабр также может способствовать опорожнению околожаберных синусов.

Таким образом, очевидно, что система кровообращения миксин характеризуется децентрализацией сил, продвигающих кровь от сердца к жабрам и жаберным мышцам, а также обеспечивающих циркуляцию в венозной части кровотока с помощью вспомогательных “сердец” [14, 23].

*Жаберное (системное) сердце миксин и “кальцевый парадокс”.* Отличительной особенностью кардиомиоцитов желудочка сердца миксин считают их нечувствительность к изменениям внеклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [29, 30], что при ишемии/реперфузии миокарда высших позвоночных животных вызывает так называемый “кальцевый парадокс” (перегрузку кардиомиоцитов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  на этапе реперфузии, возникающую в результате усиления входа  $\text{Ca}^{2+}$  после периода снижения его внеклеточной концентрации и тесно связанную с нарушением  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обмена). В частности, проявление  $\text{Ca}^{2+}$ -парадокса наглядно было продемонстрировано на изолированных полосках миокарда человека, полученных при операции на открытом сердце [31]. Известно, что перегрузка кардиомиоцитов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  ведет к замедлению процесса расслабления сердца (реперфузионная контрактура), сопровождающемуся уменьшением диастолического объема сердца и снижением сердечного выброса. Патогенез подобной сократительной дисфункции связан не только с замедлением релаксации кардиомиоцитов, но и с развитием энергодифицита, который вызван тем, что большая часть энергии, образующейся в митохондриях, расходуется на аккумуляцию  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных депо.

Показано, что ишемия/реперфузия изолированного сердца миксин не сопровождается развитием “кальцевого парадокса”; данный факт свидетельствует о функциональной адаптации механизмов, которые обеспечивают секвестрацию  $\text{Ca}^{2+}$  и производство энергии [29]. Миксины отличаются от большинства позвоночных практически “закрытыми” от внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  клетками миокарда [30], по-видимому, за счет особенностей  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, которые практически не “отвечают” на действие активаторов каналов [29]. Источниками  $\text{Ca}^{2+}$  для сокращения миоцитов служат внутриклеточные свободные и связанные в органеллах ионы. Внеклеточный пул  $\text{Ca}^{2+}$  “связывает” необычайно толстый гликокаликс в непосредственной близости к сарколемме (SL) кардиомиоцитов [17,

30], что является важным компонентом защиты от поступления внеклеточных ионов в клетки, в частности, при внеклеточном ацидозе [30]. Данные результаты указывают на некоторые уникальные качества SL кардиомиоцитов миксин, обладающей экстраординарной буферной емкостью для  $\text{Ca}^{2+}$  при сопутствующей ограниченной проницаемости для данного катиона. Отсутствие “кальциевого парадокса” в сердце миксин может отражать некоторые критические свойства клеточной мембраны миоцитов, которые, без сомнения, существенно различаются между высшими и низшими позвоночными [30].

*Хромаффинные клетки сердца миксин.* В настоящее время очень мало известно о механизмах управления сердцем миксин. У высших позвоночных животных контроль сердечного ритма включает симпатический (стимулирующий  $\beta$ -адренергический) и парасимпатический (ингибирующий холинергический) механизмы. Гормональный контроль работы миокарда опосредуется катехоламинами (КА: норадреналин, адреналин), высвобождаемыми либо из ткани надпочечников, либо из других хромаффинных тканей. Миксины считаются уникальными представителями позвоночных животных, у которых сердце полностью лишено соответствующей иннервации (“*aneural heart*”, *аневральное сердце*) [18, 25]. Показано, что аневральное сердце миксин реагирует на введение КА и обладает своим собственным запасом КА [8, 18, 22, 25].

При изучении сердец трех видов миксин *Muxine glutinosa*, *E. stoutii* и *E. cirrhatus* в миокарде и адвентиции брюшной аорты была выявлена популяция КА-содержащих хромаффинных клеток [18], которые оказались гомологичны клеткам мозгового вещества надпочечников млекопитающих [32]. Вместе с тем при сравнении с млекопитающими (кролики и собаки) концентрация КА в сердце миксин оказалась в 50 раз выше [33]; причем доля адреналина могла достигать 99%. Уровень адреналина является преобладающим в желудочке, в то время как концентрация норадреналина достигает максимума в предсердии, портальном “сердце” миксин [11, 16, 34] и во втором по значимости “депо” КА — задней кардинальной вене [34]. Благодаря большей массе тканей сердца и более высокой концентрации адреналина в миокарде накоплено примерно в три раза больше КА, чем в задней кардинальной вене [35]. Очевидно, что сердце миксин действует как КА-высвобождающая железа, оказывающая паракринное действие на клетки миокарда. В частности, было показано, что КА в больших количествах высвобождаются при острой гипоксии [34], причем гипоксемия определяет значительное увеличение уровня норадреналина в плазме при отсутствии изменений содержания адреналина [35].

Соотношение секреции норадреналина и адреналина позволяет предположить, что у миксин, подобно другим позвоночным, эти медиаторы хранятся в разных типах хромаффинных клеток [34].

Как известно, у большинства позвоночных животных контроль высвобождения КА осуществляется преганглионарными симпатическими волокнами [34, 36]. Миксины являются исключением из этого общего правила, поскольку их основная КА-содержащая ткань — хромаффинные клетки жаберного (системного) сердца — не иннервируется [22]. Кроме того, инъекции ацетилхолина и М-холинблокатора атропина не оказывают заметного влияния на ЧСС миксин, что свидетельствует об отсутствии аппарата холинорецепторов в тканях сердца [37]. Очевидно, что регуляция секреции КА у этих примитивных позвоночных воплощается исключительно посредством нехолинергических механизмов [34].

В отсутствие внешней иннервации высвобождаемые хромаффинными клетками КА могут контролировать сократительную активность кардиомиоцитов и гладкомышечных клеток аорты [17, 18] путем связывания с их  $\beta$ -адренорецепторами [16]. Предполагается, что “рутинная” ЧСС (ЧСС покоя) у миксин устанавливается посредством аутокринного адренергического тонического воздействия, реализующегося в основных клетках-пейсмейкерах водителя сердечного ритма, которые у высших животных располагаются в синоатриальном (SA) узле (не идентифицированы у миксин) и задают частоту сокращений [11]. В пользу такого предположения свидетельствуют ингибирование сократительной активности миокарда и развитие брадикардии у *E. stoutii* и у *M. glutinosa* при истощении запасов КА в сердце миксин в ответ на введение резерпина [20, 32].

#### *К вопросу иннервации сердца миксин*

Как упоминалось выше, миксин считают уникальными представителями позвоночных животных, у которых сердце полностью лишено иннервации (так называемое “аневральное сердце”) [18, 25].

Вместе с тем при окрашивании тканей калифорнийской миксины (*E. stoutii*) в непосредственной близости к жаберному (системному) сердцу был обнаружен крупный нервный ствол, содержащий крупные и мелкие миелинизированные волокна, а также располагающиеся в миокарде желудочка клетки, которые были идентифицированы как ганглионарные [33]. Ганглионарные клетки выстраивались в цепочки по краю трабекул вблизи основных просветов желудочка и предсердия. Кроме того, внутри петель рыхлых сетей волокон миокарда распределялись одиночные, соединяющиеся длинными отростками аналогичные клетки. Оче-

видно, в пределах сердца миксин ганглионарные клетки составляли единую, непрерывную систему. Связанные с ганглионарными клетками нервные волокна оказались сопоставимы с волокнами, которые находят в тканях эпикарда у основания сердца и в межпредсердной перегородке высших позвоночных животных (включая человека). Считают, что упомянутые нервные волокна могли относиться к волокнам блуждающего нерва (*n. vagus*) [33], в частности, его кишечной ветви, также проходящей вблизи портального “сердца” [3].

Другая система крупных ганглионарных клеток была связана с зернистыми аргирофильными волокнами и распределялась по внешнему краю аорты и в тканях желудочка вдоль края эндокарда [33]. Ганглионарные клетки также присутствовали в фиброзном эпикарде. Весь миокард был пронизан сетью грубых и тонких аргирофильных волокон и веточками фибрилл, сходной со сплетением; данные волокна имели определенное сходство с волокнами, отмечаемыми в сердце костистых рыб и амфибий.

Приведенные анатомические детали противостоят утверждению, что сердце миксин аневрально, т.е. не имеет иннервации [33]. Вместе с тем в отношении жаберного (системного) сердца миксин продолжают использовать термин “функционально аневральное” (*functionally aneural*) [38].

Интересно, что сердце эмбрионов млекопитающих проходит через аневральную стадию развития; в частности, у эмбрионов крысы сердце начинает сокращаться на 9-й день, однако волокна блуждающего нерва устанавливают контроль над миокардом только начиная после 21-го дня развития [39]. Кроме того, после хирургической трансплантации сердце человека также является аневральным. Тем не менее у миксин отсутствует выраженная иннервация не препятствует эффективной модуляции сердечного ритма.

#### Проводящая система сердца миксин

Скоординированное ритмическое сокращение является фундаментальным принципом работы сердца [10]. У высших позвоночных животных клетки, задающие сердечный ритм (*pacemaker cells*, пейсмейкерные клетки, клетки водителя сердечного ритма), представляют собой узкоспециализированные клетки миокарда, чья способность ритмически деполяризоваться и инициировать возникновение потенциала действия (ПД) отвечает за воспроизведение базовой ЧСС. Пейсмейкерные клетки напрямую связаны друг с другом, а также с соседними рабочими клетками миокарда с помощью щелевых контактов, построенных коннексинами (семейства трансмембранных белков, участвующих в формировании щелевых контактов — Сх) с различными проводящими свойствами. Основ-

ными коннексинами, экспрессируемыми в рабочем миокарде, являются быстропроводящие Сх43 и Сх40. Напротив, пейсмейкерные клетки экспрессируют медленно проводящие коннексины, Сх45 и Сх32 [10]. Подобное распределение коннексинов обеспечивает однонаправленное распространение электрического сигнала от пейсмейкерных клеток к “рабочим” клеткам миокарда. Способность генерировать ПД без внешней стимуляции отличает пейсмейкерные клетки от окружающих их “рабочих” кардиомиоцитов. Их диастолический мембранный потенциал не стабилен, постепенно деполяризуется до порога, с которого запускается новый ПД. Кроме того, пейсмейкерные клетки также имеют еще одну важную особенность — они не имеют независимого от времени фонового калиевого тока (фоновый калиевый ток входящего выпрямления,  $IK^+$ ), который присутствует в желудочковых клетках. Такая особенность сообщает пейсмейкерной клетке высокий входной импеданс, что свидетельствует о значительном влиянии малых токов на фоновую электрическую активность. Одним из наиболее важных малых токов является активируемый гиперполяризацией входящий ток ( $I_f$ ), который является своего рода мишенью при адренергической и холинергической модуляции сердечного ритма. Структура доминирующего водителя ритма (*dominant pacemaker*) позвоночных и некоторых беспозвоночных животных обычно располагается между синусом и предсердием (синоатриальный узел, SA-узел) [10, 40].

Несмотря на значение миксин для воспроизведения целостной эволюционной картины, информация о сердечном ритмогенерирующем механизме миксин крайне ограничена [11, 41].

В ЭКГ миксин выделяют отчетливую волну активации мышечных волокон SV с последующей задержкой перед активацией предсердия (Р-зубец) [40]. SA-узел не был идентифицирован ни у одного из видов миксин; вместе с тем анализ ЭКГ *E. cirrhatus* наводит на предположение о его наличии, поскольку присутствующая на ЭКГ V-волна соответствует сокращению SV, предшествующему связанному с сокращением миокарда предсердия Р-зубцу [25, 28]. Одновременно у нескольких видов миксин во всех компартментах сердца регистрировались характерные для пейсмейкерных структур ПД и медленная спонтанная диастолическая деполяризация кардиомиоцитов [42]. Несмотря на тот факт, что миксины обладают ЭКГ, сопоставимой с высшими позвоночными животными, электрическая проводимость в пределах сердца миксин характеризуется меньшей скоростью, что, по-видимому, является свидетельством отсутствия скоординированной проводящей системы сердца и плохого межклеточного сопряжения внутри такой потенциальной системы [43].

Механизм генерации сердечного ритма высших позвоночных описывают две взаимодополняющие гипотезы [10], которые связывают возникающие и распространяющиеся в миокарде электрические процессы с экспрессией управляемых циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемых каналов HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-activated channels*, HCN; неселективные лиганд-зависимые катионные каналы). HCN-каналы принадлежат к суперсемейству потенциал-зависимых калиевых каналов ( $K_v$ ) и каналов, управляемых циклическими нуклеотидами, которые являются специфическими для пейсмейкерных клеток. Известно, что HCN-каналы активируются при гиперполяризации мембраны, в то время как обычно ионные каналы активируются при деполяризации. Функцией данных каналов является обеспечение ионных  $Na^+/K^+$  токов (*"a funny current"*,  $I_f$ ); результирующий ток через HCN-каналы имеет входящее направление и натриевую природу, в то время как ионы  $K^+$  при таких значениях потенциала будут выходить из клетки. Кроме того, HCN-каналы также связывают с осцилляциями высвобождения ионов  $Ca^{2+}$  из SR ( $Ca^{2+}$ -часы,  $Ca^{2+}$ -clock). Предполагают [25, 44], что существенная роль в инициации сердцебиений отводится именно HCN-каналам (мембранные часы). За свою высокую специфичность и участие в генерации ритмической активности миокарда HCN-каналы иногда называют "каналами-водителями ритма". Различное соотношение экспрессии HCN-каналов vs. тетродоксин-чувствительных потенциал-управляемых  $Na^+$  каналов (*voltage-gated  $Na^+$  channels* ( $Na_v$ ), вероятно *TTX-sensitive inactivation-resistant  $Na^+$  channels*,  $Na_{TTX}$ ), существенная роль ионных токов, создаваемых  $Na_{TTX}$ -каналами ( $IN_{TTX}$ ) в распространении волны возбуждения от предсердия к желудочку являются гипотетическими механизмами контроля последовательного распространения возбуждения, присутствующими во всех камерах сердца миксин [25].

В сердце миксин были идентифицированы шесть изоформ гена HCN — HCN2a, HCN2b, HCN3a, HCN3b, HCN3c и HCN4, что отличает миксин от млекопитающих, экспрессирующих только четыре изоформы HCN (HCN1–HCN4) [25]. В отличие от преобладающего в сердце млекопитающих гена HCN4 [45], HCN3a является основной изоформой, экспрессируемой в предсердии и желудочке миксин [44]. Кроме того, оказалось, что у миксин ген HCN3b существует в виде двух паралогов (копий генов) — HCN3bi и HCN3bii [44]. Филогенетический анализ показал, что HCN3b и HCN3c являются генами "прародителя" (*ancestor*), за которыми появились формы HCN3a, HCN4 и HCN2.

По-видимому, для обеспечения синхронизации сокращения миокарда миксин необходим более

высокий уровень экспрессии мРНК HCN-каналов в предсердии для всех изоформ (кроме сходной экспрессии для HCN3b), что позволяет укоротить время развития ПД клеток-пейсмейкеров предсердия по сравнению с желудочком [44]. Для сравнения у млекопитающих экспрессия гена HCN на единицу массы в предсердии и особенно в SA-узле намного выше, чем в желудочках [45, 46]. Таким образом, более высокая экспрессия HCN-каналов в предсердии обеспечивает большую плотность входящих токов ( $I_f$ ) и более быструю деполяризацию до порогового потенциала между ПД, которые обеспечивают его сокращение, предшествующее сокращению желудочка. У миксин экспрессия 4 из 5 изоформ была примерно в два раза выше в предсердии vs. желудочек [44]. Предполагается, что возбуждение и, следовательно, синхронность сокращения камер сердца миксин контролируется в основном плотностью распределения канала HCN3a, а не вариабельностью экспрессии специфических изоформ HCN-каналов. По-видимому, регулируемая плотность распределения каналов HCN по всему миокарду может быть предшественником проводящей системы сердца, характерной для сердца высших позвоночных [25]. Наличие HCN2, HCN3 и HCN4 в сердце миксин предполагает их присутствие до дивергенции *Myxiniiformes* и позвоночных и особую значимость в формировании сердечной активности в момент возникновения камерного миогенного сердца.

Известно, что сердце миксин находится под тоническим паракринным  $\beta$ -адренергическим воздействием, источником которого являются запасы КА в миокарде [47]. Механизмы гормонального контроля миокарда КА-ми реализуются путем их взаимодействия с HCN-каналами при прямом участии цАМФ, вызывающей конформационные изменения белков канала, что позволяет осуществлять тоническую регуляцию формирования ЧСС. Синтез цАМФ осуществляется с помощью (трансмембранной и растворимой) аденилатциклазы из АТФ. цАМФ может воздействовать на проводимость HCN-каналов и влиять на ЧСС путем прямого связывания с HCN-каналами, а также выступать модулятором циклических изменений внутриклеточной  $[Ca^{2+}]$ , запуская механизм  $Ca^{2+}$ -часов. При присоединении цАМФ к HCN-каналам происходит их открытие, сопровождающееся увеличением ЧСС. При нормоксии КА не оказывают выраженного действия на ЧСС миксин [25, 37]. При снижении  $PO_2$  стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов инактивирует трансмембранную форму аденилатциклазы (tmAC), обеспечивающую синтез цАМФ; в упомянутых условиях открытие HCN-каналов минимально.

Аноксия сопровождается утратой тонического КА-ергического контроля сокращений миокарда, связанного с аппаратом  $\beta$ -адренорецепторов, что



приводит к практически 2-кратному уменьшению ЧСС миксин. В пост-аноксический период при восстановлении сердечной функции для стимуляции сердечного ритма задействуется другой механизм “подачи” цАМФ, который связан с растворимой формой аденилатциклазы (sAC) [25]. sAC отличается от tmAC тем, что активируется бикарбонат-ионами ( $\text{HCO}_3^-$ ), а не КА. При аноксии концентрация  $\text{HCO}_3^-$  в плазме и внутри клеток обусловлена отсутствием продукции  $\text{CO}_2$  вследствие перехода энергетического метаболизма к анаэробному гликолизу и развитию метаболического ацидоза [26]. При восстановлении организма после аноксии потребление  $\text{O}_2$  быстро увеличивается [26], что способствует активной выработке  $\text{CO}_2$  и повышению содержания  $\text{HCO}_3^-$ . Исходя из предположения, что sAC действует как метаболический датчик изменений концентрации  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , сердце миксин может достаточно быстро регулировать свою ЧСС при отсутствии иннервации сердца [25].

После возврата к нормоксии ЧСС миксин может увеличиваться в четыре раза по сравнению с аноксией и существенно превышать исходные, нормоксические показатели [26] благодаря комбинации продукции цАМФ с помощью sAC и восстановленной продукции цАМФ посредством tmAC [25]. Как следствие, в течение 1.5 ч после аноксии ЧСС может практически удвоиться по сравнению с обычной ЧСС и увеличиться в четыре раза по сравнению с ЧСС при аноксии без какого-либо контроля со стороны нервной системы.

Таким образом, независимо от каких-либо дискуссий о филогенетическом положении, с точки зрения анатомии и физиологии сердца, миксины, по-видимому, являются более примитивными животными, чем миноги [2, 11, 19].

## ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИИ И ФИЗИОЛОГИИ СЕРДЦА МИНОГ

### Особенности строения сердца миног

Миноги (*Petromyzontidae*) являются обладателями рудиментарных позвонков, что оставляет открытым вопрос об их принадлежности к настоящим позвоночным животным. Тем не менее особенности строения двухкамерного петлевого сердца позволяют разместить миног на эволюционной лестнице рядом с известными классами рыб (Хрящевыми и Костистыми) [48].

У миног описаны “централизация” кровотока и отсутствие вспомогательных “сердец” [3, 19]. Располагающееся позади последней пары жаберных мешков жаберное (системное) сердце миног необычайно велико по меркам позвоночных животных [11, 49]. По разным сообщениям сердечный

индекс миног составляет от 0.59% [49] до 0.25–0.41% при относительной массе желудочка около 0.07% у *Lampetra planeri* [11]. Относительные размеры сердца речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) в 3 раза превышают таковые костистых рыб (0.3 и 0.1% соответственно) [50]. Большую массу сердца миног связывают с большим размером его миоцитов.

Размеры кардиомиоцитов желудочка миноги составляют 65–75% размера миоцитов млекопитающих и примерно на порядок больше, чем кардиомиоциты костистых рыб. Аналогично сердцу миксин кардиомиоциты миног содержат четко ориентированные миофибриллы, разветвленный SR и соединяются десмосомами [32]. Вместе с тем, чертой, объединяющей кардиомиоциты миноги и костистых рыб, является расположение миофибрилл на периферии клеток [50].

Как упоминалось выше, сердце миног состоит из тонкостенного предсердия, лежащего в левой части околосердечной сумки, и более плотного толстостенного желудочка; обширный мешковидный SV и камеры сердца полностью окружены хрящевой капсулой перикарда [22], что может использоваться для создания отрицательного и положительного давления “прокачивания”. У миног предсердие и желудочек сохраняют боковое пространственное отношение [1]; положение SV относительно предсердия сходно с тем, которое наблюдается у миксин. Стенки желудочка построены губчатым миокардом без коронарного кровоснабжения. Отток крови из желудочка контролируется двумя полулунными клапанами [2, 11]. Вне пределов перикарда OFT имеет вид расширения, переходящего в брюшную аорту. Стенка брюшной аорты построена гладкомышечными клетками с большим количеством коллагеновых волокон и заметно толще, чем у миксин, что, по-видимому, сопряжено с более высоким давлением в кровеносной системе миног [49, 51].

Уникальной особенностью миног являются располагающиеся вблизи сердца внутриартериальные “подушки”, которые представляет собой сильно ограничивающие просвет брюшной аорты образования из рыхлой соединительной ткани [1, 3, 51]. Функция этих соединительнотканых “подушек” не известна; предполагают, что они могут способствовать созданию турбулентного тока крови для ограничения оседания эритроцитов либо участвовать в регуляции просвета сосуда (вазоконстрикция) [51]. Наличие двух “подушек” в качестве сфинктеров над артериальными клапанами остается отличительной чертой кровеносной системы миног [1].

ЧСС у миног значительно выше, чем у миксин [11, 22] и составляет 33–50 ударов/мин у *Lampetra fluviatilis* [52] и 23–37 ударов/мин у *Geotria australis* [53].

Среднее давление в брюшной аорте у *Entosphenus tridentatus* составляет от 2.5 до 4.4 кПа (от 18.75 до 30 мм рт.ст.), пульсовое давление (разница между систолическим и диастолическим давлением) обычно колеблется в пределах менее 1.2 кПа (9 мм рт.ст.) [54]. Приведенный факт означает, что сердце миноги может генерировать артериальное давление в два-четыре раза выше, чем сердце миксин, с учетом большей (в 2–6 раз) сердечной массы. Вместе с тем удельная выходная мощность миокарда миног существенно ниже, чем у костистых рыб [11].

Миноги обладают полностью замкнутой системой кровообращения. Объем крови миног велик по стандартам позвоночных животных и составляет порядка 8% массы тела [46]; вместе с тем он примерно вдвое меньше, чем у миксин.

#### *Хромаффинные клетки сердца миног*

Сердце миног также содержит хромаффинные клетки в стенках предсердия и желудочка [55]. Хромаффинные клетки распределяются между клетками миокарда таким образом, что они не “открываются” ни в полость перикарда, ни в полость сердца; кроме того, их находят в эндокарде и в перикарде. По-видимому, разрозненные хромаффинные клетки образуют “внутреннюю” систему контроля циркуляторной функции [56]. В ответ на приносимые с током крови стимулы скопления “адреналиновых” хромаффинных клеток сердца высвобождают вырабатываемый ими адреналин; в свою очередь, адреналин стимулирует высвобождение норадреналина. Главной мишенью норадреналина является миокард, также, возможно, норадреналин способствует высвобождению дофамина. Предполагают [57], что за счет скоплений хромаффинных клеток жаберное (системное) сердце миног может также осуществлять эндокринную функцию. Соотношение содержания адреналина к норадреналину варьируется в тканях сердца: адреналин преобладает в желудочке и предсердии, норадреналин доминирует в SV [11]. За счет КА-содержащих гранул хромаффинные клетки, располагающиеся подобно цепи ганглионарных клеток по всем трем отделам сердца и, в меньшей степени в яремной вене, составляют некое подобие адренергических нервных волокон [22].

Поскольку характер распределения и форма отдельных хромаффинных клеток сердца миног аналогичны ганглионарным клеткам, предполагают [22], что они могут быть идентичны ганглионарным клеткам малого типа, которые также демонстрируют специфическое окрашивание солями хрома. Упомянутый пул хромаффинных клеток располагается преимущественно вдоль внутренней поверхности полостей сердца. Если такое предположение справедливо, то в отличие от миксин

сердце *Petromyzonidae* обладает нервными элементами в виде ганглионарных клеток [22].

#### *Ганглионарные клетки в сердце миног*

В сердце миног встречаются два типа ганглионарных клеток — крупные и малые. Средний размер клеток крупного типа обычно составляет 13–14 мкм, в то время как клетки малого типа достигают размера около 5–7 (иногда до 9) мкм [22].

В предсердии и желудочке ганглионарные клетки группируются и образуют цепи вдоль мышечных пучков. Отдельные цепочки ганглионарных клеток распределяются вдоль поверхностей основных, центральных полостей желудочка и предсердия; в периферических рыхлых сетях пучков миокарда встречаются одиночные клетки, которые соединяются друг с другом длинными отростками. Ганглионарные клетки в стенках SV, их клеточные цепи внутри предсердия, в атриовентрикулярном локусе и желудочке соединены между собой. В атриовентрикулярном локусе ганглионарные клетки присутствуют даже в соединительной ткани у основания клапанов, а также на поверхностях клапанов. Отмечают [22], что система ганглионарных клеток образует некий континуум в границах сердца. Кроме того, сеть ганглионарных клеток сердца миног также находится в контакте с ганглионарными клетками Кювьеровых протоков, вероятно, относящихся к симпатической нервной системе.

#### *Иннервация и особенности нервной регуляции сердца миног*

Миноги считаются первыми позвоночными животными, у которых появляется иннервация сердца в виде *n. vagus* [47]. Автономный контроль работы сердца миног отличается от типичного паттерна регуляции сердечной функции высших позвоночных целым рядом особенностей. Так, сердце миног осуществляет свою функцию при полном отсутствии симпатического адренергического контроля. Симпатические цепи полностью отсутствуют, хотя рассеянные кластеры нейронов встречаются вдоль кардинальных вен в брюшной полости миног [58]. Несмотря на тот факт, что сердце миног лишено контроля со стороны симпатической нервной системы, эндотелиальная поверхность миокарда содержит хромаффинные клетки, которые могут высвобождать оказывающие влияние на сокращение кардиомиоцитов адреналин и норадреналин [22]. В отсутствие симпатической иннервации сердце миног демонстрирует положительные инотропный и хронотропный ответы на  $\beta$ -адренергическую стимуляцию [22].

Холинергический *n. vagus*, проходящий вдоль срединной яремной вены, осуществляет иннервацию стенки SV [22]. Показано, что стимуляция *n. vagus* активизирует работу сердца миног че-

рез аппарат никотиновых рецепторов, составляя уникальную особенность сердца миног; обычно у позвоночных стимуляция *n. vagus* вызывает брадикардию, опосредуемую мускариновыми рецепторами.

#### Проводящая система сердца миног

В настоящее время механизмы генерации сердечного ритма миног остаются практически не известны. Ультраструктурно сердечная мышца миноги сходна с таковой у других позвоночных [59]. Существует мнение, что миноги лишены собственного водителя ритма (т.е. обладают “нейрогенным сердцем”, требующим приложения внешнего воздействия для генерации сокращений) [48]. Вместе с тем, опираясь на опыты Д. Йенсена, [60] К. Ровайнен [59] пришел к заключению о существовании собственного, встроенного водителя ритма в сердце миног (“миогенное сердце”). Предполагается, что у миног механизм, задающий сердечный ритм, может быть подобен механизму, описанному для аневрального сердца миксин [60]; такое предположение важно с точки зрения филогенетического становления ритмогенерирующей ткани сердца. Вместе с тем существует вероятность того, что механизмы, отвечающие за воспроизведение сердечных сокращений, в двух группах *Cyclostomata* развивались независимыми путями. Одновременно чувствительная к изменениям кровяного давления часть механизма, регулирующего сердечные сокращения в миокарде желудочка морской миноги (*Petromyzon marinus*), обладает определенным сходством с таковой у представителя костистых рыб, радужной форели (*Salmo gairdneri*) [60].

#### Участие саркоплазматического ретикулума, $\text{Ca}^{2+}$ и рианодиновых рецепторов в регуляции сократительной активности миокарда миног

SR кардиомиоцитов, играющий важную роль в управлении потоками ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , у миног чрезвычайно развит [50]. Данный факт может свидетельствовать о том, что у общего предка всех позвоночных сопряжение между возбуждением и сокращением сердца (*excitation-contraction coupling*, *e-c coupling*) могло довольно сильно зависеть от запасов  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматической сети.

Известно, что каждое сердцебиение инициируется электрическим возбуждением SL кардиомиоцитов в форме ПД [50]. Возбуждение сопрягается с сокращением миоцита через кратковременное повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , величина которой отражает степень активации миоцита. Поступление  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточного пространства действует как триггер для дальнейшего высвобождения ионов из внутриклеточных депо в SR через механизм  $\text{Ca}^{2+}$ -индуци-

рованного высвобождения (CICR) либо, если количество  $\text{Ca}^{2+}$  достаточно велико, то этот пул ионов может непосредственно активировать сокращение кардиомиоцита [50].

Было установлено, что SR сердца миноги обладает очень существенными запасами  $\text{Ca}^{2+}$  [50]. Количество высвобождаемого под действием кофеина депонированного в SR  $\text{Ca}^{2+}$  оказалось примерно в два раза больше депонированного SR  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах млекопитающих, однако меньшие запасы  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках форели [61, 62]. У млекопитающих большая часть содержащегося в SR  $\text{Ca}^{2+}$  (50–70%) высвобождается при каждом сердцебиении, что требует эффективных циклических переходов  $\text{Ca}^{2+}$  между цитозолем и SR от сокращения к сокращению миокарда. Было установлено, что в сердце миноги потребности в  $\text{Ca}^{2+}$  для активации миофиламентов совпадают с таковыми в сердце млекопитающих; однако, в отличие от млекопитающих запасы SR  $\text{Ca}^{2+}$  у миноги таковы, что их хватило бы для 2–3 сокращений [50].

Высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из SR происходит через рианодиновые рецепторы (RyR) – встроенные в мембраны SR  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (рианодин-чувствительные каналы). Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  связываются с RyR, активируя их, что в свою очередь сопровождается увеличением внутриклеточной  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Число RyR необычайно высоко в сердце миноги [50]: в желудочке экспрессия RyR достигает практически 68% от их количества у крысы и аналогично экспрессируемому количеству в желудочке налима (*Lota lota*) [63].

Показано, что характер электрической активности сердца (форма зубцов ЭКГ) у *Lampetra fluviatilis* сходен с ЭКГ миксины *E. cirrhatus* [28, 64]. Вместе с тем ЧСС миног оказалось значительно выше ЧСС миксин [11, 22]; в частности, ЧСС *L. fluviatilis* составляет порядка 34–50 ударов/мин [65]. Следовательно, можно предположить, что особенности *e-c*-сопряжения миног, нуждающихся в эффективной системе кровообращения для отлова своей добычи по сравнению со слабоактивными, питающимися падалью миксинами, обеспечивают относительно высокий сердечный выброс [11]. Подобное предположение может объяснить, почему у миксин отсутствуют признаки, которые характерны для более мощного сердца миног (в виде большего размера сердца, существенной зависимости сокращений от запасов SR  $\text{Ca}^{2+}$ ). Возможно, что физиологические особенности *e-c*-сопряжения миног воспроизводят процессы, сопровождавшие сокращения миокарда общего предка всех позвоночных, однако впоследствии миксины утратили такие специфические качества [66].

*Адренергическая и холинергическая регуляция  
входящих кальциевых токов в сердце миног*

Определенный интерес представляет адренергическая и холинергическая регуляция входящих кальциевых токов ( $ICa^{2+}$ ) миокарда миноги. Индуцированное  $\beta$ -адреномиметиком изопреналином увеличение  $ICa^{2+}$  удостоверяет, что, несмотря на отсутствие адренергической иннервации,  $\beta$ -адренергические рецепторы присутствуют на кардиомиоцитах желудочка и они связаны с  $SL Ca^{2+}$ -каналами. С другой стороны, нечувствительность  $ICa^{2+}$  к ацетилхолину показывает, что холинергическая стимуляция сердца миноги не опосредована  $SL ICa^{2+}$ . В совокупности эти результаты соответствуют предположению, что ацетилхолин косвенно может стимулировать сократимость миокарда миног, содействуя высвобождению КА из хромаффинных клеток [22]. В свою очередь, высвободившиеся под действием ацетилхолина КА связываются с  $\beta$ -адренорецепторами миоцитов сердца и таким образом увеличивают  $ICa^{2+}$  [64].

## ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИИ И ФИЗИОЛОГИИ СЕРДЦА КОСТИСТЫХ РЫБ

### *Особенности строения сердца костистых рыб*

Сердце костистых рыб располагается вблизи жаберного аппарата в небольшой окологердечной полости и заключено в перикардиальный мешок (перикардиальную мембрану). Сердце состоит только из двух камер — предсердия и желудочка (двухкамерное сердце), хотя в анатомической традиции различают четыре исходных сегмента сердца в виде SV, предсердия, желудочка и луковицы аорты (*bulbus arteriosus*). Все отделы сердца рыб располагаются S-образно.

Главным компонентом стенки SV является соединительная ткань, соседствующая с эндотелием и эпикардом; кроме того, стенка SV оснащена варьирующим между видами количеством мышечных элементов — от сплошного мышечного слоя до полного его отсутствия [67, 68], что определяет слабую сократимость SV. Объем SV также существенно различается между видами; у некоторых видов рыб объем SV может быть равен объему предсердия [68]. Функциональная роль SV связана с инициацией и контролем сердечных сокращений, поскольку является местом расположения специализированных клеток в синоатриальной области [69] либо в месте соединения SV и Кювьеровых протоков [70]. Клапаны между SV и Кювьеровыми протоками, которые могли бы предотвратить ретроградный кровоток, отсутствуют [68].

Предсердие имеет вид мышечной камеры неправильной формы с тонкой трабекулированной стенкой [70]. Масса предсердия составляет приблизительно 8–25% массы желудочка и 0.01–0.03%

массы тела рыб. В отличие от млекопитающих у рыб объем предсердия приблизительно равен объему его желудочка [70, 71].

У костистых рыб на границе предсердия и желудочка мышечные волокна образуют кольцо компактного миокарда, образованного за счет аккреции слоев мышечных пучков независимо от наличия компактного слоя [72]. Более плотный, кольцеобразный AV-сегмент миокарда поддерживает клапаны и устанавливает структурные и функциональные связи между предсердием и желудочком; AV-сегмент иногда выделяют в отдельную часть сердца.

Клапан на границе предсердия и желудочка обычно состоит из двух листочков (двустворчатый клапан), которые содержат сгруппированные в плотное ядро многочисленные клетки с большим количеством соединительной ткани, коллагена и эластина [72]. Листочки прикрепляются к тканям, обрамляющим синоатриальное отверстие, и выступают в полость предсердия. Края листочков могут быть полностью свободными или прикрепляться к трабекулам предсердий. Клапан между камерами сердца может также отсутствовать [1].

Желудочек сердца рыб обеспечивает сердечный выброс и генерирует высокое давление крови. Масса желудочка может достигать 60–80% от общей массы сердца, а относительная масса желудочка варьирует от 0.035 до 0.38% [70]. Клетки желудочка содержат больше миофиламентов и митохондрий, чем клетки предсердия, и имеют много пузырьков диаметром 0.1–0.3 мкм, функция и содержание которых не установлены [73].

По сравнению с предсердием желудочек отличается относительным разнообразием массы, морфологии, гистологии и васкуляризации, что заставляет говорить об отсутствии “типичной формы” сердца рыб [70]. Форма желудочка представлена тремя различными разновидностями — трубчатой, мешкообразной и пирамидальной [74]. Разные формы желудочка связаны с двумя структурно различными типами организации миокарда [75] — губчатого (трабекулярного) и компактного. Мышечные волокна губчатого (трабекулярного) миокарда имеют продольную, поперечную и наклонную ориентацию таким образом, чтобы уменьшить сопротивление ткани при заполнении и растяжении желудочка. Между пучками волокон губчатого миокарда наблюдаются многочисленные щелевидные пространства (лакуны), выстланные эндотелием, которые сообщаются между собой и с главной полостью (просветом) желудочка. *Spongiosa* составляет большую часть массы ткани желудочка; такая организация миокарда позволяет каждой отдельной лакуне функционировать по принципу “много маленьких сердец” в границах “большого” желудочка [79]. Компактная часть миокарда включает кортикальный слой — эпикард и субэпикард,

обеспечивает механические качества миокарда и способность выдерживать высокое давление крови. Смешанная разновидность миокарда характеризуется наличием кортикального слоя переменной толщины, наружного компактного и внутреннего губчатого слоев, в котором компактный слой получает оксигенированную кровь из коронарных сосудов [76].

У костистых рыб желудочки формируются преимущественно губчатым (трабекулярным) миокардом либо наружный слой губчатого миокарда соседствует с компактной разновидностью миокарда, представленного слоем более плотно упакованных кардиомиоцитов. Степень выраженности (толщина) компактного слоя миокарда сердечной камеры в значительной мере отражает его рабочий потенциал [77].

У костистых рыб существует достаточно тесная взаимосвязь между двигательной активностью, архитектурой миокарда и типом кровоснабжения желудочка. Так, малоподвижные виды обладают мешкообразными или трубчатыми желудочками, состоящими из трабекулярного миокарда и содержащими лакунарные венозные цепи [75, 76]. В свою очередь, физически активные, подвижные виды рыб “оснащены” большими желудочками пирамидальной формы с миоархитектурой смешанного типа, дополненной хорошо развитым коронарным кровоснабжением, которое поддерживает высокий метаболический запрос миокарда [75].

С учетом разнообразия вариантов организации миокарда желудочков была создана классификация сердец костистых рыб [76, 77], которая базируется на наличии/отсутствии компактного слоя, относительной его толщине и степени васкуляризации миокарда, что позволило выделить четыре основные морфологические категории (типы). Сердца I типа имеют полностью трабекулированные желудочки без компактного слоя, вместе с тем разделяясь еще на несколько разновидностей (подтипов). Большинство рыб обладают сердцем Ia подтипа, в котором венозная кровь, содержащаяся в просвете камеры и внутритрабекулярных пространствах желудочка (просветная кровь), обеспечивает единственный вариант кровоснабжения миокарда (отсюда термины венозное, лакунарное или аваскулированное сердце; например, *Ballistes carolinensis*) [70]. Сердца подтипов Ib и Ic характеризуются наличием поверхностной коронарной артерии, однако распределение ее русла ограничено либо эпикардом (подтип Ib, например, *Pleuronectes platessa*) либо непосредственно связями с внутритрабекулярными пространствами (подтип Ic, лишенные гемоглобина антарктические ледяные рыбы семейства *Channichthyidae*, *Nothotenia angustata*).

Желудочки остальных типов строения оснащены внешним компактным и внутренним трабекулярным слоями. Сердца типа II обладают капиллярами компактного слоя, отходящими от коронарных сосудов, которые отсутствуют в губчатой части миокарда (лососевые, *Oncorhynchus nerka*); желудочки типа III уже имеют сосуды не только в компактном слое, но и губчатой части миокарда (*Elasmobranchii*). Желудочки типа IV отличаются от желудочков типа III тем, что значительная часть их массы образована компактным миокардом (более 30%). Большинство костистых рыб, которые обладают компактным слоем миокарда, имеют желудочки типа II; активно передвигающиеся виды рыб являются обладателями желудочков типа IV (*Thunnini*, *Katsuwonus pelamis*).

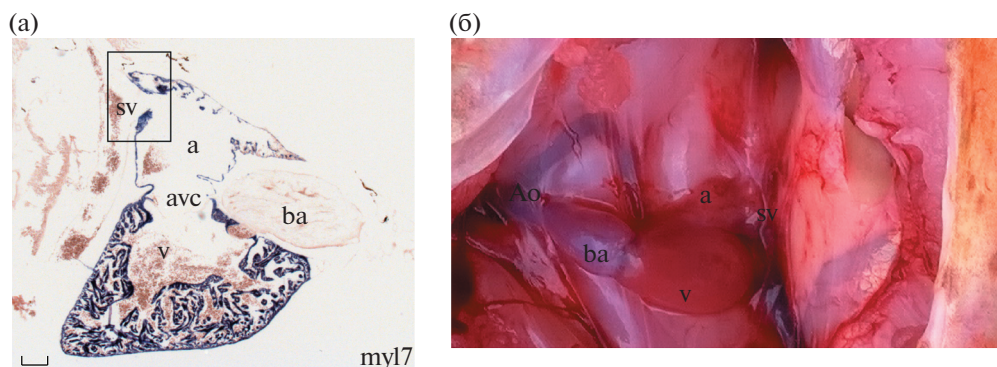
Таким образом, типичное сердце рыб (“венозное сердце”) (рис. 1, [79, 80]) построено из губчатого (трабекулированного) миокарда, снабжается венозной кровью из межтрабекулярных пространств (трабекулярных полостей, лакун) [76], которые, в свою очередь, заполняются кровью из желудочка через сосуды Тебезия (Тебезиевы сосуды). В классическом варианте у рыб отсутствует коронарное кровообращение. При усложнении архитектуры сердца губчатая часть миокарда обеспечивается венозной кровью из трабекулярных лакун, а компактный слой получает артериальную кровь по гипобронхиальным артериям второй пары жаберных дуг.

По сравнению с сердцем гомойотермных животных (птиц, млекопитающих), сердце рыб обычно функционирует как область низкого давления, сталкиваясь с относительно низкими и переменными уровнями парциального давления кислорода ( $PO_2$ ) [70, 78]. Среди позвоночных животных костистые рыбы демонстрируют самые высокие межвидовые различия не только в мио-ангио-архитектуре, но и в паттернах морфодинамических механических характеристик сердца [70, 78].

Луковица аорты имеет вид камеры грушевидной формы белого цвета и представляет собой расширенную часть брюшной аорты, которая состоит из гладкой мускулатуры, не имеет клапанов и функционирует как конденсатор, поддерживая непрерывный кровоток в направлении жаберных дуг. Эволюция четвертого отдела сердца, вероятно, связана с необходимостью демпфирования систолических колебаний кровяного давления и кровотока до того, как они достигнут капилляров жаберных ламелл.

#### Хромаффинные клетки рыб

У костистых рыб хромаффинные клетки содержатся преимущественно в стенках задних кардинальных вен, а также разбросаны в ткани передней (головной) почки [35]. Хромаффинные клетки по-



**Рис. 1.** “Венозное” сердце костистых рыб: а — сагиттальный разрез сердца *Danio rerio* [79]. б — Сердце *Scorpaena porcus* [80]. sv — венозный синус, а — предсердие, v — желудочек, ба — луковица аорты (*bulbus arteriosus*), avc — атриовентрикулярный канал, Ao — брюшная аорта.

лучают иннервацию преганглионарными холинергическими волокнами симпатической нервной системы [81]. У атлантической трески (*Gadus morhua*) электрическая стимуляция этих волокон [81], либо искусственное введение ацетилхолина [82] вызывает высвобождение КА. Следовательно, преобладающим механизмом мобилизации КА при стрессе *in vivo* является стимуляция хромаффинных клеток нервными волокнами [36]. Кроме того, вполне вероятно, что изменения в химическом составе крови, включая содержание кислорода [82], могут непосредственно вызывать высвобождение КА из хромаффинных клеток.

Вероятно, роль циркулирующих в крови КА в регуляции сердечно-сосудистой функции имеет меньшую значимость у костистых рыб [83] за счет развитой иннервации сосудов и сердечной ткани адренергическими вегетативными нервными волокнами.

#### Иннервация сердца рыб

Волокна, иннервирующие сердце костистых рыб, относятся к вегетативной нервной системе и имеют двойное происхождение — спинномозговые (симпатические) и ветви черепно-мозговых (краниальных, парасимпатических) нервов [1]. Краниальные волокна достигают сердца в составе парных сердечных ветвей *n. vagus*, тогда как симпатические волокна подходят к миокарду, присоединяясь к волокнам блуждающего нерва (отсюда термин “вагосимпатические стволы”), либо идут в составе независимых спинномозговых нервов [84]. Костистые рыбы являются первыми позвоночными, у которых симпатическая иннервация сердца осуществляется “вагосимпатическими стволами”. Подобный двойной контроль со стороны вегетативной нервной системы повышает адаптивные возможности сердца костистых рыб к меняющимся условиям водной среды. Костистых рыб можно считать самой ранней группой позвоночных, обладающих

как симпатическим, так и парасимпатическим контролем над сердцем. Блуждающий нерв реализует свой эффект в сердце костистых рыб через мускариновые холинорецепторы и вызывает тормозную реакцию, что проявляется в уменьшении ЧСС. В свою очередь изменение ингибирующего тонического воздействия *n. vagus*, обусловленные активностью преганглионарных нейронов сердца продолговатого мозга, являются преобладающими факторами, обеспечивающими у рыб кардиореспираторное взаимодействие [85]. Точный контроль ЧСС включает в себя модуляцию сердечного ритма к ритму дыхательного цикла, что может проявляться в кардиореспираторной синхронизации в формате “один к одному”.

#### Проводящая система сердца рыб

Для маркирования клеток сердца, наделенных способностью генерировать электрические импульсы — автоматизмом, у высших позвоночных животных используют экспрессию транскрипционных факторов *Isl1* и *Tbx3*. В частности, в миокарде *Danio rerio* *Isl1*- и *Tbx2b*-позитивные области были обнаружены на границе между SV и предсердием [84]. Установлено, что у *D. rerio* количество клеток, экспрессирующих *Isl1*, относительно невелико; *Isl1*-позитивные клетки образуют кольцеобразную структуру специализированной сердечной ткани, которая отличается от более компактного SA-узла млекопитающих, имеющего веретенообразную форму либо форму запятой с четко дифференцированной структурой [79]. У млекопитающих экспрессия *Isl1* (*Isl1*-1) выявляется на ранних стадиях развития эмбрионов в прогениторных кардиальных клетках; в сердце взрослых животных экспрессия *Isl1* ограничивается только SA-узлом. Одновременно в кольцеобразном SA-пейскемекере *D. rerio* экспрессируются *HCN4* [1, 79, 86]. Кроме *D. rerio* специфическая ритмогенерирующая ткань



на стыке предсердия и SV была идентифицирована еще у нескольких видов рыб [67].

Окрашивание специализированной ткани SA-области показало, что она содержит волнистые нервные пучки, ганглионарные клетки с зернистой цитоплазмой (диаметром 12–22 мкм) и отчетливо отличающиеся от других клеток миокарда широкие мышечные волокна с крупными ядрами (модифицированные кардиомиоциты) [67].

Хотя доминирующий водитель ритма сердца большинства *Teleostei*, по-видимому, дислоцируется в области SA-“перекрестка” [87], оказалось, что такое его расположение не является универсальным. Например, у европейской камбалы (*Pleuronectes platessa*) клетки водителя ритма рассредоточиваются по всей стенке предсердия [73], а у обыкновенного речного угря (*Anguilla anguilla*) аналогичные клетки локализируются на границе между SV и протоками Кьюве.

Кроме того, специализированные клетки обнаруживаются не только в SA-области, но и, в гораздо меньшей степени, в атриовентрикулярной (AV) воронке [67]. В желудочке костистых рыб не установлено каких-либо высокоспециализированных проводящих участков миокарда; вместе с тем маркируемые при адгезии полисиаловой кислоты полосы трабекулярного миокарда, простирающиеся от предсердно-желудочкового канала до верхушки желудочка, по-видимому, обеспечивают его функциональную непрерывность [88]. Предполагается, что за счет этих компонентов миокарда сердце рыб способно активироваться от верхушки до основания желудочка (*the apex-to-base ventricular activation pattern*) подобно варианту активации сердца высших позвоночных, однако при явном отсутствии дифференцированных проводящих путей. Одновременно присутствующие в губчатом миокарде желудочка медленные проводящие мышечные волокна обеспечивают его двойную функцию в виде проведения возбуждения и сокращения *per se* [13].

Картирование электрической активности сердца рыб установило, что SA-область является местом проявления “нормальной” активности водителя ритма/проводящей системы [89], обеспечивающей поддержание сердечного ритма в пределах 20–35 ударов/мин [90]; кроме того, в AV-области присутствует второй водитель ритма [89], подключающийся к генерации ритма при удалении SA-структур. Клетки водителя ритма в SA- и AV-областях оснащены  $\beta$ 2-адренергическими и холинергическими мускариновыми рецепторами (M-холинорецепторы), т.е. сердце костистых рыб имеет все общепринятые признаки контроля сердца позвоночных со стороны автономной нервной системы.

Одновременно SA-узел атлантического лосося (*Salmo salar*) содержит набор натрийуретических пептидов — sCP (*salmon cardiac peptide*) и VNP (*ventricular natriuretic peptide*), что указывает на возмож-

ную нейромодуляторную и/или нейротрансмиттерную роль данных агентов в сердце костистых рыб, направленную на регуляцию кровяного давления и механической нагрузки сердца [67, 91]. Высвобождение синтезируемых миокардом натрийуретических пептидов происходит при растяжении тканей предсердия и желудочка, а также под действием нейрогуморальных стимулов, сопровождающих развитие сердечной недостаточности.

Водитель ритма сердца рыб (включая механизмы его нейрогуморальной регуляции) функционально сопоставим с SA-узлом млекопитающих [88]. Для костистых рыб описано равномерное (изотропное) распространение электрического импульса в предсердии [90]. Миокард рыб AV-области выполняет ту же роль, что и AV-узел высших позвоночных, т.е. создает временную задержку между сокращением предсердия и желудочка и предотвращает возникновение предсердных тахикардий [88, 90]. Тем не менее существование быстропроводящего компонента в желудочковом миокарде как функционального эквивалента системы пучка Гиса — волокон Пуркинье остается дискуссионным [88]. Несмотря на отсутствие быстропроводящих волокон у рыб существует четко скоординированный механизм распространения желудочкового сокращения [1].

Таким образом, очевидно, что специфическая ткань, обеспечивающая ритмические сокращения миокарда у *Teleostei*, не обладает организованными узлами или проводящими путями [90], что отражает ее гораздо более простую организацию по сравнению с высшими позвоночными животными [92].

#### Ионные механизмы генерации сердечного ритма рыб (HCN-каналы)

Результаты исследований механизмов генерации ритма у костистых рыб поддерживают непрекращающиеся дискуссии об относительной роли мембранных и кальциевых часов в механизмах генерации сердечного ритма.

При изучении ионных механизмов регуляции сократимости сердца кумжи (*Salmo trutta fario*) была показана экспрессия шести изоформ гена (транскриптов), кодирующих HCN-каналы (HCN1, HCN2a, HCN2ba, HCN2bb, HCN3 и HCN4) [93]. Общее количество HCN-транскриптов, отмечаемое в ткани SA-пейсмейкера форели, было выше по сравнению с предсердием и желудочком в 4.0 и 4.9 раза, соответственно. HCN3 и HCN4 являлись основными изоформами субъединиц каналов, представляющими около 35.8 и 25.0%, соответственно, от общего числа HCN-транскриптов.

Кроме SA-ткани транскрипты HCN-каналов экспрессировались в некотором количестве по всему миокарду *S. trutta fario*, однако  $I_f$  отмечался только в незначительной субпопуляции SA-клеток

(24%) и полностью отсутствовал в миоцитах предсердия и желудочка [93], что свидетельствовало об отсутствии ведущей роли  $I_f$  в воспроизведении сердечного ритма. Интересен тот факт, что ткани SA-пейсмейкера бурой форели практически в равной степени содержали цАМФ-нечувствительные (HCN3 и HCN1) и цАМФ-чувствительные изоформы субъединиц (HCN4 и HCN2a) ионных каналов, тогда как предсердие и желудочек были оснащены преимущественно цАМФ-нечувствительными субъединицами. Физиологическое значение этих различий остается неясным при отсутствии функционального  $I_f$ , что в значительной мере противоречит модели мембранных часов.

Вместе с тем, опыты с эмбрионами *Danio rerio* — носителями мутации *slow mo (smo)*, ограничивающей быструю составляющую  $I_f$  и вызывающую брадикардию (2-кратное снижение ЧСС) [94], все же предоставляют веские генетические доказательства непосредственного участия  $I_f$  в генерации и контроле сердечного ритма. При *smo*-мутации было найдено избирательное снижение быстрого кинетического компонента  $I_f$  при сохранении медленного компонента тока, что заставляет предполагать существование двух “кинетических” разновидностей каналов, обеспечивающих  $I_f$  [94]. Наличие только одной разновидности каналов с измененной “мутантной” кинетикой противоречило бы устойчивости медленного компонента  $I_f$ . По-видимому, существует несколько избыточных или резервных механизмов генерации ритма [94]; проявлением одного из таких механизмов может быть сохраняющийся при *smo* медленный компонент  $I_f$ . В любом случае очевидное нарушение существенного компонента  $I_f$  позволяет сохранить определенную способность генерировать ритм и поддерживает проводимость миокарда. Вместе с тем молекулярные основы генерации ритма остаются плохо изученными, что требует установления роли гена *smo* в качестве носителя информации о самом канале или его регуляторе.

Согласно модели мембранных часов, кроме призванного играть доминирующую роль в воспроизведении ритма  $I_f$ , предполагается участие и других ионных каналов и транспортеров SL миоцитов, включая  $K^+$ -ток задержанного выпрямления ( $I_{Kr}$  и  $I_{Ks}$ ),  $Ca^{2+}$ -токи T- и L-типа ( $I_{CaT}$  и  $I_{CaL}$ ), натрий-калиевый ток ( $I_{Na,K}$ ), фоновый ток (*steady-state background current*,  $I_{ST}$ ). Отсутствие  $I_f$  у *S. trutta fario* [93] может указывать на существование альтернативного/резервного механизма генерации ритма в виде модели так называемых сопряженных часов (*the coupled clock*). Основным нерешенным вопросом в механизме воспроизведения ритма сердца кужмы является источник входящего тока, который вызывает раннюю диастолическую деполяризацию в тот момент, когда исчезают выходя-

щие  $K^+$ -токи. Если в модели мембранных часов роль источника деполяризации осуществляет  $I_f$ , то в сопряженных часах такую функцию выполняет в основном натрий-кальцевый ток ( $I_{Na,Ca}$ ). Другие альтернативные варианты могут включать  $I_{CaT}$ ,  $I_{ST}$ ,  $I_{Na,K}$  и, возможно,  $I_{CaL}$ , осуществляемый через  $Ca_v1.3$ -каналы.

Модель ритмогенеза —  $Ca^{2+}$ -часов — объясняет обеспечение сердечных сокращений ритмическими спонтанными переходами внутриклеточного  $Ca^{2+}$  между SR и субсарколеммальным цитозолем: поглощение  $Ca^{2+}$  саркоплазматической  $Ca^{2+}$ -АТФазой приводит к заполнению SR  $Ca^{2+}$ -депо и периодическому высвобождению  $Ca^{2+}$  из SR через риаудиновые или инозитолтрисфосфатные рецепторы. Поскольку внутриклеточный  $Ca^{2+}$ -цикл напрямую не влияет на величину мембранного потенциала,  $Ca^{2+}$ -часы как таковые не могут обеспечить генерацию ПД клеток водителя ритма; следовательно,  $Ca^{2+}$ -часы должны быть связаны с мембранными часами, чтобы сформировать функциональный водитель ритма [93]. Сопряжение  $Ca^{2+}$ -часов с мембранными часами происходит посредством тока  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника (NCX), когда высвобождаемый SR  $Ca^{2+}$  вытесняется из клетки непосредственно через электрогенный обменник. В модели сопряженных часов цикличность переходов SR  $Ca^{2+}$  играет доминирующую роль в формировании сердечного ритма и реакциях на вегетативную регуляцию, тогда как  $I_f$  и другие части мембранных часов играют меньшую, хотя и необходимую роль в контроле ритмогенеза. Принимая во внимание, что роль SR в инициации сокращения сердца у рыб намного меньше, чем у млекопитающих, вероятно, участие SR  $Ca^{2+}$  и механизмы сопряженных часов будут не столь существенным для работы SA-пейсмейкера рыб [93]. По-видимому, модель мембранных часов и HCN-каналы должны обеспечить альтернативное объяснение работы механизма генерации ритма сердца рыб. Вместе с тем остается возможность “разночтения” роли HCN-каналов в упомянутых процессах за счет различий в характерных для разных изоформы HCN генетических последовательностях, что может определять изоформ-специфичные и видоспецифичные функции каналов [95].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесчелюстные рыбообразные и костистые рыбы представляют разные ветви эволюционного древа позвоночных, отражающие постепенное усложнение анатомических и физиологических признаков внутри таксономических групп. Отсутствие позвоночных элементов у миксин, по-видимому, является атрибутом вторичной дегенерации критических морфологических характеристик, определяю-



ших их генеральную принадлежность к подтипу *Vertebrata* [96].

Эволюционное становление *Cyclostomata* и костистых рыб сопровождается структурной и функциональной диверсификацией системы кровообращения и архитектуры сердца, что способствует однонаправленному кровотоку и генерации высокого кровяного давления. Также очевиден тот факт, что эволюционный прогресс работает на “создание” более быстрой эффекторной системы регуляции сердечной деятельности и двойного (возбуждающего/тормозного) контроля функций миокарда [10].

Известно, что замкнутые системы кровообращения позвоночных полагаются на строго однонаправленный кровоток, управляемый единственной доминирующей ритмогенерирующей структурой [10]. В сердце круглоротых и рыб поддерживается ограничительный тренд существования одного доминирующего водителя ритма, характерный для высших позвоночных животных. Несмотря на определенные анатомо-морфологические различия строения сердца в рассматриваемых таксономических группах, существует поразительная степень эволюционной сохранности основных способов генерации и передачи возбуждения в пределах миокарда. HCN-каналы являются неким универсальным молекулярным механизмом генерации сердечного ритма, появившимся в первых систематических группах позвоночных [44]. Очевидно, что наличие и вовлечение HCN-каналов в воспроизведение ритмических сокращений миокарда в архаичных таксономических группах животных является фундаментальным, “законсервированным” механизмом, передаваемым по эволюционной лестнице высшим позвоночным; очевидно, что дальнейшее изучение HCN-каналов предоставляет новые возможности для поиска средств терапии аритмий различного генеза. Вместе с тем особенности физиологических процессов в сердце *Cyclostomata* и отдельных представителей костистых рыб с высокой степенью устойчивости к гипоксии могут служить источником данных для поиска средств терапии сердечной недостаточности.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при поддержке РФФИ (проект №20-04-00037 и № 20-44-920001).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Icardo J.M.* Heart Morphology and Anatomy. *Fish Physiology*. 36: 1–54. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.05.002>
2. *Grimes A.C., Kirby M.L.* The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *Fish Biol.* 74 (5): 983–1036. 2009  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02125.x>
3. *Yamauchi A.* Fine Structure of Fish Heart. The Hearts and Heart-like Organs. V. 1 / eds. G.H. Bourne, G.H. Bourne. New York: Academic Press. 119–148. 1980.
4. *Asnani A., Peterson R.T.* The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis. Model Mech.* 7: 763–767. 2014.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.016170>
5. *Chico T.J.A., Ingham P.W., Crossman D.C.* Modeling Cardiovascular Disease in the Zebrafish. *Trends Cardiovasc. Med.* 18 (4): 150–155. 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.04.002>
6. *Kuraku S., Kuratani S.* Time Scale for Cyclostome Evolution Inferred with a Phylogenetic Diagnosis of Hagfish and Lamprey cDNA Sequences. *Zool. Sci.* 23: 1053–1064. 2006.  
<https://doi.org/10.2108/zsj.23.1053>
7. *Байрамов А.В., Ермакова Г.В., Кучерявый А.В., Зарайский А.Г.* Миноги — “живые ископаемые” в исследованиях раннего развития и регенерации позвоночных. *Онтогенез*. 49 (5): S3–S14. 2018. [*Bayramov A.V., Ermakova G.V., Kucheryavyy A.V., Zarskiy A.G.* Lampreys — “Living Fossils” in Researches of Early Development and Regeneration of the Vertebrates. *Ontogenesis*. 49 (5): S3–S14. 2018. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S0475145018080013>
8. *Farrell A.P., Stecyk J.A.W.* The heart as a working model to explore themes and strategies for anoxic survival in ectothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147 (2): 300–312. 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.021>
9. *Abou Chakra M., Hall B.K., Stone J.R.* Using information in taxonomists' heads to resolve hagfish and lamprey relationships and recapitulate craniate–vertebrate phylogenetic history. *Historical Biology*. 25 (5): 652–660. 2014.  
<https://doi.org/10.1080/08912963.2013.825792>
10. *Burkhard S., van Eif V., Garric L., Christoffels V.M., Bakkers J.* On the Evolution of the Cardiac Pacemaker. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 4 (2): 4. 2017.  
<https://doi.org/10.3390/jcdd4020004>
11. *Farrell A.P.* Cardiovascular systems in primitive fishes. *Fish physiology: Primitive fishes* / eds. D.J. McKenzie, A.P. Farrell, C.J. Brauner. New York: Elsevier. 53–120. 2007.
12. *Baker D.W., Sardella B., Rummer J.L., Sackville M., Brauner C.J.* Hagfish: Champions of CO<sub>2</sub> tolerance question the origins of vertebrate gill function. *Sci. Rep.* 5: 11182. 2015.  
<https://doi.org/10.1038/srep11182>
13. *Jensen B., Boukens B.J.D., Postma A.V., Gunst Q.D., van den Hoff M.J.B., Antoon F. Moorman M., Wang T., Christoffels V.M.* Identifying the evolutionary building blocks of the cardiac conduction system. *PLOS one*. 7 (9): e44231. 2012.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044231>

14. Hol R., Johansen K. A cineradiographic study of the central circulation in the hagfish, *Myxine glutinosa* L. J. Exp. 37: 469–473. 1960.
15. Satchell G.H. Cardiac function in the hagfish, *Myxine* (*Myxinoidea: Cyclostomata*). Acta Zool. 67: 115–122. 1986.
16. Johnsson M., Axelsson M. Control of the systemic heart and the portal heart of *Myxine glutinosa*. J. Exp. Biol. 199: 1429–1434. 1996.
17. Forster M.E., Axelsson M., Farrell A.P., Nilsson S. Cardiac function and circulation in hagfishes. Can. J. Zool. 69: 1985–1992. 1991.  
<https://doi.org/10.1139/z91-277>
18. Icardo J.M., Colvee E., Schorno S., Lauriano E.R., Fudge D.S., Glover C.N., Zaccane G. Morphological analysis of the hagfish heart. I. The ventricle, the arterial connection and the ventral aorta. J. Morphol. 277 (3): 326–340. 2016  
<https://doi.org/10.1002/jmor.20498>
19. Randall D.J., Davie P.S. The Hearts of Urochordates and Cephalochordates. Hearts and Heart-like organ / eds. G.H. Bourne. New York: Academic Press. 41–59. 1980.  
<https://doi.org/10.1016/C2013-0-10405-9>.
20. Chapman C.B., Jensen D., Wildenthal K. On circulatory control mechanisms in the Pacific hagfish. Circ. Res. 12: 427–440. 1963.
21. Cox G.K., Sandblom E., Farrell A.P. Cardiac responses to anoxia in the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. J. Exp. Biol. 213 (21): 3692–3698. 2010.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.046425>
22. Augustinsson K.B., Fänge R., Johnels A., Östlund E. Histological, physiological and biochemical studies on the heart of two cyclostomes, hagfish (*Myxine*) and lamprey (*Lampetra*). J. Physiol. 131 (2): 257–276. 1956.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1956.sp005461>
23. Johansen K. Circulation in the hagfish, *Myxine glutinosa* L. Biol. Bull. 118 (2): 289–295. 1960.
24. Forster M.E. The Blood Sinus System of Hagfish: Its Significance in a Low-pressure Circulation. Comp. Biochem. Physiol. 116 (3): 239–244. 1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00215-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00215-0)
25. Wilson C.M., Roa J.N., Cox G.K., Tresguerres M., Farrell A.P. Introducing a novel mechanism to control heart rate in the ancestral Pacific hagfish. J. Exp. Biol. 219: 3227–3236. 2016.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.138198>
26. Cox G.K., Sandblom E., Richards J.G., Farrell A.P. Anoxic survival of the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). J. Comp. Physiol. 181 (3): 361–371. 2011.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-010-0532-4>
27. Satchell G.H. Physiology and form of fish circulation. Cambridge: Cambridge University Press. 235 P. 1991.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511983719>.
28. Davie P.S., Forster M.E., Davison B., Satchell G.H. Cardiac Function in the New Zealand Hagfish, *Eptatretus cirrhatius*. Physiol. Zool. 60 (2): 233–240. 1987.
29. Helle K.B., Miralto A., Pihl K.E., Tota B. Structural organization of the normal and anoxic heart of *Scyllium stellare*. Cell Tissue Res. 231 (2): 399–414. 1983.  
<https://doi.org/10.1007/bf00222190>
30. Poupa O., Ask J.A., Helle K.B. Absence of a calcium paradox in the cardiac ventricle of the Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*). Comp. Biochem. Physiol. 78 (1): 181–183. 1984.  
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(84\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90113-0)
31. Lomsky' M., Ekroth R., Poupa O. The calcium paradox and its protection by hypothermia in human myocardium. Eur. Heart J. 4 (H): 139–142. 1983.  
[https://doi.org/10.1093/eurheartj/4.suppl\\_h.139](https://doi.org/10.1093/eurheartj/4.suppl_h.139)
32. Bloom G., Östlund E., von Euler U.S., Lishajko F., Ritzen M., Adams-Ray J. Studies on catecholamine-containing granules of specific cells in cyclostome hearts. Acta Physiol. Scand. 53 (185): 1–34. 1961.
33. Hirsch E.F., Jellinek M., Cooper T. Innervation of the Systemic Heart of the California Hagfish. Circulation Research, XIV: 212–217. 1964.
34. Bernier N.J., Perry S.F. Control of the catecholamine and serotonin release from the chromaffin tissue of the Atlantic hagfish. J. Exp. Biol. 199: 2485–2497. 1996.
35. Perry S.F., Fritsche R., Thomas S. Storage and release of catecholamines from chromaffin tissue of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. J. Exp. Biol. 183: 165–184. 1993.
36. Randall D.J., Perry S.F. Catecholamines. Fish Physiology—The Cardiovascular System. Vol. XIIB / eds. W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell. New York: Academic Press. 255–300. 1992.  
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60011-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60011-4)
37. Axelsson M., Farrel A.P., Nilsson S. Effects of hypoxia and drugs on the cardiovascular dynamics of the Atlantic hagfish *Myxina glutinosa*. J. Exp. Biol. 151: 297–316. 1990.
38. Forster M.E. Cardiovascular Function in Hagfishes. The Biology of Hagfishes/ eds. J.M. Jorgensen, J.P. Lomholt, R.E. Weber, H. Malte. London: Springer. 237–258. 1998.
39. Marvin W.J. Jr, Hermsmeyer K., McDonald R.I., Roskoski L.M., Roskoski R. Ontogenesis of cholinergic innervation in the rat heart. Circ. Res. 46 (5): 690–695. 1980.  
<https://doi.org/10.1161/01.res.46.5.690>
40. Jensen B., Boukens B.J.D., Wang T., Moorman A.F.M., Christoffels V.M. Evolution of the Sinus Venosus from Fish to Human. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 1: 14–28. 2014.  
<https://doi.org/10.3390/jcdd1010014>
41. Wilson C.M., Farrell A.P. Pharmacological characterization of the heartbeat in an extant vertebrate ancestor, the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. Comp. Biochem. Physiol. 164 (1): 258–263. 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.013>
42. Jensen D. The aneural heart of the hagfish. Ann. NY Acad. Sci. 127 (1): 443–458. 1965.
43. Randall D. The circulatory system. Fish Physiology: The Nervous System, Circulation and Respiration / eds. W. Hoar, D. Randall. Academic Press: New York. 133–172. 1970. Academic Press: New York.  
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60129-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60129-6).

44. Wilson C.M., Stecyk J.A.W., Couturier C.S., Nilsson G.E., Farrell A.P. Phylogeny and effects of anoxia on hyperpolarization-activated, cyclic nucleotidedegated channel gene expression in the heart of a primitive chordate, the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*). J. Exp. Biol. 216: 4462–4472. 2013.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.094912>
45. Marionneau C., Couette B., Liu J., Li H., Mangoni M.E., Nargeot J., Lei M., Escande D., Demolombe S. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. J. Physiol. 562: 223–234. 2005.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074047>
46. Moosmang S., Stieber J., Zong X., Hofmann F., Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. Eur. J. Biochem. 268 (6): 1646–1652. 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02036.x>
47. Wang T. Evolution of the Cardiovascular Autonomic Nervous System in Vertebrates. Primer on the Autonomic Nervous System/ eds. D. Robertson, I. Biaggioni, G. Burnstock, P.A. Low, J.F.R. Paton. Oxford: Academic Press. 669–674. 2012.
48. Shattock M.J., Rosen M.R. The control of heart rate: the physiology of the sinoatrial node and the role of the If current. Dialogues in Cardiovascular Medicine. 11 (1): 5–17. 2006.
49. Fänge R. The circulatory system. The Biology of Lampreys/ eds. M.W. Hardisty, I.C. Potter. London: Academic. 2: 241–259. 1972.
50. Vornanen M., Haverinen J. A significant role of sarcoplasmic reticulum in cardiac contraction of a basal vertebrate, the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*). Acta Physiol. 207 (2): 269–279. 2013.  
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02479.x>
51. Wright G.M. Structure of the conus arteriosus and ventral aorta in the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*: microfibrils, a major component. Can. J. Zool. 62 (12): 2445–2456. 1984.  
<https://doi.org/10.1139/z84-361>
52. Hardisty M.W. Biology of the Cyclostomes. Springer: London. 428 P. 1979.
53. Macey D.J., Clarke L.M., Potter I.C. Basal oxygen consumption, ventilatory frequency, and heart rate during the protracted spawning run of the Southern Hemisphere lamprey *Geotria australis*. J. Comp. Physiol. 161 (5): 525–531. 1991.
54. Johansen K., Lenfant C., Hanson D. Gas exchange in the lamprey, *Entosphenus tridentatus*. Comp. Biochem. Physiol. 44 (1): 107–119. 1973.
55. Otsuka N., Chihara J., Sakurada H., Kanda S. Catecholamine-storing cells in the cyclostome heart. Arch. Histol. Jpn. 40: 241–244. 1977.  
[https://doi.org/10.1679/aohc1950.40.supplement\\_241](https://doi.org/10.1679/aohc1950.40.supplement_241)
56. Dashow L., Epple A. Plasma catecholamines in the lamprey: intrinsic cardiovascular messengers? Comp. Biochem. Physiol. 82 (1): 119–122. 1985.  
[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90217-8)
57. Jensen B. Cardioregulation in an aneural heart. Comp. Biochem. Physiol. 2 (3): 181–192. 1961.  
[https://doi.org/10.1016/0010-406X\(61\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(61)90061-5)
58. Nilsson S., Holmgren S. The Autonomic Nervous System and Chromaffin Tissue in Hagfishes. The Biology of Hagfish/ eds. J.M. Jorgensen, J.P. Lomholt, R.E. Weber, H. Malte. London: Chapman & Hall. 480–495. 1998.
59. Rovainen C.M. Neurobiology of lampreys. Physiol. Rev. 59 (4): 1007–1077. 1979.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.4.1007>
60. Jensen D. Intrinsic cardiac rate regulation in the sea lamprey, *Petromyzon marinus* and rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol. 30 (4): 685–690. 1969.  
[https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)92147-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)92147-1)  
[\\_blank10.1016/0010-406X\(69\)92147-1](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)92147-1)
61. Hove-Madsen L., Llach A., Tort L. Quantification of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in rainbow trout atrial myocytes. Pflügers Arch. 438: 545–552. 1999.  
<https://doi.org/10.1007/s004249900082>
62. Haverinen J., Vornanen M. Comparison of sarcoplasmic reticulum calcium content in atrial and ventricular myocytes of three teleost fish species. Am. J. Physiol. 297: R1180–R1187. 2009.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00022.2009>
63. Vornanen M. Temperature and Ca<sup>2+</sup> dependence of [<sup>3</sup>H]ryanodine binding in the burbot (*Lota lota* L.) heart. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290 (2): R345–351. 2006.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00443.2005>
64. Haverinen J., Egginton S., Vornanen M. Electrical Excitation of the Heart in a Basal Vertebrate, the European River Lamprey (*Lampetra fluviatilis*). Physiol. Biochem. Zool. 87 (6): 817–828. 2014.  
<https://doi.org/10.1086/678954>
65. Claridge N., Potter I.C. Oxygen consumption, ventilatory frequency and heart rate of lampreys (*Lampetra fluviatilis*) during their spawning run. J. Exp. Biol. 63 (1): 193–206. 1975.
66. Heimberg A.M., Cowper-Sallari R., Sémon M., Donoghue P.C.J., Peterson K.J. From the Cover: microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 (45): 19379–19383. 2010.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010350107>
67. Yousaf M.N., Amin A.B., Koppang E.O., Vuolteenaho O., Powell M.D. Localization of natriuretic peptides in the cardiac pacemaker of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Acta Histochem. 114 (8): 819–826. 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.02.002>
68. Farrell A.P., Smith F. Cardiac Form, Function and Physiology. Fish Physiology. 36: 155–264. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/bs.fp.2017.07.001>
69. Haverinen J., Vornanen M. Temperature acclimation modifies sinoatrial pacemaker mechanism of the rainbow trout heart. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292: R1023–R1032. 2007.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00432.2006>
70. Farrell A.P., Jones D.R. The heart. Fish Physiology. XIA / eds. W.S. Hoar, D.J. Randall, A.P. Farrell. Academic Press: San Diego. 1–73. 1992.
71. Randall D.J. Functional Morphology of the Heart in Fishes. Am. Zool. 8: 179–189. 1968.  
<https://doi.org/10.1093/icb/8.2.179>

72. Icardo J.M., Colvée E. The atrioventricular region of the teleost heart. A distinct heart segment. *Anat. Rec.* 294 (2): 236–242. 2011.  
<https://doi.org/10.1002/ar.21320>
73. Santer R.M., Cobb J.L.S. The fine structure of the heart of the teleost, *Pleuronectes platessa* L. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie.* 131 (4): 1–14. 1972.  
<https://doi.org/10.1007/BF00307196>
74. Icardo J.M. The Teleost Heart: A Morphological Approach. Ontogeny and phylogeny of the vertebrate heart/ eds. D. Sedmera, T. Wang. New York: Springer. 35–53. 2012.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3387-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3387-3_2)
75. Simões K., Vicentini C.A., Orsi A.M., Cruz C. Myoarchitecture and vasculature of the heart ventricle in some freshwater teleosts. *J. Anat.* 200 (5): 467–475. 2002.
76. Tota B., Cimini V., Salvatore G., Zummo G. Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranchs and teleost fishes. *Am. J. Anat.* 167 (1): 15–32. 1983.  
<https://doi.org/10.1002/aja.1001670103>
77. Tota B., Garofalo F. Fish Heart Growth and Function: From Gross Morphology to Cell Signaling and Back. Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart. Springer Science & Business Media. 55–74. 2012.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3387-3>
78. Tota B., Cerra M.C., Gattuso A. 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. 2010.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.027391>
79. Tessadori, F., van Weerd J.H., Burkhard S.B., Verkerk A.O., de Pater E., Boukens B.J., Vink A., Christoffels V.M., Bakkers J. Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One.* 7 (10): e47644. 2012.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047644>
80. Kolesnikova E.E., Golovina I.V. 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. 2020.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050099>
81. Nilsson S., Abrahamsson T., Grove D.J. Sympathetic nervous control of adrenaline release from the head kidney of the cod, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.* 55 (2): 123–127. 1976.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4492\(76\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0306-4492(76)90034-4)
82. Perry S.F., Fritsche R., Kinkead R., Nilsson S. Control of catecholamine release *in vivo* and *in situ* in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. *J. Exp. Biol.* 155: 549–566. 1991.
83. Fritsche R., Nilsson S. Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. *Fish Ecophysiology* / eds. J.C. Rankin, F.B. Jensen. London: Chapman & Hall. 180–206. 1993.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-011-2304-4>
84. Nilsson S., Holmgren S. Cardiovascular control by purines, 5-hydroxytryptamine, and neuropeptides. *Fish Physiology.* Vol XX (eds W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell), Academic Press, New York. Pp.180–206. 1992.
85. Taylor E.W., Leite C.A.C., Levings J.J. Central control of cardiorespiratory interactions in fish. *Acta histochem.* 111 (3): 257–267. 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.11.006>
86. Stoyek M.R., Croll R.P., Smith F.M. Intrinsic and extrinsic innervation of the heart in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 523 (11): 1683–1700. 2015.  
<https://doi.org/10.1002/cne.23764>
87. Santer R.M. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 89: 1–102. 1985.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-70135-1>
88. Sedmera D., Reckova M., deAlmeida A., Sedmerova M., Biermann M., Volejnik J., Sarre A., Raddatz E., McCarthy R.A., Gourdie R.G., Thompson R.P. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (4): H1152eH1160. 2003.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00870.2002>
89. Stoyek M.R., Quinn T.A., Croll R.P. Zebrafish heart as a model to study the integrative autonomic control of pacemaker function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 311 (3): H676–H688. 2016.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00330.2016>
90. Šolc D. The heart and heart conducting system in the kingdom of animals: A comparative approach to its evolution. *Exp. Clin. Cardiol.* 12 (3): 113–118. 2007.
91. Donald J.A., Vomachka A.J., Evans D.H. Immunohistochemical localization of natriuretic peptides in the brains and hearts of the spiny dogfish *Squalus acanthias* and the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *Cell Tissue Res.* 270 (3): 535–545. 1992.  
<https://doi.org/10.1007/BF00645056>
92. Burggren W.W., Christoffels V.M., Crossley D.A., Enok S., Farrell A.P., Hedrick M.S., Hicks J.W., Jensen B., Moorman A.F.M., Mueller C.A., Skovgaard N., Taylor E.W., Wang T. Comparative cardiovascular physiology: future trends, opportunities and challenges. *Acta Physiol.* 210: 257–276. 2014.  
<https://doi.org/10.1111/apha.12170>
93. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Small functional If current in sinoatrial pacemaker cells of the brown trout (*Salmo trutta fario*) heart despite strong expression of HCN channel transcripts. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 313 (6): R711–R722. 2017.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00227.2017>
94. Baker K., Warren K.S., Yellen G., Fishman M.C. Defective ‘pacemaker’ current (I<sub>h</sub>) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4554–4559. 1997.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4554>
95. Jackson H.A., Marshall C.R., Accili A. The evolution and structural diversification of Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel genes. *Physiol. Genomics.* 29: 231–245. 2007.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00142.2006>
96. Ota K.G., Fujimoto S., Oisi Y., Kuratani S. Late development of hagfish vertebral elements. *J. Exp. Zool.* 320 (3): 129–139. 2013.  
<https://doi.org/10.1002/jez.b.22489>

## ANATOMICAL AND PHYSIOLOGICAL PECULIARITIES OF THE HEART IN JAWLESS AND JAWED FISH

**E. E. Kolesnikova**

*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia  
e-mail: dr-kolesnikova@mail.ru*

The heart of jawless fish (*Cyclostomata*; lamprey, hagfish) and jawed fish (*Teleostei*) is homologous to the heart of higher vertebrates. A study of this organ in archaic *Cyclostomata* and *Teleostei*, which are different in their evolutionary “ages”, genetic characteristics and hypoxia tolerance, is of particular interest in the search for the factors that determine myocardial resistance to oxygen deficiency. *Cyclostomata* and *Teleostei* share the same branchial type of respiration and the presence of only one circle of blood circulation. The principal contractile organ that provides blood circulation, the branchial heart, consists of two chambers. Hagfish make up the oldest class of extant vertebrates whose circulation is maintained by the non-innervated (aneural) branchial heart and three sets of accessory “hearts”. Lampreys are the first vertebrates whose heart receives innervation from the vagus nerve. In turn, *Teleostei* are the first to receive sympathetic innervation of the heart from the vagosympathetic trunks. In the heart of *Cyclostomata* and *Teleostei*, no signs of the cardiac conduction system similar to that in higher vertebrates were found, which does not negate the existence of a well-coordinated mechanism for the propagation of myocardial excitation–contraction coupling. The mechanism of cardiac rhythm generation links the electrical processes that arise in the myocardium with the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN channels). In the heart of hagfish and teleosts, six isoforms of HCN channels are expressed. The regulated distribution density of HCN channels in the myocardium may be a precursor of the cardiac conduction system which characterizes higher vertebrates. The expression of the three cardiac HCN isoforms (HCN2, HCN3 and HCN4) in such a relict taxon as hagfish suggests their presence in the myocardium of the common ancestor of vertebrates before the divergence with *Myxiniiformes*. This may also suggest a particular significance of HCN2, HCN3 and HCN4 in the formation of cardiac activity at the time of the emergence of a multi-chambered myogenic heart. It is assumed that the evolutionary progress in the archaic groups of primitive vertebrates was aimed at the “creation” of a faster effector system for the regulation of cardiac activity and dual (excitatory/inhibitory) control of myocardial functions.

*Key words:* cyclostomes, fish, heart, hypoxia, cardiac conduction system, HCN channels

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА НА ЕГО ЭКСПРЕССИЮ В СЕМЕННИКАХ САМЦОВ КРЫС

© 2021 г. А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>, И. В. Романова<sup>1</sup>, В. Н. Сорокоумов<sup>1,2</sup>, Т. В. Соколова<sup>1</sup>, А. И. Говди<sup>1,2</sup>, И. Ю. Морина<sup>1</sup>, А. А. Перминова<sup>1,3</sup>, А. О. Шпаков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.

После доработки 29.10.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) регулируют тестикулярный стероидогенез, взаимодействуя с ортостерическим сайтом, расположенным во внеклеточном домене рецептора ЛГ (ЛГР). Применение ХГЧ и ЛГ в медицине сопряжено с побочными эффектами, которые обусловлены гиперактивацией ЛГ-зависимых каскадов и развитием резистентности клеток-мишеней к эндогенным гонадотропинам вследствие снижения активности и экспрессии ЛГР. Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с трансмембранным аллостерическим сайтом ЛГР. Целью работы было изучить взаимосвязь между стероидогенными эффектами ХГЧ и тиено[2,3-*d*]пиримидиновых производных (ТР) с активностью ЛГР-агонистов и их способностью влиять на экспрессию гена *Lhr*, кодирующего ЛГР, *in vitro* при действии на первичную культуру клеток Лейдига крысы и *in vivo* при введении самцам крыс. ХГЧ с высокой эффективностью стимулировал продукцию тестостерона на ранней стадии воздействия на клетки Лейдига (через 30 мин) и при однократном введении самцам крыс (через 3 ч), превосходя по этому показателю ТР. Через 1–3 ч после обработки клеток Лейдига и при длительном введении крысам стероидогенный эффект ХГЧ снижался и становился сопоставимым с ТР. В клетках Лейдига и семенниках крыс ХГЧ подавлял экспрессию гена *Lhr*, которая в условиях *in vivo* частично восстанавливалась на 7–10-е сутки, что сопровождалось небольшим повышением стероидогенного эффекта ХГЧ, но существенно ниже его значений в первый день. Обработка соединением ТР03, наиболее активным из изученных ТР, слабо влияла на экспрессию гена *Lhr* в клетках Лейдига и значимо повышала ее в семенниках крыс при длительном введении препарата. Стероидогенный эффект ТР03 положительно коррелировал с экспрессией гена *Lhr*. При обработке стареющих крыс стероидогенный эффект ТР03 снижался, что было ассоциировано с отсутствием его стимулирующего эффекта на экспрессию ЛГР. Таким образом, при длительном введении ТР оказывают умеренно выраженный, стабильный во времени, стимулирующий эффект на продукцию тестостерона, но не снижают экспрессию ЛГР, что предотвращает резистентность семенников к эндогенным гонадотропинам при стимуляции стероидогенеза.

**Ключевые слова:** аллостерический агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, тестикулярный стероидогенез, семенной каналец, хорионический гонадотропин

DOI: 10.31857/S0044452921020017

### ВВЕДЕНИЕ

Эндогенными стимуляторами рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР), относящегося к суперсемейству G-белок-сопряженных рецепторов, являются продуцируемые лютеотропоцитами аденогипофиза гонадотропины – лютеинизирующий гормон (ЛГ) и гипофизарная форма хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Они связывают-

ся с высокоаффинным ортостерическим сайтом, который расположен в значительном по размеру внеклеточном домене рецептора [1]. Результатом такого связывания является активация G<sub>s</sub>-белков, ответственных за стимуляцию аденилатциклазы и цАМФ-зависимых путей, и G<sub>q/11</sub>-белков, осуществляющих стимуляцию фосфолипазы C и кальций-зависимых путей, а также активация регуля-

торных белков  $\beta$ -аррестинов, контролирующих лиганд-опосредуемый эндоцитоз ЛГР и стимуляцию каскада митогенактивируемых протеинкиназ [2, 3]. Несмотря на структурное сходство и связывание с одним и тем же рецептором, ЛГ и ХГЧ функционально различаются, что обусловлено различными путями эволюции их молекул у млекопитающих, которые привели к дивергенции сигнальных путей и внутримолекулярных мишеней ЛГ и ХГЧ у приматов и человека [4]. Так, ЛГ в большей степени контролирует каскад митогенактивируемых протеинкиназ и 3-фосфоинозитидные каскады, в то время как ХГЧ является мощным стимулятором цАМФ-зависимых путей и зависимого от них стероидогенеза.

В медицине для активации рецептора ЛГ обычно используют выделяемый из мочи беременных женщин плацентарный ХГЧ [5, 6]. Несмотря на высокую активность ХГЧ, при длительном использовании его фармакологических доз отмечают десенситизацию ЛГР и развитие резистентности тканей-мишеней к эндогенным гонадотропинам, подавление активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, активацию пролиферативных процессов в гонадах, что может привести к злокачественному перерождению клеток. Вследствие этого последние годы разрабатываются аллостерические агонисты и положительные модуляторы ЛГР, которые специфично, хотя и с более низким сродством в сравнении с гонадотропинами, взаимодействуют с ЛГР. Их мишенями являются аллостерические сайты, расположенные как в трансмембранном канале ЛГР [7, 8], так и в его цитоплазматических петлях [9, 10]. Следует отметить, что в большинстве эволюционно древних G-белок-сопряженных рецепторов ортостерический сайт локализован внутри трансмембранного домена. Вследствие этого предполагают, что в процессе эволюции ЛГР и других рецепторов гликопротеиновых гипофизарных гормонов произошла инверсия ортостерического сайта в аллостерический, причем это произошло сравнительно недавно, что предопределяет появление таких рецепторов только у позвоночных животных [11, 12].

Наибольший интерес среди аллостерических регуляторов ЛГР представляют низкомолекулярные полные агонисты трансмембранного аллостерического сайта рецептора, сконструированные на основе тиено[2,3-*d*]пиримидинов [7, 13, 14]. В условиях *in vivo* при однократном введении самцам крыс даже наиболее активные тиено[2,3-*d*]пиримидиновые производные (ТР) существенно уступали ХГЧ по способности стимулировать продукцию тестостерона [15–17]. В то же время при длительном введении отмечали сближение стероидогенных эффектов аллостерических агонистов и гонадотропина, что может быть обусловлено снижением чувствительности клеток Лейдига к стимуляции гонадотропинами в условиях ХГЧ-индуци-

рованной стимуляции стероидогенеза. Имеются основания полагать, что основной причиной этого являются разнонаправленные изменения экспрессии ЛГР в семенниках крыс, обработанных ТР и ХГЧ.

Одним из основных направлений применения гонадотропинов для коррекции мужских репродуктивных дисфункций в клинике является лечение различных форм гипогонадотропных состояний, а также предотвращение возрастного ослабления стероидогенной функции. Если при лечении гипогонадотропного гипогонадизма чувствительность ЛГР к действию ЛГ, как правило, сохраняется и снижается только в процессе длительной гонадотропиновой терапии, то основной причиной возрастного андрогенного дефицита является резистентность клеток Лейдига к действию ЛГ [18], что делает терапию гонадотропинами в этом случае малоэффективной. Именно этим обусловлено снижение при старении продукции тестостерона клетками Лейдига [19]. Вследствие этого применение аллостерических регуляторов ЛГР могло бы стать хорошей альтернативой препаратам ЛГ и ХГЧ.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение влияния однократного и длительного введения самцам крыс разработанных нами ТР и гонадотропина (ХГЧ) на продукцию тестостерона и интратестикулярную экспрессию гена, кодирующего ЛГР. При этом в случае пятидневного введения одного из таких производных (ТР03) и ХГЧ исследовали молодых и стареющих животных с ослабленной стероидогенной функцией, а также с помощью иммуногистохимического подхода оценивали у них количество и распределение ЛГР в семенниках. Изучали также кратковременные эффекты ТР03 и ХГЧ на уровне тестостерона и экспрессию рецептора ЛГ в условиях *in vitro* при их инкубации с первичной культурой клеток Лейдига крысы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для экспериментов были взяты самцы крыс Wistar возраста 3–4 и 18 месяцев, которых содержали на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Синтез ТР — соединений 5-амино-N-(*m*пет-бутил)-2-(метилтио)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТР03), 5-амино-N-*m*пет-бутил-4-(3-(1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксамидо)фенил)-2-(метил-

сульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP04) и 5-амино-*N*-(*mpet*-бутил)-4-(3-(2-метоксиникотинамидо)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (TP21), осуществляли путем ацилирования 5-амино-4-(3-аминофенил)-*N*-*mpet*-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида, как описано ранее [20, 21]. Структуру синтезированных соединений подтверждали с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии, используя спектрометр Bruker Avance III 400 (“Bruker”, Германия) и масс-спектрометрию высокого разрешения, используя спектрометр micrOTOF (“Bruker”, Германия).

В каждом эксперименте использовали по шесть самцов крыс Wistar одинакового возраста, со сходной массой тела и без видимых признаков патологии. TP растворяли в ДМСО и вводили в/б, однократно или в течение нескольких дней (инъекции выполняли ежедневно в 11.00) в суточных дозах 15 мг/кг/сутки для TP03 и TP04 и 25 мг/кг/сутки для TP21. ХГЧ (“Московский эндокринологический завод”, Россия) вводили подкожно в те же сроки в суточной дозе 50 МЕ/крысу. Используемые дозы препаратов соответствовали тем дозам, которые, по результатам предварительных экспериментов, вызывали эффект, соответствующий половине максимального стероидогенного эффекта TP. Контрольным крысам вместо препаратов вводили ДМСО. Уровень тестостерона оценивали через 3 ч после введения препаратов, перед декапитацией, учитывая то, что в этот период времени стероидогенный эффект гонадотропина еще не снижался, а эффект TP03, TP04 и TP21 выходил на плато. Образцы крови для измерения уровня тестостерона получали из хвостовой вены, наркотизируя крыс с помощью 2%-ного раствора лидокаина (2–4 мг/кг массы тела). Концентрацию тестостерона определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия) и спектрофотометра “Anthos Absorbance Reader 2020” (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия). После забора крови на тестостерон, через 3 ч после последней инъекции препаратов, крыс наркотизировали с помощью ингаляции 4–5% (v/v) изофлураном и забирали у них яички для оценки в них экспрессии генов ЛГР и проведения иммуногистохимического анализа семенных канальцев.

Частично очищенные клетки Лейдига выделяли из семенников самцов крыс в соответствии с методом [22], как описано ранее [23]. Крыс наркотизировали 4–5%-ным изофлураном, декапитировали и извлекали семенники, которые затем декапсулировали и промывали раствором Хенкса, содержащим 20 mM Na-HEPES-буфер (pH 7.4), 0.1% БСА и 0.025 мг/мл ингибитора трипсина (буфер А). В течение 5–10 мин при 34°C проводили диссоциацию клеток семенников с помощью коллагеназы (0.25 мг/мл). Эту процедуру останавливали добавлением пятикратного объема буфера А, удаляли се-

менные канальцы пропусканием образовавшейся суспензии через нейлоновый фильтр ( $d = 100$  мкм). Фильтрат центрифугировали (200 g, 10 мин), и осажденные клетки дважды промывали буфером А. Полученная фракция клеток, наряду с клетками Лейдига, в небольшом количестве содержала герминативные клетки, сперматозоиды и эритроциты. Клетки суспендировали в среде инкубации DMEM/F12 в соотношении 1:1, вносили в 24-луночные планшеты и инкубировали с TP03 (в ДМСО) или ХГЧ (в физиологическом растворе) при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ . Продолжительность инкубации составила 30 мин, 1 и 3 ч. В контрольные пробы добавляли ДМСО. После обработки клеток TP03 или ХГЧ содержимое лунок центрифугировали (10000 g, 5 мин), супернатант отбирали и использовали для определения концентрации тестостерона в инкубационной среде с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия).

Экспрессию мРНК гена *Lhr*, кодирующего ЛГР, в семенниках крыс (*in vivo*) или в осажденных путем центрифугирования (10000 g, 5 мин) культивируемых клетках Лейдига (*in vitro*) оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени, как описано ранее [24]. Для этого из семенников с помощью реагента ExtraRNA (“Evrogen”, Россия) выделяли тотальную РНК. Обратную транскрипцию проводили, используя набор “MMLV RT Kit” (“Evrogen”, Россия). Для количественной оценки экспрессии гена *Lhr* использовали амплификатор 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) и праймеры CTGCGCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev). В качестве референсного использовали ген  $\beta$ -актина (*Actb*). Результаты анализировали с помощью порогового метода  $\Delta\Delta C_t$  и программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ рассчитывали по отношению к контролю.

Для иммуногистохимического анализа ЛГР семенники фиксировали в течение 48 ч (+4°C) в 4%-ном растворе *para*-формальдегида (“Sigma”, США), промывали 0.9% натрий-фосфатным буфером (PBS), погружали в PBS, содержащий 30% сахарозу (4°C) и замораживали на сухом льду с использованием среды Tissue-Tek® (“Sacura Finetek Europe”, Нидерланды). Серии поперечных срезов из различных уровней яичка (6 мкм) готовили с помощью криостата Leica CM-1520 (“Leica Microsystems”, Германия) и монтировали на стеклах Super-Frost/plus (“Menzel”, Германия). В дальнейшем срезы промывали PBS, обрабатывали 0.6% перекисью водорода в PBS (30 мин) для блокирования активности эндогенной пероксидазы, снова промывали PBS (10 мин), а затем тем же буфером, но содержащим 0.1% Тритон X-100 (PBST) (20 мин). Далее срезы инкубировали в течение 1 ч в блокиру-



ющем растворе (3% сыворотки козы и 2% БСА в PBST). Инкубацию с первичными поликлональными антителами кролика к ЛГР крысы ("LSBio", США) осуществляли в 1% блокирующем растворе в разведении 1:1000 в течение ночи при комнатной температуре. После отмывки в PBST (40 мин) срезы инкубировали в течение 1 ч в PBST с вторичными биотинилированными антителами козы против IgG кролика ("VectorLabs", Великобритания) в разведении 1 : 500. Затем срезы в течение 30 мин промывали с помощью PBS и инкубировали в течение 1 ч в PBS, содержащем стрептавидин-пероксидазу ("BioLegend", США) (разведение 1 : 700). После промывки в PBS срезы обрабатывали PBS, содержащим 0.03% перекиси водорода и 0.05% 3,3'-диаминобензидина ("Sigma-Aldrich", США). Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, после чего срезы помещали под покровное стекло с глицерином. Специфичность иммунной реакции контролировали с помощью отрицательного контроля (реакция в отсутствие антител). Микрофотографии (по 20 для каждого животного) с разных уровней семенников были получены с помощью микроскопа "Carl Zeiss Imager A1" (объектив  $\times 20$ , "Carl Zeiss", Германия) с одинаковыми оптическими характеристиками для исследуемых групп животных. Оптические плотности определяли количественно с помощью программы Image J NIH Analysis ("NIH", США). На каждой микрофотографии анализировали пять различных участков семенных канальцев и определяли оптическую плотность ЛГР-иммунопозитивного материала, которую выражали в условных единицах. Результаты нормировали относительно контроля, принятого за 1.00.

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с помощью программы "Microsoft Office Excel 2007". Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех групп — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ . Данные представляли как  $M \pm SEM$ .

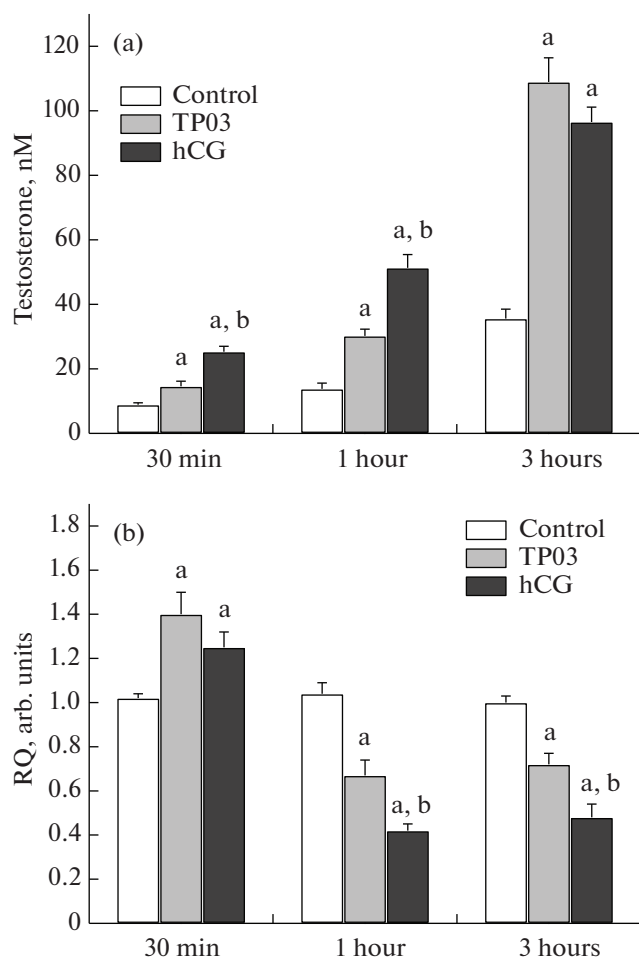
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация тестостерона в инкубационной среде культуры клеток Лейдига, обработанных 10 мкМ ТР03, статистически значимо повышалась через 30 мин, 1 и 3 ч ( $p < 0.05$ ). При этом стероидогенный эффект ХГЧ (1 МЕ/мл) развивался быстрее, и через 30 мин прирост уровня тестостерона, вызываемый гонадотропином, был в три раза выше эффекта ТР03. Однако в дальнейшем эффект ХГЧ нарастал медленнее, чем таковой ТР03 (рис. 1а). Вследствие этого значения  $AUC_{0.5-3}$ , представляющие собой интегрированную площадь под кривой

"концентрация тестостерона (нМ) — время (ч)", для ТР03 и ХГЧ были сходными и составили  $150 \pm 8$  и  $167 \pm 6$  соответственно. При обработке ТР03 и ХГЧ отмечали снижение экспрессии гена *Lhr*, кодирующего ЛГР, но оно было выражено в большей степени в случае гонадотропина и через 1 и 3 ч экспрессия гена *Lhr* в клетках Лейдига, обработанных ТР03, была выше таковой в сравнении с клетками, обработанными ХГЧ (рис. 1б). Эти данные свидетельствуют о том, что при действии на культивируемые клетки Лейдига как аллостерический, так и ортостерический агонисты ЛГР, взятые в концентрациях, вызывающих полумаксимальный стероидогенный ответ, с одинаковой эффективностью стимулируют продукцию тестостерона, а также снижают экспрессию гена *Lhr*, причем ингибирующее влияние гонадотропина выражено в большей степени.

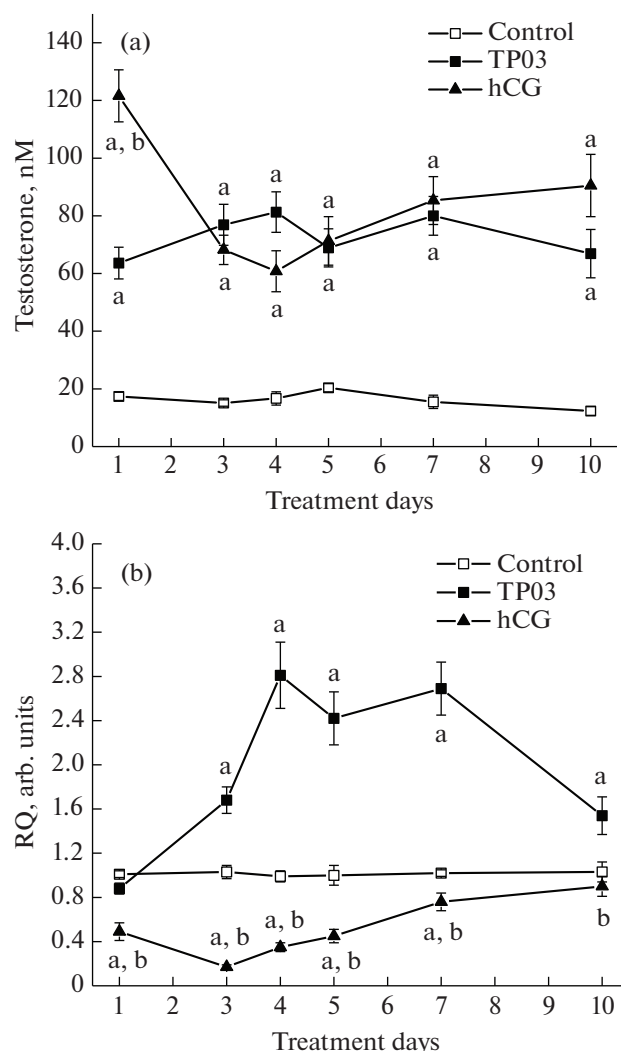
В экспериментах *in vivo* при введении половозрелым трехмесячным самцам крыс ТР наблюдали существенные различия в их эффектах на продукцию тестостерона и экспрессию гена ЛГР в семенниках. При однократном введении стероидогенный эффект ХГЧ (50 МЕ/крысу, п/к) превосходил эффекты ТР03, ТР04 (оба — 15 мг/кг, в/б) и ТР21 (25 мг/кг, в/б) (табл. 1), в то время как при трехдневном введении стероидогенные эффекты ТР и гонадотропина существенно не различались (табл. 1). Исключение составляло только соединение ТР21, которое по своему стероидогенному эффекту в третий день обработки уступало ХГЧ и ТР03 (табл. 1). Через 3 ч после однократного введения ТР03, ТР04 и ТР21 экспрессия гена *Lhr* не менялась, в то время как в случае гонадотропина она снижалась в два раза (табл. 1). На третьи сутки обработки отмечали почти полное подавление экспрессии гена *Lhr* в группе с обработкой ХГЧ, и, напротив, ее повышение в группе с обработкой ТР03. При этом в группах, которым вводили ТР04 и ТР21, экспрессия гена рецептора ЛГ либо не менялась (ТР04), либо имела тенденцию к снижению (ТР21) (табл. 1). При этом отчетливо прослеживается взаимосвязь между величиной стероидогенного эффекта и уровнем экспрессии гена *Lhr*.

На примере соединения ТР03 показано, что при длительной, в течение 10 дней, обработке самцов крыс стероидогенный эффект ТР03 менялся слабо (рис. 2а). Экспрессия гена *Lhr*, увеличиваясь на третий день введения, в дальнейшем оставалась повышенной (рис. 2б). Только на 10-й день обработки отмечали небольшое снижение уровня тестостерона и экспрессии гена ЛГР (рис. 2). Стероидогенный эффект ХГЧ на третий день снижался в сравнении с первым днем обработки, и только на 7-й и 10-й дни в небольшой степени восстанавливался (рис. 2а). В то же время экспрессия гена *Lhr*, достигнув минимума на третий день, затем начинала постепенно повышаться и на 10-й день уже значимо не отличалась от контроля (рис. 2б). Рассчи-



**Рис. 1.** Влияние инкубации первичной культуры клеток Лейдига крысы с аллостерическим агонистом TP03 и гонадотропином на содержание тестостерона в инкубационной среде (a) и экспрессию гена рецептора лютеинизирующего гормона (b). <sup>a</sup> – различия между контролем и группами с обработкой TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между группами с обработкой TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

танные значения  $AUC_{1-10(test)}$  для продукции тестостерона (интегрированная площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ) – время (дни)”) в группах с обработкой TP03 и ХГЧ составили  $664 \pm 22$  и  $741 \pm 32$  и статистически значимо не различались, существенно превышая этот показатель в контроле ( $145 \pm 6$ ,  $p < 0.05$ ). Значение  $AUC_{1-10(expr)}$  для экспрессии гена *Lhr* (интегрированная площадь под кривой “RQ (отн. ед.) – время (дни)”) в группе с обработкой ХГЧ ( $5.0 \pm 0.3$ ) было достоверно ниже значений  $AUC_{1-10(expr)}$  как в контроле ( $9.1 \pm 0.2$ ), так и в группе с обработкой TP03 ( $18.9 \pm 0.9$ ). Таким образом, стероидогенный эффект TP03 был более устойчивым во времени, чем эффект ХГЧ, а обработка крыс аллостерическим агонистом со-



**Рис. 2.** Влияние однократной и длительной обработки самцов крыс с помощью TP03 и ХГЧ на уровень тестостерона в крови (a) и экспрессию гена рецептора лютеинизирующего гормона в семенниках (b). Оценку уровня тестостерона и определение экспрессии гена *Lhr* проводили через 3 ч после введения препаратов. <sup>a</sup> – различия между контролем и группами с обработкой TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между группами с обработкой TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

провождалась не снижением, а повышением тестикулярной экспрессии гена, кодирующего ЛГР.

На заключительном этапе исследовали влияние пятидневного введения TP03 и ХГЧ на стероидогенез, тестикулярную экспрессию гена *Lhr*, а также на плотность и распределение ЛГР-иммунопозитивного материала в семенниках трехмесячных (контроль) и стареющих (18 мес) самцов крыс. Несмотря на снижение базового уровня тестостерона в крови стареющих животных, стероидогенные эффекты TP03 и ХГЧ у них сохранялись, хотя в группе

**Таблица 1.** Влияние однократной и трехдневной обработки самцов крыс с помощью TP03, TP04 и TP21 и гонадотропина на уровень тестостерона в крови и экспрессию гена рецептора лютеинизирующего гормона в семенниках

|                                                                                                 | Контроль,<br>ДМСО/<br>Control, DMSO | ХГЧ, 50<br>МЕ/крысу/<br>hCG, 50 IU/rat | TP03, 15<br>мг/кг/мг/кг    | TP04, 15<br>мг/кг/мг/кг    | TP21, 25<br>мг/кг/мг/кг     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Уровень тестостерона в крови, нМ/Testosterone level in the blood, nM                            |                                     |                                        |                            |                            |                             |
| Однократное введение/Single administration                                                      | 17.4 ± 1.4                          | 121.6 ± 9.0 <sup>a</sup>               | 63.6 ± 5.5 <sup>a,b</sup>  | 52.5 ± 2.8 <sup>a,b</sup>  | 47.8 ± 2.4 <sup>a,b</sup>   |
| Трехдневное введение/3-day administration                                                       | 15.1 ± 1.1                          | 68.2 ± 5.1 <sup>a</sup>                | 76.9 ± 7.1 <sup>a</sup>    | 57.0 ± 2.8 <sup>a</sup>    | 43.4 ± 4.8 <sup>a,b,c</sup> |
| Экспрессия гена <i>Lhr</i> , RQ, отн. Ед/The expression of <i>Lhr</i> gene, RQ, arbitrary units |                                     |                                        |                            |                            |                             |
| Однократное введение/Single administration                                                      | 1.01 ± 0.03                         | 0.49 ± 0.08 <sup>a</sup>               | 0.89 ± 0.05                | 0.94 ± 0.05                | 0.84 ± 0.06                 |
| Трехдневное введение/3-day administration                                                       | 1.03 ± 0.06                         | 0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>               | 1.68 ± 0.12 <sup>a,b</sup> | 1.12 ± 0.11 <sup>b,c</sup> | 0.74 ± 0.08 <sup>b,c</sup>  |

*Примечание.* Оценка уровня тестостерона и определение экспрессии гена *Lhr* проводились через 3 ч после введения препаратов. <sup>a</sup> – различия между контролем и группами с обработкой ХГЧ или TP статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между группами с обработкой ХГЧ и TP статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия между группами с обработкой TP03 и TP04 или TP21 статистически значимы при  $p < 0.05$ . Данные представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Ст + TP уровень тестостерона был существенно ниже, чем в группе К + TP (рис. 3). В семенниках стареющих крыс не было выявлено повышения экспрессии гена *Lhr* при обработке TP03, но в той же степени, как и в контроле, была снижена экспрессия этого гена при обработке гонадотропином (рис. 3).

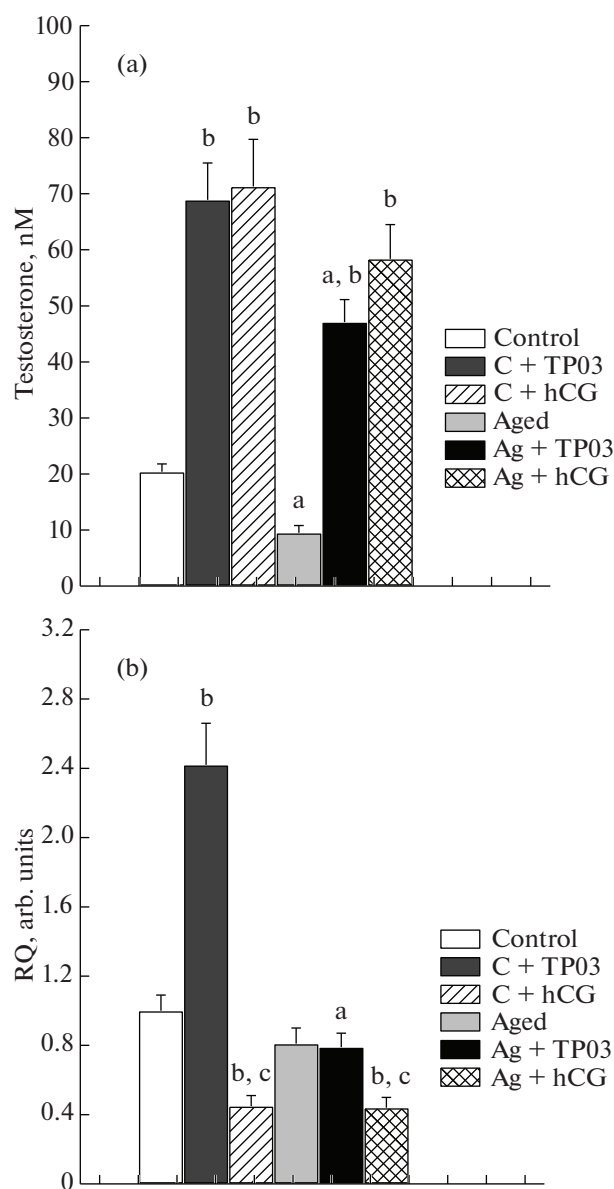
Иммуногистохимический анализ семенников трехмесячных крыс показал, что обработка TP03 приводила к увеличению количества ЛГР-иммунопозитивного материала в семенных канальцах, в то время как обработка ХГЧ на него не влияла (рис. 4a–с, рис. 5). У стареющих крыс число ЛГР существенно не менялось в сравнении с контролем, а их обработка TP03 и ХГЧ снижала количество ЛГР-иммунопозитивного материала, в наибольшей степени в случае гонадотропина (рис. 4d–f, 5). Несмотря на то, что наибольшее количество ЛГР локализовано в клетках Лейдига, основных мишенях ЛГ, ЛГР-иммунопозитивный материал также выявлен в головках созревающих сперматозоидов (рис. 4a–с).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регуляторные эффекты гонадотропинов с ЛГ-подобной активностью – ЛГ, гипофизарной формы ЛГ и плацентарного ХГЧ, а также низкомолекулярных аллоsterических агонистов на основе тиено[2,3-*d*]пиримидинов реализуются через ЛГР [2, 3, 6]. Гонадотропины специфично связываются с внеклеточным доменом ЛГР, где локализован высокоаффинный ортостерический сайт, и потому их относят к ортостерическим лигандам, в то время

как TP проникают внутрь трансмембранного канала ЛГР и взаимодействуют с локализованным там аллоsterическим сайтом, вследствие чего их относят к аллоsterическим агонистам этого рецептора [2, 7, 8, 25]. С одной стороны, в обоих случаях происходит переход ЛГР в активную конформацию, в которой он приобретает способность функционально взаимодействовать с нижележащими трансдукторными белками – G-белками и β-аррестинами, и вызывать ЛГ-зависимые ответы в клетке-мишени. С другой стороны, гонадотропины стабилизируют множество активных конформаций ЛГР, стимулируя сразу несколько внутриклеточных мишеней, в том числе ответственных за десенситизацию и даун-регуляцию ЛГР, в то время как аллоsterические агонисты стабилизируют преимущественно одну активную конформацию ЛГР и потому являются избирательными в отношении ЛГ-зависимых путей [7, 8, 26]. При этом даже в случае ЛГ и ХГЧ наблюдается определенная избирательность активации ими внутриклеточных мишеней, которая сформировалась в процессе коэволюции этих гормонов и специфичного к ним рецептора. Предполагают, что эта избирательность обусловлена различным паттерном аллоsterических влияний на гормон-связанную форму ЛГР [4].

Избирательность регуляции внутриклеточных каскадов является общим свойством аллоsterических регуляторов G-белок-сопряженных рецепторов [27, 28]. Это является следствием происходящей в процессе эволюции аллоsterических влияний на паттерн активных конформаций рецепторов [28]. Другим важным отличием алло-



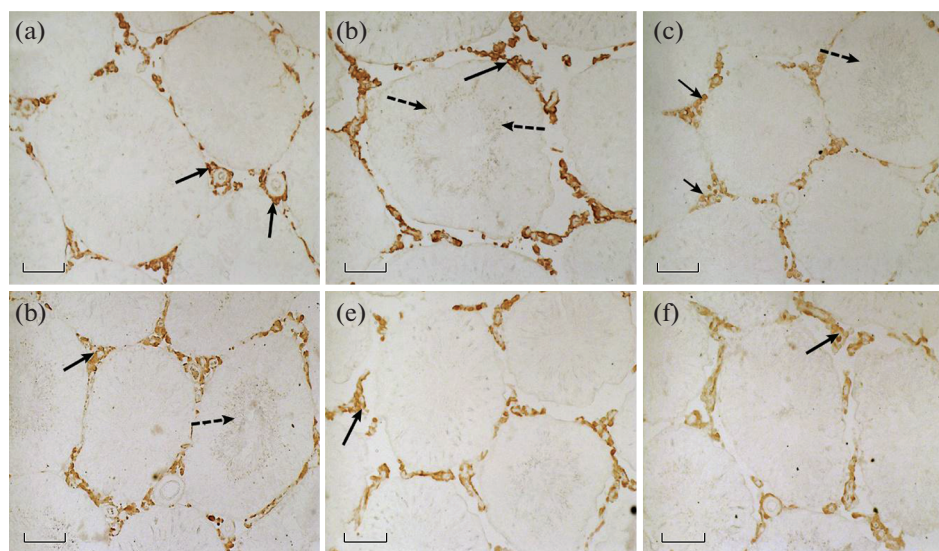
**Рис. 3.** Уровни тестостерона и экспрессия рецептора ЛГ у контрольных и стареющих, 18-тимесячных крыс, и влияние на них обработки TP03 и ХГЧ в течение 5 дней. <sup>a</sup> – различия между группами контрольных и стареющих крыс статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между группами крыс с обработкой TP03 или ХГЧ и без таковой статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия между группами, обработанными TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ .

стерических агонистов от лигандов ортостерического сайта является более мягкая стимуляция внутриклеточных эффекторов, что обусловлено более низким сродством аллостерических агонистов к рецептору [28–30]. Принято считать, что природные аллостерические агонисты эволюционировали от положительных аллостерических модуляторов, постепенно приобретая функции агонистов. В случае TP показано, что они способны

усиливать регуляторные эффекты низких концентраций ХГЧ, оказывая на ЛГ-зависимый сигналинг потенцирующее действие и проявляя тем самым свойства как агонистов, так и положительных модуляторов [25].

Нами показано, что TP03, имеющий наибольший стероидогенный эффект среди разработанных низкомолекулярных агонистов ЛГР, по активности уступает ХГЧ на ранней стадии инкубации с клетками Лейдига (в первые 30 мин) и при однократном введении самцам крыс (через 3 ч). Ранее нами было показано, что TP в существенно меньшей степени стимулируют активность аденилатциклазы в тестикулярных мембранах, выделенных из семенников крысы, в сравнении с гонадотропином [14, 20, 21]. В то же время повышение длительности воздействия на клетки-мишени приводит к существенному изменению соотношений стимулирующих эффектов TP и ХГЧ. Так, уже через 3 ч после инкубации клеток Лейдига с TP03 его стероидогенный эффект не уступал таковому гонадотропина (рис. 1). При введении TP самцам крыс в течение 3 и более дней их стероидогенные эффекты были сопоставимы с таковыми гонадотропина, причем это было справедливо как для контрольных, так и стареющих животных (табл. 1, рис. 2–4). Одной из основных причин этого является снижение экспрессии гена, кодирующего ЛГР, в семенниках крыс, многократно обработанных гонадотропином, а также в клетках Лейдига, инкубированных с ХГЧ в течение 1 ч и более. При этом TP не снижали экспрессию гена *Lhr*, и более того, как продемонстрировано нами для TP03, повышали ее при длительном введении самцам крыс. Необходимо отметить, что в случае длительного введения гонадотропина, на 7-й и 10-й дни обработки, экспрессия гена *Lhr* начинала восстанавливаться, что сопровождалось плавным повышением стероидогенного эффекта ХГЧ, хотя и сильно уступающего таковому в первый день обработки.

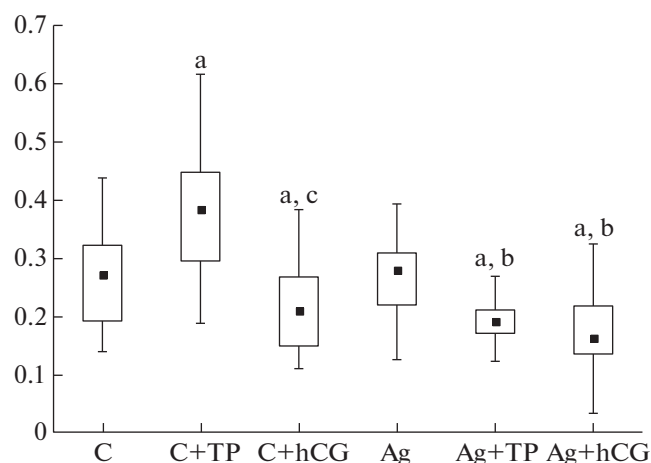
Важнейшим фактором, вызывающим ослабление экспрессии ЛГР, является вызываемая гонадотропином гиперактивация цАМФ-зависимых каскадов, которая происходит на ранних стадиях обработки клеток Лейдига в условиях *in vitro* и самцов крыс в условиях *in vivo*. Недавно было показано, что индуцированная ХГЧ активация цАМФ-зависимых путей и их основного эффекторного звена, протеинкиназы A, в клетках Лейдига повышает экспрессию фарнезоидного рецептора- $\alpha$  (Farnesoid-X-Receptor alpha, FXR $\alpha$ ), основного рецептора желчных кислот. Этот рецептор в семенниках функционирует как транскрипционный фактор, являясь негативным регулятором экспрессии гена *Lhr* [31–33]. Тем самым реализуется короткая отрицательная обратная связь между повышением уровня цАМФ в клетках Лейдига в ответ на стимуляцию гонадотропином и снижением гормональной



**Рис. 4.** Иммуногистохимическое исследование рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) в семенниках трехмесячных (контроль) и стареющих самцов крыс Wistar и влияние на него пятидневной обработки с помощью TP03 и ХГЧ. а – С (К), б – С + TP (К + TP), в – С + hCG (К + ХГЧ), д – Ag (Ст), е – Ag + TP (Ст + TP), ф – Ag + hCG (Ст + ХГЧ). Черные стрелки указывают на ЛГР-иммунопозитивность в клетках Лейдига, локализованных вокруг сосудов и капилляров между извитыми семенными канальцами. Пунктирные стрелки указывают на ЛГР-иммунопозитивность в головках сперматозоидов. Масштаб, 100 мкм.

чувствительности этих клеток [32]. TP более мягко стимулируют продукцию цАМФ на ранних стадиях воздействия на клетки-мишени [20, 21], и тем самым не вызывают гиперактивации протеинкиназы А. Базируясь на этом и на обнару-

женном нами сохранении и даже повышении экспрессии гена *Lhr*, имеются все основания полагать, что TP03 и, возможно, другие TP слабо влияют на активность фактора FXRα, предотвращая тем самым его ингибирующее влияние на экспрессию ЛГР.



**Рис. 5.** Количество рецептора ЛГ в клетках Лейдига трехмесячных (контроль) и стареющих самцов крыс по данным иммуногистохимического анализа и влияние на него обработки TP03 и ХГЧ. По оси ординат – оптическая плотность в условных единицах. <sup>a</sup> – различия с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия между стареющими крысами без введения препаратов и с введением TP03 и ХГЧ статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различие между группами, обработанными TP03 и ХГЧ, статистически значимы при  $p < 0.05$ .

В пользу взаимосвязи между стимулирующим эффектом TP на продукцию тестостерона и их влиянием на экспрессию гена *Lhr* свидетельствуют данные по сравнительному анализу эффективности TP03, TP04 и TP21 при их трехдневном введении самцам крыс. TP03 имел наиболее выраженный стероидогенный эффект и при этом повышал экспрессию гена *Lhr*, в то время как TP21 был наименее активным стимулятором продукции тестостерона, и это было ассоциировано со снижением экспрессии ЛГР (табл. 1). В случае ХГЧ отмечали значительное подавление экспрессии гена *Lhr*, но стероидогенный эффект гонадотропина был сопоставимым с таковым TP03. Это может быть обусловлено тем, что для умеренно выраженной, стабильной во времени, стимуляции ЛГ-зависимых путей в случае воздействия высокоактивного ортостерического агониста достаточно небольшого количества ЛГР в клетках Лейдига. Тем самым при обработке ХГЧ в семенниках крыс запускаются компенсаторные механизмы, которые направлены на предотвращение гиперпродукции тестостерона, и поддерживают стероидогенез на уровне, который сопоставим с таковым при воздействии TP.



У стареющих крыс базовая продукция тестостерона снижалась, что является характерным признаком возрастного ослабления тестикулярной функции [15, 34–36]. При этом нами показано, что стероидогенный эффект ХГЧ при его введении стареющим животным в течение пяти дней сохранялся, в то время как соответствующий эффект ТР03 снижался. Это снижение было ассоциировано с отсутствием стимулирующего влияния ТР03 на тестикулярную экспрессию гена *Lhr*. Следует отметить, что экспрессия этого гена у контрольных и стареющих крыс, получавших ХГЧ, была сходной (рис. 3). Иммуногистохимические исследования показали, что в семенниках трехмесячных крыс, получавших ТР03, количество ЛГР-иммунопозитивного материала повышалось, в то время как у стареющих животных оно было снижено (рис. 4, 5). При этом количество ЛГР-иммунопозитивного материала в семенниках крыс, получавших ХГЧ, снижалось как у молодых, так и у стареющих животных (рис. 4, 5). Одними из причин изменений стимулирующего эффекта ТР03 на экспрессию ЛГР у стареющих крыс могут быть функциональные изменения в тестикулярных гормональных системах, в первую очередь в аденилатциклазной системе и цАМФ-зависимых сигнальных путях [37–40], а также нарушение рибосомального синтеза и посттрансляционного процессинга тестикулярных белков, что характерно для старения и обусловлено усилением окислительного стресса, воспаления, стресса эндоплазматического ретикулаума в семенниках [41, 42].

Таким образом, нами впервые показано, что аллостерические агонисты ЛГР на основе тино[2,3-*d*]пиримидина как при однократном, так и при длительном введении самцам крыс вызывают умеренно выраженный стероидогенный эффект, но при этом не подавляют экспрессии гена *Lhr*, а в случае наиболее активного соединения ТР03 повышают экспрессию этого гена. Это отличает их от ХГЧ, стероидогенный эффект которого в первый день обработки достигает максимума, затем в значительной степени ослабевает, что ассоциировано с подавлением экспрессии гена *Lhr*, и только через 7 дней начинает постепенно восстанавливаться, что обусловлено нормализацией экспрессии ЛГР. Различия в динамике эффектов ТР03 и ХГЧ воспроизводятся и в условиях *in vitro* при воздействии на систему стероидогенеза и экспрессию гена ЛГР в первичной культуре клеток Лейдига. Показано, что структурно различные ТР различаются по стероидогенным эффектам и влиянию на экспрессию гена *Lhr*, что, вероятно, обусловлено особенностями их взаимодействия с трансмембранным аллостерическим сайтом ЛГР. В семенниках стареющих крыс стероидогенный эффект ТР03 при его длительном введении ослабевал, что было ассоциировано с исчезновением его стимулирующего эффекта на экспрессию ЛГР. Все вышесказанное поз-

воляет сделать вывод, что при длительном введении ТР умеренно стимулируют тестикулярный стероидогенез и не вызывают снижения экспрессии ЛГР, что важно для предотвращения развития резистентности семенников к эндогенным гонадотропинам в условиях фармакологической стимуляции стероидогенеза. Этот вывод важен в плане использования аллостерических агонистов ЛГР во вспомогательных репродуктивных технологиях, поскольку препараты ХГЧ и рекомбинантного ЛГ при их введении женщинам с целью обеспечения нормального созревания фолликулов и индукции овуляции вызывают синдром гиперстимуляции яичников, как результат гиперактивации ЛГ-зависимых систем, и провоцируют развитие резистентности яичников к гонадотропинам [2, 6, 43, 44].

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). <sup>1</sup>H-ЯМР исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, для получения масс-спектров высокого разрешения использовано оборудование ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakabayashi K., Kudo M., Hsueh A.J., Maruo T. Activation of the luteinizing hormone receptor in the extracellular domain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 202 (1–2): 139–144. 2003.  
[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(03\)00075-3](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(03)00075-3)
2. Riccetti L., Yvinec R., Klett D., Gally N., Combarnous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A. Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* 7 (1): 940. 2017.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01078-8>
3. De Pascali F., Reiter E.  $\beta$ -arrestins and biased signaling in gonadotropin receptors. *Minerva Ginecol.* 70 (5): 525–538. 2018.  
<https://doi.org/10.23736/S0026-4784.18.04272-7>

4. Casarini L., Santi D., Brigante G., Simoni M. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG. *Endocr Rev.* 39 (5): 549–592. 2018. <https://doi.org/10.1210/er.2018-0006529905829>
5. Choi J., Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Mol. Cell. Endocrinol.* 383 (1-2): 203–213. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.009>
6. Riccetti L., De Pascali F., Gilioli L., Potì F., Giva L.B., Marino M., Tagliavini S., Trenti T., Fanelli F., Mezzullo M., Pagotto U., Simoni M., Casarini L. Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15 (1): 2. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
7. van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G. A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 378 (5): 503–514. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
8. Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6: 142. 2015. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
9. Derkach K.V., Shpakova E.A., Shpakov A.O. Palmitoylated peptide 562–572 of luteinizing hormone receptor increases testosterone level in male rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 158 (2): 209–212. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2724-5>
10. Shpakova E.A., Sorokoumov V.N., Aken'tev A.V., Derkach K.V., Tennikova T.B., Shpakov A.O. The relationship between micelle formation and biological activity of peptide 562–572 of luteinizing hormone receptor modified by decanoyl radicals. *Cell Tissue Biol.* 11 (3): 227–233. 2017. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17030105>
11. Troppmann B., Kleinau G., Krause G., Gromoll J. Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Hum Reprod Update.* 19 (5): 583–602. 2013. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt023>
12. Hollander-Cohen L., Böhm B., Hausken K., Levavi-Sivan B. Ontogeny of the specificity of gonadotropin receptors and gene expression in carp. *Endocr Connect.* 8 (11): 1433–1446. 2019. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0389>
13. van de Lagemaat R., Raafs B.C., van Koppen C., Timmers C.M., Mulders S.M., Hanssen R.G. Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology.* 152 (11): 4350–4357. 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
14. Shpakov A.O., Dar'in D.V., Derkach K.V., Lobanov P.S. The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenyl cyclase systems in the rat testes. *Dokl. Biochem. Biophys.* 456: 104–107. 2014. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
15. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Sharova T.S., Shpakov A.O. Decrease in the basal and luteinizing hormone receptor agonist-stimulated testosterone production in aging male rats. *Adv. Gerontol.* 9 (2): 179–185. 2019. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020036>
16. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O. Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* 484 (1): 78–81. 2019. <https://doi.org/10.1134/S1607672919010216>
17. Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A., Dar'in D.V., Sorokoumov V.N., Romanova I.V., Morina I.Y., Stepochkina A.M., Shpakov A.O. Comparative Study of the Steroidogenic Effects of Human Chorionic Gonadotropin and Thieno[2,3-D]pyrimidine-Based Allosteric Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in Young Adult, Aging and Diabetic Male Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (20): 7493. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
18. Harman S.M., Metter E.J., Tobin J.D., Pearson J., Blackman M.R.; Baltimore Longitudinal Study of Aging. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2): 724–731. 2001. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7219>
19. Midzak A.S., Chen H., Paoadopoulous V., Zirkin B.R. Leydig cell aging and the mechanisms of reduce testosterone synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (1): 23–31. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.07.016>
20. Derkach K.V., Legkoduikh A.S., Dar'in D.V., Shpakov A.O. The stimulating effect of thienopyrimidines structurally similar to Org 43553 on adenylate cyclase activity in the testes and on testosterone production in male rats. *Cell Tissue Biol.* 11 (1): 73–80. 2017. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
21. Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O. In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 10 (4): 294–300. 2016. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
22. Abayasekara D.R., Kurlak L.O., Band A.M., Sullivan M.H., Cooke B.A. Effect of cell purity, cell concentration, and incubation conditions on rat testis Leydig cell steroidogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27 (3): 253–259. 1991. <https://doi.org/10.1007/BF02630926>
23. Бахтыуков А.А., Соколова Т.В., Дарьин Д.В., Деркач К.В., Шпачков А.О. Сравнительное изучение стимулирующего эффекта низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина на стероидогенез в клетках Лейдига крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 103 (10): 1181–1192. 2017 [Bakhtyukov A.A., Sokolova T.V., Dar'in D.V., Derkach K.V., Shpakov A.O. The comparative study of the stimulating effect of low-weight-molecular agonist of the luteinizing hormone receptor and the hu-

- man chorionic gonadotropin on the steroidogenesis in the rat Leydig cells. *Russ. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova*. 103 (10): 1181–1192. 2017. (In Russ)].
24. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepankina A.M., Shpakov A.O.* A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Series A: Memb. Cell Biol.* 13 (4): 301–309. 2019.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
  25. *Shpakov A.O., Derkach K.V.* The new pharmacological approaches for the regulation of functional activity of G protein-coupled receptors (Chapter 6). In: *Evolutionary Physiology and Biochemistry – Advances and Perspectives*. Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 61–74. 2018.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.73322>
  26. *Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor. *Cell Tissue Biol.* 11 (6): 475–482. 2017.  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17060037>
  27. *Kenakin T., Christopoulos A.* Signalling Bias in New Drug Discovery: Detection, Quantification and Therapeutic Impact. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 12: 205–216. 2013.  
<https://doi.org/10.1038/nrd3954>
  28. *Lindsley C.W., Emmitte K.A., Hopkins C.R., Bridges T.M., Gregory K.J., Niswender C.M., Conn P.J.* Practical Strategies and Concepts in GPCR Allosteric Modulator Discovery: Recent Advances with Metabotropic Glutamate Receptors. *Chem. Rev.* 116 (11): 6707–6741. 2016.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00656>
  29. *Wenthur C.J., Gentry P.R., Mathews T.P., Lindsley C.W.* Drugs for Allosteric Sites on Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54: 165–184. 2014.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134525>
  30. *Foster D.J., Conn P.J.* Allosteric Modulation of GPCRs: New Insights and Potential Utility for Treatment of Schizophrenia and Other CNS Disorders. *Neuron*. 94 (3): 431–446. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.016>
  31. *Baptissart M., Martinot E., Vega A., Sédes L., Rouaisnel B., de Haze A., Baron S., Schoonjans K., Caira F., Volle D.H.* Bile acid-FXR $\alpha$  pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget*. 7 (15): 19468–19482. 2016.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>
  32. *Holota H., Thirouard L., Garcia M., Monroe M., de Haze A., Saru J.P., Caira F., Beaudoin C., Volle D.H.* Fxr $\alpha$  gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194: 105460. 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2019.105460>
  33. *Holota H., Thirouard L., Monroe M., Garcia M., De Haze A., Saru J.P., Caira F., Beaudoin C., Volle D.H.* FXR $\alpha$  modulates leydig cell endocrine function in mouse. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518: 110995. 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110995>
  34. *Wang Y., Chen F., Ye L., Zirkin B., Chen H.* Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. *Reproduction*. 154: 111–122. 2017.  
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0064>
  35. *Kaufman J.M., Lapauw B., Mahmoud A., T'Sjoen G., Huhtaniemi I.T.* Aging and the Male Reproductive System. *Endocr. Rev.* 40: 906–972. 2019.  
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00178>
  36. *Zhou S.J., Zhao M.J., Yang Y.H., Guan D., Li Z.G., Ji Y.D., Zhang B.L., Shang X.J., Xiong C.L., Gu Y.Q.* Age-related changes in serum reproductive hormone levels and prevalence of androgen deficiency in Chinese community-dwelling middle-aged and aging men: Two cross-sectional studies in the same population. *Medicine*. 99: e18605. 2020.  
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018605>
  37. *Sokanovic S.J., Janjic M.M., Stojkov N.J., Baburski A.Z., Bjelic M.M., Andric S.A., Kostic T.S.* Age related changes of cAMP and MAPK signaling in Leydig cells of Wistar rats. *Exp Gerontol.* 58: 19–29. 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.07.004>
  38. *Baburski A.Z., Sokanovic S.J., Andric S.A., Kostic T.S.* Aging has the opposite effect on cAMP and cGMP circadian variations in rat Leydig cells. *J. Comp. Physiol.* 187 (4): 613–623. 2017.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-016-1052-7>
  39. *Aversa A., Duca Y., Condorelli R.A., Calogero A.E., La Vignera S.* Androgen Deficiency and Phosphodiesterase Type 5 Expression Changes in Aging Male: Therapeutic Implications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10: 225. 2019.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00225>
  40. *Zhao Y., Liu X., Qu Y., Wang L., Geng D., Chen W., Li L., Tian Y., Chang S., Zhao C., Zhao X., Lv P.* The roles of p38 MAPK  $\rightarrow$  COX2 and NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  COX2 signal pathways in age-related testosterone reduction. *Sci. Rep.* 9 (1): 10556. 2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46794-5>
  41. *Huang D., Wei W., Xie F., Zhu X., Zheng L., Lv Z.* Steroidogenesis decline accompanied with reduced antioxidant and endoplasmic reticulum stress in mice testes during ageing. *Andrologia*. 50 (1). 2018.  
<https://doi.org/10.1111/and.12816>
  42. *Zhao H., Ma N., Chen Q., You X., Liu C., Wang T., Yuan D., Zhang C.* Decline in testicular function in ageing rats: Changes in the unfolded protein response and mitochondrial apoptotic pathway. *Exp. Gerontol.* 127: 110721. 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110721>
  43. *Veldhuis J.D., Liu P.Y., Takahashi P.Y., Keenan D.M.* Dynamic testosterone responses to near-physiological LH pulses are determined by the time pattern of prior intravenous LH infusion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303: 720–728. 2012.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00200.2012>
  44. *Latronico A.C., Arnhold I.J.P.* Gonadotropin resistance. *Endocr. Dev.* 24: 25–32. 2013.  
<https://doi.org/10.1159/000342496>



## THE INFLUENCE OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ALLOSTERIC AGONISTS OF THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR ON ITS EXPRESSION AND DISTRIBUTION IN RAT TESTES

A. A. Bakhtyukov<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>, I. V. Romanova<sup>a</sup>, V. N. Sorokoumov<sup>a,b</sup>, T. V. Sokolova<sup>a</sup>,  
A. I. Govdi<sup>a,b</sup>, I. Yu. Morina<sup>a</sup>, A. A. Perminova<sup>a,c</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Human chorionic gonadotropin (hCG) and luteinizing hormone (LH) regulate testicular steroidogenesis by interacting with the orthosteric site located in the extracellular domain of the LH receptor (LHR). The use of hCG and LH in medicine is fraught with side effects caused by hyperactivation of LH-dependent cascades and the development of resistance of target cells to endogenous gonadotropins due to a decrease in the activity and expression of LHR. An alternative to gonadotropins is low-molecular-weight compounds which interact with the LHR transmembrane allosteric site. The aim of this work was to study the relationship between the steroidogenic effects of hCG and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives (TPDs) with an activity of LHR agonists and their ability to influence the expression of the LHR-encoding *Lhr* gene both *in vitro*, when acting on the primary culture of rat Leydig cells, and *in vivo*, when administered to male rats. hCG stimulated testosterone production with a high efficiency at an early stage of its effect on Leydig cells (after 30 min) and upon a single administration to male rats (after 3 h), exceeding TPDs in activity by this parameter. After 1–3 h of acting on Leydig cells and long-term administration to male rats, the steroidogenic effect of hCG decreased and became comparable to that of TPDs. In Leydig cells and rat testes, hCG suppressed *Lhr* gene expression, which was partially restored *in vivo* on days 7–10 being accompanied by a slight increase in the steroidogenic effect of hCG, though to a significantly smaller extent than on the first day. The treatment with TP03, which was the most active of the TPDs studied, had a little effect on *Lhr* gene expression in Leydig cells but significantly increased it in rat testes after long-term administration of the drug. The steroidogenic effect of TP03 positively correlated with *Lhr* gene expression. When TP03 was applied to aging rats, its steroidogenic effect decreased, most likely, due to the absence of its stimulating effect on LHR expression. Thus, after long-term administration, TPDs exert a moderately expressed, stable over time, stimulating effect on testosterone production but do not decrease LHR expression, which prevents testicular resistance to endogenous gonadotropins under conditions of steroidogenesis stimulation.

**Keywords:** allosteric regulator, luteinizing hormone receptor, chorionic gonadotropin, steroidogenesis, testosterone

## ТОПОГРАФИЯ ГАНГЛИОЗНОГО СЛОЯ СЕТЧАТКИ И РЕТИНАЛЬНОЕ РАЗРЕШЕНИЕ У ГРЕБНЕЗУБОГО ДЕЛЬФИНА *STENO BREDANENSIS* (CETACEA: DELPHINIDAE)

© 2021 г. А. М. Масс<sup>1,\*</sup>, А. Я. Супин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции РАН, Москва, Россия

\*e-mail: alla-mass@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2020 г.

После доработки 22.11.2020 г.

Принята к публикации 05.12.2020 г.

На тотальных препаратах сетчатки выполнено морфологическое исследование ганглиозного слоя сетчатки гребнезубого дельфина *Steno bredanensis*. Составлены карты распределения плотности ганглиозных клеток по поверхности сетчатки. Выявлены две области концентрации ганглиозных клеток: в назальном и темпоральном секторах. Максимальные значения плотности ганглиозных клеток в назальном секторе составили 544 клеток/мм<sup>2</sup>, в темпоральном — 594 клеток/мм<sup>2</sup>. Диаметры ганглиозных клеток лежали в пределах от 12 до 50 мкм, в среднем от 20 до 29 мкм в различных областях сетчатки. Для полученных значений плотности ганглиозных клеток ретиальная разрешающая способность составила 11'.

**Ключевые слова:** сетчатка, ганглиозные клетки, топография, ретиальное разрешение, гребнезубый дельфин

**DOI:** 10.31857/S0044452921020042

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования зрительной системы китообразных выявили особенности организации сетчатки глаза, не характерные для большинства наземных млекопитающих. В первую очередь, это касается областей с высокой концентрацией ганглиозных клеток, которые обеспечивают разрешающую способность сетчатки. Форма и положение этих областей могут быть различными у разных видов китообразных; эти различия зависят от условий обитания и систематического положения вида [1].

Данные о топографии ганглиозных клеток, в том числе о форме и расположении зон повышенной концентрации клеток, были получены при исследовании тотальных препаратов сетчатки (whole mounts). Метод исследования ретиальной топографии на тотальных препаратах оказался полезным также для исследования зрения малодоступных видов морских млекопитающих, для которых применение других методов (электрофизиологических, поведенческих) сложно или практически невозможно. Таким способом были получены данные об организации полей зрения у ряда видов китообразных [2–7].

Организация полей зрения существенно различается у разных видов китообразных. Это различие в значительной степени обусловлено оптическими

свойствами среды обитания. У представителей нескольких семейств зубатых китов (Odontoceti) [2–6] и некоторых усатых китов (Mysticeti) [7, 8], обитающих в водах с высокой прозрачностью, в поле зрения имеется две области высокого разрешения: в назальном и в темпоральном секторах. Принципиально иная организация поля зрения найдена у представителя семейства Iniidae *Inia geoffrensis*, обитающего в речных водах с низкой прозрачностью. Помимо низкой плотности ганглиозных клеток, у них обнаружена только одна зона повышенного разрешения в дорзальной части поля зрения [9].

В связи с данными о зависимости полей зрения от свойств среды обитания китообразных, представляет интерес рассмотрение организации поля зрения у тех видов, образ жизни которых сочетает пребывание в водах как высокой, так и низкой прозрачности. Одним из таких видов является гребнезубый дельфин *Steno bredanensis* Cuvier in Lesson, 1828 (Delphinidae, Odontoceti). Эти дельфины относительно небольшого размера обнаруживаются как в мелких прибрежных водах, так и в глубоких океанических водах тропической и субтропической зон [10]. Зрительная система гребнезубого дельфина практически не изучена. Имеется единственное исследование роговицы глаза (визуальное кератометрическое наблюдение [11]). В литературе нет

сведений ни по морфологии глаза, ни по ретинальной организации, ни по разрешающей способности зрительной системы этого вида. Поэтому неизвестно, в какой степени организация поля зрения у гребнезубого дельфина сходна с таковой у зубатых китов, обитающих в прозрачных или малопрозрачных водах. Решение этого вопроса может способствовать пониманию того, в какой степени организация полей зрения у китообразных зависит от систематического положения вида, а в какой — от условий обитания.

Задача данной работы состояла в том, чтобы исследовать морфологию и геометрические параметры глаза, ретинальную топографию и организацию поля зрения, а также ретинальную разрешающую способность сетчатки гребнезубого дельфина *S. bredanensis*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материал.** Материалом для исследования служили два глаза, взятые у одного взрослого дельфина длиной тела 130 см, найденного на побережье в районе острова Фукуи в Южно-Китайском море в 2002 г. во время работы совместной Российско-Вьетнамской экспедиции. Найденное животное было определено как гребнезубый дельфин *S. bredanensis* Cuvier in Lesson. До исследования материал хранился в 10%-ном буферном формалине, сменяемом ежегодно.

**Подготовка материала.** Оба глаза найденного животного были использованы для приготовления тотальных препаратов сетчатки (wholamounts). Глаза были фиксированы в 10%-ном буферном формалине. Такая фиксация наиболее приемлема для изготовления тотальных препаратов сетчатки большой площади.

Перед извлечением сетчатки делали наружные обмеры глаза (диаметр и аксиальная длина глазного яблока, размеры роговицы и зрачка). Для извлечения сетчатки удаляли роговицу, хрусталик и стекловидное тело, открывая глазной бокал. Измеряли хрусталик и внутренний диаметр глазного бокала. На сетчатке делали насечки для обозначения ее дорзального и вентрального полюсов, после чего отделяли от пигментного эпителия. На извлеченной сетчатке делали несколько радиальных надрезов, которые позволяли наклеить препарат на плоское предметное стекло. Сетчатку наклеивали ганглиозным слоем вверх и высушивали на воздухе. Препарат окрашивали по методу Ниссля 0.1%-ным раствором крезил-виолета. Степень прокраски контролировали визуально и прекращали, когда прокрашивалась поверхностно лежащий ганглиозный слой, без окрашивания глубоких слоев сетчатки. Этим обеспечивалось окрашивание всех поверхностно лежащих ганглиозных клеток, что было важным условием для их подсчета. Окрашенный

препарат дегидратировали в последовательности спиртов возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в заливочную среду Permount (Electron Microscopy Sciences, США). По краям надрезов наблюдали незначительную усадку препарата, возникшую в процессе дегидратации, однако на всей остальной площади фиксации препарата на предметном стекле не страдала.

**Исследование препаратов.** Распределения ганглиозных клеток в тотальном препарате сетчатки исследовали, используя микроскоп Olympus BX41 (Япония). Объектив микроскопа ( $\times 20$ , не иммерсионный) фокусировали на глубину ганглиозного слоя. Подсчет ганглиозных клеток проводили в пределах этого слоя систематически по всей поверхности сетчатки через 1 мм в квадратах  $0.5 \times 0.5$  мм; границы квадратов устанавливали по окулярной сетке, окуляр  $\times 10$ . Координаты участков, в которых подсчитывали клетки, задавали координатами столика микроскопа. Как правило, в квадратах площадью  $0.25 \text{ мм}^2$  насчитывали не менее 20 клеток, а в зонах высокой плотности — до 150 клеток, что мы считали достаточным для картирования с удовлетворительным разрешением. Полученные значения количества клеток в квадратах площадью  $0.25 \text{ мм}^2$  пересчитывали в плотность клеток (количество на  $1 \text{ мм}^2$ ) и для уменьшения разброса данных производили скользящее усреднение в блоках  $2 \times 2$  мм. По этим результатам составляли карты плотности ганглиозных клеток. Для построения карт применяли программы собственной разработки с использованием программной оболочки LabVIEW (National Instruments, США).

Карты распределения ганглиозных клеток использовали также для вычисления общего количества клеток и площади сетчатки. Общее количество клеток определяли как количество клеток во всех квадратах площадью  $\text{мм}^2$  каждый. Площадь сетчатки определяли как количество квадратов площадью  $\text{мм}^2$  каждый.

Размеры клеток измеряли в областях сетчатки с разной плотностью клеток: в областях высокой концентрации (назальной и темпоральной) и в областях низкой концентрации (в дорзальном и вентральном секторах). Измерения проводили на цифровых микрофотографиях, сделанных с выбранных участков тотальных препаратов сетчатки (камера Moticam 2300, Китай), с использованием программы Motic Image Plus 2.0 (Hong Kong). Измеряли площади профилей клеток и полученные значения пересчитывали в диаметр равного по площади круга, который принимали за размер тела клетки.

Более подробно методики изготовления и исследования тотальных препаратов сетчатки описаны в ряде публикаций [12–14], в том числе для водных млекопитающих [15, 16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

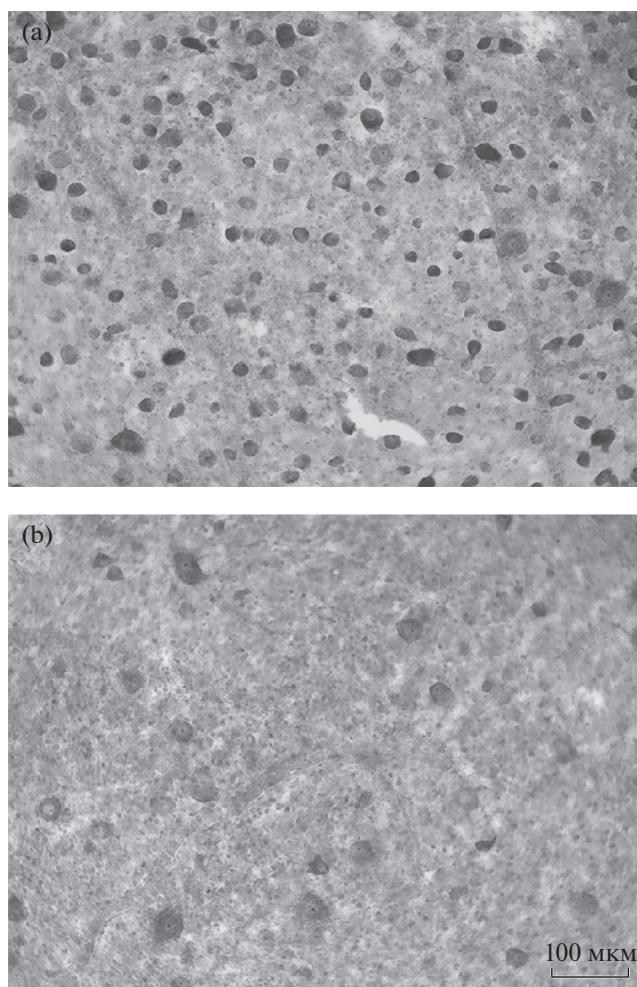
**Геометрические характеристики глаза.** Глаз гребнезубого дельфина имел свойства, характерные для большинства исследованных видов морских китообразных. Глазное яблоко имело конусовидную форму за счет развитых ретракторных мышц, прикрепленных к заднему сегменту глаза. Глазное яблоко было незначительно уплощено в дорзовентральном направлении: горизонтальный диаметр (26.5 мм) был больше вертикального (24.5 мм). Хрусталик был слабо уплощен в аксиальном направлении: диаметр составлял 8 мм, аксиальная длина 7 мм. Зрачок был вытянут горизонтально и имел размеры  $6.5 \times 3.4$  мм. Верхний край радужки образовывал язычок (оперкулюм) U-образной формы. Хорошо развитый яркий сине-зеленый тапетум покрывал все глазное дно, за исключением небольшой вентральной темнопигментированной области. Склера глаза была толстой, передняя камера мелкой. Роговица слабо овальной формы была уплощена в дорзовентральном направлении: ее горизонтальный диаметр составлял 16.5 мм, вертикальный — 15 мм. Выход глазного нерва находился 1–2 мм дорзальнее оси глазного яблока. Диаметр зрительного нерва составлял 3 мм.

**Характеристики ганглиозных клеток.** Для идентификации ганглиозных клеток применяли критерии, предложенные в работах, выполненных на других видах наземных [12, 14, 17–20] и морских [5, 15, 16] млекопитающих. В соответствии с этими критериями, ганглиозными считали мультиполярные клетки поверхностного слоя сетчатки со следующими признаками: 1) размер не менее 10 мкм; 2) большое количество цитоплазмы с интенсивно окрашенными глыбками субстанции Ниссля; 3) хорошо видимое светлое ядро с четким ядрышком (рис. 1). Ядро могло располагаться либо в центре клетки, либо эксцентрично.

Форма ганглиозных клеток была разнообразной. Большинство клеток были круглыми или овальными, иногда с одним четко видимым отростком. Встречались также клетки веретенообразной формы. У очень крупных нейронов были видны места отхождения от сомы клеток одного — двух отростков.

Кроме типичных ганглиозных нейронов ганглиозный слой содержит мелкие клетки с темным крупным ядром и узким ободком цитоплазмы, которые располагались на тех же уровнях, что и ганглиозные нейроны. Такие клетки, согласно критериям, описанным в работах [14, 16–20], считали амакриновыми; их исключали из дальнейшего рассмотрения.

Характерным свойством ганглиозного слоя сетчатки гребнезубого дельфина была низкая плотность ганглиозных клеток: слой составлен редко расположенными нейронами, разделенными большими межклеточными промежутками. Особенно

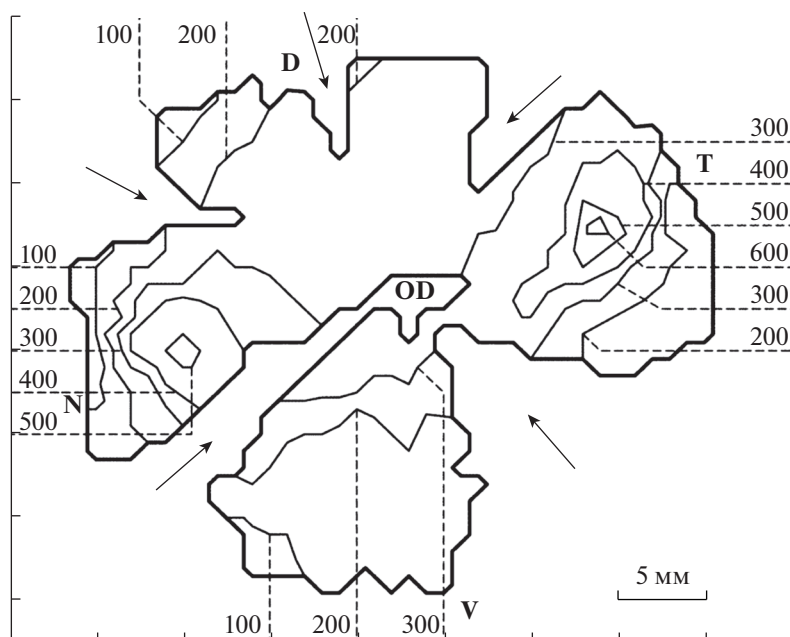


**Рис. 1.** Микрофотографии ганглиозного слоя. (а) В зоне концентрации ганглиозных клеток. (б) В зоне низкой плотности ганглиозных клеток.

большими были межклеточные промежутки в зонах низкой плотности клеток; в зонах повышенной плотности клеток межклеточные промежутки были несколько меньше, как видно на фрагментах тотальных препаратов, представленных на рис. 1.

**Топографическое распределение ганглиозных клеток.** Как видно на микрофотографиях ганглиозного слоя (рис. 1а, 1б), плотность ганглиозных клеток в разных областях сетчатки значительно различается. Количественные данные по топографическому распределению плотности ганглиозных клеток получены на обоих имевшихся тотальных препаратах, условно обозначенных ниже как препараты № 1 (левый глаз) и № 2 (правый глаз).

Площади двух препаратов составили 665 и 780 мм<sup>2</sup> (разница в 17%), в среднем 722 мм<sup>2</sup>. Общее количество ганглиозных клеток сетчатки составило 137 тысяч у препарата № 1 и 147 тысяч у препарата № 2 (разница в 7%), в среднем 142 тысячи.



**Рис. 2.** Карта распределения плотности ганглиозных клеток в тотальном препарате сетчатки гребнезубого дельфина (левый глаз). Плотности клеток обозначены равноуровневыми линиями, значения которых указаны на сторонах карты. D, V, N, T — соответственно дорзальный, вентральный, назальный и темпоральный полюсы сетчатки, OD — оптический диск. Стрелками указаны радиальные разрезы, сделанные для распрямления сетчатки на плоском стекле.

Ганглиозные клетки подсчитывали на всей площади препарата. Если в каком-то квадрате не находили клеток (что было очень редким случаем), на карте ставили «0». На краях радиальных надрезов, где возникала незначительная усадка ткани при дегидратации, не наблюдали повышенной плотности ганглиозных клеток. Это обстоятельство принимали как указание на то, что усадка не оказывала существенного влияния на картирование плотности клеток.

Картирование ганглиозных клеток на обоих препаратах (рис. 2) показало, что сетчатка содержит две зоны повышенной плотности в виде вытянутых овальных областей. На обоих тотальных препаратах области повышенной плотности были сходны по локализации, размеру, форме и ориентации. Одна зона повышенной плотности клеток была расположена в темпоральном квадранте, другая — в назальном квадранте сетчатки. Области максимальной плотности располагались ближе к периферии, чем к центру сетчатки, на расстоянии 12–13 мм от оптического диска. Максимальные плотности клеток в обеих зонах различались незначительно и составили соответственно 544 и 616 клеток/мм<sup>2</sup> (различие 13%) у препарата № 1, 543 и 571 клеток/мм<sup>2</sup> (различие 5%) у препарата № 2. Средние по двум препаратам значения максимумов плотности составляли 544 и 594 клеток/мм<sup>2</sup> (различие 7%) соответственно в назальном и темпоральном квадрантах.

Распределение плотностей ганглиозных клеток на обоих исследованных препаратах демонстрируется профилями распределения плотностей вдоль линии, проходящей через обе зоны повышенной плотности и центр сетчатки (рис. 3). При таком представлении видны два пика повышенной плотности в темпоральном и назальном секторах и значительное снижение плотности между ними.

**Размеры ганглиозных клеток.** На препарате № 1 измерены размеры 440 тел клеток в трех областях сетчатки с различной плотностью ганглиозных клеток. Результаты измерений представлены на рис. 4: а — для темпоральной области высокой плотности, в — для назальной области высокой плотности (в обеих зонах плотность более 500 клеток/мм<sup>2</sup>) и с — для области низкой плотности на периферии назального сектора (плотность около 100 клеток/мм<sup>2</sup>). Размеры клеток лежали в пределах от 12 до 50 мкм. В темпоральной и назальной областях размер сомы клеток лежал в пределах от 12 до 28 мкм, в области низкой плотности — от 14 до 50 мкм. Средние размеры в темпоральной и назальной областях были практически одинаковыми и составляли соответственно 20 и 21 мкм. В области низкой плотности средний размер клеток был больше: 29 мкм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Размеры ганглиозных клеток.** Для сетчатки гребнезубого дельфина характерны крупные ганглиоз-



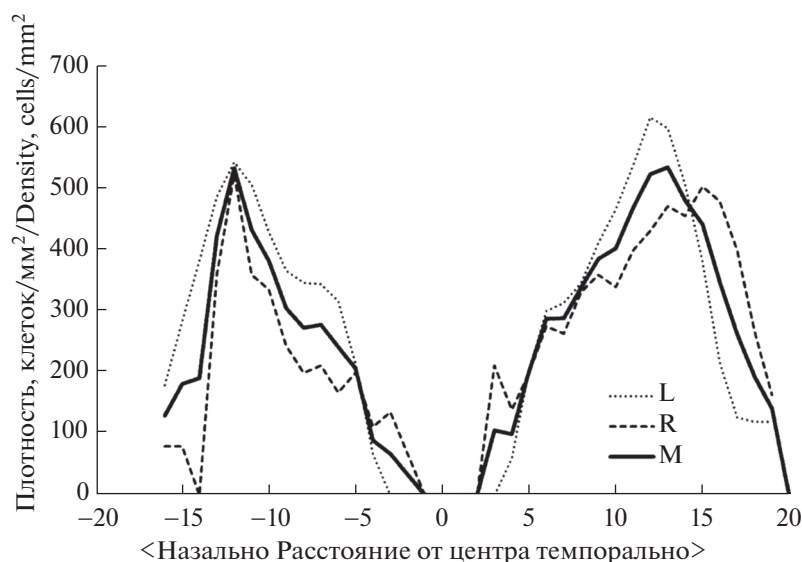


Рис. 3. Распределения плотности ганглиозных клеток вдоль линии, проходящей через зоны высокой плотности и центр препарата. L – левый глаз, R – правый глаз, M – средние значения по двум препаратам.

ные клетки, разделенные большими межклеточными расстояниями. Крупные ганглиозные клетки были описаны ранее у нескольких видов китов и дельфинов [4, 6–8, 21, 22]. У них основная масса клеток имеет диаметры от 20 до 35 мкм, а отдельные нейроны достигают 60–75 мкм и более. В сетчатке косатки *Orcinus orca* были обнаружены гигантские ганглиозные клетки размером от 80 до 100 мкм [5]. Таким образом, размеры основной массы ганглиозных нейронов гребнезубого дельфина в основном сходны с размерами клеток в сетчатке большинства других исследованных китообразных, хотя клетки размером более 50 мкм у гребнезубого дельфина не обнаружены.

**Количество ганглиозных клеток.** Общее количество клеток в сетчатке гребнезубого дельфина (142 тысячи) сопоставимо с таковым у других китообразных: 122 тысячи у кита белухи *Delphinapterus leucas* [4, 6]; 112–199 тысяч в сетчатке косатки *O. orca* [5] и ложной косатки *Pseudorca crassidens* [6]; 220 тысяч у бутылконового дельфина *T. truncatus* [2]. Эти значения близки к данным о количестве волокон в зрительном нерве белухи – 137 тысяч [23], бутылконового дельфина – от 157 до 185 тысяч [22, 24, 25].

**Плотность ганглиозных клеток.** Для сетчатки гребнезубого дельфина характерна относительно низкая, по сравнению с наземными млекопитающими, плотность ганглиозных клеток. Низкая плотность клеток отмечена и у других представителей китообразных. Максимальная плотность ганглиозных клеток в сетчатке гребнезубого дельфина, выявленная в настоящем исследовании (594 клеток/мм² в среднем по двум препаратам) сопоставима со значениями 500–700 клеток/мм² у

других видов дельфинов: бутылконового дельфина *T. truncatus* [2, 26], дельфина Долла *Phocoenoides dalli* [27]. Из всех видов китообразных, обитающих в прозрачной морской воде, самая низкая плотность

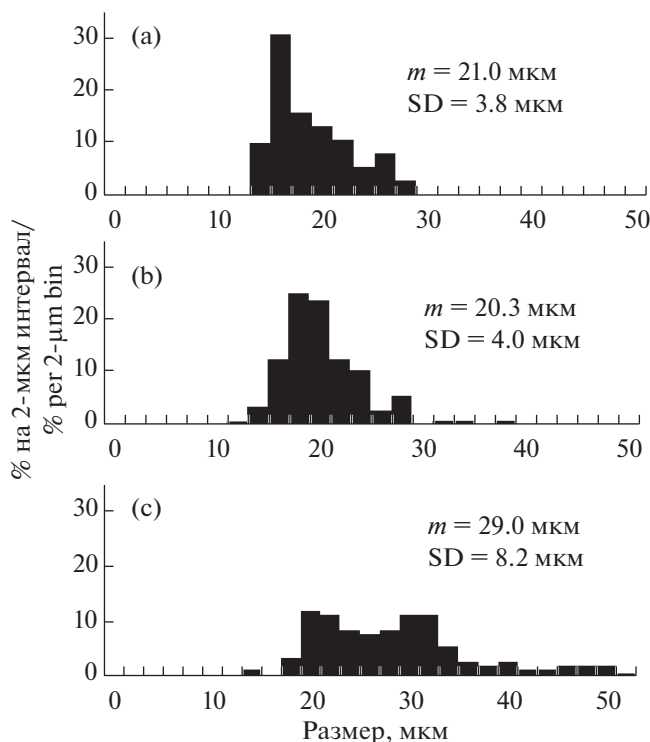


Рис. 4. Распределения размеров ганглиозных клеток. а – Назальная зона концентрации клеток. б – темпоральная зона концентрации клеток. в – периферия сетчатки с низкой плотностью клеток.  $m$  – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

(не более 330 клеток/мм<sup>2</sup>) найдена в сетчатке косатки *O. orca* [5].

Таким образом, плотность ганглиозных клеток в сетчатке гребнезубого дельфина сопоставима с таковыми у других зубатых китов. Эта плотность у зубатых китообразных, в том числе у гребнезубого дельфина, на порядок ниже, чем у наземных хищных, у которых она составляет от 7000 до 14000 клеток/мм<sup>2</sup> [14, 28, 29].

*Топографическое распределение ганглиозных клеток.* Настоящее исследование выявило две области повышенной плотности ганглиозных клеток в сетчатке гребнезубого дельфина. Аналогичная топография ганглиозных клеток с зонами максимальной плотности, локализованными не в центре сетчатки, а на ее периферии, характерна для многих видов китообразных: бутылконового дельфина *T. truncatus* [2], обыкновенного дельфина *D. delphis* [30], дельфина Долла *Ph. Dalli* [31], ложной косатки *P. crassidens* [6], белухи *D. leucas* [4, 6], китайского речного дельфина *Lipotes vexillifer* и бесперой морской свиньи *Nephocaena phocaenoides* [32], дельфина тукаши *Sotalia fluviatilis* [3]. Исключение составляет амазонский речной дельфин *Inia geoffrensis*, живущий в мутной воде в условиях низкой освещенности. Этот вид имеет лишь одну область повышенной плотности ганглиозных клеток, расположенную в вентральной области сетчатки, проецирующуюся в верхний сектор поля зрения, где освещенность выше [9].

Возможное функциональное значение двух зон повышенной плотности ганглиозных клеток рассматривалось ранее в связи со способностью использовать различные области сетчатки для рассматривания объектов и в воде, и в воздухе [2]. Две области повышенной плотности клеток коррелируют с формой зрачка китообразных, у которых верхний край радужки глаза образует выступ (оперкулюм). При сокращении зрачка оперкулюм выдвигается, так что зрачок приобретает U-образную форму, а при значительном перекрытии зрачок превращается в две щелевидные апертуры, расположенные в темпоральной и назальной его частях [33–35]. Эти апертуры расположены напротив областей повышенной плотности ганглиозных клеток в темпоральной и назальной областях сетчатки. Свет попадает на области повышенной плотности ганглиозных клеток, проходя через периферические области роговицы, затем через щелевидные апертуры зрачка и сферический хрусталик. При высокой освещенности (что характерно для зрения в воздухе) свет попадает на сетчатку через периферическую часть роговицы, которая имеет значительно меньшую кривизну, чем остальная поверхность роговицы. Благодаря меньшей кривизне периферии роговицы уменьшается миопия, в воздухе образуется эмметропичное “оптическое окно” [11, 36, 37]. При этом используется темпо-

ральная зона сетчатки, обеспечивающая фронтальное зрение и, возможно, бинокулярное зрение [38]. При открытом зрачке (при слабой освещенности под водой) свет попадает через расширенный зрачок на все области повышенной плотности, обеспечивая широкое поле монокулярного зрения. Но кривизна роговицы при этом не создает миопии, поскольку коэффициенты преломления перед роговицей (вода) и за ней (жидкость передней камеры глаза) практически одинаковы. Благодаря такому сочетанию оптической системы глаза и организации сетчатки китообразные имеют практически эмметропичное зрение как в воде, так и в воздухе.

*Разрешающая способность сетчатки.* Разрешающая способность сетчатки может быть определена как среднее угловое расстояние между соседними ганглиозными клетками. Среднее *линейное* расстояние может быть выведено из данных о плотности ганглиозных клеток простым вычислением:

$$L = 1/\sqrt{D}, \quad (1)$$

где  $L$  (мм) — расстояние и  $D$  (клеток/мм) — плотность. Чтобы перевести линейное расстояние в угловое, необходимо знать расстояние от задней узловой точки оптической системы до сетчатки (постеронодальное расстояние):

$$\alpha = 180L/\pi r = 180/\pi r \sqrt{D}, \quad (2)$$

где  $\alpha$  (град) — угловое расстояние между клетками и  $r$  (мм) — постеронодальное расстояние. Значение  $D$  было получено в результате данного исследования, но постеронодальное расстояние  $r$  в данном исследовании не было измерено ввиду ограниченности доступного материала. В качестве первого приближения можно исходить из того, что оптическая система глаза дельфина центрально симметрична, причем центром системы является общая точка центра хрусталика и центра ретиальной полусферы. Поскольку в воде роговица не работает как светопреломляющий элемент, единственным светопреломляющим элементом должен быть почти сферический хрусталик. В этом случае единственная нодальная точка оптической системы совпадает с центром хрусталика, а значит и с центром ретиальной полусферы, а постеронодальное расстояние равно радиусу ретиальной полусферы. При диаметре глазного бокала (среднее значение между вертикальным и горизонтальным диаметрами) 25.5 мм, постеронодальное расстояние может быть принято равным 12.75 мм. Это значение — приблизительная оценка, основанная на ряде допущений, однако оно может быть использовано, чтобы в первом приближении оценить ретиальную разрешающую способность. Подставляя в выражение (2) среднее значение плотности ганглиозных клеток в областях максимальной их концентрации (594 клеток/мм<sup>2</sup>) и принятое значение постеронодального расстояния (12.75 мм), получаем:  $\alpha = 0.18^\circ = 11'$ . Это значение близко к



**Таблица 1.** Ретиальная разрешающая способность некоторых китообразных

| Вид                             | Ретиальное разрешение в угловых минутах | Ссылки |
|---------------------------------|-----------------------------------------|--------|
| <b>Морские дельфины</b>         |                                         |        |
| Обыкновенный дельфин            | 8                                       | [30]   |
| Бутылконосый дельфин            | 9                                       | [2]    |
|                                 | 8                                       | [34]   |
| Дельфин Долла                   | 11.5                                    | [31]   |
| Ложная косатка                  | 9.3                                     | [6]    |
| Тихоокеанский белобокий дельфин | 11.2                                    | [6]    |
| Белуха                          | 11.8                                    | [6]    |
|                                 | 14.4                                    | [4]    |
| Косатка                         | 9.6                                     | [5]    |
| <b>Речные дельфины</b>          |                                         |        |
| Тукаши                          | 25                                      | [3]    |
| Амазонский речной дельфин       | 40                                      | [9]    |
| <b>Настоящие киты</b>           |                                         |        |
| Серый кит                       | 11                                      | [7]    |
| Полосатик Брайда                | 6.3*                                    | [8]    |
| Горбач                          | 9.1*                                    | [8]    |
| <b>Данное исследование</b>      |                                         |        |
| Гребнезубый дельфин             | 11                                      |        |

Данные ретиального разрешения рассчитаны по плотности ганглиозных клеток для водной среды (преломление света на роговице игнорируется). Данные, отмеченные знаком \*, представлены авторами в цикл/град и пересчитаны в угловое разрешение, принимая, что угловое разрешение равно половине цикла, т.е.  $R = 60/2F$ , где  $R$  — разрешение в угловых минутах и  $F$  — разрешение в цикл/град, множитель 60 переводит полученные значения ретиального разрешения из градусов в минуты.

оценкам ретиального разрешения, полученным у других зубатых китообразных (как семейства Delphinidae, так и других семейств), обитающих в прозрачных океанических водах (табл. 1).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Топография ганглиозного слоя и разрешающая способность сетчатки гребнезубого дельфина принципиально не отличаются от таковых у других зубатых китообразных, обитающих в океанических водах. Особенности условий обитания этого вида (как прибрежные воды низкой прозрачности, так и океанические воды высокой прозрачности) не отражаются в особенностях организации сетчатки.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Бюджетное финансирование ИПЭЭ РАН.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е. и В. Родионовым за помощь в получении материала.

## ВКЛАД АВТОРОВ

А.М. Масс: постановка задачи, обработка материала, исследование препаратов, подготовка рукописи, А.Я. Супин: программы обработки данных, количественный анализ данных, подготовка рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mass A.M., Supin A.Ya. Adaptive features of aquatic mammal's eye. Anat. Rec. 290: 701–715. 2007.
2. Mass A.M., Supin A.Ya. Ganglion cells topography of the retina in the bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. Brain, Behav. Evol. 45: 257–265. 1995.
3. Mass A.M., Supin A.Ya. Retinal topography and visual acuity in the riverine tucuxi, (*Sotalia fluviatilis*). Marine Mammal Sci. 15: 351–365. 1999.
4. Mass A.M., Supin A.Ya. Visual field organization and retinal resolution of the beluga, *Delphinapterus leucas* (Pallas). Aquatic Mammals. 28: 241–250. 2002.
5. Mass A.M., Supin A.Y., Abramov A.V., Mukhametov L.M., Rozanova E.I. Ocular anatomy, ganglion cell distribution, and retinal resolution of a killer whale (*Orcinus orca*). Brain Behav. Evol. 81: 1–11. 2013.
6. Murayama T., Somiya H. Distribution of ganglion cells and object localizing ability in the retina of three cetaceans. Fisheries Sci. 64: 27–30. 1998.
7. Mass A.M., Supin A.Ya. Ocular anatomy, retinal ganglion cell distribution, and visual resolution in the gray whale, *Eschrichtius gibbosus*. Aquatic Mammals. 23: 17–28. 1997.
8. Lisney T.J., Collin S.P. Retinal topography in two species of ballen whale (Cetacea: Mysticety). Brain Behav. Evol. 92: 97–116. 2018.
9. Mass A.M., Supin A.Ya. Distribution of ganglion cells in the retina of an Amazon river dolphin, *Inia geoffrensis*. Aquatic Mammals. 15: 49–56. 1989.
10. West K.L., Mead J.G., White W. Mammalian Sciences *Steno bredanensis* (Cetacea: Delphinidae). Mammalian Species. 43 (886): 177–189. 2011.
11. Dral A.D.G. Problems in image-focusing and astigmatism in cetacea — a state of affairs. Aquatic Mammals. 2: 22–28. 1974.
12. Stone J. The wholemount handbook. A guide to the preparation and analysis of retinal wholemounts. Maitland, Sidney, 1981. 129 pp.
13. Ullmann J.F.P., Moore B.A., Templ S.E., Fernandez-Juricic E., Collin S.P. The retinal wholemount technique: a window to understanding the brain and behaviour. Brain, Behav. Evol. 79: 26–44. 2012.
14. Peichl L. Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. J. Comp. Neurol. 324: 603–620. 1992.

15. Mass A.M., Supin A.Y. Retinal ganglion cell layer of the Caspian seal *Pusa capsica*: Topography and localization of the high-resolution area. *Brain, Behav. Evol.* 76: 144–153. 2010.
16. Hanke F.D., Peichl L., Dehnhardt G. Retinal ganglion cell topography in juvenile harbor seals (*Phoca vitulina*). *Brain, Behav. Evol.* 74: 102–109. 2009.
17. Hughes A. Population magnitudes and distribution of the major modal classes of cat retinal ganglion cells as estimated from HRP filling and systematic survey of the soma diameter spectra for classical neurons. *J. Comp. Neurol.* 197: 303–339. 1981.
18. Wong R.O.L., Wye-Dvorak J., Henry G.H. Morphology and distribution of neurons in the retina ganglion cell layer of the adult Tammar wallaby *Macropus eugenii*. *J. Comp. Neurol.* 253: 1–12. 1986.
19. Wässle H., Hoon C.M., Müller F. Amacrine cells in the ganglion cell layer of the cat retina. *J. Comp. Neurol.* 265: 391–408. 1987.
20. Wong R.O.L., Hughes A. The morphology, number and distribution of a large population of confirmed displaced amacrine cells in the adult cat retina. *J. Comp. Neurol.* 255: 159–177. 1987.
21. Dawson W.W., Perez J.M. Unusual retinal cells in the dolphin eye. *Science*. 181: 747–749. 1973.
22. Dawson W.W., Hawthorne M.N., Jenkins R.L., Goldston R.T. Giant neural system in the inner retina and optic nerve of small whales. *J. Comp. Neurol.* 205: 1–7. 1982.
23. Pütter A. Die Augen der Wassersaugetiere. *Zool. Jahrb. Abth. Anat. Ontog. Thiere.* 17: 99–402. 1903.
24. Jacobs M.S. Further fiber counts of cetacean cranial nerve. *Anat. Rec.* 175: 505–506. 1973.
25. Morgane P.J., Jacobs M.S. Comparative anatomy of the cetacean nervous system. *Functional anatomy of marine mammals*. Ed. R.J. Harrison, New York, Academic Press, 117–244. 1972.
26. Dral A.D.G. On the retinal anatomy of Cetacea (mainly *Tursiops truncatus*). *Functional Anatomy of Marine Mammals*. Ed. R. J. Harrison. London, Acad. Press. 3: 81–134. 1977.
27. Murayama T., Fujise Y., Aoki I., Ishii T. Histological characteristics and distribution of ganglion cells in the retina of the Dall's porpoise and minke whale. In: *Marine Mammal Sensory Systems*, eds. J.A. Thomas, R.A. Kastlein, A.Ya. Supin, New York: Plenum, 137–145. 1992.
28. Stone J. The number and distribution of ganglion cells in the cat's retina. *J. Comp. Neurol.* 180: 753–772. 1978.
29. Calderone J.B., Reese B.E., Jacobs G.H. Topography of photoreceptors and retinal ganglion cells in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). *Brain, Behav. Evol.* 62: 182–192. 2003.
30. Dral A.D.G. The retinal ganglion cells of *Delphinus delphis* and their distribution. *Aquatic Mammals*. 10: 57–68. 1983.
31. Murayama T., Somiya H., Aoki I., Ishii T. Retinal ganglion cell size and distribution predict visual capabilities of Dall's porpoise. *Marine Mammal Sci.* 11: 136–149. 1995.
32. Gao A., Zhou K. On the retinal ganglion cells of *Neophocaena* and *Lipotes*. *Acta Zool. Sin.* 33: 316–332. 1987.
33. Rochon-Duvigneaud A. L'oeil des cétacés. *Archives Museum National Histoire Naturelle Paris*. 16. 1939.
34. Herman L.M., Peacock M.F., Yunker M.P., Madsen C.J. Bottlenosed dolphin: Double-slit pupil yields equivalent aerial and under water diurnal acuity. *Science*. 189: 650–652. 1975.
35. Dawson W.W., Adams C.K., Barris M.C., Litzkov C.A. Static and kinetic properties of the dolphin pupil. *Am. J. Physiol.* 237: R301–R305. 1979.
36. Dral A.D.G. Aquatic and aerial vision in the bottle-nosed dolphin. *Neth. J. Sea Res.* 5: 510–513. 1972.
37. Dawson W.W., Schroeder J.P., Sharpe S.N. Corneal surface properties of two marine mammal species. *Marine Mammal Sci.* 3: 186–197. 1987.
38. Dawson W.W. The Cetacean Eye. *Cetacean Behavior: Mechanisms and Functions*. Ed. L.M. Herman. New York, Wiley. 53–100. 1980.

## TOPOGRAPHY OF THE GANGLION RETINAL LAYER AND RETINAL RESOLUTION IN THE ROUGH-TOOTHED DOLPHIN *STENO BREDANENSIS* (CETACEA: DELPHINIDAE)

A. M. Mass<sup>a,#</sup> and A. Ya. Supin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: alla-mass@mail.ru

Morphological investigation of the retinal ganglion layer in the rough-toothed dolphin *Steno bredanensis* was performed using the retinal wholemount technique. Mapping of the distribution density of ganglion cells revealed two areas of their concentration: in the nasal (544 cells/mm<sup>2</sup>) and temporal (594 cells/mm<sup>2</sup>) quadrants. Ganglion cell diameters ranged from 12 to 50 μm, with mean values varying from 20 to 29 μm in different areas. The obtained cell distribution density corresponded to a retinal resolution of 11'.

**Key words:** retina, ganglion cells, topography, retinal resolution, rough-toothed dolphin

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕРАЦИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ В 4-АМИНОПИРИДИНОВОЙ МОДЕЛИ В СРЕЗАХ МОЗГА КРЫСЫ

© 2021 г. Е. Ю. Смирнова<sup>1,2,3,\*</sup>, Д. С. Синяк<sup>2</sup>, А. В. Чижов<sup>2,3</sup>, А. В. Зайцев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 01.09.2020 г.

После доработки 09.11.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

Известно, что эпилептические приступы (иктальные разряды, длящиеся десятки секунд) легче провоцируются в раннем возрасте, тогда как мозг взрослых более устойчив к этой форме патологической активности. Считается, что большая склонность к возникновению эпилептической активности обусловлена преобладанием возбуждения над торможением в развивающемся мозге. Однако какие конкретно молекулярные и нейрофизиологические механизмы лежат в основе этих возрастных различий — до конца не выяснено. В данной работе мы сравнили иктальную активность, вызванную хемоконвульсантом 4-аминопиридином, в горизонтальных срезах энторинальной коры и гиппокампа 3- и 8-недельных крыс Вистар. У 3-недельных крыс иктальному разряду всегда предшествует легко детектируемая преиктальная активность в виде 3–4-секундных ГАМК-глутаматных событий, а у 8-недельных крыс такие события обычно отсутствуют. Также различается устойчивость генерации иктальных событий по отношению к внешним воздействиям. Генерацию иктальных разрядов в энторинальной коре 8-недельной крысы можно полностью заблокировать и вызвать интериктальную активность (одновременные 1–3-сек пачечные разряды нейронов) с частотой 0.2–0.3 Гц путем частичного ингибирования КСС2-котранспортера или  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы, а также с помощью низкочастотной электрической стимуляции. Такие же воздействия на срезы мозга 3-недельных животных не приводят к подавлению иктальной активности. Таким образом, наши данные показывают, что иктальные разряды в незрелом мозге оказываются устойчивее к внешним воздействиям, чем в мозге 8-недельных животных. Интериктальная и иктальная формы эпилептиформной активности являются антагонистическими у 8-недельных животных, и появление интериктальной активности полностью прерывает генерацию иктальных разрядов, что может быть одним из противоэпилептических механизмов зрелого мозга.

**Ключевые слова:** височная эпилепсия, 4-аминопиридиновая модель, ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы, КСС2-котранспортер,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпа, защитные механизмы

**DOI:** 10.31857/S0044452921020078

### ВВЕДЕНИЕ

Клинические исследования показывают, что чаще всего судороги впервые возникают в раннем детстве [1]. Также известно, что у 2–4% детей в возрасте от 6 мес до 5 лет при повышении температуры тела могут наблюдаться фебрильные судороги [2]. То есть развивающийся мозг в большей степени склонен к генерации эпилептиформной активности, чем мозг взрослого человека [3]. Причиной этого считают преобладание возбуждения над торможением в нервной ткани, которое может быть обусловлено целым рядом причин. Так, в раннем постнатальном периоде развития уровень экспрессии КСС2-котранспортера составляет всего 5–15% от такового во взрослом мозге, тогда как уровень

экспрессии НКСС1, наоборот, значительно понижается с развитием [4–8]. КСС2-котранспортер выводит ионы калия и хлора из клетки, а НКСС1-котранспортер закачивает ионы натрия, калия и хлора в клетку. Поэтому пониженный уровень экспрессии КСС2 и повышенный уровень НКСС1 способствуют повышенному уровню хлорид-ионов в цитоплазме. В таких условиях действие основного тормозного нейромедиатора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) неэффективно и даже может быть возбуждающим, поскольку потенциал реверсии хлорных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов становится выше потенциала покоя.

Другое отличие свойств тормозной системы в незрелом мозге обусловлено тем, что ГАМК<sub>B</sub>-ре-

цептор-опосредованные постсинаптические события формируются на относительно поздних сроках постнатального развития. Например, такие постсинаптические события регистрируются лишь у крыс старше 22 дней [9, 10]. Постсинаптические ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы оказывают тормозное и шунтирующее действие на нейрон, поскольку активируют калиевые каналы — внутренние выпрямители (inward rectifier, IR) [11].

Недавнее исследование выявило возрастные различия в экспрессии субъединиц Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы с помощью иммуоблоттинга [12]. В коре и гиппокампе у взрослой мыши значительно выше уровень экспрессии  $\alpha 1$ - и  $\alpha 3$ -субъединиц Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы по сравнению с 6-м днем постнатального развития. Субъединица  $\alpha 1$  экспрессируется в глии и нейронах,  $\alpha 3$  — только в нейронах [12, 13].

Целью данной работы стало сравнение характеристик эпилептиформной активности в срезах мозга крыс разного возраста, а также поиск защитных нейрофизиологических механизмов, препятствующих генерации икctalного разряда во взрослом мозге.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Приготовление переживающих срезов энторинальной коры и гиппокампа*

В эксперименте использовали 21-дневных и 8-недельных крыс Вистар ( $n = 25$  и 18 соответственно). Животных содержали в стандартных условиях (соотношение день/ночь составило 12 ч/12 ч, температура  $24 \pm 4^\circ\text{C}$ ) со свободным доступом к корму и воде. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН, разработанными на основе международных рекомендаций European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC).

Метод приготовления горизонтальных срезов энторинальной коры и гиппокампа подробно описан ранее [14]. Кратко: крыс декапитировали, затем быстро извлекали головной мозг и помещали его в охлажденную до  $0^\circ\text{C}$  искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ), аэрируемую газовой смесью 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>.

Срезы мозга толщиной 350 мкм нарезали на вибротоме Microm HM650V (Thermo Fisher Scientific, США) и помещали в аэрируемую ИСМЖ при  $35^\circ\text{C}$ . ИСМЖ содержала следующие компоненты (в mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-глюкозы.

### *4-аминопиридиновая модель in vitro*

Для вызова эпилептиформной активности использовался хемоконвульсант 4-аминопиридин (4-АП), который блокирует несколько типов кали-

евых каналов, наиболее важными из которых являются потенциал-зависимые калиевые каналы [15, 16]. В 4-АП модели периодически наблюдается синхронизованная активность всех нейронов локальной сети на протяжении десятков секунд, что описывается как икctalный разряд и считается аналогом эпилептического припадка в целом мозге. В срезах редко могут возникать более короткие залпы активности нейронов длительностью 1–2 с, которые описываются как интерикctalные разряды. В 4-аминопиридиновой модели икctalному разряду часто предшествуют короткие (3–4 с) пачки синхронизованной активности, так называемые преикctalные разряды.

В данной работе эпилептиформную активность вызывали при  $30^\circ\text{C}$  эпилептогенным раствором следующего состава (в mM): 150 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-глюкозы, 0.10 4-АП.

### *Регистрация электрофизиологических показателей нейронов и динамики внеклеточной концентрации ионов калия*

Изготовленные срезы перемещали в перфузируемую камеру, нейроны глубоких слоев энторинальной коры визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse FN1 (Nikon, Япония), оснащенного водно-иммерсионным объективом ( $\times 40$ ), оптическим блоком для дифференциального контраста и цифровой камерой Grasshopper3 GS3-U3-23S6M-C (FLIR, США). Электрофизиологическую регистрацию проводили с помощью усилителя НЕКА ЕРС-10 USB (НЕКА Electronic, Германия) и программного обеспечения PatchMaster v2x90.4 (НЕКА Electronic).

Активность сети отслеживали по генерации потенциалов действия или по постсинаптическим токам репрезентативного нейрона глубоких слоев энторинальной коры, используя метод патч-кламп в конфигурации “целая клетка” в режиме фиксации тока или напряжения, соответственно. Для записей в режиме фиксации тока использовался калий-глюконатный раствор следующего состава (в mM): 135 K-gluconate, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, and 0.3 GTP (pH был доведен до 7.25 с помощью КОН). Для записей в режиме фиксации потенциала использовался цезий-метансульфонатный раствор (в mM): 127 CsMeS, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 ATP-Mg, and 0.3 GTP (pH был доведен до 7.25 с помощью CsOH).

За момент генерации икctalного разряда было принято начало тонической спайковой активности пирамидных нейронов, т.е. порог генерации первого спайка тонической фазы. В режиме фиксации потенциала на уровне  $-27$  мВ этому соответствует точка начала первого входящего (возбуждающего) тока.

Тормозные постсинаптические токи (ТПСТ) были зарегистрированы во время преиктальной активности в срезах мозга 3-недельных крыс методом патч-клампа в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации напряжения на уровне  $-27$  мВ. Преиктальная активность была охарактеризована тремя параметрами: продолжительностью преиктальной активности, амплитудой и длительностью первого ТПСТ. Продолжительность преиктальной активности измерялась как временной интервал между временем начала первого ТПСТ и временем начала иктального разряда.

#### *Регистрация внеклеточной концентрации ионов калия*

Внеклеточную концентрацию калия регистрировали с помощью калиевых электродов, частично заполненных калиевым ионофором I-coat А. Метод изготовления электродов и регистрации подробно описан ранее [17]. После записи концентрации ионов калия рассчитывали по формуле:

$[K^+]_0 = 3.5 \text{ mM } e^{\alpha(V(t)-V_{base})}$ , где коэффициент  $\alpha = 0.044$  был определен при калибровке электродов,  $V_{base}$  — значение потенциала на калиевом электроде в растворе,  $V(t)$  — регистрируемый потенциал на калиевом электроде в срезе.

#### *Фармакология*

Все реактивы, использованные в работе, были произведены компанией Sigma-Aldrich (США). Для блокады KCC2-котранспортера использовался ингибитор VU0463271 ( $10 \text{ } \mu\text{M}$ ), а нейрональной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы — оубаин ( $5 \text{ } \mu\text{M}$ ).

#### *Статистическая обработка*

Анализ первичных электрофизиологических данных производился с использованием программы Clampfit 10.5.2.6 (Molecular Devices, США). Для статистической обработки данных использовалась среда R-Studio 8.12.175.481 (R-Tools Technology, Канада). Нормальность распределения данных оценивалась по критерию Колмогорова—Смирнова. Эффект действия блокаторов оценивался с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующими апостериорными сравнениями средних значений по тесту Тьюки. Все значения приведены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### *1. Эпилептиформная активность в срезах энторинальной коры и гиппокампа 3-недельной крысы*

В срезах мозга 21-дневных крыс стабильная иктальная активность возникала через 10–15 мин по-

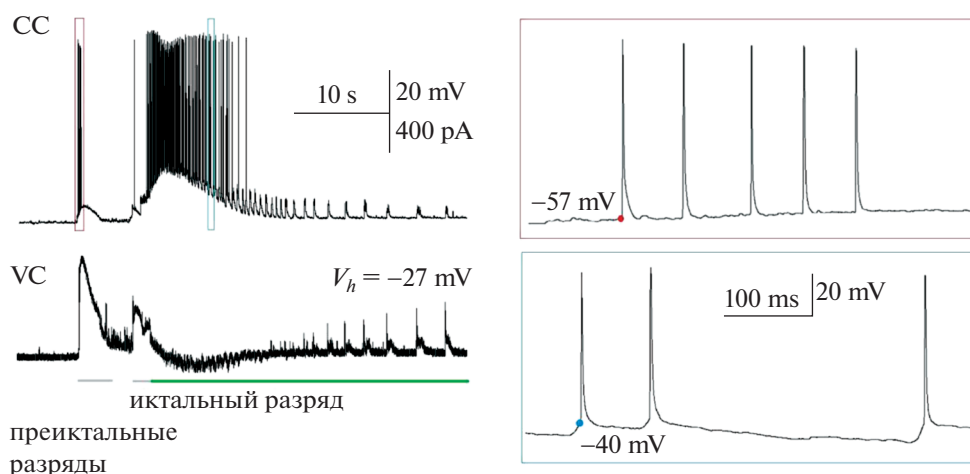
сле применения эпилептогенного раствора. Интервал между иктальными разрядами составил  $484 \pm 26$  с (число срезов  $n = 16$ ), средняя продолжительность иктальной активности —  $33 \pm 4$  с. При этом интериктальная активность наблюдалась редко или полностью отсутствовала.

На рис. 1 приведена одновременная запись спайковой активности одного репрезентативного нейрона и постсинаптические токи другого нейрона энторинальной коры во время эпилептиформной активности. Чтобы одновременно отслеживать как тормозные (потенциал реверсии порядка  $-50$  мВ), так и возбуждающие (потенциал реверсии порядка  $+10$  мВ) постсинаптические токи, в режиме фиксации потенциала удерживалось значение  $-27$  мВ. Представленная на рисунке репрезентативная запись демонстрирует, что в 3-недельном возрасте иктальному разряду обычно предшествует преиктальная активность в виде одного или нескольких продолжительных (3–4 с) ТПСТ, сопровождающихся также спайковой активностью 75% пирамидных нейронов (118 из 160 наблюдений). Порог генерации потенциалов действия пирамидных нейронов энторинальной коры в клонической фазе иктального разряда составлял  $-38.2 \pm 1.0$  мВ ( $n = 16$ ). Однако во время преиктальных разрядов у 38% (18/47) нейронов наблюдались спайки с низким порогом  $-56.0 \pm 1.1$  мВ (рис. 1). Такие же спайки зарегистрированы при локальной активации светом хлорных светоправляемых каналов GtACR на мембране аксона [18]. Согласно работе [19], низкопороговые спайки наблюдаются в том случае, когда они инициированы дистальнее аксонного холмика. Описаны также интернейроны, которые имеют синаптические входы на аксоны пирамидных нейронов, это аксо-аксональные нейроны или клетки-канделябры [20]. Хотя клетки-канделябры являются ГАМКергическими нейронами, их синаптические входы могут оказаться возбуждающими в условиях локального накопления в аксоне хлорид-ионов. Быстрому локальному накоплению хлорид-ионов также способствует низкий уровень экспрессии KCC2-котранспортера у ювенильных животных [21], особенно в области начального сегмента аксона.

Важной особенностью генерации иктального разряда в срезах мозга 21-дневной крысы в 4-аминопиридиновой модели является продолжительная преиктальная активность, сопровождающаяся ТПСТ, т.е. генерация иктального разряда в незрелом мозге определяется первоначальной синхронной активацией ГАМКергических нейронов.

#### *2. Эпилептиформная активность в срезах мозга 8-недельных крыс*

При использовании эпилептогенного раствора в срезах мозга 8-недельной крысы стабильная иктальная активность обычно отсутствовала, чаще



**Рис. 1.** Спайковая активность репрезентативного нейрона энторинальной коры 21-дневной крысы в 4-аминопиридиновой (4-АП) модели эпилептиформной активности *in vitro*. Слева представлена одновременная запись спайковой активности одного нейрона и постсинаптических токов другого нейрона. Иктальному разряду предшествует преиктальная активность в виде продолжительных тормозных постсинаптических токов (ТПСТ), гиперполяризующих событий при фиксации потенциала на  $-27$  мВ. Справа представлены в увеличенном масштабе потенциалы действия во время преиктальной активности (сверху в красной рамке) и во время клонической фазы иктального разряда (снизу в синей рамке). Пороги генерации первого потенциала действия в паттернах отмечены красной и синей точками соответственно.

устанавливался режим интериктальной активности, когда пачки синхронизированной спайковой активности нейронов продолжительностью менее секунды генерировались с частотой 0.05–0.20 Гц.

Вызвать стабильную иктальную активность в срезе можно было при соблюдении двух условий: 1) отсечении зоны СА3 гиппокампа, которая являлась генератором интериктальной активности; 2) длительном предварительном выдерживании срезов (не менее часа) в ИСМЖ с 0.1 мМ 4-АП. Помещать срезы после порезки сразу в эпилептогенный раствор нежелательно, поскольку это существенно сокращает срок жизни срезов и длительность стабильной генерации иктальной активности.

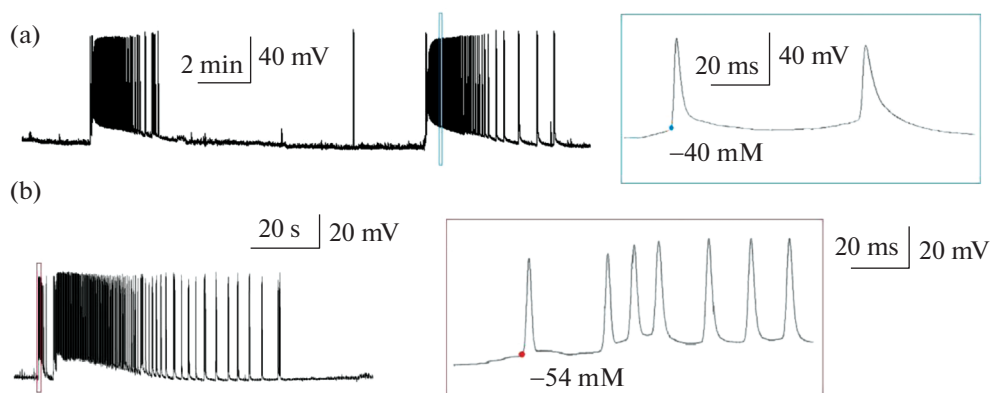
В режиме иктальной активности у 8-недельных крыс, также как у 3-недельных, между иктальными разрядами редко наблюдались интериктальные разряды, т.е. после прекращения одного иктального разряда срез молчит (рис. 2). Перед генерацией следующего иктального разряда у 8-недельных крыс может возникнуть одна короткая пачка синхронизированной активности (преиктальный разряд). В отличие от 3-недельных животных, она возникала только в 28% (9/32) срезов (рис. 2а). Во время преиктального разряда в половине этих срезов (5/9) также наблюдались низкороговые спайки (рис. 2в), которые, возможно, свидетельствуют о локальной деполяризации мембраны в аксонах за счет накопления хлорид-ионов. Таким образом, срезы 8-недельных крыс более возбудимы, поскольку в режиме готовности к генерации иктального разряда (в режиме преиктальной активности) находятся короткое время (1–5 с у 8-недельных крыс, 8–50 с у 3-недельных крыс).

### 3. Блокада КСС2-котранспортера в срезах мозга 8-недельной крысы прекращает иктальную активность, а в срезах 3-недельной — нет

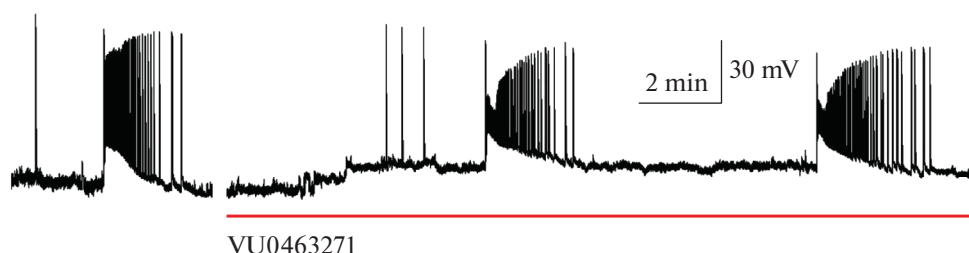
КСС2-котранспортер отвечает за нормализацию внутриклеточной концентрации хлорид-ионов. Его недостаток приводит к деполяризации потенциала реверсии ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, тем самым делает неэффективной главную систему торможения нейронов. В ряде работ [22, 23] была выдвинута гипотеза о том, что деполяризующее действие ГАМК, возникающее при неправильном функционировании КСС2-котранспортера, может провоцировать иктальные разряды, кроме того, спайки с низким порогом, которые мы наблюдали во время преиктальной активности, могут свидетельствовать о накоплении хлорид-ионов в нейроне в 4-АП модели. Поэтому мы изучили эффект ингибирования КСС2-котранспортера на эпилептиформную активность, сравнив спайковую активность репрезентативного нейрона до и после добавления в перфузирующий раствор ингибитора КСС2-котранспортера VU0463271 (10  $\mu$ М).

В срезах гиппокампа и энторинальной коры 3-недельной крысы ингибитор КСС2-котранспортера VU0463271 (10  $\mu$ М) не приводил к изменениям свойств эпилептиформной активности ( $n = 4$ , рис. 3).

В срезах 8-недельных крыс иктальная активность вызывалась также, как описано в части 2, при этом спустя 5–10 мин после аппликации блокатора КСС2-котранспортера устанавливался режим частой интериктальной активности, при этом мы не наблюдали деполяризации нейрона или изменения внеклеточной концентрации ионов калия



**Рис. 2.** Эпилептиформная активность в 4-аминопиридиновой модели в срезах энторинальной коры и гиппокампа 8-недельной крысы Вистар. Пример эпилептиформной активности без (а) и при наличии (б) преиктального разряда. Во время преиктальной активности наблюдаются спайки с низким порогом генерации потенциала действия. Справа приведены примеры спайков в увеличенном масштабе, синей и красной точками, соответственно, отмечены пороги генерации первого в паттерне потенциала действия в тонической фазе иктального разряда и во время преиктального события.



**Рис. 3.** Эффект блокады KCC2-котранспортера с помощью VU0463271 (10  $\mu$ M) в срезах мозга 3-недельных крыс.



**Рис. 4.** Блокада KCC2-котранспортера с помощью VU0463271 (10  $\mu$ M) в срезах энторинальной коры и гиппокампа с отсечением зоны СА3 гиппокампа 8-недельных крыс препятствует генерации иктальных разрядов. Эффект продемонстрирован с помощью одновременной регистрации внеклеточной концентрации калия и спайковой активности репрезентативного нейрона глубоких слоев энторинальной коры.

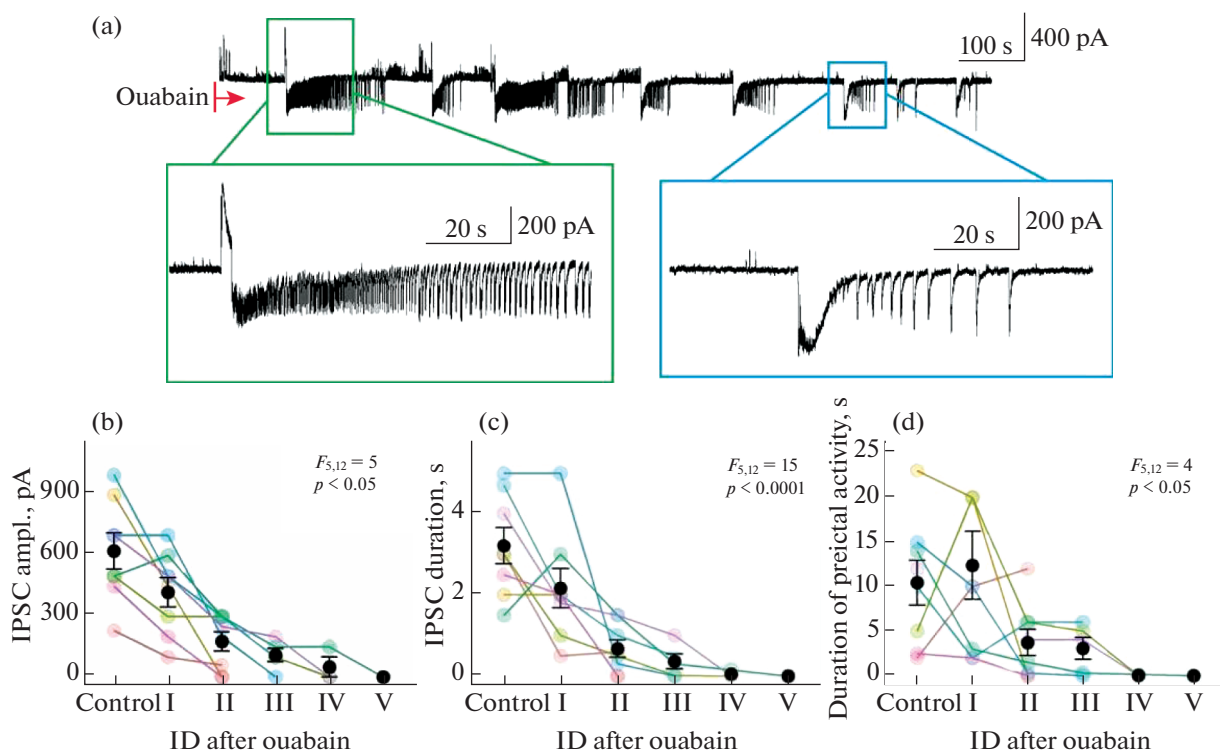
( $n = 5$ , рис. 4). На рис. 4 показано, что после генерации очередного иктального разряда, нейронная сеть продолжает генерировать пачечную активность, характерную для клонической фазы.

Эта серия экспериментов позволяет сделать вывод, что при блокаде KCC2-котранспортера не может прекратиться клоническая фаза иктального разряда в срезах 8-недельных крыс. Качественное различие в эффектах блокады KCC2-котранспортера у крыс разных возрастов требует дальнейшего исследования.

#### 4. Частичная блокада $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы в срезах мозга 8-недельных крыс прекращает иктальную активность, а у 3-недельных — нет

Поскольку возбудимость нервной ткани зависит от внеклеточной концентрации ионов калия, то еще одним механизмом, препятствующим эпилептической активности, должно быть изменение активности нейрональной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы [24]. Помпа выкачивает ионы натрия и закачивает ионы калия в клетку из внеклеточного пространства. Мы





**Рис. 5.** Эффект частичной блокады  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы на преиктальную активность в срезах мозга 3-недельных крыс Вистар. (а) Постсинаптические токи репрезентативного нейрона, записанные в режиме фиксации потенциала на уровне  $-27$  мВ в 4-АП модели, записанные с момента добавления в перфузирующий раствор оуабайна ( $5 \mu\text{M}$ ). В зеленой рамке приведен в увеличенном масштабе первый иктальный разряд после аппликации оуабайна (I), в синей рамке — седьмой (VII) b–d. Изменение характеристик иктальных разрядов со временем, по оси абсцисс точка Control — контроль, I — первый иктальный разряд после аппликации оуабайна, II — второй и так далее. По оси ординат: амплитуда первого ТПСТ (b), длительность первого ТПСТ (c) и продолжительность преиктальной активности (d).  $F_{5,12}$  — результаты дисперсионного анализа с повторными измерениями.

изучили эффект частичной блокады нейрональной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы оуабайном ( $5 \mu\text{M}$ ) на эпилептиформную активность.

В срезах мозга 3-недельных крыс аппликация оуабайна постепенно уменьшала амплитуду и продолжительность ТПСТ перед иктальным разрядом, а также уменьшала время от начала преиктальной активности до иктальной (однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, число срезов  $n = 8$ , рис. 5). Таким образом, блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы приводила к постепенному исчезновению преиктальной активности в срезах энторинальной коры, а также сокращению интервала между иктальными разрядами (однофакторный дисперсионный анализ с повторениями  $F_{4,12} = 25$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

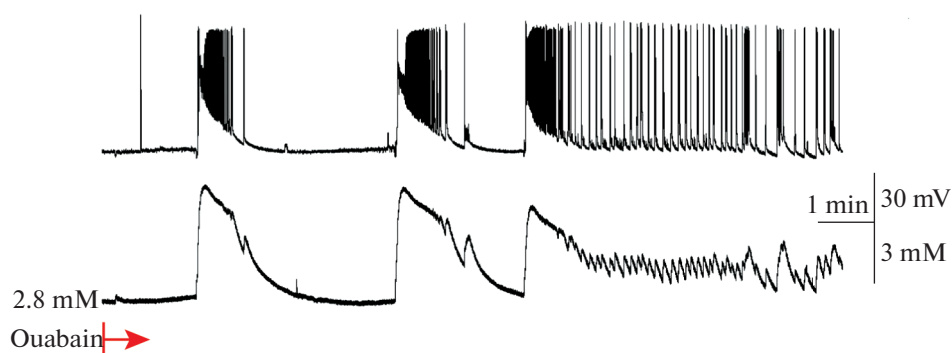
В срезах мозга 8-недельных крыс иктальная активность вызывалась способом, описанным в части 2, при этом оуабайн ( $5 \mu\text{M}$ ) приводил к тому, что после генерации очередного иктального разряда нейронная сеть оставалась в клонической фазе и начинала генерировать постоянные интериктальные разряды с частотой  $0.2\text{--}0.3$  Гц (рис. 6,  $n = 6$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение эпилептиформной активности в 4-АП модели у 3- и 8-недельных крыс показывает, что в зрелом мозге существуют защитные механизмы, препятствующие регулярной генерации иктальных разрядов. В энторинальной коре 8-недельной крысы, в отличие от 3-недельной, иктальная активность легко блокируется, когда поступает входной сигнал из зоны СА3 гиппокампа, или при блокаде катион-хлорного транспортера КСС2 или  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы. Таким же эффектом обладает низкочастотная электрическая стимуляция [25]. При действии любого из этих факторов устанавливается стабильная интериктальная активность, которая препятствует генерации иктального разряда.

*Интериктальная активность подавляет иктальную в зрелом мозге, но не в ювенильном*

Антагонистическое действие интериктальной активности на иктальную в зрелом мозге было описано ранее в нескольких работах [26, 27]. Н. Swartzwelder и соавт. обнаружили этот эффект в модели эпилептиформной активности *in vitro* с нулевым



**Рис. 6.** Эффект частичной блокады  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы на epileptiformную активность в срезах мозга 8-недельных крыс Вистар.

магнием в срезах гиппокампа и энторинальной коры взрослых крыс [26], а М. Barbarosie и М. Avoli — в 4-АП модели [27]. Интересно, что на органотипической культуре гиппокампа было выявлено, что гибель нейронов коррелирует с иктальной активностью, но не интериктальной [28]. Таким образом, генерация интериктальной активности в зрелом мозге может рассматриваться как потенциально важный нейропротекторный механизм.

Клинические данные показывают, что незрелый мозг больше склонен к генерации epileptических приступов, которые сложнее подавляются [1]. Мы недавно показали, что в срезах мозга ювенильных крыс интериктальная активность, генерируемая в зоне СА3 гиппокампа, равно как и низкочастотная стимуляция не препятствуют генерации иктальных разрядов в энторинальной коре. Сами интериктальные разряды сложно вызвать в срезах ювенильных крыс с помощью электрической стимуляции [25]. А если интериктальная активность возникает, то она может провоцировать иктальный разряд и поэтому в этом случае ее часто называют преиктальной активностью [25].

В 4-АП модели различают два типа интериктальной активности: ГАМК-глутаматные, которые возникают из-за рекуррентного взаимодействия интернейронов (деполяризация потенциала реверсии ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов приводит к деполяризующему действию ГАМК), а также глутаматные, которые возникают из-за рекуррентного взаимодействия возбуждающих нейронов [14]. ГАМК-глутаматные события регистрируются в срезах 3-недельной крысы перед началом иктальной активности, они провоцируют генерацию иктального разряда. Глутаматные разряды более типичны для взрослой крысы. Они регистрируются при сохранении связей энторинальной коры с гиппокампом, при низкочастотной электрической стимуляции, а также генерируются при блокаде КСС2-котранспортера и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы. В срезах мозга 8-недельной крысы в 4-АП модели генерация глутаматных

интериктальных разрядов препятствует развитию иктального разряда.

#### *Причины высокой готовности к генерации иктального разряда в незрелом мозге*

Причины отличий во взаимоотношениях интериктальной и иктальной активности в развивающемся и зрелом мозге, вероятно, обусловлены различиями в экспрессии ряда мембранных белков. Например, до 22-го дня постнатального развития в мозге крыс отсутствуют ГАМК<sub>B</sub>-опосредованные постсинаптические события [9, 10], которые обеспечивают длительное следовое торможение. В раннем постнатальном периоде меняется соотношение экспрессии хлорных котранспортеров КСС2 и НКСС1. Уровень экспрессии КСС2 достигает максимального значения лишь к концу второй недели постнатального развития у крыс [4–8]. В этот же период продолжается формирование связей между гиппокампом и энторинальной корой [29].

#### *КСС2-котранспортер*

Роль КСС2-котранспортера в генерации и прекращении иктальной активности противоречива. Помимо обнаруженных нами различий в действии ингибитора КСС2 у 3- и 8-недельных крыс, есть данные о том, что при искусственном повышении экспрессии КСС2 фотостимуляция парвальбумин-положительных интернейронов не способна инициировать иктальный разряд (в отличие от нормального уровня экспрессии КСС2) [30]. Это еще раз доказывает то, что одной из причин генерации иктального разряда в незрелом мозге может являться возбуждающее действие ГАМК вследствие накопления хлорид-ионов из-за недостаточной работы КСС2-котранспортера. Кроме того, у некоторых людей с эпилепсией зарегистрированы мутации гена КСС2 [31, 32]. У таких пациентов из-за ослабленной функции КСС2-котранспортера действи-

тельно должен реализовываться сценарий возбуждающего действия ГАМК.

У 3-недельных крыс наблюдаются продолжительные ГАМК-глутаматные события во время преиктальной активности и в клонической фазе иктального разряда. Не исключена роль положительного действия ГАМК из-за повышения концентрации хлорид-ионов в инициации таких событий [33, 34].

#### *Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпа*

Последние исследования выявили возрастные различия в экспрессии субъединиц Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы [12]. В коре и гиппокампе у взрослой мыши значительно выше уровень экспрессии α1- и α3-субъединиц Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы по сравнению с 6-м днем постнатального развития. Более активная работа Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы позволяет быстро нормализовать внутриклеточную концентрацию ионов натрия и внеклеточную концентрацию ионов калия, т.е. контролирует возбудимость нейронов. По такому механизму Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпа может защищать зрелый мозг от эпилептической активности. Согласно нашим данным о действии оуабаина, в срезах мозга 3-недельной крысы ослабление работы Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы приводит к сокращению преиктальной активности и увеличению частоты иктальных разрядов, т.е. имеет проэпилептический эффект. В срезах мозга 8-недельных крыс при блокаде помпы режим иктальной активности сменяется режимом интериктальной активности.

#### *ГАМК<sub>B</sub> рецепторы*

Ранее мы выявили возрастные различия в эффекте низкочастотной электрической стимуляции на иктальную активность в срезах мозга крыс в 4-АП модели [25]. Во время низкочастотной электрической стимуляции в срезах ювенильных крыс наблюдается уменьшение частоты иктальных разрядов, тогда как в срезах взрослых крыс каждый стимул вызывает интериктальный разряд, при этом сама иктальная активность исчезает. Механизм эффекта низкочастотной стимуляции в срезах мозга взрослых животных реализуется посредством активации постсинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов [35, 36]. Toprani и Durand [35] показали, что при стимуляции тракта в билатеральных срезах гиппокампа каждый электрический импульс вызывает продолжительную гиперполяризацию нейронов. При блокаде ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов эта гиперполяризация исчезает, и стимуляция становится неэффективной, что свидетельствует о том, что механизм действия стимуляции реализуется посредством активации постсинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов.

В срезах мозга ювенильных животных эффект реализуется посредством активации пресинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов [25]. Мы показали, что на эпилептическую активность влияет блокада любого типа синаптических рецепторов: AMPA, NMDA, ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub>, но только при блокаде ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов стимуляция становится неэффективной. Ответы нейронов на парную стимуляцию, математическое моделирование, а также эффект блокады обратного захвата глутамата указали на то, что низкочастотная электрическая стимуляция приводит к активации пресинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов, за счет чего уменьшается вероятность выброса медиатора, в итоге уменьшается частота иктальных разрядов [25].

Недостаточное развитие постсинаптических ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов в раннем постнатальном периоде объясняет различие противоэпилептического действия низкочастотной стимуляции у крыс разных возрастов.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-60016.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Ю. Смирнова — планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи, Д.С. Синяк — сбор данных по эффектам блокады Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-помпы и KCC2-котранспортера в срезах 3-недельных крыс, А.В. Чижов, А.В. Зайцев — обсуждение результатов и редактирование статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cowan L.D. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8: 171–181. 2002.  
<https://doi.org/10.1002/mrdd.10035>
2. Студеникин В.М., Шелковский В.И., Балканская С.В. Фебрильные судороги. *Практика педиатра.* 1: 8–10. 2007. [Studenikin V. M., Shelkovskij V. I., Balkanskaya S. V. Febril'nye sudorogi. *Praktika pediatria.* 1: 8–10. 2007. (In Russ)].
3. Hauser W.A. Incidence and Prevalence. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* / Eds. J. Engel, Jr., T.A. Pedley. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia. 47–58. 1997.  
[https://doi.org/10.1007/978-88-470-2903-3\\_81](https://doi.org/10.1007/978-88-470-2903-3_81)
4. Plotkin M.D., Snyder E.Y., Hebert S.C., E. Delpire. Expression of the Na–K–2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J. Neurobiol.* 33 (6): 781–795. 1997.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(19971120\)33:6<781::aid-neu6>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(19971120)33:6<781::aid-neu6>3.0.co;2-5)
5. Wang C., Shimizu-Okabe C., Watanabe K., Okabe A., Matsuzaki H., Ogawa T., Mori N., Fukuda A., Sato K. De-

- velopmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Dev. Brain Res.* 139 (1): 59–66. 2002.  
https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00536-9
6. *Dzhala V.I., Talos D.M., Sdrulla D.A., Brumback A.C., Mathews G.C., Benke T.A., Delpire E., Jensen F.E., Staley K.J.* NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11 (11): 1205–1213. 2005.  
https://doi.org/10.1038/nm1301
  7. *Khazipov R., Khalilov I., Tyzio R., Morozova E., Ben-Ari Y., Holmes G. L.* Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Europ. J. Neurosci.* 19 (3): 590–600. 2004.  
https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2003.03152.x
  8. *Watanabe M., Fukuda A.* Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front Cell Neurosci.* 9: 371. 2015.  
https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00371
  9. *Lei S., McBain C.J.* GABAB receptor modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto rat CA3 hippocampal interneurons. *J. Physiol.* 15 (2): 546: 439–453. 2003.  
https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.034017
  10. *Nurse S., Lacaille J.C.* Late maturation of GABA (B) synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 38 (11): 1733e42. 1999.  
https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00122-7
  11. *Scanziani M.* GABA spillover activates postsynaptic GABA (B) receptors to control rhythmic hippocampal activity. *Neuron.* 25 (3): 673–681. 2000.  
https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81069-7
  12. *Sundaram S.M., Safina D., Ehrkamp A., Faissner A., Heumann R., Dietzel I.D.* Differential expression patterns of sodium potassium ATPase alpha and beta subunit isoforms in mouse brain during postnatal development. *Neurochem Int.* 128: 163–174. 2019.  
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.009
  13. *Banerjee B., Chaudhury S.* Thyroidal regulation of different isoforms of NaKATPase in the primary cultures of neurons derived from fetal rat brain. *Life Sci.* 71 (14): 1643–1654. 2002.  
https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01856-8
  14. *Amakhin D.V., Ergina J.L., Chizhov A.V., Zaitsev A.V.* Synaptic conductances during interictal discharges in pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Front Cell Neurosci.* 10: 233. eCollection. 2016.  
https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00233
  15. *Yao J. A., Tseng G.N.* Modulation of 4-AP block of a mammalian A-type K channel clone by channel gating and membrane voltage. *Biophys. J.* 67 (1): 130–142. 1994.  
https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80462-X
  16. *Choquet D., Korn H.* Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 99 (2): 217–240. 1992.  
https://doi.org/10.1085/jgp.99.2.217
  17. *Octeau J.C., Faas G., Mody I., Khakh B.S.* Making, Testing, and Using Potassium Ion Selective Microelectrodes in Tissue Slices of Adult Brain. *J. Vis. Exp.* (135): 57511. 2018.  
https://doi.org/10.3791/57511
  18. *Malyshev A.Y., Roshchin M.V., Smirnova G.R., Dolgikh D.A., Balaban P.M., Ostrovsky M.A.* Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. *Neurosci. Lett.* 640: 76–80. 2017.  
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.026
  19. *Yu Y., Shu Y., McCormick D.A.* Cortical action potential backpropagation explains spike threshold variability and rapid-onset kinetics. *J. Neurosci.* 28 (29): 7260–7272. 2008.  
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1613-08.2008
  20. *Tai Y., Gallo N.B., Wang M., Yu J. R., Van Aelst L.* Axo-axonic Innervation of Neocortical Pyramidal Neurons by GABAergic Chandelier Cells Requires AnkyrinG-Associated L1CAM. *Neuron.* 102 (2): 358–372.e9. 2019.  
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.009
  21. *Ben-Ari Y., Gaiarsa J.L., Tyzio R., Khazipov R.* GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological reviews.* 87 (4): 1215–1284. 2007.  
https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006
  22. *Huberfeld G., Wittner L., Clemenceau S., Baulac M., Kaila K., Miles R., Rivera C.* Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 27: 9866–9873. 2007.  
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2761-07.2007
  23. *Kaila K., Ruusuvuori E., Seja P., Voipio J., Puskarjov M.* GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 26: 34–41. 2014.  
https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.11.004
  24. *Chizhov A.V., Zefirov A.V., Amakhin D.V., Smirnova E.Y., Zaitsev A.V.* Minimal model of interictal and ictal discharges “Epileptor-2”. *PLoS Comput Biol.* 14 (5): e1006186. 2018.  
https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006186
  25. *Smirnova E.Y., Chizhov A.V., Zaitsev A.V.* Presynaptic GABAB receptors underlie the antiepileptic effect of low-frequency electrical stimulation in the 4-aminopyridine model of epilepsy in brain slices of young rats. *Brain Stimul.* 13 (5): 1387–1395. 2020.  
https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.07.013
  26. *Swartzwelder H.S., Lewis D.V., Anderson W.W., Wilson W.A.* Seizure-like events in brain slices: suppression by interictal activity. *Brain Res.* 410 (2): 362–366. 1987.  
https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90339-8
  27. *Barbarosie M., Avoli M.* CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J. Neurosci.* 17 (23): 9308–9314. 1997.  
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-23-09308.1997
  28. *Berdichevsky Y., Dzhala V., Mail M., Staley K.J.* Interictal spikes, seizures and ictal cell death are not necessary for post-traumatic epileptogenesis in vitro. *Neurobiol. Dis.* 45 (2): 774–785. 2012.  
https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.11.001
  29. *Jabès A., Lavenex P. B., Amaral D. G., Lavenex P.* Post-natal development of the hippocampal formation: a stereological study in macaque monkeys. *The Journal of comparative neurology.* 519 (6): 1051–1070. 2011.  
https://doi.org/10.1002/cne.22549
  30. *Magloire V., Cornford J., Lieb A., Kullmann D.M., Pavlov I.* KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-

- promoting action of somatic inhibition. *Nat Commun.* 10 (1): 1225. 2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08933-4>
31. Puskarjov M., Ahmad F., Kaila K., Blaesse P. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. *J. Neurosci.* 32 (33): 11356–11364. 2019.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6265-11.2012>
  32. Kahle K.T., Merner N.D., Friedel P., Silayeva L., Liang B., Khanna A., Shang Y., Lachance-Touchette P., Bourassa C., Levert A., Dion P.A., Walcott B., Spiegelman D., Dionne-Laporte A., Hodgkinson A., Awadalla P., Nikbakht H., Majewski J., Cossette P., Deeb T.Z., Moss S.J., Medina I., Rouleau G.A. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Reports.* 15 (7): 766–774. 2014.  
<https://doi.org/10.15252/embr.201438840>
  33. Ellender T.J., Raimondo J.V., Irkle Lamsa, K.P. Akerman C.J. Excitatory effects of parvalbumin-expressing interneurons maintain hippocampal epileptiform activity via synchronous afterdischarges. *J. Neurosci.* 34: 15208–15222. 2014.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1747-14.2014>
  34. Nardou R., Yamamoto S., Chazal G., Bhar A., Ferrand N., Dulac O., Ben-Ari Y., Khalilov I. Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. *Brain.* 134: 987–1002. 2011.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awr041>
  35. Toprani S., Durand D. M. Long-lasting hyperpolarization underlies seizure reduction by low frequency deep brain electrical stimulation. *J. Physiol.* 591 (22): 5765e90. 2013.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.253757>
  36. Kano T., Inaba Y., D'Antuono M., Biagini G., Levesque M., Avoli M. Blockade of in vitro ictogenesis by low-frequency stimulation coincides with increased epileptiform response latency. *J. Neurophysiol.* 114 (1): 21e8. 2015.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00248.2015>

## AGE-RELATED DIFFERENCES IN EPILEPTIFORM ACTIVITY IN SLICES OF THE RAT ENTORHINAL CORTEX IN 4-AMINOPYRIDINE MODEL

E. Y. Smirnova<sup>a,b,c,#</sup>, D. S. Sinyak<sup>b</sup>, A. V. Chizhov<sup>b,c</sup>, and A. V. Zaitsev<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Almazov National Medical Research Centre, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup> Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: elena.smirnova@mail.ioffe.ru

Children are more likely to develop epileptic seizures (ictal discharges lasting tens of seconds) than adults. A higher predisposition of the juvenile brain to the generation of epileptiform activity is thought to be due to the preeminence of inhibition over excitation at the early stage of brain development. However, the molecular and physiological mechanisms underlying these age-related differences are yet to be clarified. We compared the ictal activity induced by a chemoconvulsant 4-aminopyridine (4-AP) in the horizontal slices of the entorhinal cortex and hippocampus of 3- and 8-week-old Wistar rats. In 3-week-old rats, the ictal discharge was always preceded by a clearly detectable preictal activity as manifested in one or several 3–4-s GABA-glutamate events. In contrast, in 8-week-old rats, such events were typically absent or very rare (no more than one occasional short event). The ictal activity resistance to external exposures was also age-dependent. In 8-week-old rats, by contrast to 3-week-old animals, ictal discharge generation in the entorhinal cortex was blocked completely and replaced by the 0.2–0.3 Hz interictal activity (simultaneous 1–3-s burst discharges) by a partial blockade of the KCC2-cotransporter or Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump, as well as by low-frequency electric stimulation. Thus, our data indicate that ictal discharges in the immature (3-week-old) brain are more resistant to external exposures than in the brain of adult rats. Interictal and ictal epileptiform activities are antagonistic in 8-week-old animals, while the appearance of interictal activity interrupts the generation of ictal discharges completely and can, therefore, be considered as one of the putative antiepileptic mechanisms in the mature rat brain.

**Keywords:** temporal lobe epilepsy, 4-aminopyridine model, GABA<sub>B</sub>-receptors, KCC2-cotransporter, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump, antiepileptic mechanisms

## ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЕЦИМЕТРОВЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН НА АКТИВНОСТЬ ПИРУВАТКИНАЗЫ МОЗГА КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2021 г. А. М. Рашидова

*Институт физиологии им. академика Абдуллы Караева НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан*

*e-mail: afag.rashidova@gmail.com*

Поступила в редакцию 04.05.2020 г.

После доработки 09.11.2020 г.

Принята к публикации 13.11.2020 г.

Изучено влияние дециметровых микроволн (ЭМИ) на активность одного из ферментов энергообеспечения пируваткиназы (ПК) в структурах мозга 3-, 6- и 24-месячных белых нелинейных крыс. Опытные крысы в течение 10 дней ежедневно по 20 мин подвергались воздействию 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> ЭМИ. Установлено, что активность ПК в корковых и подкорковых структурах головного мозга, различающихся по снабжению кислородом, морфофункциональным и филогенетическим особенностям, по-разному реагирует на воздействие ЭМИ: при 10 мкВт/см<sup>2</sup> вызывает повышение, а при 30 мкВт/см<sup>2</sup> — снижение ПК-активности в тканях структур головного мозга. В митохондриальной субклеточной фракции структур мозга при 10 мкВт/см<sup>2</sup> облучении активность фермента ниже, чем при 30 мкВт/см<sup>2</sup>. В цитозольной субклеточной фракции структур головного мозга не было выявлено существенных различий в активности ПК в зависимости от степени интенсивности излучения, тогда как эти показатели, взятые отдельно, достоверно различались по сравнению с контролем ( $p < 0.01$ ;  $< 0.001$ ). Имеются несколько предположений относительно объяснения полученных результатов. Наблюдаемое повышение ПК-активности в изучаемых структурах головного мозга — это процесс метаболической адаптации, направленный на защиту структурной целостности и функциональных компонентов нервных клеток от вредных воздействий излучения. И, наоборот, нехватка энергии, обусловленная падением активности ПК, в свою очередь, вызывает различные вторичные негативные метаболические изменения и окисление свободных радикалов в клетках. Данные показали, что при 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> ЭМИ у крыс эндогенные сигналы направляются от корковых структур к подкорковым, но при этом активность ПК не восстанавливается до контрольных показателей. Предполагается, что под воздействием ЭМИ мозжечок, орбитальная и сенсомоторная кора являются донорами, а лимбическая кора и гипоталамус — акцепторами в системе сигнальной трансдукции.

**Ключевые слова:** крыса, онтогенез, электромагнитное излучение, мозг, пируваткиназа

**DOI:** 10.31857/S0044452921020066

### ВВЕДЕНИЕ

Основным источником энергии, необходимой для деятельности и поддержания структур мозга, являются сопряженные реакции окисления и фосфорилирования, катализируемые комплексом ферментных систем, локализованных в митохондриях клеток мозга. При этом недостаточно сведений в отношении гликолитических ферментов, в той или иной мере связанных с процессами накопления энергии в клетках мозга. Мозг животных представляет собой гетерогенное образование. Выяснение особенностей динамики изменения и величины активности ферментов энергетического обмена в разных структурах мозга, отличающихся между собой по филогенетическому возрасту, структуре и функции, как в норме, так и после воз-

действия неблагоприятных факторов среды привлекает внимание исследователей [1, 2].

Пируваткиназа (ПК; КФ 2.7.1.40) — внутриклеточный регуляторный гликолитический фермент генерации АТФ, находящийся практически во всех тканях. Этот фермент в присутствии ионов магния и калия катализирует необратимую реакцию превращения фосфоэнолпирувата в пируват, сопровождающуюся образованием АТФ. Это фосфорилирование не является окислительным процессом. Кроме этого, ПК наряду с фосфофруктокиназой и гексокиназой является основным регулятором гликолитического процесса.

Так как энергетический обмен в головном мозге протекает с высокой интенсивностью, то изменения активности ПК нарушают энергозависимые процессы и могут привести организм к патологиче-

скому состоянию. Имеется большое количество данных о влиянии электромагнитного излучения (ЭМИ) на центральную нервную систему (ЦНС), биологические объекты и особенно на организм человека [3–5]. Это связано как с существованием естественных и искусственных источников ЭМИ, так и с их постоянным и растущим внедрением во многие сферы жизнедеятельности человека [3, 6–8]. Исследования биологических эффектов ЭМИ микроволновых диапазонов актуальны и приоритетны: плотность данного частотного диапазона значительно возросла из-за широкого применения предметов первой необходимости (микроволновые печи, мобильные телефоны, компьютеры и т.д.), военных (радиолокационных) и медицинских источников излучения. Интерес к таким исследованиям связан с отсутствием точного механизма действия ЭМИ. Собрано большое количество экспериментальных данных о влиянии и последствиях их воздействия на биологические системы [3, 9]. Раскрытие механизмов повышения резистентности мозга к действию экстремальных факторов продолжает обсуждаться в широких кругах ученых. Актуальной задачей является раскрытие эндогенных защитных механизмов с целью разработки новых способов повышения резистентности мозга к повреждающим воздействиям стресс-факторов [10]. Поскольку энергетический баланс головного мозга на 80% обеспечивается глюкозой, мы попытались проанализировать воздействие ЭМИ на динамику активности одного из основных ферментов гликолиза ПК в структурах головного мозга крыс в различные периоды постнатального онтогенеза. Изменение активности ПК в структурах головного мозга в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды представляет определенный интерес [11, 12].

Обзор литературы показывает, что проблема воздействия ионизирующего и неионизирующего ЭМИ на биологические объекты приобретает все большую актуальность. С учетом важности этой проблемы в представленной работе ставилась цель исследования особенностей воздействия неионизирующих дециметровых электромагнитных волн с плотностью мощностей 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> на активность ПК мозга крыс в онтогенезе в сравнительном аспекте в зависимости от возраста животных, структуры мозга, субклеточного компартмента, а также интенсивности ЭМИ.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на белых нелинейных крысах-самцах в 3 группах по 54 особи в каждой: 3-месячного (масса 90–110 г), 6-месячного (масса 130–160 г) и 24-месячного (масса 250–270 г) возраста. Группы разделены на 1 контрольную и 2 экспериментальные подгруппы, в каждой по 18 крыс. В специальной камере животные подвер-

гались воздействию ЭМИ с частотой электромагнитных волн 460 МГц с использованием физиотерапевтической установки “Волна-2” (Россия). Опыты проводились на протяжении 10 дней ежедневно в течение 20 мин при 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> интенсивности ЭМИ. Контрольная группа животных, соответствующая тому же возрасту, что и экспериментальная, подвергалась “облучению” под выключенным аппаратом. После 10 дней облучения крыс декапитировали, извлекали головной мозг и на льду идентифицировали структуры мозга: гипоталамус, мозжечок, орбитальную, сенсомоторную и лимбическую кору [13]. Ткани структур головного мозга гомогенизировали в буферной среде, состоящей из 0.2 М трис-НСl буфера (рН 7.4), 1 мМ ЭДТА, 0.25 М сахарозы в соотношении 1:9 и центрифугировали на рефрижераторной центрифуге К-24 (Германия) при 900 g в течение 10 мин. После удаления обрывков ткани супернатант разбавляли в соотношении 1 : 10 раствором 0.32 М сахарозы и центрифугировали в течение 20 мин при 11 000–14 000 g. Далее из супернатанта получали цитозольную субклеточную фракцию (ЦФ) методом дифференциального центрифугирования на ультрацентрифуге “Beckman coulter Optima L-100XP” (Германия) при 100 000 g оборотах в течение 1.5–2.0 ч. Митохондрии после повторного ресуспендирования в 5 мл 0.32 М сахарозы осаждали центрифугированием при 14 000 g в течение 20 мин. Для определения максимальной внутримитохондриальной активности ПК мембраны митохондрий разрушали 1% раствором Тритон X-100, приготовленном на 0.25 М растворе сахарозы [14]. Все процедуры проводились при температуре 0–4°C. ПК-активность определяли спектрофотометрически на анализаторе скоростей реакции системы “ULTRALAB-2101” для регистрации активности ферментов (“LKB”, Швеция) при длине волны  $\lambda = 340$  нм и 25°C с применением ЛДГ в качестве индикаторного фермента окисления NADH [15]. Удельную ферментативную активность ПК считали как  $\mu\text{M NADH} / 1 \text{ мин} / \text{мг белка}$ . Общее содержание белка определяли по Брэдфорд, используя 0.01% раствор кумасси бриллиантового синего G-250, при длине волны  $\lambda = 595$  нм [16]. Опыты проводили в 6 повторностях. Обработка данных проводилась в программе OriginPro 7.0. Статистическую обработку проводили с использованием пакета анализа программ Statistica. Оценка значимости различий данных между группами проводилась с использованием t-критерия Стьюдента, различия считались достоверными при значениях  $p < 0.01$ .

В процессе экспериментов соблюдались правила гуманного обращения с экспериментальными животными, изложенные в директиве Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС), под наблюдением локального комитета по биоэтике НАН Азербайджана.



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные данные в группах молодых (3-месячного возраста), взрослых (6-месячного возраста) и старых (24-месячного возраста) экспериментальных животных показывают достоверные изменения активности ПК в структурах мозга в зависимости от возраста животного, исследуемой структуры, субклеточной фракции и интенсивности воздействия ЭМИ (рис. 1–3).

Во всех возрастных группах выявлены следующие изменения: в большинстве случаев в гомогенате тканей структур головного мозга при воздействии излучения интенсивностью в 10 мкВт/см<sup>2</sup> активность ПК возрастала по сравнению с контрольной группой крыс в ~2.5 раза ( $p < 0.001$ ). Причем как у молодых, так и у взрослых особей общая картина динамики активности ПК в тканях структур головного мозга идентична. Лимбическая кора составила исключение, где активность фермента находилась в пределах показателей контроля. В то же время в группе молодых животных, несмотря на некоторое снижение, ПК-активность выше контрольных показателей ( $p < 0.01$ ). У крыс 24-месячного возраста в некоторых случаях наблюдалась тенденция к снижению активности ПК в структурах мозга до уровня контроля и даже ниже ( $p < 0.05$ ). Самая высокая активность фермента обнаружена в орбитальной коре 3-месячных крыс (в 2.5 раза выше контроля,  $p < 0.001$ ), наименьшая — в гипоталамусе 24-месячных крыс (в 1.7 раза ниже контроля,  $p < 0.01$ ).

Излучение интенсивностью в 30 мкВт/см<sup>2</sup> также приводило к различным изменениям ПК-активности в структурах мозга. Причем характер динамики активности фермента различается от такового при излучении интенсивностью в 10 мкВт/см<sup>2</sup>. А именно, в группе 3-месячных крыс ПК-активность значительно ниже, чем при воздействии излучения в 10 мкВт/см<sup>2</sup>, но выше контрольных значений, кроме лимбической коры, где наблюдалась гипоактивность фермента ( $p < 0.01$ ). При сравнении с контрольными показателями, в зависимости от возраста в орбитальной коре у 6-месячных крыс наблюдалось достоверное повышение активности фермента, в то время как у 24-месячных — наблюдалась лишь тенденция к повышению, а у 3-месячных — изменения были недостоверны. В сенсомоторной коре 24-месячных крыс активность фермента достоверно повышалась в 1.2 раза, в то время как в более молодых группах крыс изменения активности фермента недостоверны. В лимбической коре у 3- и 6-месячных крыс различия в показателях наблюдаемой гипоактивности ПК высокодостоверны ( $p < 0.001$ ), в то время как у 24-месячных — различие в активности ПК недостоверно по сравнению с контролем.

В подкорковых структурах мозга общая картина динамики ПК в возрастных группах идентична:

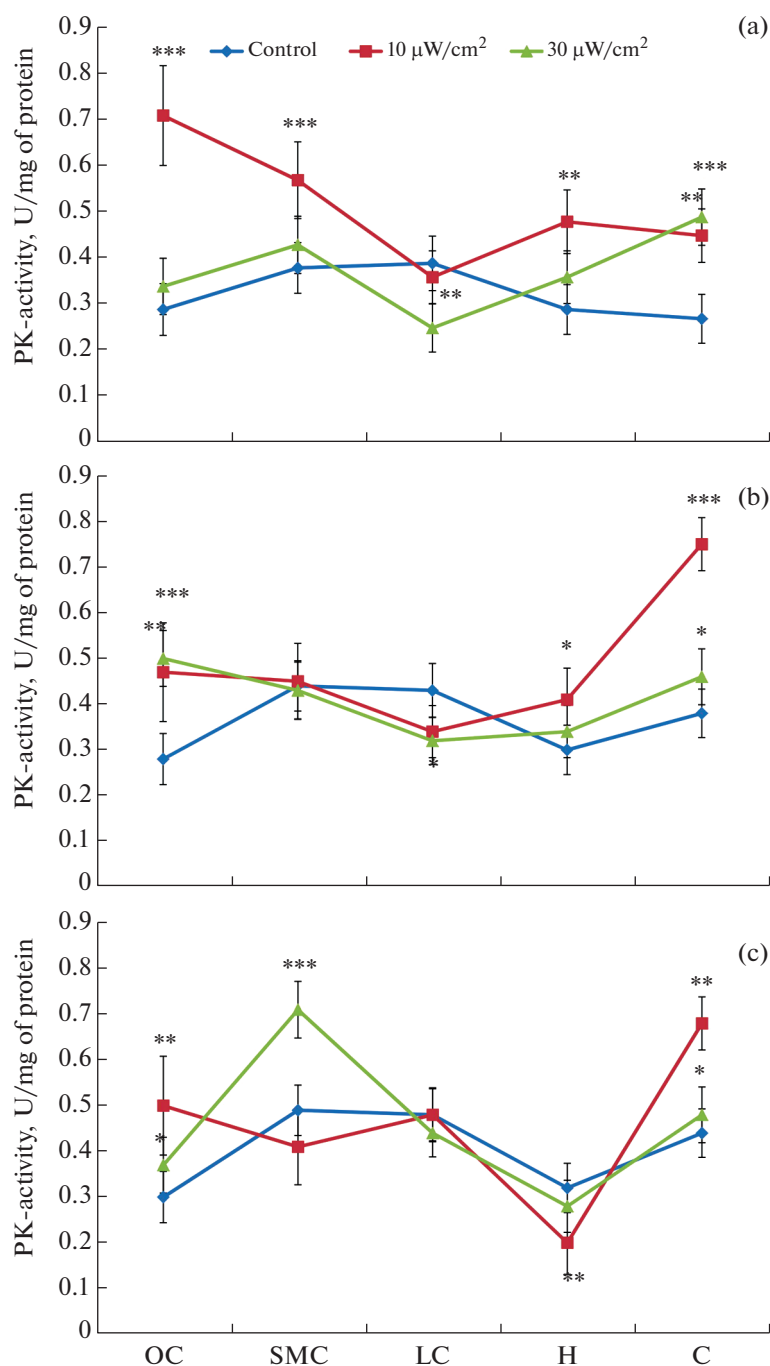
при достоверном изменении активности фермента в группе 3-месячных крыс, с увеличением возраста различия недостоверны. Сравнительный анализ данных показал, что в основном при облучении в 10 мкВт/см<sup>2</sup> ПК-активность во всех исследованных тканях структур мозга выше, чем при облучении в 30 мкВт/см<sup>2</sup>. После экспозиции облучения различными интенсивностями почти во всех возрастных группах лишь в двух структурах мозга — в орбитальной коре и мозжечке — активность фермента была достоверно намного выше контрольного уровня ( $p < 0.001$ ) (рис. 1).

Исходя из того, что исследования на субклеточном уровне увеличивают интегративную информативность, проведена серия экспериментов с митохондриальной и цитозольной субклеточными фракциями исследуемых структур мозга.

В митохондриальной субклеточной фракции структур мозга на фоне резкого снижения ПК-активности при 10 мкВт/см<sup>2</sup> наблюдалась гиперактивность фермента при облучении в 30 мкВт/см<sup>2</sup>. В частности, при облучении интенсивностью 10 мкВт/см<sup>2</sup> у 3- и 24-месячных крыс в корковых структурах и гипоталамусе наблюдалось резкое снижение активности фермента ( $p < 0.001$ ), в то время, как в мозжечке 3-месячных крыс она повышалась на 25%, а в мозжечке 24-месячных — значения достоверности, отражающие различия в активности ПК относительно значения контрольных крыс соответствующей структуры и возраста недостоверны. У 6-месячных крыс во всех изучаемых структурах мозга, кроме орбитальной коры, выявлено достоверное снижение активности фермента по сравнению с контролем ( $p < 0.01$ ;  $< 0.001$ ). В группе 24-месячных крыс при снижении абсолютных показателей разница в общей картине динамики активности фермента во всех структурах мозга, по сравнению с контролем, достоверна ( $p < 0.01$ ), за исключением мозжечка.

ПК-активность в митохондриальной субклеточной фракции структур мозга крыс при 30 мкВт/см<sup>2</sup> облучении намного выше по сравнению с контрольным уровнем ( $p < 0.001$ ), за исключением орбитальной коры 3-месячных крыс, сенсомоторной коры 3- и 6-месячных крыс, гипоталамуса и мозжечка 6-месячных крыс, где она ниже, чем в контроле. Таким образом, в митохондриальной субклеточной фракции структур мозга ПК-активность при воздействии 30 мкВт/см<sup>2</sup> облучения была выше, чем при воздействии 10 мкВт/см<sup>2</sup> (рис. 2).

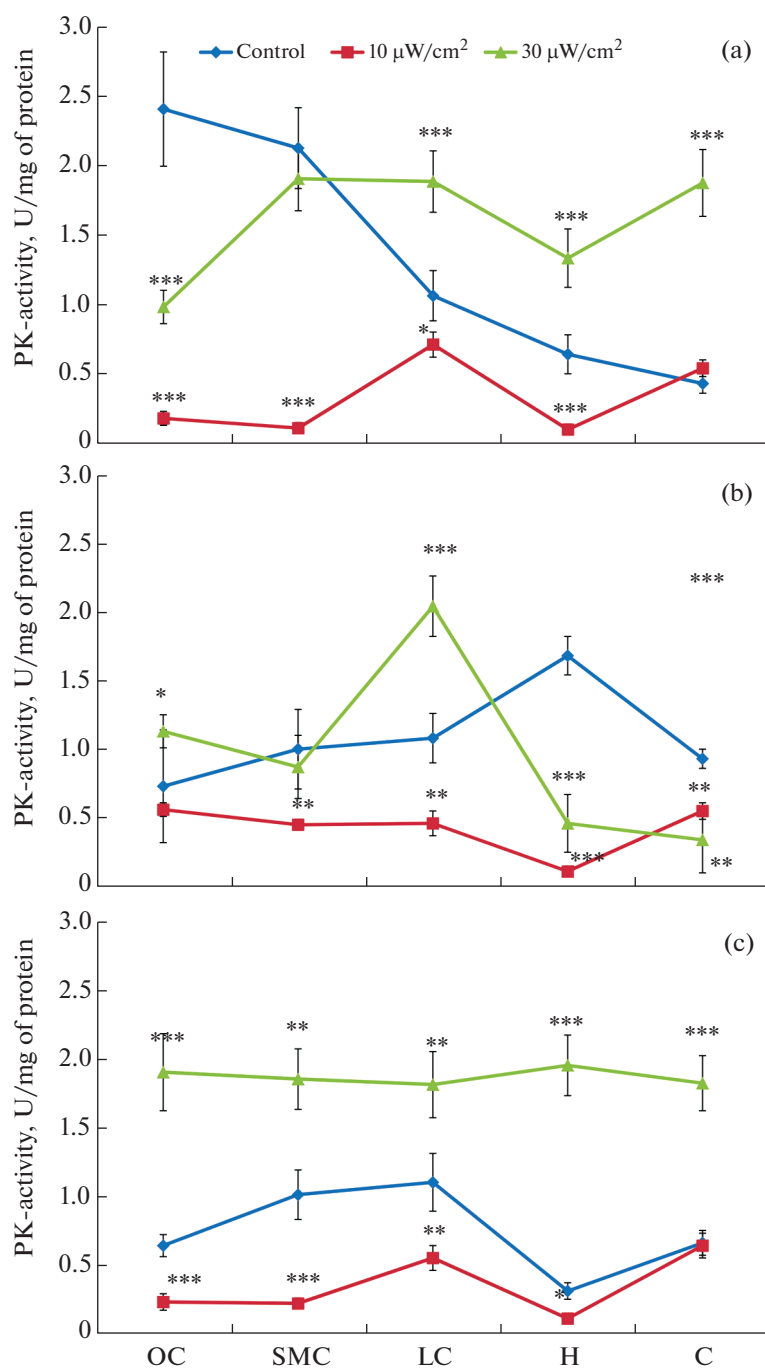
В цитозольной субклеточной фракции структур мозга при излучении в 10 мкВт/см<sup>2</sup> распределение активности ПК в зависимости от исследуемой структуры мозга и возраста крыс неравномерное (рис. 3). В частности, в мозжечке крыс всех возрастных групп активность ПК резко снизилась по сравнению с контролем на 35–51% ( $p < 0.001$ ), то-



**Рис. 1.** Изменение удельной активности пируваткиназы в тканях структур головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ЭМИ интенсивности 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> в онтогенезе (μМ NADH /1 мин/ мг белка;  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ;  $\lambda = 340$ , 25°C). Здесь и далее: 1) ОС-орбитальная кора, SMC – сенсомоторная кора, LC – лимбическая кора, Н-гипоталамус, С – мозжечок; 2) а – 3-месячные крысы, б – 6-месячные крысы, с – 24-месячные крысы; 3) \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$  – значения достоверности, отражающие различия в активности ПК относительно значения у контрольных крыс соответствующей структуры и возраста.

гда как в сенсомоторной и лимбической коре 24-месячных крыс она повысилась почти на 80% ( $p < 0.001$ ). В остальных структурах наблюдалась тенденция различия в показателях активности ПК по сравнению с таковыми в контроле. Активность ПК в

структурах мозга при излучении в 30 мкВт/см<sup>2</sup> также выше по сравнению с контрольным уровнем, и в то же время она незначительно отличается от показателей активности фермента, полученных после облучения в 10 мкВт/см<sup>2</sup> во всех возрастных группах крыс.

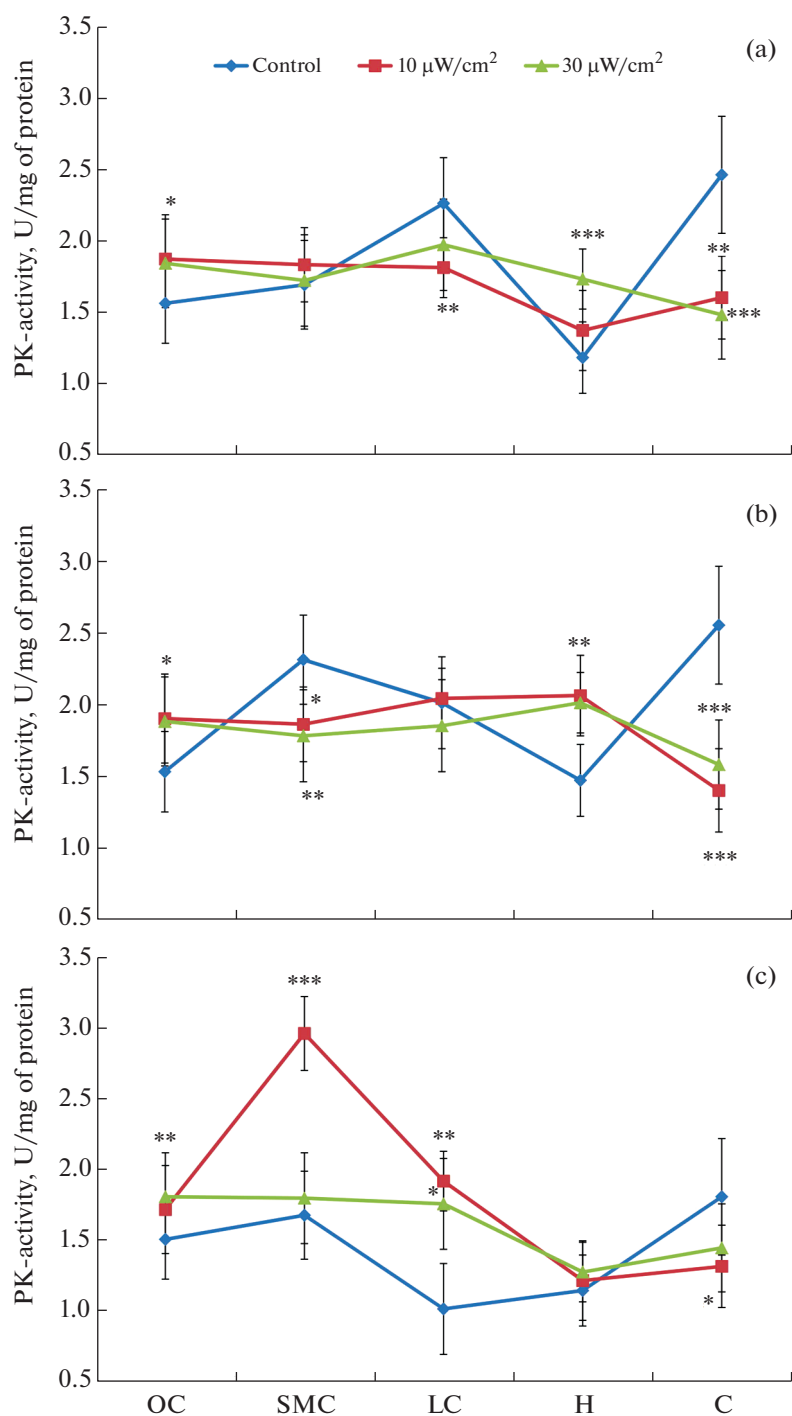


**Рис. 2.** Изменение удельной активности пируваткиназы в митохондриях структур головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ЭМИ интенсивности 10 и 30 мкВт/см<sup>2</sup> ( $\mu\text{M}$  NADH /1 мин/мг белка;  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ;  $\lambda = 340$ , 25°C).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как гипо-, так и гиперактивность ПК наряду с нарушением энергообеспечения мозга, приводят организм к патологическому состоянию. Предполагается, что изменения в ПК-активности на фоне воздействия ЭМИ различной интенсивности обусловлены включением продуктов распада деятельности ферментов энергоснабжения в клет-

ках и активацией биосинтетических процессов. С другой стороны, известно, что в ответ на воздействие такого фактора, как гипоксия в головном мозге образуется белок HIF-1, который участвует в регуляции транскрипции более чем 60 белков, в том числе и гликолитических ферментов [17]. Этим фактором можно и объяснять изменения в активности ПК под воздействием ЭМИ. При низкоин-



**Рис. 3.** Изменение удельной активности пируваткиназы в цитозоле структур головного мозга крыс, подвергшихся воздействию ЭМИ интенсивности 10 и 30 мВт/см<sup>2</sup> ( $\mu\text{M}$  NADH / 1 мин / мг белка;  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ;  $\lambda = 340$ , 25°C).

тенсивном излучении ПК-активность в тканях структур претерпевает более заметные изменения по сравнению с высокоинтенсивным излучением: она достоверно возрастает как по сравнению с контрольным уровнем, так и высокоинтенсивным излучением ( $p < 0.001$ ). Причем у 3-месячных крыс активность ПК в корковых структурах выше, чем в

подкорковых структурах. В то же время у 6- и 24-месячных крыс в мозжечке отмечается высокая активность ПК, что может свидетельствовать о том, что здесь синтез ПК идет более интенсивно. В лимбической коре и гипоталамусе во всех 3 возрастных группах отмечается своеобразное снижение активности ПК. Это объясняется тем, что лимбическая

система отвечает за внутренний гомеостаз и снижение в них активности ПК при длительном воздействии ЭМИ (10 дней) также оказывает повреждающий эффект на мозг животных. Можно говорить о направленности сигнала облучения от филогенетически молодых к более древним корковым структурам: от корковых структур → к подкорковым, который ведет к патологии, ухудшению общего состояния, и активность ПК не восстанавливается до контрольных показателей. Предполагается, что под воздействием ЭМИ структуры мозга — орбитальная, сенсомоторная кора и мозжечок являются донорами, а лимбическая кора и гипоталамус — акцепторами в системе сигнальной трансдукции. Это, возможно, связано с тем, что при облучении происходит стереотипная неспецифическая реорганизация метаболизма для поддержания гомеостаза, ингибирование биосинтеза метаболитов пластического обмена и изменения молекулярных механизмов нарушений нервной ткани [18, 19]. Известно, что с увеличением возраста наблюдается повышение свободнорадикального окисления митохондрий, что вызывает снижение энергетического обмена. Дефицит энергии в результате приводит к снижению механизмов адаптации. Полученные результаты подтверждают данные наших прежних исследований по воздействию неблагоприятных факторов среды: пре- и постнатальной гипоксии, а также влияния паров легколетучих фракций сырой нефти на динамику активности ПК в отдельных структурах мозга в онтогенезе [11, 12].

В возрастном аспекте известно, что при снижении энергообеспечения тканей ниже порогового уровня развиваются дегенеративные заболевания, связанные с некоторыми патологическими заболеваниями, а также процессом старения. В то же время, согласно генорегуляторной гипотезе В.В. Фролькиса, возрастные дисфункции регуляции генов могут привести к изменению соотношения синтезируемых белков, экспрессии ранее не обработанных генов, появлению ранее не синтезированных белков и, как следствие, старению клеток [20]. Наши результаты подтверждают эти данные и согласуются с мнением ряда авторов по этому вопросу [21–23].

Клетки содержат как цитоплазматические, так и митохондриальные формы ПК. Анализ полученных данных показывает, что в контрольной группе животных ПК-активность в каждой исследуемой структуре достигает своего максимального значения сначала в цитозольной субклеточной фракции, затем в митохондриальной и ткани в целом. Но при облучении соотношение форм этих ферментов изменяется. Это дает нам основание говорить о способности переклочения или “инверсии” активности ПК в субклеточных фракциях тканей структур мозга под воздействием ЭМИ различной интенсивности. То есть, эпигенетически активизируют-

ся различные гены ПК, локализованные в различных хромосомах. В этом случае не исключена активация гена Tu M2-ПК, вызывающая карциногенез в тканях, которая может привести к летальному исходу, особенно в группах взрослых и старых особей [24, 25]. Это согласуется с работами ученых, в которых было отмечено, что уровень общей антиоксидантной способности был значительно снижен в группах ЭМИ, а уровни общей окислительной способности и индекса окислительного стресса были значительно увеличены в лобной коре, стволе мозга и мозжечке. Это позволило им прийти к заключению, что ЭМИ вызывает в них структурные изменения и ухудшает окислительный стресс и воспалительную систему цитокинов, что может привести к заболеванию, включая потерю функции этих областей и развитие рака [2].

С другой стороны, возможно, неионизирующее облучение, как и гипоксия, позволили организму оптимизировать энергетический обмен за счет появления в клетках митохондрий небольшого размера с пониженным содержанием цитохромов, высокой активностью митохондриальных ферментов, с более низким сродством к своим субстратам и повышенной эффективностью окислительного фосфорилирования [26]. Как следствие, в этом случае активация гликолиза приводит к активации как цитоплазматической, так и митохондриальной ПК [12]. Однако превышение активности митохондриальной формы ПК над цитоплазматической в структурах мозга экспериментальных групп крыс указывает на возрастающие потребности нейрональных клеток в АТФ при специфическом конкретном действии ЭМИ как стресс-фактора [27].

Энергетический обмен в мозге отличается высокой реактивностью и играет важную роль в адаптации функционального состояния в целом. При этом энергетический баланс в мозге преимущественно обеспечивается расщеплением глюкозы [27]. Согласно нашим предыдущим исследованиям дефицит энергии, в свою очередь, вызывает множество вторичных отрицательных метаболических изменений и вызывает окисление свободных радикалов в клетках [12, 28]. Вследствие высокой реакционной способности свободных радикалов многие компоненты клетки становятся мишенью для химических поражений и вызывают более глубокий дефицит энергии в клетке [27, 29]. В этом ракурсе нужно учитывать и роль редокс-гомеостаза в жизнедеятельности клетки, характеризующего определенный баланс между процессами окисления и восстановления и в изучении молекулярных механизмов, участвующих в регуляции редокс-гомеостаза клеток и тканей [30].

Наблюдаемое повышение ПК-активности в изучаемых структурах головного мозга — это процесс метаболической адаптации, направленный на защиту структурной целостности и функциональ-

ных компонентов нервных клеток от вредных воздействий ЭМИ. И наоборот, нехватка энергии, в свою очередь, вызывает различные вторичные негативные метаболические изменения и способствует при определенных условиях окислению свободных радикалов в клетках, что, помимо всего, может также ускорить старение организма. Большая вариабельность в показателях активности ПК под воздействием ЭМИ — это нормальное состояние, объясняемое адекватной реакцией мозга на воздействие неблагоприятного фактора. Чередование спада активности ПК с подъемом изменяет оптимальное функционирование нейрональных клеток, и далее самих структур мозга. Снижение активности ПК в лимбической коре и гипоталамусе, включенных в лимбическую систему, говорит о состоянии внутреннего гомеостаза, т.е. мозг усиленно борется за его сохранение, за нормализацию работы редокс-системы. Кроме этого, лимбические структуры участвуют в механизмах памяти; в формировании эпилептической активности, особенно при слабых электромагнитных воздействиях.

В нейрофизиологическом аспекте структуры, в которых активность ПК под воздействием ЭМИ повышается, по своей сути это структуры — доноры, где же снижается — это структуры — акцепторы. Например: от сенсомоторной коры идет компенсаторно-адаптивный сигнал, поддерживающий его внутренний метаболизм и гипоталамус как акцептор, пытается восстановиться и активизировать свои функции. Доноры работают против раздражителя. Определение значимости внешнего раздражителя реализуется в системе ассоциативных структур с участием лимбической системы. Эти два процесса восприятия при организации ответных реакций организма взаимодействуют на элементах интегративно-пусковых систем мозга. К таковым по общепризнанному мнению относятся сенсомоторные отделы коры. Существенная роль сенсомоторной коры в процессах сенсомоторной координации определяется структурно-функциональной организацией связей со специфическими сенсорными и лимбическими структурами мозга, полисенсорными свойствами ее отдельных элементов, их высокой способностью к пластическим перестройкам. На уровне сенсомоторной коры реализуются механизмы согласования сенсорных и моторных элементов поведения, которые осуществляются на выходных элементах СМК, имеющих строгое соответствие между соматическим входом и моторным выходом. Орбитальная кора — функционально более интегративная структура, осуществляющая высшую функцию мозга, а сенсомоторная кора — более ассоциативная структура, отвечающая за сенсорную систему, передает сигнал на моторику и связана с мозжечком. Нейронные импульсы, вызывающие движения, генерируются в коре головного мозга. При повреждении моторной зоны сенсомоторной области нарушается ини-

цирование движений. Структуры мозжечка осуществляют коррекцию движения, но сама программа формируется в коре больших полушарий мозга. При повреждении мозжечка нарушается углеводный, минеральный и белковый обмен, а также процессы энергообразования, терморегуляции и кроветворения. Метаболизм активнее в корковых структурах, так как и кровообращение здесь интенсивнее, максимальная энергия для двигательной системы, биосинтез в корковых структурах идет интенсивнее. В то же время среди различных частей головного мозга наибольшей скоростью обновления белков обладает мозжечок, затем серое вещество больших полушарий, гипоталамус и др.

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует об относительно высокой чувствительности ПК-активности, как маркера, к воздействию ЭМИ на мозг, что, возможно, стимулирует включение компенсаторных и адаптивных механизмов, направленных на нормализацию обмена веществ. Разница в динамике активности ПК в структурах головного мозга, по-видимому, связана с различной степенью поглощения интенсивности ЭМИ тканями этих структур. С другой стороны, реакции адаптации включены, и характер обратной реакции будет связан со степенью стресс-фактора, структурой мозга и с возрастом животного. Это свидетельствует о том, что при воздействии ЭМИ гликолиз, являясь источником энергии для клеток, способствует активизации адаптивно-компенсаторных реакций посредством изменения динамики ферментативных реакций в тканях и клеточных компартментах структур мозга, а также, в зависимости от возраста, может оказывать существенное влияние на биохимический баланс организма в целом. То есть полученные нами экспериментальные данные констатируют факт влияния воздействия ЭМИ на биологические системы, в данном случае, структуры мозга крыс [3, 9].

Митохондриальная ПК может быть важна для поддержания благоприятного для окислительного фосфорилирования содержания внутримитохондриального АДФ и отношения АТФ/АДФ. По мнению ученых, различия окислительно-восстановительного баланса в биологических структурах, количественным выражением которого является эффективный восстановительный потенциал и редокс-буферная емкость, являются общим признаком, характеризующим самые разнообразные процессы структур в организме [31].

ПК по своей сути является релейным ферментом в регуляции энергетического состояния клетки, переключающей синтез АТФ с гликолиза на окислительное фосфорилирование или на лактатный путь ресинтеза АТФ. Учитывая это, можно заключить, что полученные данные позволяют рассматривать изменение активности ПК как де-

терминанты клеточной реакции в ответ на воздействие ЭМИ, что приводит к временному повышению защиты внутриклеточной энергетики за счет развития адаптивного ответа мозга. В то же время обнаруженные статистически значимые различия в динамике активности ПК указывают на возможности энергосинтетических процессов в зависимости от исследуемого нейронального внутриклеточного компартмента структур головного мозга в онтогенезе. Данное исследование может быть актуальным в решении проблем возрастного энергообеспечения мозга в стрессовых условиях, ведущих к развитию дегенеративных заболеваний, служить основой для коррекции некоторых патологических состояний, а также для выяснения нейрофизиологического механизма реакции организма на воздействие ЭМИ различной интенсивности, с вытекающими отсюда последствиями.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Национальной Академии Наук Азербайджана (0111AZ321 № 27.21: 20.27.25.).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

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

Конфликт интересов отсутствует.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lipskaya T.Y., Voinova V.V.* Mitochondrial nucleoside diphosphate kinase: mode of interaction with the outer mitochondrial membrane and proportion of catalytic activity functionally coupled to oxidative phosphorylation. *Biochemistry (Moscow)*. 73 (3): 321–331. 2008. <https://doi.org/10.1134/S0006297908030139>
2. *Eser O., Songur A., Aktas C., Karavelioglu E., Caglar V., Aylak F., Ozguner F., Kanter M.* The effect of electromagnetic radiation on the rat brain: an experimental study. *Turk Neurosurg*. 23 (6): 707–715. 2013. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.7088-12.2>
3. *Григорьев Ю.Г.* Мобильный телефон и неблагоприятное влияние на головной мозг пользователя – оценки риска. *Рад. биол. радиоэкол.* 54 (2): 215–216. 2014. [*Grigorev Yu.G.* Mobil'nyj telefon i neblagopriyatnoe vliyanie na golovnoj mozg pol'zovatelya – ocenki riska. *Rad. Biol. Radioekol.* 54 (2): 215–216. 2014. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803114020052>
4. *Krause C.M., Sillanmäki L., Koivisto M.* Effects of electromagnetic fields emitted by cellular phones on the electroencephalogram during a visual working memory task. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (12): 1659–1667. 2000. <https://doi.org/10.1080/09553000050201154>
5. *Sit'ko S.P.* Life as the fourth level of the quantum organization of nature.// *Energy and Information Transfer in Biological Systems*. 293–307. 2003. [https://doi.org/10.1142/9789812705181\\_0014](https://doi.org/10.1142/9789812705181_0014)
6. *Хиразова Е.Э., Байжуманов А.А., Трофимова Л.К., Девев Л.И., Маслова М.В., Соколова Н.А., Кудряшова Н.Ю.* Влияние электромагнитного излучения GSM-диапазона на некоторые физиологические и биохимические характеристики крыс. *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 153 (6): 816–819. 2012. [*Hirazova E.E., Bayzhumanov A.A., Trofimova L.K., Maslova M.V., Sokolova N.A., Kudryashova N.Yu.* Vliyanie elektromagnitnogo izlucheniya GSM-diapazona na nekotorye fiziologicheskie i biokhimicheskie harakteristiki kryis. *Byull. eksperim. biol. med.* 153 (6): 816–819. 2012. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1833-2>
7. *Яшин А.И.* Резонансные эффекты во взаимодействии электромагнитных полей с биосистемами. Ч. I. Виды резонансов и их физико-биологические модели. *J. Newmed. Technol.* 2: 127–143. 2018. [*Yashin A.I.* Rezonansnye effekty vo vzaimodeystvii elektromagnitnyh poley s biosistemami. Ch. I. Vidyarezonansov i ih fiziko-biologicheskie modeli. *J. New med. Technol.* 2: 127–143. 2018. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24411/2075-4094-2018-16005>
8. *Zosangzuali M.Z., Lalramdinpui M., Ganesh C. J.* Impact of radiofrequency radiation on DNA damage and antioxidants in peripheral blood lymphocytes of humans residing in the vicinity of mobile phone base stations. *Elektromagn. Biol. and Med.* 36 (3): 295–305. 2017. <https://doi.org/10.1080/15368378.2017.1350584>
9. *Radon K., Parera D., Rose D.-M., Jung D., Vollrath L.* No effects of pulsed radio frequency electromagnetic fields on melatonin, cortisol and selected markers of the immune system in man. *Bioelectromagnetics*. 22 (4): 280–287. 2001. <https://doi.org/10.1002/bem.51>
10. *Samoilov M.O., Rybnikova E.A.* Molecular-Cellular and Hormonal Mechanisms of Induced Tolerance of the Brain to Extreme Environmental Factors. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 43 (7) : 827–837. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9813-1>
11. *Рашидова А.М.* Динамика активности ферментов энергообеспечения головного мозга крыс на фоне воздействия стресс-факторов. *Ж. Українське товариство генетик і селекціонер – Вісник Українського товариства генетик і селекціонер*. 17 (1): 16–32. 2019. [*Rashidova A.M.* Dinamika aktivnosti fermentov energoobespecheniya golovnogo mozga kryis na fone vmozdeystviya stress-faktorov. *ZH. Ukrain's'ka tovaristva genetika tot selekcioner – Visnik Ukrain's'koe tovaristva genetika tot selekcioner*. 17 (1): 16–32. 2019. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.1.1197>
12. *Rashidova A.M.* Effect of pre-/postnatal hypoxia on pyruvate kinase in rat brain. *Int. J. Sec. Metabolite*. 5 (3): 224–232. 2018. <https://doi.org/10.21448/ijsm.450963>
13. *Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrukhina O., Manent J.-B., Represa A.* Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates *Front Neuroanat.* 9: 161. 2015. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>



14. *Chinopoulos C., Zhang S.F., Thomas B., Ten V., Starkov A.A.* Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Meth. Mol. Biol.* 793: 311–324. 2011.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-328-8_20)
15. *Rashidova A.M., Babazadeh S.N., Mamedkhanova V.V., Abiyeva E.Sh.* Dynamics in the enzymes activity in brain of rat exposed to hypoxia. *Biotechnologia Acta.* 12 (4): 42–49. 2019.  
<https://doi.org/10.15407/biotech12.04.043>
16. *Kruger N.J.* Bradford method for protein quantitation. *The protein Protocols Handbook*, (2-nd ed. Ed. by J.M. Walker, Humana press Inc.). Totowa N.J. 15–21. 2002.  
<https://www.springer.com/gb/book/9781588298805>
17. *Semenza G.L.* Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 148 (3): 399–408. 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>
18. *Reisz J.A., Bansal N., Qian J., Zhao W., Furdul C.M.* Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal.* 21 (2): 260–292. 2014.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>
19. *Рашидова А.М., Гашимова У.Ф.* Особенности динамики активности пируваткиназы в цитозоле структур мозга облученных молодых и взрослых крыс. *Сб. трудов Междунар. Конф. “Радиоэкология-2017”*. Киев. 210–213. 2017. [*Rashidova A.M., Hashimova U.F.* Osobennosti dinamiki aktivnosti piruvatkinazy v tsitozole struktur mozga obluchennykh molodykh i vzroslykh kryis. *Sb. Tr. Mezhd. Konf. “Radioekologiya-2017”*. Kiev. 210–213. 2017. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.1.1197>
20. *Rashidova A.M., Hashimova U.F., Gadimova Z.M.* Study of energy metabolism enzymes and state of cardiovascular system in elderly and senile age patients. *J. Adv. Gerontol.* 10 (1): 86–93. 2020.  
<https://doi.org/10.1134/s2079057020010130>
21. *Titorenko V.I.* Molecular and Cellular Mechanisms of Aging and Age-related Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (7): 2049. 2018  
<https://doi.org/10.3390/ijms19072049>
22. *Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.* Peptide bioregulation of aging: Results and prospects. *Biogerontology.* 11 (2): 139–49. 2009.  
<https://doi.org/10.1007/s10522-009-9249-8>
23. *Malavolta M., Caraceni D., Olivieri F., Antonicelli K.* New challenges of geriatric cardiology: from clinical top research. *Geriatr. Cardiol.* 14 (4): 223–232. 2017.  
<https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2017.04.005>
24. *Dabbous H.K., Mohamed Y.A.E., El-Folly R.F., El-Talawy M.D., Seddik H.E., Johar D., Sarhan M.A.* Evaluation of Fecal M2PK as a Diagnostic Marker in Colorectal Cancer. *J. Gastrointest Cancer.* 50 (3): 442–450. 2019.  
<https://doi.org/10.1007/s12029-018-0088-1>
25. *Huang J.X., Zhou Y., Wang C.H., Yuan W.W., Zhang Z., Zhang X.F.* Tumor M2-pyruvate kinase in stool as a biomarker for diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *J. Can. Res. Ther.* 10 (Suppl S3): 225–228. 2014.  
<https://doi.org/10.4103/0973-1482.145886>
26. *Lukyanova L.D.* Mitochondria Signaling in Adaptation to Hypoxia. *International Journal of Physiology and Pathophysiology.* 5 (4): 363–381. 2014.  
<https://doi.org/10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i4.90>
27. *Pellerin L., Magistretti P.J.* How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. *J. Physiology.* 546 (2): 325. 2003.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035105>
28. *Рашидова А.М., Гашимова У.Ф.* Возраст-зависимая активность лактатдегидрогеназы в структурах головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе, гипоксированных в плодный период. *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 55 (3): 172–178. 2019. [*Rashidova A.M., Hashimova U.F.* Vozrast-zavisimaya aktivnost laktatdegidrogenazy v strukturah golovnogogo mozga kryis v postnatalnom ontogeneze, gipoksirovannykh v plodnyy period. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 55 (3): 172–178. 2019. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S0044452919030124>
29. *Harman D.* Free Radical Theory of Aging: An Update Increasing the Functional Life Span. *ANNALS of the NY Academy of Sciences*, 10–21. 2006.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1354.003>
30. *Tapio S., Jacob V.* Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys.* 46 (1): 1–12. 2007.  
<https://doi.org/10.1007/s00411-006-0078-8>
31. *Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N., Sauer H.* Redox buffer capacity of the cell: theoretical and experimental approach. *Cell Biochem Biophys.* 58 (2): 75–83. 2010.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-010-9090-3>

## DIFFERENTIAL EFFECTS OF DECIMETRIC ELECTROMAGNETIC MICROWAVES ON PYRUVATE KINASE ACTIVITY IN THE RAT BRAIN DURING ONTOGENESIS

A. M. Rashidova

*Abdulla Garayev Institute of Physiology, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan  
e-mail: afag.rashidova@gmail.com*

The effect of decimetric microwaves (DMW) on the activity of pyruvate kinase (PK), one of the energy supply enzymes, was investigated in the brain structures of 3-, 6-, and 24-month-old white non-linear rats. Experimental rats were exposed on a daily basis for 20 min to 10 and 30  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  of DMW irradiation over a period of 10 days. It was established that PK activity in the cortical and subcortical brain structures, which differ in their oxygen supply, morphofunctional and phylogenetic characteristics, reacts differently to the effect of DMW: at

10  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  it increases while at 30  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  it decreases. In mitochondrial subcellular fractions of the brain structures, PK activity was lower at 10  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  than at 30  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . In cytosolic subcellular fractions, no significant differences were revealed in PK activity at different intensities of DMW irradiation, while these indicators, taken separately, were significantly different compared to the control ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ ). There are two alternative assumptions to account for the obtained results. The increased PK activity in the brain structures studied may reflect a metabolic adaptation aimed at protecting the structural integrity and functional components of nerve cells from detrimental effects of DMW irradiation. Conversely, a lack of energy due to a drop in PK activity, in turn, causes various negative secondary metabolic changes and free-radical oxidation in nerve cells. Our data indicate that both at 10 and 30  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  of DMW irradiation, endogenous signals in the rat brain are directed from cortical to subcortical structures, but PK activity does not recover to the control values. It is hypothesized that under the effect of DMW, the cerebellum, orbital and sensorimotor cortices serve as donors, while the limbic cortex and hypothalamus are acceptors in the system of signal transduction.

*Keywords:* rat, ontogenesis, electromagnetic irradiation, brain, pyruvate kinase

## АДАПТАЦИЯ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ ИКРОНОЖНЫХ МЫШЦ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA* В НАЧАЛЕ АНАБИОЗА

© 2021 г. М. В. Каранова

Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московская область, Россия  
Лаборатория криобиологии и биофизики воды, г. Пущино, Московская область, Россия

e-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 17.10.2020 г.

При изучении влияния сезонного снижения температуры на состав свободных аминокислот и нингидринположительных вторичных метаболитов в мышцах лягушки *R. temporaria* выявлено увеличение пула аланина в начале зимней спячки, от 2.43 мкмоль/г сырой массы в летний период до 6.10 мкмоль/г, а также 3-метилгистидина, от 1.52 до 2.80 мкмоль/г. Впервые в мышцах пойкилотермных животных, — а именно, у лягушек, — обнаружены цистеиновая кислота и фосфоэтаноламин, количество которых к началу зимней спячки значительно повышалось, особенно для цистеиновой кислоты: от 0.91 до 2.15 мкмоль/г. Уровень таурина в мышцах *R. temporaria* оказался намного ниже по сравнению с животными более низкой и более высокой ступеней филогенеза, однако в начале зимней спячки он увеличился почти в 3 раза. Предполагается, что аккумуляция названных метаболитов связана с протекторной ролью этих соединений при температурах, экстремально низких для выживания *R. temporaria*.

**Ключевые слова:** низкотемпературная адаптация, мышцы лягушки, таурин, фосфоэтаноламин, цистеиновая кислота, филогенез

**DOI:** 10.31857/S0044452921010058

### ВВЕДЕНИЕ

Экотермные холодостойкие животные, не обладающие совершенной терморегуляцией, выживают в строго определенных пределах пониженных температур благодаря способности к низкотемпературной адаптации. В эволюции биохимической адаптации пойкилотермов выделено три основных типа стратегии: количественная адаптация — изменения в концентрациях компонентов биохимических процессов; качественная — включение в метаболизм новых видов макромолекул; модуляционная — изменения активности существующих макромолекул [1]. Адаптация к низким температурам может осуществляться совместным действием всех трех типов и каждого в отдельности. Помимо снижения интенсивности метаболизма, смены набора изоферментов и подготовки липидного компонента мембран, многие животные синтезируют и различные виды защитных соединений, криопротекторов, или адаптогенов.

Свободные протеиногенные аминокислоты выполняют важнейшую функцию создания метаболического фона низкотемпературной адаптации, который определяет адаптивные возможности организма [2, 3]. Некоторые из аминокислот, аккумулируясь при низких температурах в органах или в

гемолимфе в значительном количестве, выполняют, вероятно, и протекторную роль [2–4]. Согласно нашим исследованиям, в низкотемпературных адаптациях экотермов, — в частности, рыб, — особую роль играют также некоторые вещества, которые, в отличие от протеиногенных аминокислот, не являются активными участниками метаболизма и относятся к вторичным метаболитам, но их уровень при околонулевых температурах повышается весьма значительно [5, 6]. К ним относятся фосфо- и серосодержащие соединения: фосфоэтаноламин, фосфосерин, цистеиновая кислота, таурин [5, 6]. Аккумуляция этих метаболитов при низких температурах специфична для органов и животных и, вероятно, играет важную роль в адаптации.

Мышцы амфибий анатомически и морфологически отличаются от мышц рыб, но участие свободных аминокислот в мышечной адаптации к низким температурам, в состоянии анабиоза, практически не изучено. Лишь две работы, выполненные на свистящей квакше *Pseudacris crucifer* и лесной лягушке *Rana sylvatica*, посвящены изучению состава свободных аминокислот в мышечной ткани при воздействии низких температур [2, 7]. В качестве объектов для аналогичных целей были ис-

пользованы и рептилии: два вида черепах и подвзрочный уж *Thamnophis sirtalis* [8, 9].

Для понимания эволюции процессов низкотемпературной адаптации интересно иметь представление и о возможном участии в мышцах амфибий вышеперечисленных вторичных метаболитов (фосфо- и серосодержащих соединений) — данные по этой теме в литературе совершенно отсутствуют.

Травяная лягушка *Rana temporaria*, представитель семейства настоящих лягушек, является обычным видом бесхвостых амфибий в умеренном климатическом поясе европейской части России. Наиболее комфортно амфибии чувствуют себя при температуре 17–20°C; пониженная температура воздуха не ограничивает их активность даже при 2–3°C, но с наступлением регулярных заморозков их активность прекращается и наступает состояние анабиоза, отличающееся от гибернации млекопитающих, прежде всего, отсутствием периодов бодрствования [6]. Анабиоз травяных лягушек не столь продолжителен для земноводных, обитающих в наших широтах, и длится в среднем 180 дней, однако в очень суровые зимы, когда водоемы, в которых они зимуют, промерзают до дна, может случиться их массовая гибель.

Изучение механизмов толерантности к низким температурам земноводных, переходных между гидробионтами и наземными животными, выявление соединений, являющихся активными (и подчас, специфическими) участниками процессов адаптации на тех или иных этапах эволюции, представляет несомненный интерес и добавит новое знание для понимания механизмов низкотемпературной адаптации, необходимого для практических задач криобиологии и криомедицины.

Задача данного исследования заключалась: 1) в выявлении особенностей состава свободных аминокислот и нингидринположительных вторичных метаболитов (фосфомоноэфиров и серосодержащих кислот) мышц лягушек в зимний период в сравнении с летним; 2) в сравнении полученных данных с имеющимися литературными данными для животных, стоящих на более ранних и более поздних стадиях филогенеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объект исследования.** Поимка травяных лягушек *R. temporaria* осуществлялась в 2015–2017 гг. в неглубоких водоемах окрестностей Пушкино (54°50' с.ш., 37°36' в.д.) в середине июня при среднесуточной температуре +17° С и в третьей декаде ноября (–2°С) — из водоема, частично покрытого рыхлым льдом. Вес животных составлял  $34 \pm 5$  г. Декапитация летних лягушек и извлечение икроножных мышц осуществлялись на следующий день после поимки; декапитация зимних лягушек осуществлялась спустя несколько дней после отлова, в

первых числах декабря; в этот период они находились в аквариуме при температуре +4°C. Отлов и содержание животных, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми “II Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментов или в других научных целях” (1986). Депротеинизацию и гомогенизацию мышечной ткани проводили в 0.2 н хлорной кислоте в соотношении веса ткани и объема кислоты 1:9 (w/v) и центрифугировали при 20000 об/мин в течение 15 мин, при 0°C на центрифуге Centricon. Супернатант (S<sub>1</sub>) нейтрализовали 0.2 н КОН (S<sub>2</sub>); до использования хранили при –20°C.

Концентрацию свободных аминокислот и нингидринположительных соединений (НПС) определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии на автоматическом анализаторе аминокислот LC-2000 (Германия). Разделение аминокислот проводили на ионообменной колонке (0.37 × 35.0 см), в которой неподвижной фазой являлась катионообменная смола Ostion LG ANB [10]. Для элюирования использовали трехступенчатый градиент натрий-цитратного буфера с возрастающей ионной силой и pH: № 1 — 0.3 М, pH 2.98, № 2 — 0.4 М, pH 3.81, № 3 — 0.45 М, pH 9.97. Рабочая температура колонки постоянная, 55°C. В колонку вводили 100 мкл биоматериала (S<sub>2</sub>), соответствующего исходному 1 мг мышечной ткани. Постколоночная модификация аминокислот проводилась с нингидрином, интенсивность окрашивания аминокислот и НПС измерялась спектрофотометрически при 570 нм. Пределы обнаружения аминокислот — от 0.3 нмоль, пределы определения — от 1 до 20 нмоль.

Для количественного определения аминокислот в каждой серии опытов получали хроматограмму стандартной смеси аминокислот и НПС: таурина, фосфоэтаноламина, фосфосерина и цистеиновой кислоты (фирм “Sigma” и “Hitachi”). Содержание свободных аминокислот выражали в мкмоль/г сырой массы.

Статистический анализ выполняли, используя пакет статистических программ для Microsoft Excel 2010. Данные выражали как среднее из 3 параллельных проб ( $n = 3$ ), в каждой из которых использовалось 2 особи (итого 6 особей)  $\pm$  ошибка среднего значения ( $M \pm s.e.m.$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Протеиногенные аминокислоты и 3-метилгистидин.** Концентрация свободных протеиногенных аминокислот мышечной ткани из летней и зимней популяций *R. temporaria* представлена в табл. 1 и 2. Характерной особенностью летнего периода среди заменимых аминокислот (табл. 1) является соотношение аланина к глутаминовой кислоте,

при котором пул аланина составляет приблизительно две трети от пула глутаминовой кислоты (2.4 и 4.0 мкмоль/г сырой массы соответственно для аланина и глутаминовой кислоты). Уровень аспарагиновой кислоты в мышцах летнего периода, 1.35 мкмоль/г, составляет приблизительно одну треть от пула глутаминовой кислоты. В мышечной ткани *R. temporaria* в значительном, но меньшем, количестве обнаружены также гистидин и его производное, непротеиногенная аминокислота 3-метилгистидин (2.2 и 1.52 мкмоль/г соответственно).

Соотношение аланина к глутаминовой кислоте мышц *R. temporaria* заметно изменяется в начале зимнего периода по сравнению с летним: количество аланина увеличивается от 2.4 до 6.1 мкмоль/г. Заметное увеличение концентрации отмечается для 3-метилгистидина, от 1.52 до 2.8 мкмоль/г. На фоне повышения уровня названных соединений в начале гибернации травяной лягушки происходит заметное уменьшение пулов дикарбоновых аминокислот: аспарагиновой — от 1.35 до 0.55 мкмоль/г, глутаминовой — от 4.0 до 3.0 мкмоль/г (табл. 1). Уровень серина и глицина, 1.24 и 1.50 мкмоль/г, соответственно, почти не изменился; уровень  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) был ниже предела ее количественного определения (1 нмоль).

Характерной особенностью летнего периода среди незаменимых аминокислот (табл. 2) является существенная концентрация гидроксикаминокислоты треонина (2.05 мкмоль/г) и основной аминокислоты лизина (1.38 мкмоль/г). В начале анабиоза *R. temporaria* уровень этих аминокислот изменяется противоположным образом: у треонина увеличивается до 2.90 мкмоль/г, а у лизина уменьшается до 0.94 мкмоль/г.

В отличие от треонина и лизина, серосодержащая аминокислота метионин и аминокислоты с разветвленной боковой цепью, — валин, изолейцин и лейцин, — присутствуют в очень небольшой концентрации и в начале гибернации *R. temporaria* их уровень практически не изменяется (табл. 2).

Суммарное количество заменимых аминокислот у зимних животных выше, чем у летних, и составляет 17.5 мкмоль/г (табл. 1). Суммарный пул незаменимых аминокислот у зимних животных почти не отличается от летнего пула (табл. 2). Таким образом, общий баланс аминокислот, вероятно, отражает преобладание процессов протеолиза над процессами синтеза белков.

**Вторичные метаболиты.** Результаты изучения влияния сезонного снижения температуры на состав вторичных метаболитов мышечной ткани *R. temporaria* представлены на рис. 1. Своеобразие и сложность перехода от водного образа жизни к наземному отражены в появлении новых соединений: цистеиновой кислоты и фосфоэтаноламина 0.91 и 0.30 мкмоль/г, соответственно, а также в низком летнем уровне 2-аминоэтансульфоновой кислоты,

**Таблица 1.** Пулы заменимых аминокислот икроножных мышц лягушки *R. temporaria* летом и в начале гибернации (мкмоль/г сырой массы)

| Аминокислоты    | Июнь            | Декабрь          |
|-----------------|-----------------|------------------|
| Аспарагин       | 1.35 $\pm$ 0.13 | 0.55 $\pm$ 0.05* |
| Серин           | 1.24 $\pm$ 0.11 | 1.0 $\pm$ 0.1    |
| Глутамин        | 4.0 $\pm$ 0.3   | 3.0 $\pm$ 0.3*   |
| Глицин          | 1.50 $\pm$ 0.13 | 1.35 $\pm$ 0.12  |
| Аланин          | 2.4 $\pm$ 0.2   | 6.1 $\pm$ 0.6*   |
| ГАМК            | <0.01           | <0.01            |
| Гистидин        | 2.2 $\pm$ 0.2   | 2.6 $\pm$ 0.2    |
| 3-метилгистидин | 1.52 $\pm$ 0.14 | 2.8 $\pm$ 0.2*   |
| Общий пул       | 14.3 $\pm$ 1.3  | 17.5 $\pm$ 1.8   |

**Примечания.** Тирозин, цистеин, аргинин, пролин, триптофан, фенилаланин не обнаружены. Данные представляют среднее из 3 параллельных опытов ( $M \pm s. e. m.$ ), в каждом из которых использовались 2 особи; \* — достоверность значения  $p < 0.05$  по отношению к июню. ГАМК —  $\gamma$ -аминомасляная кислота.

**Таблица 2.** Пулы незаменимых аминокислот икроножных мышц лягушки *R. temporaria* летом и в начале гибернации (мкмоль/г сырой массы)

| Аминокислоты | Июнь            | Декабрь         |
|--------------|-----------------|-----------------|
| Треонин      | 2.05 $\pm$ 0.19 | 2.9 $\pm$ 0.3*  |
| Валин        | 0.39 $\pm$ 0.03 | 0.30 $\pm$ 0.03 |
| Метионин     | 0.09 $\pm$ 0.02 | 0.08 $\pm$ 0.01 |
| Изолейцин    | 0.14 $\pm$ 0.02 | 0.11 $\pm$ 0.02 |
| Лейцин       | 0.23 $\pm$ 0.02 | 0.20 $\pm$ 0.02 |
| Лизин        | 1.38 $\pm$ 0.12 | 0.9 $\pm$ 0.1   |
| Общий пул    | 4.3 $\pm$ 0.4   | 4.5 $\pm$ 0.5   |

**Примечания.** Данные представляют среднее из 3 параллельных опытов ( $M \pm s. e. m.$ ), в каждом из которых использовались 2 особи. \* — достоверность значения  $p < 0.05$  по отношению к июню.

или таурина (0.61 мкмоль/г). К началу зимнего периода пулы таурина, цистеиновой кислоты и фосфоэтаноламина увеличиваются в 2–3 раза, при этом уровень цистеиновой кислоты по-прежнему выше, чем уровень таурина или фосфоэтаноламина, и составляет 2.15 мкмоль/г.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результатом эволюции мышечной системы амфибий стало резкое изменение характера их движений в сравнении с рыбами и соответствующее усложнение мускулатуры [11]. Мышцы конечностей у лягушек, в отличие от рыб, делятся на две главные группы, приводящие и отводящие, а мышцы туловища уже не делятся на миомеры, а принимают вид продольных и косых лент. Такие анато-

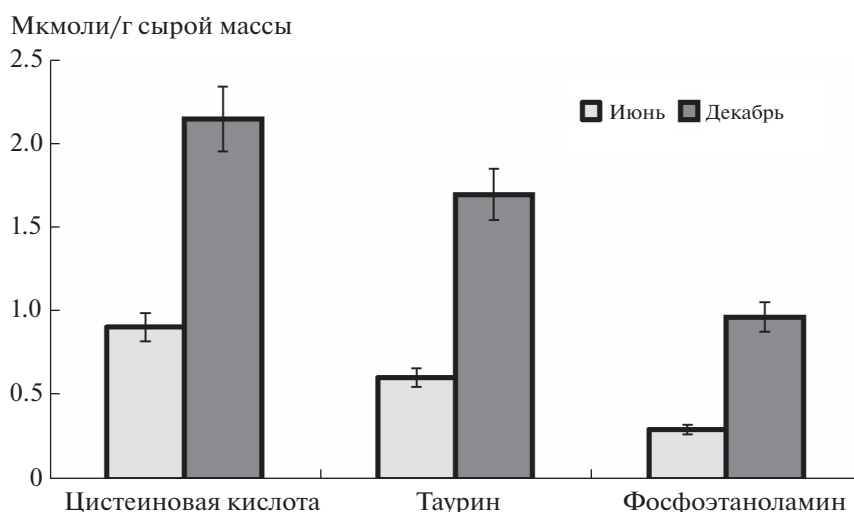


Рис. 1. Вторичные метаболиты икроножных мышц лягушки *R. temporaria* летом и в начале гибернации.

мические и морфологические изменения, наряду с изменением образа жизни, наверно, могут сопровождаться и биохимическими изменениями состава мышечной ткани, включая изменение соотношения пулов свободных аминокислот и возможное появление каких-то “новых” вторичных метаболитов. Эти изменения особенно ярко проявляются в процессе адаптации к низким температурам и у разных видов животных имеют свои особенности.

Так, в данной работе показано, что в мышцах лягушек *R. temporaria*, в отличие от рыб *Perccottus glenii* [12], свободная аспарагиновая кислота присутствует уже в значительном количестве, обретая, вероятно, существенную роль в усложненных задачах метаболизма амфибий. В мышцах летнего периода она составляет около одной трети от пула глутаминовой кислоты, 1.35 мкмоль/г (табл. 1), но зимой ее уровень понижается до 0.55 мкмоль/г.

Весомое участие аланина в низкотемпературной адаптации травяной лягушки сопряжено с убылью глутаминовой кислоты (табл. 1), от которой, возможно, и заимствованы аминокислоты для синтеза аланина. Возрастание количества аланина соответствует феномену повышения его уровня у лесных и свистящих лягушек, зимой вмерзающих в лед и выдерживающих экспериментальное замораживание до  $-4^{\circ}\text{C}$  в течение 36–48 ч [2, 7]. У лесных лягушек *R. sylvatica* в результате экспозиции при  $-2.5^{\circ}\text{C}$  в течение 2 сут выявлено увеличение пула аланина от 5.34 до 13.15 мкмоль/г [2]. У свистящих квакш *Pseudacris crucifer* при замораживании до  $-4^{\circ}\text{C}$  в течение 36 ч происходит еще более значительное увеличение уровня аланина, от 1.68 до 5.85 мкмоль/г, обусловленное, как предполагают авторы, криопротекторным воздействием этой аминокислоты [2, 7]. В пользу криопротекторного эффекта аланина свидетельствует также огромное возрастание его кон-

центрации, в 14 раз, в гемолимфе бабочки *Pieris brassicae* при  $-6^{\circ}\text{C}$  [4].

Обращает на себя внимание значительное количество гистидина и 3-метилгистидина, 2.20 и 1.52 мкмоль/г, выявленных в летний период. О присутствии гистидина, причем в наибольшем по сравнению с другими аминокислотами количестве (особенно, у головастиков), сообщалось только в работе, выполненной на мышцах лягушки-быка *R. catesbeiana* [13]. Интересен и обнаруженный в нашей работе факт существенного увеличения 3-метилгистидина в начале гибернации *R. temporaria*, до 2.80 мкмоль/г (табл. 1), выявляющий особенности метаболизма и специфику участия в низкотемпературной адаптации свободных аминокислот травяной лягушки. О функции непротеиногенной аминокислоты 3-метилгистидина известно не так много; известно, что он является продуктом метаболизма актина и миозина и отражает уровень распада белков в мышечной ткани. Asatoog и соавт. [14] когда-то посвятили 3-метилгистидину работу, показав его присутствие в актине крыс.

Аминокислотный состав мышц разных видов рептилий кажется, по сравнению с таковым *R. temporaria*, более своеобразным и даже необычным. Например, для мышц черепах *Chrysemys picta marginata* и *C. picta bellii* характерно необычайно высокое содержание метаболитически малоактивного валина, 2.488 и 3.409 мкмоль/г, соответственно, и очень высокое содержание ГАМК, часто отсутствующей не только в мышцах лягушек, но и в мышцах других позвоночных [8].

Большинство незаменимых аминокислот (метионин, валин, изолейцин, лейцин) присутствует в мышцах *R. temporaria* в очень небольшом количестве (табл. 2). В процессе сезонного снижения температуры и наступившего затем оцепенения их пу-

лы практически не изменяются. Исключением является пул треонина, возросший от 2.0 мкмоль до 2.9 мкмоль/г, и лизин, уровень которого, напротив, снизился от 1.38 до 0.9 мкмоль/г (табл. 2). Увеличение количества треонина коррелирует с уменьшением количества аспарагиновой кислоты (табл. 1), из которой он мог образоваться. Стабильный уровень незаменимых свободных аминокислот особенно важен для синтеза белков и регуляторных пептидов, и в этих процессах баланс незаменимых аминокислот играет особенно важную роль: заменимые могут быть легко синтезированы из кетокислот или других относительно простых предшественников. В связи с этим следует отметить, что в мышцах свистящей квакши *Pseudacris crucifer*, напротив, уровень незаменимых аминокислот, изолейцина, лейцина и лизина (треонин и валин не обнаружены) при замораживании животных до  $-4^{\circ}\text{C}$  в течение 36 ч увеличивается в 3–6 раз [7]. Незаменимые аминокислоты лесной лягушки *R. sylvatica* при замораживании незначительно уменьшают свои пулы [2]. Наличие свободных незаменимых аминокислот только в следовых количествах и наблюдаемое постоянство их концентраций указывают на существование чрезвычайно эффективных механизмов регулирования.

Суммарное количество заменимых аминокислот у зимних животных выше, чем у летних, и составляет 17.5 мкмоль/г по сравнению с летними 14.3 мкмоль/г (табл. 1). Суммарное количество незаменимых аминокислот у зимних животных почти совпадает с летним пулом (табл. 2). Таким образом, общий баланс аминокислот может предполагать преобладание процессов протеолиза над процессами синтеза белков.

В данной работе впервые в мышцах земноводных обнаружены цистеиновая кислота и фосфоэтаноламин. Об этих веществах не сообщалось даже в классических работах Churchill и Storey, выполненных на мышцах лягушек [2, 7]; вероятно, используемый авторами метод не позволял выявить эти НПС. Присутствие названных вторичных метаболитов в мышцах *R. temporaria* свидетельствует о специфике обменных процессов лягушек, а их аккумуляция в состоянии анабиоза — о специфике адаптации при низких температурах (рис. 1). Значимость полученной информации дополняется отсутствием названных вторичных метаболитов в мышцах рыб-телеостов и др. [5], что свидетельствует о появлении в мышечной ткани земноводных новых биохимических особенностей по сравнению с предыдущим уровнем филогенеза.

Цистеиновая кислота не обнаруживается в мышечных тканях предшествующих стадий филогенеза, — по крайней мере, у рыб не выявляется [5, 12], зато в существенном количестве присутствует на более высоких ступенях эволюции и уже не только в мышцах. Этот промежуточный продукт серосодержащих кислот обнаружен в мышцах млекопитающих (включая человека), в плазме крови, в

эритроцитах людей [15–17], в гипоталамусе крыс, чувствительном к радикальным температурным сдвигам [18]. Во время соревнований, когда возрастает количество свободных радикалов, уровень цистеиновой кислоты повышается в плазме человека в три раза; возможно, этот эффект обусловлен антиоксидантными свойствами этой субстанции [16, 17]. Цистеиновая кислота образуется в результате окисления цистеина в цистеинсульфиновую кислоту, которая затем окисляется в цистеиновую, а та, через образование гипотаурина, превращается в таурин [16, 19]. Низкое содержание таурина в мышечной ткани *R. temporaria* (рис. 1) — неожиданный факт данного исследования, вероятно, напрямую связанный с накоплением цистеиновой кислоты, предшественника таурина.

Таурин к началу зимы в мышцах лягушек все же накапливается, но не в таком количестве, как у рыб-телеостов, где он аккумулируется зимой, несмотря на то, что его пул и летом достаточно велик [3, 5, 12]. Согласно литературным данным, таурин не синтезируется в мышцах из-за отсутствия цистеиндиоксигеназы — первого фермента катаболического пути цистеина, приводящего к таурину [20]. Пул таурина в мышцах зависит от его доставки, осуществляемой зависящим от хлора транспортером таурина (TauT, *SLC6A6* gene) [20]. В тканях организмов более древних филогенетических уровней количество таурина наиболее значительно — например, у литоральных моллюсков и рыб [3]. Любопытным моментом является и то, что значительно падение уровня таурина в мышцах лягушки по сравнению с мышцами рыб носит, “с точки зрения эволюции”, временный характер и, возможно, связано с отсутствием в них транспортера таурина. В мышцах более высокоразвитых животных таурин присутствует вновь в большом количестве [9, 12, 19, 21], но теперь вне зависимости от низкой температуры. Исключительно яркой иллюстрацией к этому утверждению являются эксперименты, проведенные на ужах *Thamnophis sirtalis*, отловленных в сентябре-месяце при температуре окружающей среды  $+15^{\circ}\text{C}$  [9]. После отлова животных температуру снижали на  $1^{\circ}\text{C}$  в день до установления  $+3^{\circ}\text{C}$ , и далее поддерживали на уровне  $+3^{\circ}\text{C}$  в течение 2–3 нед. В это время животные находились в состоянии гибернации. Аккумуляции таурина (как и протеиногенных аминокислот) в мышечной ткани охлажденных, гибернирующих ужей не наблюдалось, но ведь крайне важно иметь в виду, что уровень таурина изначально, в контроле ( $+15^{\circ}\text{C}$ ), был очень высоким, 18.06 мкмоль/г [9].

В меньшем количестве, чем в мышцах ужей, таурин присутствует в мышцах черепах *Chrysemys picta marginata* и *C. picta bellii*, однако изменение его пула при снижении температуры до  $-2.5^{\circ}\text{C}$  установлено лишь частично: таурин выходил из хроматографической колонки, вследствие недостаточной селективности сорбента, в одном пике с алаином, поэтому авторы представили суммарную



величину их пулов (7.4 и 7.7 мкмоль/г при +5 и –2.5°C) [8]. Можно предположить, что возрастные количества таурина после охлаждения если имело место, то оно было незначительным.

Согласно литературным данным, в мышцах человека таурин является аминокислотой, самой преобладающей в количественном отношении, но еще более высокая концентрация ее — в сердце, в сетчатке глаза, в эритроцитах, значительная концентрация и в мозге [19, 22]. О широком спектре эффектов таурина написаны сотни, если не тысячи статей, поэтому предположение о его функции при низких температурах можно делать, учитывая его влияние на системы антиоксидантной защиты, функционирование транспортных систем, процессы синтеза и деградации свободных серосодержащих аминокислот, стабилизацию клеточных мембран и т.д. [19].

Фосфоэтанолламин, отсутствовавший в мышцах рыб [12], но обнаруженный в данной работе в мышечной ткани лягушек, был впервые выявлен автором в мозге прудовых рыб *P. glenii*, причем в значительном количестве — именно при низких температурах, 0°C [5]. О присутствии фосфоэтанолламина в мышцах амфибий и рептилий не упоминалось ни в одной работе, поскольку разделение и идентификация этого соединения требует использования другого метода, с нингидрином в качестве окрашивающего агента (в нашем случае, это метод Шпахмана и соавт. [10]). Однако фосфоэтанолламин, причем в значительном количестве, был обнаружен автором в мозге исследуемых лягушек *R. temporaria* [6], а Ташики и Бакстером — в мозге зимних жаб *Bufo boreas*, где его количество превышало пул таурина в 10 раз [23]; известно о его присутствии и в мозге млекопитающих [18]. Образование этого вторичного метаболита, возможно, обусловлено процессами биосинтеза и распада мембранных фосфолипидов или же, напротив, — синтезом из АТФ и этаноламина с последующим использованием для построения глицерофосфолипидов и сфингомиелина [24]. Предшествующие данные об аккумуляции фосфоэтанолламина в мозге лягушек в зимнее время [6], в совокупности с настоящими результатами, но уже по отношению к мышцам, могут предполагать адаптогенную функцию этого соединения, как и цистеиновой кислоты, при низких температурах. О том, что функция фосфоэтанолламина, вероятно, изменяется в зависимости от органа и стадии филогенеза, свидетельствует накопление литературных данных о значительном изменении количества фосфоэтанолламина при некоторых патологиях и стрессах, о его антиангиогенной и антиметастазной активности у человека, об участии в активизации иммунной системы [25]. Таким образом, механизмы, функционирующие в мышцах амфибий при низких температурах как адаптивные, переходят на более высокую ступень филогенеза и функционируют там при нормальных температурах, участвуя в каких-то других процессах.

## ВЫВОДЫ

1. При переходе от водного образа жизни к наземному происходит усложнение механизма низкотемпературной адаптации, находящее отражение в качественном изменении биохимического состава ее звеньев.

2. В икроножной мышце лягушки *R. temporaria* в начале анабиоза при температуре +4°C выявлена существенная перестройка метаболизма свободных аминокислот, которая сопровождалась значительной аккумуляцией аланина и, в меньшей степени, 3-метилгистидина.

3. Впервые в мышцах пойкилотермных животных, травяных лягушек *R. temporaria*, обнаружены цистеиновая кислота и фосфоэтанолламин. Количество этих вторичных метаболитов в начале гибернации значительно выше, чем в летний период.

4. Низкое содержание таурина, выявленное в мышцах лягушек и не свойственное мышцам животных предшествующей и последующих стадий филогенеза, предполагает изменение свойств ферментов (или состава участников), задействованных в метаболизме серосодержащих аминокислот земноводных.

5. Аккумуляция метаболитов, вызванная низкой температурой, может быть связана с протекторной ролью этих соединений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution New York: Oxford University Press; 466 p. 2002.
2. Storey K.B., Storey J.M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. Can. J. Zoology. 64 (1): 49–56. 1986.
3. Karanova M. Influence of Low Temperature on the Evolution of Amino Acids Pools Adaptive Modifications in Poikilothermic Animals (review). Int. J. Biochem. Biophys. 1 (2): 33–40. 2013.
4. Somme L. The effect of temperature and anoxia on haemolymph composition and supercooling in three overwintering insects. J. Insect Physiol. 13: 805–814. 1967.
5. Каранова М.В. Влияние сезонного снижения температуры и холодового шока на состав свободных аминокислот и фосфомоноэфиров в разных органах ротана-головешки *Perccottus glenii* (Eleotridae). Вopr. ихтиол. 58 (4): 486–495. 2018. [Karanova M.V. Impact of Seasonal Temperature Decrease and Cold Shock on the Composition of Free Amino Acids and Phosphomonoethers in Various Organs of Amur Sleeper *Perccottus glenii* (Eleotridae). J. Ichthyol. 58 (4): 570–579. 2018. (In Russ)].
6. Каранова М.В. Вторичные метаболиты и аспарагиновая кислота в мозге амфибий *R. temporaria* как низкотемпературные адаптогены. Ж. эвол. биох. и физиол. 56 (3): 207–212. 2020. [Karanova M.V. Secondary Metabolites and Aspartic Acid in the Brain of the Frog *Rana temporaria* as Low-Temperature Adaptogens. J. Evol. Biochem. Physiol. 56 (3): 207–212. 2020. (In Russ)].

7. Churchill T.A., Storey K.B. Organ Metabolism and Cryoprotectant Synthesis during Freezing in Spring Peepers *Pseudacris crucifer*. Copeia. 1996 (3): 517–525. 1996.
8. Churchill T.A., Storey K.B. Natural freezing survival by painted turtles *Chrysemys picta marginata* and *C. picta bellii*. Amer. J. Physiol. 11: R530–R537. 1992.
9. Churchill T.A., Storey K.B. Freezing survival of the garter snake *Thamnophis sirtalis*. Canadian J. Zoology. 70 (1): 99–105. 2011.
10. Spachman D.H., Stein W.H., Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30 (7): 1190–1206. 1958.
11. Шмальгаузен И.И. Основы сравнительной анатомии позвоночных животных. М.: Советская наука. 512 с. 1947.
12. Каранова М.В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Perccottus glenii* в период подготовки и завершения гибернации. Ж. эвол. биохим. и физиол. 45 (1): 59–67. 2009. [Karanova M.V. Free amino acid composition in blood and muscle of the gobi *Perccottus glenii* at the period of preparation and completion of hibernation. J. Evol. Biochem. Physiol. 45 (1): 67–77. 2009].
13. Nakagawa H., Lindsay R.H., Cohen P.P. Composition and labeling patterns of “free” and protein amino acids in *Rana catesbeiana* tadpoles and frogs. Arch. Biochem. Biophys. 106: 299–306. 1964.
14. Asatoor A.M., Armstrong M.D. 3-Methylhistidine, a component of actin. Biochem. Biophys. Res. Com. 26 (2): 168–174. 1967.
15. Мурадян А.Ш., Едигарян А.Н., Галоян А.А. Содержание аминокислот и других нингидринположительных соединений в сердечной мышце крупного рогатого скота. АН Арм. ССР. Биол. журнал Армении. XXXIV (9): 968–972. 1981.
16. Гараева О.И. Серосодержащие аминокислоты как маркеры состояния стресса. Fiziol. și Sanocreatol. Bul. AȘM. Științele vieții. 3 (315): 50–62. 2011.
17. Grimble F.R. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. J. Nutr. 136 (6): 1660–1665. 2006.
18. Шейбак В.М., Лях И.В., Дорошенко Е.М., Смирнов В.Ю., Моги́левец О.Н. Свободные аминокислоты и их азотсодержащие метаболиты в гипоталамусе крыс при острой интоксикации динилом и их корреляция с аминокислотным спектром плазмы крови. Вестник ВГМУ. 11 (1): 31–35. 2012. [Shejbak V.M., Lyah I.V., Doroshenko E.M., Smirnov V.Yu., Mogilevec O.N. Svoobodnye aminokisloty i ih azotsoderzhashchie metabolity v gipotalamuse krysv pri ostroj intoksikacii dinilom i ih korrelyaciya s aminokislotnym spektrom plazmy krovi. Vestnik VGMU. 11(1): 31–35. 2012. (In Russ)].
19. Harris R., Wen S. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. Mol. Vis. 18: 2673–2686. 2012.
20. Ito T., Kimura Y., Uozumi Y., Takai M., Muraoka S., Matsuda T., Ueki K., Yoshiyama M., Ikawa M., Okabe M., Schaffer S.W., Fujio Y., Azuma J. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy. J. Mol. Cell. Cardiol. 44: 927–937. 2008.
21. Iwata K. Nitrogen metabolism in the mudskipper, *Periophthalmus cantonensis*: Changes in free amino acids and related compounds in various tissues under conditions of ammonia loading, with special reference to its high ammonia tolerance. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol. 91 (3): 499–508. 1988.
22. Galloway S.D., Talanian J.L., Shoveller A.K., Heigenhauser G.J., Spriet L.L. Seven days of oral taurine supplementation does not increase muscle taurine content or alter substrate metabolism during prolonged exercise in humans. J. Appl. Physiol. 105 (2): 643–651. 2008.
23. Tachiki K.H., Baxter C.F. Taurine: levels in brain tissue: the need for reevaluation. J. Neurochem. 33 (5): 1125–1129. 1979.
24. Morozov V.I., Sakuta G.A., Kalinski M.I. Sphingosine-1-phosphate: distribution, metabolism and role in the regulation of cellular functions. Ukr. Biochem. J. 85 (1): 5–21. 2013.
25. Ferreira A.K., Menegueto R., Pereira A. et al. Anticancer Effects of Synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich Ascites Tumor: An Experimental Study. Anticancer Res. 32 (1): 95–104. 2012.

## LOW-TEMPERATURE ADAPTATION OF THE *RANA TEMPORARIA* GASTROCNEMIUS MUSCLE AT THE ONSET OF ANABIOSIS

M. V. Karanova

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow, Russia*

*e-mail: karanovari@mail.ru*

A study of the effect of a seasonal decrease in ambient temperature on the composition of free amino acids and ninhydrin-positive secondary metabolites in gastrocnemius muscles of the frog *Rana temporaria* revealed that at the onset of winter anabiosis, as compared to the summer season, the alanine pool increased from 2.43 to 6.10  $\mu\text{mol/g w.w.}$ , and the 3-methylhistidine pool rose from 1.52 to 2.80  $\mu\text{mol/g w.w.}$  For the first time, muscles of poikilothermic animals (namely, frogs) were found to contain cysteine and phosphoethanolamine, the level of which increased by the onset of hibernation, particularly for cysteine (from 0.91 to 2.15  $\mu\text{mol/g w.w.}$ ). The taurine level proved to be far lower compared to animals both of lower and higher phylogenetic ranks, but by the onset of hibernation it increased almost threefold. Presumably, the accumulation of the above metabolites relates to their protective role at temperatures that are extremely low for the survival of *R. temporaria*.

**Keywords:** low-temperature adaptation, frog muscles, taurine, phosphoethanolamine, cysteine, phylogenesis

## МЕЖСАМЦОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА НЕЙТРАЛЬНОЙ ТЕРРИТОРИИ И ПОСЛЕДУЮЩАЯ ДИНАМИКА УРОВНЯ КОРТИКОСТЕРОНА И ТЕСТОСТЕРОНА В КРОВИ У РУЧНЫХ И АГРЕССИВНЫХ СЕРЫХ КРЫС (*RATTUS NORVEGICUS*)

© 2021 г. Р. Г. Гулевич<sup>1,\*</sup>, С. Г. Шихевич<sup>1</sup>, М. Ю. Коношенко<sup>2</sup>, Р. В. Кожемякина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

\*E-mail: gulevich@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 25.12.2020 г.

Принята к публикации 27.12.2020 г.

Ранее у серых крыс (*Rattus norvegicus*), селекционируемых на отсутствие и усиление агрессивно-оборонительной реакции на человека (или ручное и агрессивное поведение), исследовали стресс-реактивность, в основном, на несоциальные воздействия. Тогда как данные о последствиях социального стресса, вызванного, в частности, взаимодействием с конспецификом, ограничены. Как уже было показано, отбор серых крыс на ручное и агрессивное поведение по отношению к человеку вызывает, соответственно, ослабление или усиление внутривидовой межсамцовой агрессии. Чтобы выяснить, сопровождаются ли различия в агрессивном поведении гормональными сдвигами, исследовали динамику уровня кортикостерона и тестостерона в крови после теста на межсамцовую агрессию у ручных, агрессивных крыс и неселекционированных крыс, которых разводили в виварии в течение 7–8 поколений в качестве контроля. Целью данной работы было исследование влияния отбора по отношению к человеку на агонистические взаимодействия в условиях незнакомой клетки (или на нейтральной территории) и последующую динамику изменения уровней кортикостерона и тестостерона в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных крыс.

Показано, что латентный период атаки у ручных самцов более длительный, а продолжительность агрессивного поведения и количество его паттернов, приближаясь к нулевым значениям, существенно меньше, чем у агрессивных и неселекционированных. Агрессивные крысы в условиях теста на нейтральной территории уступают неселекционированным по суммарному времени конфронтаций. Более выраженные проявления агрессивности у неселекционированных крыс по сравнению с агрессивными и ручными животными отмечаются на фоне более высокого базального уровня кортикостерона и повышенной стресс-реактивности в ответ на взаимодействие с незнакомым самцом, в то время как пониженная агрессивность у ручных крыс в тесте на нейтральной территории сопровождается более низким уровнем тестостерона после теста по сравнению с неселекционированными и агрессивными животными.

**Ключевые слова:** отбор, серая крыса, поведение, агрессивность, кортикостерон, тестостерон

**DOI:** 10.31857/S0044452921020091

### ВВЕДЕНИЕ

Агрессивное поведение является общим симптомом многих психологических расстройств и психических заболеваний, таких как шизофрения, биполярные расстройства, повышение тревожности и аутизм [1–4]. Среди многих факторов, способствующих развитию агрессии, рассматриваются генетические, средовые (обучение агрессии в детском возрасте или нарушение родительской заботы), онтогенетические, нарушающие развитие центральной нервной системы, гормональные и нейротрансмиттерные дисфункции. Убедительные доказательства наследственной компоненты в проявлении агрессии

выявляются при селекции животных на специфические параметры агрессивности [5–7].

В литературе обсуждается участие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) в регуляции агрессивного поведения [8–11]. В экспериментах на крысах было показано, что введение кортикостерона усиливает проявление агрессивного поведения, а введение метирапона, ингибитора синтеза кортикостерона, наоборот, ослабляет его [8]. По данным Haller (2014) у животных при встрече с незнакомыми субъектами, вызывающей мобилизацию ресурсов для контроля над ситуацией, активируется ГГНС уже на ранних стадиях со-

циального взаимодействия, даже до начала борьбы, и глюкокортикоиды, секретируемые в ответ на встречу, быстро стимулируют агрессивность [11]. У самцов линии крыс, селекционированных на пониженное тревожно-подобное поведение (LAB — low-anxiety-related behavior), в отличие от самцов линии крыс, селекционированных на повышенное тревожно-подобное поведение (HAB — high-anxiety-related behavior), отмечали усиление межсамцовой агрессии, а также повышение базального уровня кортикостерона в крови и уровня АКТГ спустя 15 мин после начала теста резидент—интродер [6, 10]. Тогда как стресс-реактивность на несоциальное воздействие, вызванное условиями открытого рукава приподнятого крестообразного лабиринта, у крыс линии LAB, наоборот, оказалась ниже, чем у крыс линии HAB [12]. В отличие от крыс этих линий мыши из контрастных по поведению линий, полученных в разных лабораториях по трем селекционным программам на повышенную (SAL, TA и NC900) и пониженную (LAL, TNA и NC 100) агрессивность, существенно не отличались по базальному уровню кортикостерона [13].

Известно, что тестостерон, биосинтез которого осуществляется в клетках Лейдига семенников, оказывает стимулирующее влияние на агрессивное поведение, о чем свидетельствуют, в частности, эффекты кастрации самцов грызунов и последующего введения этого гормона [14, 15]. В то же время согласно гипотезе вызова (challenge) причинно-следственная связь между тестостероном и агрессивностью бывает непродолжительной и возникает только у полигамных, конкурентных видов, когда самцы вынуждены бороться за статус и/или ресурсы, необходимые для воспроизводства [16]. Вместе с тем у самцов крыс линий HAB и LAB, описанных выше и отличающихся по степени агрессивности, уровни тестостерона в крови не отличаются ни в состоянии покоя, ни спустя час после начала теста резидент—интродер [10]. При этом только у более агрессивных самцов линии LAB спустя час после начала теста резидент—интродер авторы отмечали увеличение количества c-Fos-позитивных клеток в парвоцеллюлярном районе паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN), свидетельствующее о нейрональной активации этого района, по сравнению с менее агрессивными самцами линии HAB.

Серые крысы, селекционируемые в течение длительного периода (80 поколений) в Институте цитологии и генетики СО РАН на отсутствие и усиление агрессивно-оборонительной реакции на человека (или ручное и агрессивное поведение), позволяют исследовать генетически-детерминированные особенности межсамцовых взаимодействий и вызванные ими гормональные изменения, что может способствовать пониманию механизмов агрессивного поведения, которое формируется в процессе отбора. Ранее было показано, что у ручных

самцов ослабевает агрессивное поведение по отношению к конспецификам в тестах резидент—интродер и на нейтральной территории (или в незнакомой клетке), а также уровень тревожности, судя по поведению в светло-темной камере и реакции вздрагивания [17–19]. В отличие от теста резидент—интродер, когда самцы крыс защищают свою собственную территорию, в тесте на нейтральной территории агрессивность самцов крыс проявляется слабее [17, 20]. В ранее опубликованной работе по межсамцовым взаимодействиям крыс на нейтральной территории не было данных по результатам теста у неселекционированных самцов крыс. В одной из последних работ были представлены данные по динамике изменения уровня кортикостерона в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных крыс после рестрикционного стресса [21]. Однако оставалось неизвестно, каковы особенности динамики изменения этого гормона у исследуемых крыс после взаимодействия с незнакомым конспецификом. В исследовании межсамцовых взаимодействий в тесте резидент—интродер данные по уровню кортикостерона в крови приводятся только в одной точке после теста [18]. При этом неселекционированные крысы превосходили агрессивных и ручных крыс по уровню гормона как до, так и после теста. К тому же независимо от поведения у самцов крыс после теста резидент—интродер уровень кортикостерона в крови повышался по сравнению с базальным уровнем. В ряде исследований, проведенных ранее как на зрелых самцах крыс, так и в процессе онтогенеза, ручные, агрессивные и неселекционированные самцы существенно не отличались по базальному уровню тестостерона в крови [21, 22], но было неясно, как влияет отбор крыс по поведению на уровень тестостерона после межсамцовых взаимодействий.

Предполагалось, что агонистические взаимодействия у неселекционированных самцов крыс в незнакомой клетке могут иметь характерные особенности в отличие от селекционируемых на ручное и агрессивное поведение, и что вектор отбора по поведению может влиять на динамику изменения уровней кортикостерона и тестостерона после межсамцовых взаимодействий.

Целью данной работы было исследование влияния отбора по отношению к человеку на параметры межсамцовых взаимодействий в условиях незнакомой клетки и последующую динамику изменения уровней кортикостерона и тестостерона в крови у ручных, агрессивных и неселекционированных крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

### *Экспериментальные животные*

Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Биоэтической комиссии Института цитоло-

гии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19 марта 2012 г.). Эксперименты проводили в Центре коллективного пользования (ЦКП) "Виварий конвенциональных животных" ИЦиГ на двухмесячных самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*) весом 270–300 г, которые были получены в результате 80 поколений отбора на отсутствие и усиление агрессивного-оборонительной реакции на человека, далее называемых ручными и агрессивными соответственно. Реакцию крыс оценивали в условных единицах или так называемых баллах поведенческой реакции на руку человека в перчатке в условиях домашней клетки в интервале от +4 до –4 баллов [5, 23]. Во время тестирования в клетке откидывали переднюю стенку, и экспериментатор протягивал руку в перчатке в открытую клетку. Средние популяционные баллы поведения достигали (+)3.45 ± 0.05 у ручных и (–)3.05 ± 0.07 у агрессивных самцов. В качестве контроля использовали неселекционированных самцов 7–8 поколений разведения в условиях вивария. Средний балл поведения у этих животных (–)2.26 ± 0.07 достоверно отличался от баллов у агрессивных и ручных ( $p < 0.001$  в обоих случаях). Животных содержали в металлических клетках (50 × 33 × 20 см) по 4 самца в условиях естественного фотопериода и свободного доступа к воде и пище. За неделю до тестирования самцов крыс рассаживали в клетки по одному. Все тесты проводили с 14:00 до 18:00.

#### *Тест на межсамцовую агрессию в незнакомой клетке*

Тест проводили в клетке из прозрачного пластика (40 × 40 × 60 см), разделенной на два равных отсека перегородкой [23]. В эти отсеки одновременно помещали по одному незнакомому самцу из каждой исследуемой линии с равной массой, а затем перегородку убирала. Всего было проведено 18 тестов: 6 – между дикими парами, 6 – между агрессивными парами и 6 – между неагрессивными парами. Поведение самцов регистрировали в течение 5 мин на видеокамеру Panasonic, SDR-H280EE-S (Япония). В дальнейшем видеозаписи обрабатывали с помощью программы, разработанной в лаборатории, позволяющей оценивать число и продолжительность поведенческих паттернов, а именно латентный период первого агрессивного взаимодействия, число и время атак, преследований, ударов задними лапами, вертикальных стоек, опрокидываний на спину, агрессивного груминга, время боковых угрожающих поз [24]. Кроме того, регистрировали время социального поведения, паттернами которого были подходы к партнеру и его обнюхивания, а также позы вытягивания в направлении партнера, но не приближения к нему.

#### *Взятие проб крови и определение уровня гормонов в плазме*

Сразу после 5-минутного теста в незнакомой клетке у самцов крыс брали пробы крови из кончика хвоста, а затем их возвращали в домашние клетки. Далее кровь брали через 30 мин, один и два часа после окончания теста. Для определения базального уровня гормонов кровь брали спустя 6 дней после теста. Кровь центрифугировали, полученную плазму замораживали на –20°C до определения уровня гормонов в плазме крови. Уровни кортикостерона и тестостерона определяли иммуноферментным методом с помощью специальных EIA наборов фирмы IDS Ltd UK. Интенсивность окрашивания проб регистрировали на планшетном спектрофотометре Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter. В каждой группе было по 9–12 животных, как указано в подписи к рисункам. Часть проб выпали или в процессе определения, или из калибровочной кривой.

#### *Статистическая обработка результатов*

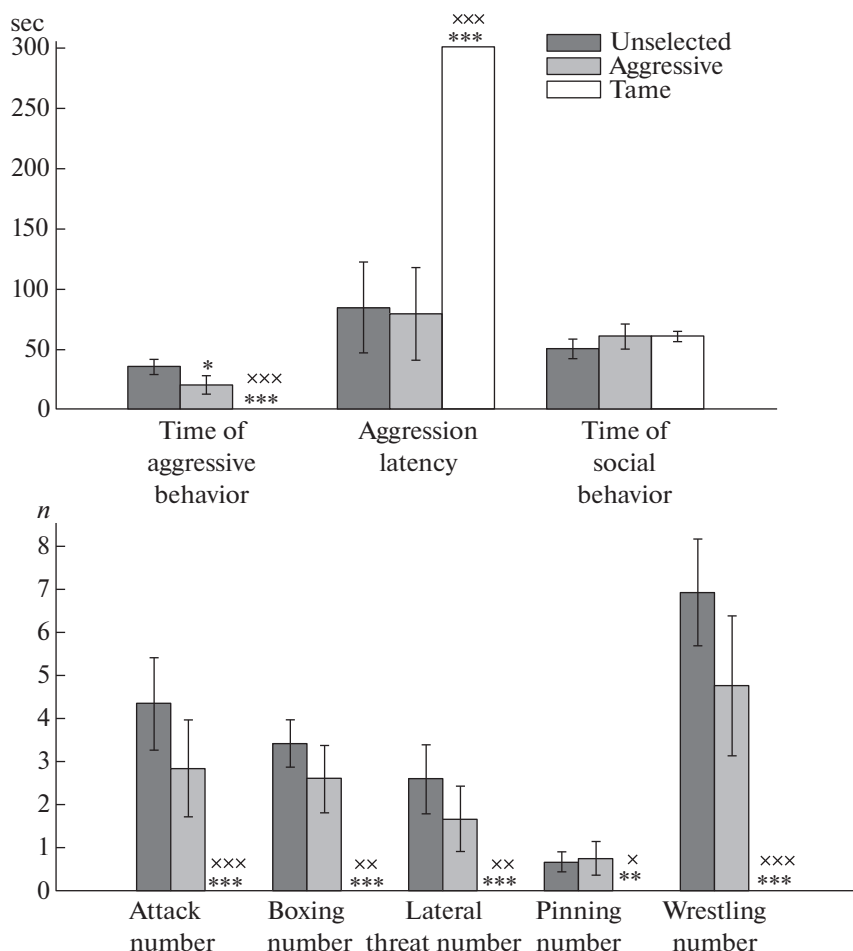
Все значения исследуемых параметров представлены в виде средних и ошибок средних ( $M \pm m$ ). Влияние фактора генотипа на поведенческие параметры самцов крыс определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а влияние факторов генотипа и межсамцовых конфронтаций на динамику изменения гормонов до и после конфронтаций – с помощью двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений. Достоверность различий между группами животных оценивали с помощью Kruskal–Wallis и Fisher LSD post hoc тестов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ межсамцовых взаимодействий у самцов крыс в условиях незнакомой клетки показал достоверное влияние фактора генотипа на суммарное время агрессии  $F_{2,36} = 26.74$ ,  $p < 0.001$ , латентный период атаки  $F_{2,36} = 15.09$ ,  $p < 0.001$ , число атак  $F_{2,36} = 15.61$ ,  $p < 0.001$ , вертикальных стоек  $F_{2,36} = 18.18$ ,  $p < 0.001$ , боковых поз угрозы  $F_{2,36} = 12.72$ ,  $p < 0.001$ , поваливаний на спину  $F_{2,36} = 7.02$ ,  $p < 0.05$ , эпизодов с борьбой  $F_{2,36} = 25.09$ ,  $p < 0.001$ .

Латентный период атаки был достоверно больше, а время и число всех паттернов агрессивного поведения – достоверно меньше у ручных самцов, чем у агрессивных и неселекционированных (рис. 1). По суммарному времени агрессии агрессивные самцы уступали неселекционированным ( $p < 0.05$ ).

Двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений показал влияние факторов генотипа ( $F_{2,25} = 34.28$ ,  $p < 0.001$ ) и конфронтаций ( $F_{4,100} = 63.38$ ,  $p < 0.001$ ) на динамику изменения уровня кортикостерона в крови у неселек-



**Рис. 1.** Параметры межсамцовой агрессии у неселекционированных, агрессивных и ручных самцов на нейтральной территории. На верхнем рисунке представлены продолжительность агрессивного, социального поведения и латентный период до первого агрессивного взаимодействия, на нижнем — количество отдельных паттернов агрессивного поведения. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  по сравнению с неселекционированными крысами, <sup>xxx</sup>  $p < 0.001$ , <sup>xx</sup>  $p < 0.01$ , <sup>x</sup>  $p < 0.05$  по сравнению с агрессивными крысами. Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 12$ .

ционированных, агрессивных и ручных самцов крыс, тогда как взаимодействие этих факторов было не достоверно ( $F_{8,100} = 1.98$ ,  $p < 0.06$ ). У крыс всех исследуемых групп уровень кортикостерона в крови достоверно повышался сразу после взаимодействий с незнакомым самцом по сравнению с базальным ( $p < 0.001$  во всех случаях), достигая максимальных значений у диких и ручных спустя 30 мин, а у агрессивных самцов спустя 1 ч после окончания теста (рис. 2). Через 2 ч после теста уровни кортикостерона у крыс всех исследуемых групп становились ниже, чем соответствующие уровни, измеряемые через час ( $p < 0.001$  — для неселекционированных,  $p < 0.01$  — для ручных,  $p < 0.05$  — для агрессивных), но не достигали базальных значений.

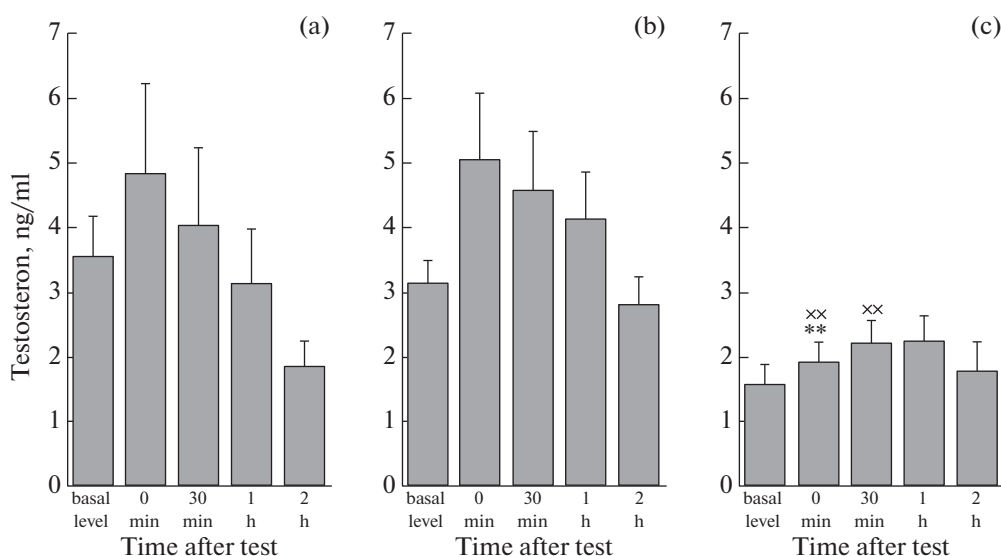
У неселекционированных самцов уровень кортикостерона в крови как в состоянии покоя, так и во всех исследуемых точках после теста был выше, чем у агрессивных и ручных животных. Между агрессивными и ручными самцами различия по

уровню кортикостерона отмечали только через 30 мин после теста, причем ручные самцы превосходили агрессивных ( $p < 0.05$ ).

Двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений показал влияние факторов генотипа ( $F_{2,27} = 3.41$ ,  $p < 0.05$ ) и конфронтаций ( $F_{4,108} = 5.67$ ,  $p < 0.001$ ) на уровень тестостерона в крови у неселекционированных, агрессивных и ручных самцов крыс, тогда как взаимодействие этих факторов было не достоверно ( $F_{8,108} = 1.65$ ,  $p > 0.05$ ). По базальному уровню тестостерона самцы крыс трех генотипов достоверно не отличались, только у ручных отмечалась тенденция к более низкому уровню этого гормона по сравнению с неселекционированными ( $p = 0.06$ ). Сразу после межсамцовых взаимодействий у ручных крыс уровень гормона становился достоверно ниже, чем у неселекционированных и агрессивных животных ( $p < 0.01$  в обоих случаях), и спустя 30 мин после окончания тестирования оставался более низ-







**Рис. 3.** Уровень тестостерона в крови у неселекционированных (а), агрессивных (в) и ручных (с) крыс до и после межсамцовых взаимодействий на нейтральной территории. \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с неселекционированными крысами; <sup>xx</sup>  $p < 0.01$  по сравнению с агрессивными крысами. Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 10-12$ .

пона), наоборот, — ослабляет [8]. У более агрессивных самцов крыс линии LAB также отмечают повышенные уровни кортикостерона до и после теста резидент—интродер по сравнению с самцами линии HAB [10]. Хотя в отличие от крыс линии LAB, для неселекционированных крыс характерна не только повышенная агрессивность, но и тревожность, судя по выраженной тенденции к менее продолжительному времени нахождения в центре открытого поля по сравнению с агрессивными и ручными крысами [22].

Наблюдаемые различия между неселекционированными и агрессивными крысами по суммарному времени конфронтаций и уровню кортикостерона в крови позволяют заметить, что отбор на агрессивное поведение по отношению к человеку не компенсирует процесс лабораторизации, происходящий в течение длительного разведения и содержания крыс в условиях вивария.

В отличие от неселекционированных крыс, у которых более выраженная агрессивность сопровождается более высоким базальным уровнем кортикостерона и повышенной стресс-реактивностью относительно ручных и агрессивных крыс, у последних по сравнению с ручными крысами уровень кортикостерона до теста не отличается, а спустя 30 мин после теста становится даже ниже. Ранее после теста резидент—интродер отмечали отсутствие различий по базальному уровню кортикостерона и стресс-реактивности у ручных и агрессивных крыс после теста резидент—интродер [18]. Следует заметить, что на ранних этапах отбора уровень кортикостерона как базальный, так и после стресса у агрессивных самцов был достоверно выше, чем у ручных [5, 23], тогда как на более поздних этапах

различия по уровню кортикостерона между агрессивными и ручными крысами становились более сглаженными [21, 26]. Можно предполагать, что в процессе отбора на агрессивное поведение подключаются или становятся более значимыми иные механизмы, которые вызывают агрессивность на фоне выровненного или даже пониженного функционирования ГГНС относительно ручных крыс. Отсутствие различий по базальному уровню кортикостерона отмечали также у мышей линий, селекционированных по длительности латентного периода атаки (SAL и LAL) и по частоте атак на социального партнера NC900 и NC100 [12]. Причем у более агрессивных мышей линии NC900 наблюдали повышенную тревожность, а также понижение уровня  $\alpha(2)$ -субъединицы ГАМК<sub>A</sub> рецептора во фронтальной коре и амигдале [27]. Следует отметить, что для агрессивных крыс также характерна повышенная тревожность по сравнению с ручными [19, 28]. Кроме того, в дорзальном гиппокампе у агрессивных крыс методом магнитно-резонансной спектроскопии найдено понижение процента ГАМК от общего содержания нейрометаболитов по сравнению с ручными крысами [29]. Возможно, селекция по реактивности грызунов как на социального партнера, так и на руку человека влияет на систему ГАМК в тех отделах мозга, которые связаны с агрессивностью и тревожностью.

У самцов всех трех групп уровень кортикостерона в крови сразу после 5-минутных взаимодействий с конспецификом на нейтральной территории повышается по сравнению с базальным, что ранее наблюдали и после теста резидент—интродер [18]. Такое повышение уровня кортикостерона говорит о том, что присутствие рядом незнакомого

партнера оказывает стрессирующее влияние на всех самцов, независимо от их поведения, и вызывает конфронтации у неселекционированных и агрессивных, но не у ручных крыс, у которых латентный период агрессии продолжается в течение всего 5-минутного теста и все остальные параметры агрессивного поведения близки к нулевым значениям. Поскольку ранее было показано, что между стресс-ответом и центральными механизмами, участвующими в регуляции агрессивности, существует быстрая положительная обратная связь [9], можно предполагать, что в процессе отбора на ручное поведение такая связь нарушается.

По базальному уровню тестостерона в крови самцы трех исследуемых групп достоверно не отличались, что подтверждает ранее полученные данные [21, 22] и согласуется с результатами исследования на самцах крыс линий LAB и HAB, отличающихся по степени агрессивности [10]. Уровень тестостерона у ручных крыс становится достоверно ниже, чем у агрессивных и неселекционированных животных только после взаимодействий с самцами-конкурентами. Эти результаты согласуются с гипотезой вызова (challenge), согласно которой связь между агрессивностью и уровнем тестостерона появляется в тот период, когда самцы вступают в борьбу за статус или ресурсы, необходимые для воспроизводства [16]. Через 1 ч после теста все различия по уровню тестостерона у самцов из трех исследуемых групп нивелируются. У самцов крыс линий LAB и HAB, проявляющих разную степень агрессивности, уровень тестостерона через 1 ч после начала теста резидент-интродер также не отличается, но при этом не приводятся данные по уровню этого гормона сразу после теста [10].

Методом иммуногистохимии было показано, что у ручных и агрессивных самцов крыс после теста резидент-интродер увеличивается число клеток, содержащих транскрипционный фактор c-Fos, являющийся маркером нейрональной активности, в ядре ложа конечной полоски, медиальной миндалине и гипоталамической области атаки по сравнению с контрольными животными [30]. Причем по числу таких клеток в гипоталамической области атаки ручные самцы уступали агрессивным. У клеток из гипоталамической области атаки, относящейся к вентро-латеральным районам вентро-медиального гипоталамуса [31, 32], находят аксоны в других отделах гипоталамуса и, в частности, преоптической области [33], играющей важную роль как в агрессивном, так и половом поведении [34]. К тому же преоптическая область — место локализации Gn-RH нейронов [35], секретирующих гонадотропный рилинг-гормон, стимулирующий продукцию гонадотропных гормонов в гипофизе, которые в свою очередь повышают синтез тестостерона в семенниках. В связи с этим можно предполагать, что повышенное число c-Fos положительных клеток у агрессивных крыс после межсамцовых взаимодей-

ствий в гипоталамической области атаки способствует повышенной активности Gn-RH нейронов в преоптической области гипоталамуса, что и приводит к более высокому уровню тестостерона у этих животных по сравнению с ручными самцами.

Таким образом, у неселекционированных крыс и крыс, селекционированных на усиление агрессивно-оборонительной реакции на человека, агрессивность сопровождается разным уровнем функционирования ГГНС до и после взаимодействия с самцом-конкурентом на нейтральной территории. В то время как ручные самцы крыс отличаются от агрессивных и неселекционированных более низким уровнем тестостерона в крови после взаимодействия с самцом-конкурентом.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Селекция крыс и сохранение исследуемых линий в ЦКП “Виварий конвенциональных животных” ИЦиГ СО РАН финансировались в рамках бюджетного проекта (0259-2021-0016). Тестирование крыс по поведению и гормональные исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 19-74-10041.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента — М.Ю. Коношенко, Р.Г. Гулевич.

Сбор данных — Р.В. Кожемякина, С.Г. Шихевич.

Обработка данных — М.Ю. Коношенко, Р.В. Кожемякина, С.Г. Шихевич.

Написание манускрипта — Р.Г. Гулевич, Р.В. Кожемякина.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu Y., Kang R., Yan Y., Gao K., Li Z., Jiang J., Chi X., Xia L. Epidemiology of schizophrenia and risk factors of schizophrenia-associated aggression from 2011 to 2015. *J. Intern. Med. Res.* 46 (10): 4039–4049. 2018. <https://doi.org/10.1177/0300060518786634>
2. Garo J.L., Gunawardane N., Goldberg J.F. Predictors of trait aggression in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 10 (2): 285–292. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2007.00489.x>
3. Neumann I.D., Veenema A.H., Beiderbeck D.I. Aggression and Anxiety: Social Context and Neurobiological Links. *Front. Behav. Neurosci.* 4: 12. 2010. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00012>
4. Mazurek M.O., Kanne S.M., Wodka E.L. Physical aggression in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Res. Autism. Spectrum. Disorders.* 7 (3): 455–465. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2012.11.004>

5. *Plyusnina I. and Oskina I.* Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol. Behav.* 61: 381–385. 1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00445-3)
6. *Veenema A.H., Neumann I.D.* Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain. Behav. Evol.* 70 (4): 274–285. 2007.  
<https://doi.org/10.1159/000105491>
7. *Takahashi A. and Miczek K.* Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 17: 3–44. 2014.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2013\\_263](https://doi.org/10.1007/7854_2013_263)
8. *Mikics E., Kruk M.R., Haller J.* Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 29 (5): 618–635. 2004.  
[https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00090-8)
9. *Kruk M.R., Halasz J., Meelis W., Haller J.* Fast positive feedback between the adrenocortical stress response and a brain mechanism involved in aggressive behavior. *Behav. Neurosci.* 118 (5): 1062–1070. 2004.  
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.5.1062>
10. *Veenema A.H., Torner L., Blume A., Beiderbeck D.I., Neumann I.D.* Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: Link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Horm. Behav.* 51 (1): 11–19. 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.07.004>
11. *Haller J.* Neurobiological Bases of Abnormal Aggression and Violent Behaviour. Springer, Vienna. 2014.
12. *Landgraf R., Wigger A., Holsboer F., Neumann I.D.* Hyper-reactive hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 11: 405–407. 1999.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00342.x>
13. *Caramaschi D., de Boer S.F., Koolhaas J.M.* Is hyper-aggressiveness associated with physiological hypoarousal? A comparative study on mouse lines selected for high and low aggressiveness. *Physiol. Behav.* 95(4): 591–598. 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.08.019>
14. *Beeman A.E.* The effect of male hormone on aggressive behavior in male mice. *Physiol. Zool.* 20: 373–405. 1947.
15. *Albert D.J., Walsh M.L., Gorzalka B.B., Siemens Y., Louie H.* Testosterone removal in rats results in a decrease in social aggression and a loss of social dominance. *Physiol. Behav.* 36 (3): 401–407. 1986.  
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90305-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90305-7)
16. *Wingfield J.C., Lynn S., Soma K.K.* Avoiding the ‘costs’ of testosterone: ecological bases of hormone–behavior interactions. *Brain. Behav. Evol.* 57 (5): 239–251. 2001.  
<https://doi.org/10.1159/000047243>
17. *Плюснина И.З., Соловьева М.Ю.* Внутривидовая межсамцовая агрессия у ручных и агрессивных серых крыс. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 60(2): 175–183. 2010. [*Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y.* Intraspecific intermale aggression in tame and aggressive Norway rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova.* 60 (2): 175–183. 2010. (In Russ.)].
18. *Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y., Oskina I.N.* Effect of domestication on aggression in gray Norway rats. *Behav. Genet.* 41 (4): 583–592. 2011.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00445-3)
19. *Albert F.W., Schepina O., Winter C., Rompler H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., Kratzsch J., Sohr R., Trut L.N., Thiery J., Morgenstern R., Plyusnina I.Z., Schonenberg T., Paabo S.* Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards human. *Horm. Behav.* 53 (3): 413–421. 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.010>
20. *Toth I. and Neumann I.D.* Animal model of social avoidance and social fear. *Cell and tissue research.* 354(1): 107–118. 2013.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>
21. *Прасолова Л.А., Гербек Ю.Э., Гулевич Р.Г., Шихевич С.Г., Коношенко М.Ю., Кожемякина Р.В., Оськина И.Н., Плюснина И.З.* Эффекты длительного отбора по поведению на стресс-ответ и активность половой системы самцов серых крыс (*Rattus norvegicus*). Генетика. 50 (8): 959–966. 2014. [*Prasolova L.A., Gerbeck Yu.E., Gulevich R. G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z.* The effect of prolonged selection for behavior on the the stress response and activity of reproductive system of male grey rats (*Rattus norvegicus*). *Russian Journal of Genetics,* 50 (8): 846–852. 2014. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S1022795414080031>
22. *Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Herbeck Y.E., Prasolova L.A., Oskina I.N., Plyusnina I.Z.* The influence of social environment in early life on the behavior, stress response, and reproductive system of adult male Norway rats selected for different attitudes to humans. *Physiol. Behav.* 144: 116–123. 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.018>
23. *Naumenko E.V., Popova N.K., Nikulina E.M., Dygalo N.N., Shshkina G.T., Borodin P.M., Markel A.L.* Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33 (1): 85–91. 1989.  
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90434-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90434-6)
24. *Плюснина И.З., Трут Л.Н., Карпушкеева Н.И., Алехина Т.А., Оськина И.Н.* Некоторые поведенческие и физиологические особенности мутации *NONAGOUTI* у серых крыс при отборе на агрессивность. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 53(6): 730–738. 2003. [*Plyusnina I.Z., Trut L.N., Karpushkeeva N.I., Alekhina T.A., Oskina I.N.* Some behavioral and physiological characteristics of Nonagouti mutation in gray rats during breeding for aggressiveness. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova.* 53: 730–738. 2003. (In Russ)].
25. *Оськина И.Н., Гербек Ю.Э., Шихевич С.Г., Плюснина И.З., Гулевич Р.Г.* Изменения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем при отборе животных на доместикационное поведение. Информационный вестник ВОГиС. 12 (1/2): 39–49. 2008. [*Oskina I.N., Herbeck Y.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G.* Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Vestnik VOGiS.* 12 (1/2): 39–49. 2008. (In Russ)].

26. Гербек Ю.Э., Амелькина О.А., Коношенко М.Ю., Шихевич С.Г., Гулевич Р.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З., Оськина И.Н. Влияние неонатального хэндлинга на поведение и стресс-ответ у крыс, селекционируемых по реакции на человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 20 (2): 145–154. 2016. [Herbeck Y.E., Amelkina O.A., Konoshenko M.Y., Shikhevich S.G., Gulevich R.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Effect of neonatal handling on behavior and stress-response in rats selected for reaction towards humans. Russian Journal of genetics: applied research. 7 (1): 71–81. 2017. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18699/VJ16.144>
27. Nehrenberg D.L., Rodriguiz R.M., Cyr M., Zhang X., Lauder J.M., Gariepy J.-L., Wetsel W.C. An anxiety-like phenotype in mice selectively bred for aggression. Behav. Brain. Res. 201 (1): 179–191. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.02.010>
28. Kozhemyakina R.V., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Gulevich R.G. Adolescent oxytocin treatment affects resident behavior in aggressive but not tame adult rats. Physiol. Behav. 224: 113046. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113046>
29. Гулевич Р.Г., Акулов А.Е., Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З. Магнитно-резонансная спектроскопия нейрометаболитов в гиппокампе у агрессивных и ручных самцов крыс. Вавиловский журнал генетики и селекции. 19 (4): 432–438. 2015. [Gulevich R.G., Akulov A.E., Shikhevich S.G., Kozhemyakina R.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of neurometabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats. Russian Journal of genetics: applied research. 6 (4): 430–436. 2016. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18699/VJ15.057>
30. Konoshenko M.Y., Timoshenko T.V., Plyusnina I.Z. c-Fos activation and intermale aggression in rats selected for behavior toward humans. Behav Brain Res 2379: 103–106. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.022>
31. Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. Nature. 470 (7333): 221–226. 2011. <https://doi.org/10.1038/nature09736>
32. Falkner A.L., Lin D. Recent advances in understanding the role of the hypothalamic circuit during aggression. Front Syst. Neurosci. 8: 168. 2014. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00168>
33. Yang C.F., Chiang M.C., Gray D.C., Prabhakaran M., Alvarado M., Juntti S.A., Unger E.K., Wells J.A., Shah N.M. Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. Cell. 153 (4): 896–909. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017>
34. Albert D.J., Walsh M.L., Gorzalka B.B., Mendelson S., Zalys C. Intermale social aggression: suppression by medial preoptic area lesions. Physiol. Behav. 38 (2): 169–173. 1986. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90151-4)
35. Dees W.L., Hiney J.K., Sower S.A., Yu W.H., McCann S.M. Localization of immunoreactive lamprey gonadotropin-releasing hormone in the rat brain. Peptides. 20 (12): 1503–1511. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00162-X)

## INTER-MALE INTERACTIONS ON NEUTRAL TERRITORY AND SUBSEQUENT DYNAMICS OF BLOOD CORTICOSTERONE AND TESTOSTERONE LEVELS IN TAME AND AGGRESSIVE NORWAY RATS (*RATTUS NORVEGICUS*)

R. G. Gulevich<sup>a,#</sup>, S. G. Shikhevich<sup>a</sup>, M. Y. Konoshenko<sup>b</sup>, and R. V. Kozhemyakina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>b</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>#</sup>e-mail: [gulevich@bionet.nsc.ru](mailto:gulevich@bionet.nsc.ru)

Previously, stress responses in Norway rats (*Rattus norvegicus*) selected for the absence or enhancement of aggressive and defensive behaviors toward humans (tame and aggressive behavior, respectively) were studied mainly to nonsocial factors, whereas data on the consequences of social stress induced, in particular, by interactions with conspecifics are scarce. As has already been shown, the above selection of Norway rats causes an attenuation or enhancement of intraspecific inter-male aggression. To find out whether the differences in aggressiveness are accompanied by hormonal changes, we addressed the dynamics of blood corticosterone and testosterone levels after inter-male aggression testing in tame, aggressive, and unselected rats bred in a vivarium for 7–8 generations as a reference. The aim of this work was to investigate the effect of selection toward humans on agonistic interactions under conditions of an unfamiliar cage or neutral territory and on the subsequent dynamics of blood corticosterone and testosterone levels in tame, aggressive, and unselected rats. In our experiments, tame males, as compared to their aggressive or unselected conspecifics, demonstrated a longer attack latency, as well as a shorter duration and smaller number of patterns of aggressive behavior, approximating zero values. When tested on neutral territory, aggressive male rats were inferior to their unselected conspecifics in the total time of confrontations. More pronounced manifestations of aggression in unselected males compared to aggressive or tame animals arose against the background of elevated basal corticosterone levels and enhanced stress responsiveness to interacting with an unfamiliar male. At the same time, reduced aggressiveness of tame rats in the neutral territory test, as compared to unselected or aggressive animals, correlated with the lower testosterone level

**Keywords:** selection, Norway rats, behavior, aggressiveness, corticosterone, testosterone